



**ÇİNKO OKSİT (ZNO) NANOPARTİKÜLLERİNİN
Symphoricarpos albus BİTKİ ÖZÜTÜ
KULLANILARAK YEŞİL SENTEZİ VE
BİYOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

Abdussamed Yasin DEMİR

Doktora Tezi

**Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

2019

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ÇİNKO OKSİT (ZNO) NANOPARTİKÜLLERİNİN *Symphoricarpos
albus* BİTKİ ÖZÜTÜ KULLANILARAK YEŞİL SENTEZİ VE
BİYOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

Abdussamed Yasin DEMİR

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU



**ÇİNKO OKSİT (ZNO) NANOPARTİKÜLLERİNİN *Symphoricarpos albus* BİTKİ ÖZÜTÜ
KULLANILARAK YEŞİL SENTEZİ VE BİYOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Abdussamed Yasin DEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma, 17/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Furkan ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **27.06/2019** tarih ve **26/.../...88** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

ÇİNKO OKSİT (ZNO) NANOPARTİKÜLLERİNİN *Symphoricarpos albus* BİTKİ ÖZÜTÜ KULLANILARAK YEŞİL SENTEZİ VE BİYOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

Abdussamed Yasin DEMİR

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

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, *Symphoricarpos albus* bitkisi kullanılarak ZnO nanopartiküllerinin daha güvenli, çevreci, ekonomik ve kontrollü üretimine olanak sağlayan yeşil sentez yöntemi ile üretilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla bitkinin meyvelerinden su özütü elde edilmiş ve çinko nitrat öncüsü ile reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyondan elde edilen ürünün karakterizasyonu SEM ve EDAX analizleri ile yapılmıştır. Ayrıca sentezlenen ürünün biyoyumluluğu Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2, Maya delesyon, RAPD ve MTT test sistemleri kullanılarak araştırılmıştır. SEM incelemelerinden elde edilen bulgular sentez reaksiyonu sonucunda ortalama 30 nm çapında küresel nanopartiküllerin sentezlendiğini göstermiştir. EDAX bulguları da bu nanopartiküllerin Zn ve O elementlerinden oluştuğunu doğrulamıştır. Öte yandan biyoyumluluk testlerinin bulgularına göre sentezlenen nanopartikülün MTT hariç test sistemlerinin hiçbirinde 640 µg/ml konsantrasyona kadar toksik ve genotoksik etki göstermediği buna karşın MTT test sisteminde HDFa hücre hattı üzerine doza bağlı olarak artan sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Buna göre, çalışmamızın bulguları göz önünde bulundurularak *S. albus* meyvelerinin sulu özütünün ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentezi için kullanılabileceği, elde edilen ürünlerin biyoyumluluk testlerinin çoğunluğunu geçebilecek nitelikte olduğu buna karşın MTT sonuçları da hesaba katıldığında endüstriyel ölçekli üretime geçilmeden önce daha kapsamlı biyoyumluluk testlerinin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

2019, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çinko Oksit, Genotoksisite, Nanopartikül, Toksisite, Yeşil Sentez

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GREEN SYNTHESIS OF ZINC OXIDE (ZNO) NANOPARTICLES USING *Symphoricarpos albus* PLANT EXTRACT AND INVESTIGATION OF BIOCOMPATIBILITY

Abdussamed Yasin DEMİR

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

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In this study, the potential of producing ZnO nanoparticles via green synthesis method which enables safer, environmentally, economical and controlled production by using *Symphoricarpos albus* plant was investigated. For this purpose, aqueous extract was obtained from the fruits of the plant and reacted with zinc nitrate precursor. Characterization of the synthesized product was carried out by SEM and EDAX analyzes. In addition, the biocompatibility of the product was also investigated by using Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2, Yeast DEL, RAPD and MTT test systems. The results obtained from SEM studies showed that spherical nanoparticles with an average diameter of 30 nm were synthesized as a result of the reaction. EDAX findings confirm that these nanoparticles are composed of Zn and O elements. On the other hand, according to the findings of biocompatibility tests, nanoparticle synthesized showed no toxic and genotoxic effect up to 640 µg/ml concentration in any of the test systems except MTT. Accordingly, considering the findings of our study, it was concluded that the aqueous extract of *S. albus* fruits could be used for the green synthesis of ZnO nanoparticles, that the products obtained could exceed the majority of the biocompatibility tests, but when MTT results are taken into consideration, it is concluded that more comprehensive biocompatibility tests should be performed before industrial scale production.

2019, 122 pages

Keywords: Genotoxicity, Green Synthesis, Nanoparticles, Toxicity, Zinc Oxide

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, çok değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye gönülden teşekkür ederim.

Çalışmalarımın ilgili kısımlarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alı TAGHIZADEHGHAEHJOUGHİ'na ve Sayın Kimyager Fatma YEŞİLYURT'a teşekkür ederim. Çalışma sürecimde göstermiş olduğu anlayışından dolayı Sayın Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a teşekkür ederim. Çalışmalarımın farklı aşamalarında yanımda olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burak ALAYLAR'a, Sayın Uzm. Biyolog Selma SEZEN'e, Sayın Uzm. Kimyager Mine İSAOĞLU'na, Sayın Uzm. Biyolog Taha Yasin KOÇ'a, Sayın Uzm. Biyolog Selin DOĞAN'a, Sayın Uzm. Biyolog Güller ÖZKAN'a ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarı ekibine gönülden teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Hikmet DEMİR'e, annem Döndü DEMİR'e, kardeşlerim Sevdnur YUMAK ve Feyzanur DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Abdussamed Yasin DEMİR

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Nanobiyoteknoloji.....	5
2.2. Nanopartiküller.....	8
2.3. Moleküler Tanı ve Teşhisde Nanobiyoteknolojinin Rolü	10
2.3.1. Moleküler teşhis için nanopartiküller.....	11
2.3.2. Biyoetiketler olarak nanopartiküller.....	12
2.3.3. Paramanyetik ve süperparamanyetik nanopartiküller	12
2.3.4. Biyobelirteçlerin keşfedilmesinde nanobiyoteknolojinin rolü	13
2.3.5. Nanobiyoteknoloji ve sitogenetik.....	14
2.4. Nanobiyoteknolojinin Farmasötik Uygulamaları	15
2.4.1. İlaç keşfi ve geliştirilmesinde nanobiyoteknolojinin rolü	15
2.4.2. Nanobiyoteknolojiye dayalı ilaç taşınımı.....	16
2.4.3. Nanobiyoteknoloji ve ilaç dağıtım cihazları	17
2.5. Biyolojik Tedavilerde Nanobiyoteknolojinin Rolü.....	18
2.5.1. Hücre tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü	18
2.5.2. Gen tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü	19
2.5.3. Aşılarında nanobiyoteknolojinin rolü.....	21
2.5.4. Antisens tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü	22
2.6. Klinik Nanotıp	23
2.7. Nanoonkoloji.....	24
2.7.1. Kanserde nanoteknoloji bazlı ilaç teslimatı.....	24
2.7.2. Kanserde tanı ve tedavi kombinasyonu	25

2.8. Nanonöroloji.....	27
2.8.1. Nörolojik bozuklukların tanısında nanobiyoteknolojinin rolü	27
2.8.2. Beyine nanopartikül bazlı ilaç verilmesi	29
2.8.3. Nörokoruma için nanopartiküller	29
2.9. Nanokardiyoloji.....	30
2.9.1. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ile teşhisi birleştirmek.....	30
2.9.2. Kardiyovasküler hastalıklarda hedefe yönelik ilaç taşınımı.....	31
2.9.3. Restenoz tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü	32
2.9.4. Doku mühendisliği ve kardiyovasküler sistemin rejenerasyonu	32
2.10. Nanocerrahi	33
2.11. Nanorobotik.....	33
2.12. Kişiselleştirilmiş Tıbbın Gelişmesinde Nanobiyoteknolojinin Rolü.....	34
2.13. Nanopartiküllerin Güvenlik Sorunları.....	35
2.13.1. İnsan vücudunda nanopartiküllerin akıbeti	35
2.13.2. Nanopartiküllerin insan sağlığına etkisi	36
2.13.3. Nanopartiküllerin toksisite sorunlarını çözme önlemleri	37
2.14. Nanobiyoteknolojinin Gelecek Beklentileri	37
2.15. Nanopartikül Sentez Yöntemleri	38
2.16. Biyosentez Sonrası Güvenlik Testleri	42
2.16.1. Ames/Salmonella test sistemi.....	42
2.16.2. <i>Escherichia coli</i> WP2 test sistemi	44
2.16.3. Maya delesyon testi (Yeast DEL Assay).....	44
2.16.4. RAPD	45
2.16.5. MTT.....	46
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1. Materyal.....	48
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin temini	48
3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattının temini	48
3.1.3. Çalışmada kullanılan mutant organizmalar	48
3.1.4. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler	49
3.1.5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri.....	49
3.1.6. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	49

3.1.7. Çözeltiler ve besiyerleri.....	50
3.2. Yöntem	65
3.2.1. Biyosentez çalışmaları.....	65
3.2.1.a. <i>Symphoricarpos albus</i> bitki ekstraktının eldesi	65
3.2.1.b. Biyosentez işleminin gerçekleştirilmesi	65
3.2.1.c. Elde edilen ürünlerin saflaştırılması	65
3.2.1.d. Elde edilen ürünlerin karakterizasyonu	65
3.2.2. Mutajenite çalışmaları	66
3.2.2.a. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü	66
3.2.2.b. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi	69
3.2.2.c. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi	70
3.2.2.d. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması	72
3.2.2.e. Mutajenite	73
3.2.2.f. Sonuçların değerlendirilmesi	74
3.2.3. RAPD çalışmaları.....	75
3.2.3.a. Nanopartiküllerin bitkiye uygulanması	75
3.2.3.b. DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi.....	75
3.2.3.c. RAPD primerleri.....	76
3.2.3.d. PCR protokolü.....	77
3.2.3.e. Agaroz jel elektroforezi	78
3.2.3.f. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (%GTS) belirlenmesi	78
3.2.4. Hücre kültürü çalışmaları	79
3.2.4.a. Hücrelerin çözünmesi ve ekiminin yapılması	79
3.2.4.b. Hücrelerin pasajlanması	79
3.2.4.c. Hücre sayılarının hesaplanması	80
3.2.4.d. ZnO nanopartiküllerinin hücrelere uygulanması.....	80
3.2.5. MTT çalışmaları	80
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	81
4.1. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	81
4.2. Mutajenite Çalışmaları	82

4.2.1. Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü.....	82
4.2.1.a. Histidin/biyotin gereksinimi	82
4.2.1.b. Triptofan gereksinimi	84
4.2.1.c. <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonları	84
4.2.1.d. <i>rfa</i> mutasyonu.....	86
4.2.1.e. Histidin gereksinimi	88
4.2.1.f. Lösin gereksinimi.....	88
4.2.1.g. Adenin gereksinimi	89
4.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi	89
4.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsatrasyonlarının belirlenmesi	90
4.2.4. ZnO nanopartiküllerinin mutajenik özellikleri.....	90
4.3. RAPD Çalışmaları.....	95
4.3.1. RAPD sonuçlarının değeriendirilmesi.....	95
4.3.2. RAPD jel görüntüsü	95
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	96
4.4.1. Hücre canlılık sonuçları.....	96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	98
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	123

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece (Sıcaklık)
9-AA	9-Aminoakridin
Å	Angstrom
Ag	Gümüş
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AlO	Alüminyum Oksit
Au	Altın
CdS	Kadmiyum Sülfid
CO ₂	Karbon Dioksit
EDAX	Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskopisi
eV	Elektron volt
Fe	Demir
FTIR	Spectroscopy Fourier Transform Infrared
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
meV	Milielektron volt
ml	Mililitre (10 ⁻³)
mM	Mili Molar
MNNG	<i>N</i> -Metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaN ₃	sodyum azid
nm	Nanometre (10 ⁻⁹)
ROS	Reaktif Oksijen türleri

SEM	Scanning Electron Microscopy
SiO	Silisyum Oksit
SPR	Surface Plasmon Resonance
TiO ₂	Titanyum Dioksit
TTM	Taramalı Tünel Mikroskobu
UV	Ultra Violet
X-ray	X-ışınları
Zn(NO ₃) ₂	Çinko Nitrat
ZnO	Çinko Oksit
μ	Mikron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanoteknolojinin ilişkili olduğu alanlar	8
Şekil 4.1. ZnO nanopartikülüne ait SEM görüntüsü.....	81
Şekil 4.2. ZnO nanopartikülüne ait EDAX görüntüsü.....	82
Şekil 4.3. <i>S. typhimurium</i> TA1535 suşunda üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi.....	83
Şekil 4.4. <i>S. typhimurium</i> TA1537 suşunda üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi.....	83
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> WP2uvrA suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi.....	84
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> WP2 test suşunun <i>uvrA</i> mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi	85
Şekil 4.7. <i>S. typhimurium</i> TA1535 test suşunun <i>uvrB</i> mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	85
Şekil 4.8. <i>S. typhimurium</i> TA1537 test suşunun <i>uvrB</i> mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	86
Şekil 4.9. <i>S. typhimurium</i> TA1535 suşunda <i>rfa</i> mutasyonunun gösterilmesi.....	87
Şekil 4.10. <i>S. typhimurium</i> TA1537 suşunda <i>rfa</i> mutasyonunun gösterilmesi.....	87
Şekil 4.11. <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda histidin, lösin, adenin gereksiniminin gösterilmesi	88
Şekil 4.12. ZnO nanopartiküllerin bakteriyel mutajenite test sonuçları	92
Şekil 4.13. ZnO nanopartiküllerinin maya delesyon mutajenite testi sonuçları	94
Şekil 4.14. OPW-7 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	96
Şekil 4.15. 24 saat süreli ZnO uygulaması yapılan HDFa hücrelerine ait hücre canlılığı analizi sonuçları	97
Şekil 4.16. 72 saat süreli ZnO uygulaması yapılan HDFa hücrelerine ait hücre canlılığı analizi sonuçları	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanoölçekte çeşitli nesnelerin boyutları.....	5
Çizelge 2.2. Temel nanobiyoteknolojilerin sınıflandırılması	6
Çizelge 2.3. Nanopartiküller	9
Çizelge 2.4. Moleküler tanılamada nanoteknoloji uygulamaları	10
Çizelge 2.5. Klinik nanotıbbın uygulama alanları	23
Çizelge 2.6. Kanserde hedefe yönelik ilaçlar için nanobiyoteknoloji yaklaşımları.....	24
Çizelge 3.1. RAPD primerleri.....	77
Çizelge 3.2. PCR işleminin sonunda örnekler 4°C’de muhafaza edilmiştir.	78
Çizelge 4.1. Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları	89
Çizelge 4.2. Test suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayıları	89
Çizelge 4.3. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları.....	90
Çizelge 4.4. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları.....	91
Çizelge 4.5. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları.....	91
Çizelge 4.6. ZnO nanopartiküllerinin bakteriyel mutajenite testi sonuçları	92
Çizelge 4.7. ZnO nanopartiküllerinin kromozom içi kırılma mutajenite testi sayım sonuçları.....	93
Çizelge 4.8. ZnO nanopartiküllerinin kromozomlar arası mutajenite testi sayım sonuçları	93
Çizelge 4.9. ZnO nanopartiküllerinin maya delesyon mutajenite testi sonuçları	94
Çizelge 4.10. Genomik kalıp sabitliliği	95

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji ortaya çıktığı tarihten bu yana pek çok alanda olduğu gibi sağlık ve çevreyle ilgili alanlarda iyileştirme konusunda devrim yaratmıştır. Bununla birlikte nanoteknolojide oldukça önemli bir yere sahip olan nanomateriyallerin toplu üretimleri, kullanımları ve bertaraf edilmeleri çevre için tehdit oluşturmaktadır. Çevrenin bu nanopartiküllere maruz kalmasıyla birlikte toksisite değerlendirmeleri önemli bir sorun haline gelmiştir.

Sentezlenmiş nanomalzemelerin “Çevre Sağlığı ve Güvenliği” ile ilgili araştırmaların geliştirilmesindeki itici güçlerden biri, ultra ince parçacıkların insan sağlığı için önemli tehditler teşkil ettiğini gösteren çalışmalar olmuştur. 1990’ların sonlarında ve 2000’lerin başında gerçekleştirilen bir dizi çalışma, özellikle 100 nm’den daha küçük olan parçacıkların solunmasının tehlikeli olduğunu öne sürmüştür. Gerçekleştirilen bu öncü çalışmalarda (Oberdörster *et al.* 1995; Donaldson *et al.* 1998), çok küçük partiküllerin daha büyük partiküllerinden farklı spesifik özelliklere sahip olduğunu ve bazı durumlarda daha büyük bir toksisiteye sebep olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra yapılan çalışmalar, nanopartiküllere *in vitro* yöntemlerle maruz kalmanın hücre hatlarında oksidatif strese yol açtığını ortaya koymuştur (Li *et al.* 2003). Benzer şekilde, gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalar nanopartiküllere maruz kalmanın solunum fonksiyonlarının azalmasına yol açtığını göstermiştir (Peters *et al.* 1997). Yukarıda belirtilen bulgular ışığında ve tasarlanmış nanomalzemeler ve ultra ince parçacıklar arasındaki benzer boyut aralığı göz önüne alındığında, hava kalitesi alanında çalışan bilim insanları nanopartiküllerin benzer şekilde olumsuz biyolojik özellikler ortaya çıkarma potansiyelini değerlendirmeye başlamışlardır (Li *et al.* 2016).

Çevre Sağlığı ve Güvenliği ile ilgili çalışmalara katkıda bulunan bir diğer itici güç ise nanoteknoloji ve nanopartiküllerin çeşitli uygulama alanlarındaki artan kullanımları olmuştur. Bu büyüme, nanopartiküllerin yarı iletken cihazlara, tıbbi tedavilere, kimyasal ve fiziksel süreçlere dahil edilmesiyle desteklenmiştir. Her yıl üretilen yeni

nanopartiküllerin sayısındaki hızlı artışın yanı sıra nanopartiküllerin ticari uygulamalarındaki bu büyüme güvenlik endişelerini ortaya çıkarmıştır (Franco 2018).

Çevre Sağlığı ve Güvenliği ile ilgili ilk çalışmalara ve endişelere dayanarak, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki birkaç federal kurum 2000'lerin başında nanopartiküllerin çevresel uygulamaları ve etkileri ile ilgili araştırmaları desteklemek için fon ayırmaya başlamışlardır. ABD federal hükümet kurumları tarafından başlatılan bu araştırma girişimleri, 2004-2007 yılları arasında Çevre Sağlığı ve Güvenliği araştırmalarında kilometre taşları olan ve belirleyici ilkeler geliştirmeye odaklanan birkaç seminal çalışma ve raporun yayınlanması ile sonuçlanmıştır. Donaldson *et al.* 2004 gerçekleştirdikleri bir çalışmada nanopartiküllerin yeterli toksisite ve risk değerlendirmesinin gerekliliğinin önemini vurgulamış ve hakemli bir dergide ilk kez “nanotoksikoloji” terimini kullanmıştır. Bu gelişme, nanotoksikoloji teriminin tanımlanabilir bir alan olarak ortaya çıkmasına yol açmıştır (Oberdörster *et al.* 2005; Santamaria 2012).

Nanotıp, yeni araştırma ve geliştirme alanları yaratan genişleyen bir alandır. Son yıllardaki çalışmaların ve araştırmaların çoğu nanopartiküllerin görüntüleme, ilaç dağıtımı ve antimikrobiyal aktiviteler gibi alanlarda uygulanmasına odaklanmıştır. Bu sebepten dolayı, nano boyutlu malzemelerin geliştirilmesi ve uygulanmasındaki hızlı büyümenin biyolojik sistemler üzerindeki potansiyel olumsuz etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu değerlendirmeler, nanomalzemelerin insan vücudunda güvenli bir şekilde kullanımı için oldukça önemlidir (Bach 2015).

Nanotıp alanı geliştikçe, nanomalzemelerin ayrıntılı karakterizasyonuna olan ihtiyaç belirgin hale gelmiştir. Nanopartiküller, benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları ile karakterize edilir ve 1-100 nm boyutunda materyaller olarak tanımlanır. Nanokompozitlerin parçacık büyüklüğü, morfolojisi, kümelenme eğilimleri ve yüzey yükü bilgisi, toksikolojileri hakkındaki bilgilere katkı sağlamaları açısından oldukça önemlidir (Singh 2015).

Metal iyonlarını serbest bırakabilen metal ve metal oksit bazlı nanopartiküller için sorulması gereken asıl önemli soru, toksisitenin başlı başına partikül tarafından mı yoksa serbest bırakılan iyonlar aracılığıyla mı meydana gelmiştir. Nanopartiküller farklı amaçlar için hücrelere dağıtım yapmak amacıyla taşıyıcı yapılar olarak işlev görebilir. Bazen “truva atı mekanizması” olarak adlandırılan bu tür taşıma mekanizmaları nanotıp için faydalı olabilir (Bach 2015).

Nanopartiküllerin hücrelere erişebilmesi ve biyokimyasal fonksiyonları etkileyebilmesi, onları moleküler düzeyde önemli araçlar haline getirmektedir. Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ileri analizleri; büyüklükleri, şekilleri, bileşimleri, kristallenmeleri, morfolojileri, kinetikleri ve kümelenme reaktiviteleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymada temel olmaya devam edecektir. Nanotoksosite konusundaki mevcut araştırmalar, nanopartikül özellikleri arasındaki ilişkiye daha az önem verilerek çeşitli nanopartiküllerin toksisitesinin ampirik değerlendirmesine odaklanmıştır (Singh 2015). Ayrıca, bu alanda yapılan çalışmalar nanopartikül translokasyon yollarını, kısa ve uzun süreli toksisiteyi, hücrelerle etkileşimleri, sinyal yollarını, sitotoksosite ve etkili fagositoz için yüzey modifikasyonunu kapsamalıdır. Takip edilecek diğer önemli araştırma konuları arasında nanopartiküllerin takibi, yüzey modifikasyonu ve ortamdaki maddelerle ve organizma içindeki biyomoleküller ve diğer kimyasal maddelerle etkileşime girdikten sonra kümelenme durumundaki değişiklikler yer alır (Bach 2015).

Nanopartikül kaynaklı toksisitenin değerlendirilmesine yönelik gelecekteki çalışmalar için şu hususlar göz önünde bulundurulmalıdır. İlk olarak, nanopartiküller ana atomlarına veya iyonlarına kıyasla farklı fizikokimyasal özellikler sergilediklerinden muhtemelen nanopartiküllerin benzersiz yollardan sitotoksositeye neden olabilecek hücreler/dokular ile etkileşime girmesi olasıdır (Singh 2015). İkinci olarak, nanopartikül kaynaklı sitotoksosite ile ilgili sayısız araştırma yayınlanmıştır. Fakat bu çalışmaların çoğunda, her araştırma grubu için bağımsız deneysel yöntemler kullanmıştır. Bu, özellikle nanopartiküllerin hazırlanması, kaplanması ve dağıtılması ile ilgili prosedürlerde geçerlidir. Bu nedenle, farklı laboratuvarlarda yapılan çalışmalar arasındaki verilerin karşılaştırılması sağlıklı sonuçlar veremeyebilir. Nanopartikül toksisite çalışmaları ile

ilgili deneysel prosedürleri standartlaştırmak bu alandaki ilerleme için oldukça önemlidir (Bach 2015).

Nanopartiküllerin artan kullanımları göz önüne alındığında, toksikolojik tarama yaklaşımları; nanopartikül özellikleri ve yaşam döngüsünün tüm aşamalarında maruz kalma potansiyeline dayanan iyi karakterize edilmiş bir nanopartikül modeli, nanopartikül biyokinetiği hakkında yeterli bilgi, *in vivo* maruziyeti izleyen sonuçların öngörücü olduğu *in vitro* modeller ve *in vitro* sonuçların uygun kıyaslama yoluyla nanopartiküllere özgü olduğuna dair kanıtları içermelidir.

Bu amaç doğrultusunda benzer ilkeler çerçevesinde kurgulanan bu doktora tez çalışmasında, nanobiyoteknoloji araştırmalarında oldukça önemli bir yere sahip olan çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin *Symphoricarpos albus* bitkisinin sulu ekstraktı kullanılarak daha güvenli, çevreci, ekonomik ve kontrollü üretimine olanak sağlayan yeşil sentez yöntemi ile üretilme potansiyelinin araştırılması ve elde edilecek olan biyosentetik nanopartiküllerin SEM (taramalı elektron mikroskopisi) ve EDAX (enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi) analitik yöntemleriyle karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, son yıllarda artan endüstriyel kullanım alanlarından dolayı ZnO nanopartiküllerin insan ve çevre ile doğrudan etkileşime girebilme potansiyelleri göz önünde bulundurulduğunda bu nanopartiküllerin kapsamlı sitotoksikite ve genotoksikite değerlendirmelerinin yapılması bir zorunluluk haline gelmektedir. Bu doğrultuda, elde edilen nanopartiküllerin Ames/Salmonella ve E. coli WP2 test sistemi kullanarak prokaryotik organizmalar üzerindeki mutajenik ve antimutajenik etkilerinin araştırılması, Yeast DEL assay test sistemi kullanarak ökaryotik organizmalar üzerindeki mutajenik ve antimutajenik etkilerinin araştırılması, MTT hücre canlılık testi kullanarak fibroblast hücre hattı (HDFa, ATCC® PCS-201-012™) üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması ve RAPD yöntemi kullanarak bitkiler üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji, nanometre uzunluk ölçeğindeki maddenin atomlar, moleküller ve supramoleküler yapılar düzeyinde kontrolü yoluyla materyallerin, cihazların ve sistemlerin tasarlanması ve kullanılmasıdır. Ulusal Nanoteknoloji Girişimi tarafından tanımlandığı gibi nanoteknoloji; nanoboyutta kazanılan benzersiz özelliklerin yeni uygulamalara olanak tanıdığı, maddenin yaklaşık 1-100 nm boyutlarında anlaşılması ve kontrol edilmesidir. Nanoölçekli bilim, mühendislik ve teknolojiyi kapsayan nanoteknoloji, bu boyutlardaki maddede görüntüleme, ölçme, modelleme ve manipülasyonu içerir (Algar *et al.* 2010; Baalousha *et al.* 2014). Nanoteknoloji nanometre cinsinden ölçülen en az bir karakteristik boyutu olan fonksiyonel yapıların inşası ve kullanımı için popüler bir terimdir. Bu uzunluk, kabaca tek bir atomun çapının 4 katıdır ve iki ayrı atom arasındaki bağ 0.15 nm uzunluğundadır. Proteinlerin büyüklüğü 1-20 nm'dir. Nano ölçekte çeşitli nesnelerin boyutları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Jain 2011; Blom and Brismar 2014).

Çizelge 2.1. Nanoölçekte çeşitli nesnelerin boyutları (Jain 2011)

Nesne	Boyut
Saç genişliği	50 000 nm
Kırmızı kan hücresi	2500 nm
Bir hücrede vezikül	200 nm
Bakteri	1000 nm
Virüs	100 nm
Eksozomlar	65-100 nm
DNA genişliği	2.5 nm
Ribozom	2-4 nm
İnsan genomunda bir baz çifti	0.4 nm
Proteinler	1-20 nm
Amino asit	1.2 nm
Aspirin molekülü	1 nm
Bireysel bir atom	0.25 nm

Doğa, canlı organizmalardaki tüm süreçler için karmaşık, verimli, kendi kendine organize olan ve kendi kendini düzenleyen moleküler makineler ve sistemler oluşturur. Doğa milyarlarca yıldır DNA, proteinler, membranlar gibi çok hassas ve işlevsel nanoyapılara sahiptir (Cardinale *et al.* 2012; Bonaccorso *et al.* 2015). Ancak insanların istedikleri gibi bu hassas sentetik nanoyapıları üretebilmeleri 1980'lerden bu yana mümkün olmuştur. Nanoyapılar, uzayda tam olarak tanımlanmış binlerce atomdan yapılır. Sınırsız sayıda kompozisyona, boyuta, şekle ve en önemlisi işlevselliğe sahiptirler. Çeşitli nanobiyoteknolojik ürünlerin sınıflandırılması Çizelge 2.2'de gösterilmektedir (Jain 2011).

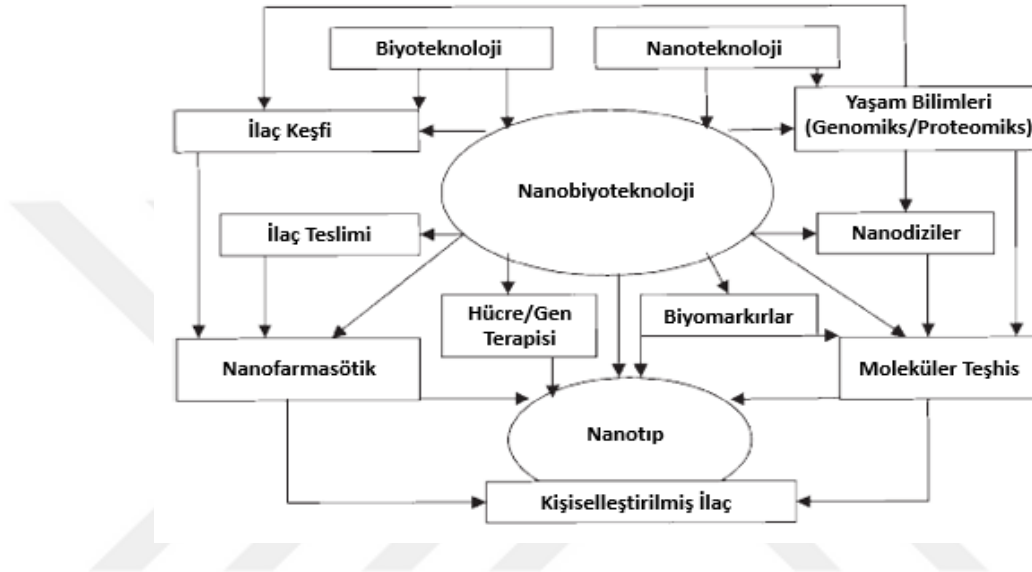
Çizelge 2.2. Temel nanobiyoteknolojilerin sınıflandırılması (Jain 2011)

Nanopartiküller
Kuantum noktaları
Nanokristaller
Lipopartiküller
Manyetik nanopartiküller
Polimer nanopartiküller
Nanolifler
Nanoteller
Karbon nanolifler
Dendrimerler
Polipropilenimin dendrimerleri
Bileşik nanoyapılar
Kokleatlar
Diğer maddeleri saran nanokapsüller
Nanoemülsiyonlar
Nanolipozomlar
Nanokabuklar
Nanoveziküller
Nanokanallar
Nanoporlar
Nanoakışkanlar
Nanoyapılı silikonlar
Nanoölçekli hareketler
Konsollar
Nanoölçekte görselleştirme ve manipülasyon
Atomik kuvvet mikroskopisi
Tarama probu mikroskopisi
Nanomanipülasyon
Yüzey plazmon rezonansı
Femtosaniye lazer sistemleri

Nanobiyoteknoloji, yapı ve fonksiyonun ötesinde nanoölçekte görselleştirme ve manipülasyona kadar uzanır. En temel haliyle, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), yüzey üzerindeki konturları hissetmek için numune boyunca bir probu tam olarak tarayarak topografya görüntüler. İğne ile yüzey arasındaki etkileşim ölçülür ve bu şekilde toplanan verilerden bir görüntü oluşturulur. AFM'deki temel teknoloji olan uçlar (cantilever), nanometre ölçeğinde kimyasal bir reaksiyonu mekanik bir harekete dönüştürür. Bir cantilever'in ölçüleri mikrometre ölçeğindedir ancak sapmalar nanometre cinsindendir. AFM uçlarındaki bu hareket, uç yüzeyinden bir ışın yönlendirilerek doğrudan ölçülebilir. AFM ile son derece yüksek bir çözünürlüğe ulaşmak mümkündür. AFM, üstün çözünürlüğü ve rutin üç boyutlu ölçüm kabiliyetine ek olarak, geleneksel mikroskopi tekniklerine kıyasla diğer birçok açık avantajlar sunar. Örneğin, taramalı ve transmisyon elektron mikroskopisi (SEM ve TEM) biyolojik olarak aktif olmayan, dehidrate edilmiş numuneleri görüntüler ve genellikle boyama veya metal kaplama gibi kapsamlı bir numune hazırlama süreci gerektirir. AFM, bu gereklilikleri ortadan kaldırır ve çoğu durumda numunelerin ve devam eden işlemlerin doğal şartları altında doğrudan gözlemlenmesini sağlar. Belirtilen benzersizliklere ek olarak AFM doğrudan nano ölçekli etkileşimli kuvvetleri, örneğin ligand-reseptör bağlanmalarını ölçebilir. Bahsedilen görüntüleme tekniklerinin yanı sıra nanobiyoteknolojide uygulama için birçok başka mikroskop sistemi geliştirilmiştir (Chatterjee *et al.* 2008; Jain 2011).

Akademik merkezlerde ve ticari sektörde çeşitli nanobiyoteknoloji ve nanoyapılar geliştirilmektedir (Jain 2010a; Cotte *et al.* 2011). Medikal araştırma ve teşhis konularında halen araştırılmakta olan çeşitli nanomakineler ve diğer nanoyapıların tıp pratiğindeki uygulamaları başlamıştır. Nanobiyoteknoloji, insan hastalıklarının özellikle de immun bozukluklarının modellerini oluşturmak ve incelemek için kullanılmaktadır (Degen *et al.* 2009; Miller *et al.* 2016). Nanobiyoteknolojinin tıp alanındaki uygulamaları nanotıp olarak adlandırılır (Jain 2010b). Geniş bir terim olarak nanotıp, nanobiyoteknolojinin moleküler tanılardaki uygulamalarını da kapsar ve bu aynı zamanda nanoteşhis olarak da adlandırılır. Nanobiyoteknolojinin ilaç endüstrisindeki hedefe yönelik ilaçların geliştirilmesi uygulamaları ise nanobiyofarmasötikler olarak adlandırılabilir (Dosev *et al.* 2008; Dong *et al.* 2016). Nano ön eki, kanserde nano biyoteknolojinin uygulanması için

nanoonkoloji ve nörolojik bozukluklara yönelik uygulamaları belirtmek için nanonöroloji gibi tıpta çeşitli terapötik alanlara uygulanmıştır (Fantner *et al.* 2009; Dragavon *et al.* 2012). Nanobiyoteknolojinin sağlık hizmetleri ve ilgili teknolojilerle ilişkisi Şekil 2.1’de grafiksel olarak gösterilmiştir (Jain 2011).



Şekil 2.1. Nanoteknolojinin ilişkili olduğu alanlar (Jain 2011)

2.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller her biri on ila binlerce atom içeren farklı malzemelerden oluşan ve kuantum aleminde bulunan nanomalzemelerdir. Bu boyutlarda her parçacık, boyutuna bağlı olarak değişen yeni özelliklere sahiptir (Grotjohann *et al.* 2012; Gupta *et al.* 2013). Nanoboyuta inildikçe maddelerin, elektronik ve diğer pek çok özelliklerinde farklılıklar ortaya çıkar. Nanopartiküller, materyal özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilen ve bu nedenle yalnızca küçük hacimli parçalar olarak kabul edilemeyen olağandışı yapısal farklı formları içerebilir (Hall *et al.* 2010; Hoskins *et al.* 2012). Her ikisi de saf altından yapılan iki nanopartikül, biri diğerinden daha büyükse farklı erime sıcaklığı, farklı elektrik iletkenliği ve renk farklılığı gibi belirgin davranış sergileyebilir. Nanopartiküllere dayalı geliştirilen teknolojilerin temelinde, malzemenin daha küçük boyutlara indirgendiğinde daha fazla yüzey alanı ve farklı özelliklerin ortaya çıkması avantajından yararlanılmaktadır (Karami and Hamidi 2016; Jain *et al.* 2017). Manyetik nanopartiküller

için, lekelerin olmaması parçacıkların büyüklüğü göz önüne alındığında oldukça kuvvetli manyetik alanlar üretir. Nanopartiküller de o kadar küçüktür ki, çoğunda atomlar tek bir leke olmadan mükemmel kristallerde sıralanırlar (Koltonow and Huang 2016). Çizelge 2.3’de seçilmiş nanopartiküller uygulamaları ile birlikte listelenmiştir (Jain 2011).

Çizelge 2.3. Nanopartiküller

Yapı	Boyut	Uygulamalar
Karbon manyetik nanopartiküller	40–50 nm	İlaç teslimi ve hedef hücre imhası
Seramik nanopartiküller	~35 nm	Sadece tümör dokusunda birikir ve ilacın serbest bırakılmadan Fotodinamik tedavi için hassaslaştırıcı görevi görmesine izin verir
Dendrimerler	1–20 nm	DNA gibi terapötik maddeleri oyuklarında tutmak
Altın nanopartiküller	2–4 nm	Harici olarak kontrol edilen ilaç salımını etkinleştir
Misel / nanohap	25–200 nm	İki polimer molekülünden yapılmıştır - biri su itici ve diğer hidrofobik - hücre içindeki belirli yapılara ilaç verebilen "misel" adı verilen bir küreye kendi kendine monte olan
Düşük yoğunluklu lipoproteinler	20–25 nm	Lipid çekirdeğinde çözünen veya yüzeye tutturulmuş ilaçlar
Nanoemülsiyonlar	20–25 nm	Emilimi artırmak için yağ ve / veya sıvı fazlarda bulunan ilaçlar
Nanolipozomlar	25–50 nm	Suda çözünmeyen ve büyük moleküllere sahip olma eğiliminde olan ilaçları vermek için fullerenler içerir
Nanopartikül bileşikleri	~40 nm	Hedeflenen ilaç iletimi için monoklonal antikorlar gibi kılavuz moleküllere bağlanır
Nanoküreler	50–500 nm	Ultrason tarafından oluşturulan oyuk seramik nanoküreler
Nanoyapılı organojeller	~50 nm	Zeytinyağı ve sıvı çözücüler karışımı ve bir şekeri kimyasal olarak Aktive etmek için basit bir enzim eklemek; ilaçları kapsüllemek
Nanotüpler (Tek duvar)	1–2nm	Küçük içme pipetlerine benzeyen ve bazı uygulamalar için küresel
Nanotüpler (Çok duvarlı)	20–60 nm	Nanopartiküllere göre avantajlar sunabilir
Nanoveziküller	25–100 nm	Lipidlerde ilaç içeren iki tabakalı küreler
Polimer nanokapsüller	50–200 nm	Çevreleyen ilaçlar
Kuantum noktaları	2–10 nm	Terapötikler ile görüntülemeyi birleştirmek
Süperparamanyetik demir-oksit nanopartikülleri	10–100 nm	İntravenöz enjeksiyonlar için ilaç taşıyıcılar olarak retiküloendotelial sistemi atlatmanın yanı sıra vücut dokularındaki çok küçük kılcal damarlara nüfuz eder ve böylece belirli dokularda etkili dağılımı sunar

2.3. Moleküler Tanı ve Teşhisde Nanobiyoteknolojinin Rolü

Nanomoleküler tanı, nanobiyoteknolojinin moleküler tanılamadaki kullanımıdır ve kısaca nanotanılama olarak adlandırılabilir. Çok sayıda nanocihaz ve nanosistem DNA'nın dizi analizlerini gerçekleştirmek için kullanılabilir (Almutairi *et al.* 2009; Alam *et al.* 2012). Reseptörlerin, gözeneklerin ve canlı hücrelerin diğer fonksiyonel bileşenlerinin içsel nanoölçeği göz önüne alındığında bu bileşenlerin ayrıntılı bir şekilde izlenmesi ve analiz edilmesi yeni bir nano ölçekli prob sınıfının geliştirilmesiyle mümkün olacaktır (Breitenstein 2010; Avcı *et al.* 2015). Tanı veya teşhis koymada etken olan maddelerin varlığını veya aktivitesini ölçen biyolojik testler, nanoölçekli parçacıklar işaretleme aracı olarak kullanıldığında daha hızlı, daha hassas ve daha esnek bir yöntem haline gelir (Butler *et al.* 2008; Byers and Hitchman 2011). Nanoteknoloji, yaşam süreçlerinin daha tutarlı bir şekilde değerlendirmesini sağlamak için analitik yöntemlerin hassasiyetini ve entegrasyonunu geliştirecektir. Nanobiyoteknolojilerin moleküler tanıdaki uygulamaları Çizelge 2.4'te listelenmiştir (Carbonaro *et al.* 2008; Jain 2011).

Çizelge 2.4. Moleküler tanılamada nanoteknoloji uygulamaları (Jain 2011)

Polimeraz zincir reaksiyonu geliştirmek için nanoteknoloji (pcr)
Bir çip üzerinde nanoteknoloji
Nanolitre hacimleri için mikroakışkan cips: Nanoçip
Nanopartikül etiketlerinin optik okunması
Nanodiziler
Protein nanodiziler
Nanoteknoloji tabanlı sitogenetik
Kromozomların atomik kuvvet mikroskopisi ile incelenmesi
Kuantum nokta floresan in situ hibridizasyon (FISH)
Nanoölçekli tek molekül tanılama
Nanopartikül teknolojileri
Altın partikülleri
Nanobarkodlar
Manyetik nanopartiküller
Kuantum nokta teknolojileri
Nanopartikül problemler
Nanopor teknolojisi
Dna fragmanlarının uzunluğunun ölçülmesi
Dna parmakizi

Çizelge 2.4. (devam)

Nanoteknoloji tabanlı dna dizileme
Moleküler tanı için dna nanomakinleri
Nanopartikül tabanlı bağışıklık
Dna-protein ve nanopartikül eşlenikleri
Nanobiyosensörler
Nanosensör glikoz monitörü
Nanopartiküllerdeki fotostimüle Edilmiş Işıldama
Optik biyosensörler: örneğin, yüzey plazmon rezonans teknolojisi

2.3.1. Moleküler teşhis için nanopartiküller

Altın nanopartiküller bir sensör yüzeyine sadece tamamlayıcı bir hedef varlığında bağlanırlar. Bu özellikten yola çıkarak birden fazla DNA dizisinin desenli bir sensör yüzeyi kullanılırsa, teknik aynı anda milyonlarca farklı DNA dizisini tespit edebilir (Castaneda *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Bu yöntemin mevcut optimize edilmemiş algılama sınırı 20 fmol'dur. Optik absorpsiyon, floresan, Raman saçılması, atomik ve manyetik kuvvet ve elektriksel iletkenlik gibi çeşitli teknikler sensörleri algılamada kullanılabildiği için altın nanopartiküllerin sensörler için özellikle iyi işaretleyiciler olduğu bulunmuştur (Corstjens *et al.* 2011; Jain 2011).

Son yıllarda, geleneksel olarak kullanılan floresan markırlara kıyasla önemli avantajlar sağladıklarından dolayı inorganik floroforlar olarak kuantum noktalarının (QD) kullanımına büyük ilgi vardır. Örneğin QD'ler, boyutlarına ve kompozisyonlarına bağlı olarak ultraviyolede kırmızıya kadar ayarlanabilen oldukça geniş uyarma spektrumlarına sahiptir (Cunningham 2010; Dantham *et al.* 2013). Aynı zamanda, QD'ler dar emisyon spektrumlarına sahiptir ve farklı nanopartiküllerin emisyonlarını aynı anda ve minimum örtüşme ile çözmeyi mümkün kılarlar. Son olarak, QD'ler bozulmaya karşı oldukça dirençlidir ve floresansları oldukça stabildir. QD'ler, virüsleri ve kanser hücrelerini etiketlemek için boyalara olası alternatifler olarak kullanılmıştır (Debbage *et al.* 2008; Delogu *et al.* 2012). Bu uygulamalarda karşılaşılan en büyük sorun ise QD'lerin yağlı bir yüzeye sahip olmaları, hücresel ortamın ise su bazlı olmasıdır. Proteinler ve

DNA gibi hidrofilik moleküller ile etkileşime girebilmeleri için QD'lerin yüzey kimyasını modifiye çalışmaları devam etmektedir (Jain 2011; Deng *et al.* 2012; Du *et al.* 2014).

2.3.2. Biyoetiketler olarak nanopartiküller

Nanopartiküller genel olarak nanobiyomalzemelerin çekirdeğini oluşturur. Bununla birlikte, biyolojik bir hedefle etkileşime girebilmeleri için nanopartiküllere bir arayüz olarak etki eden biyolojik veya moleküler bir kaplamanın bağlanması gerekir (Edwards *et al.* 2010; Esfandyarpour *et al.* 2016). Nanopartikülleri biyoyumlu hale getiren kaplamalar arasında antikorlar, biyopolimerler veya küçük moleküllerin mono tabakaları bulunur (Feng *et al.* 2016). Nanopartiküller ve nanocihazlar kullanmanın potansiyel yararları işaretleme araçları olarak kullanılabilecek çeşitli seçenekler sunmasıdır. Biyoteknolojide geleneksel olarak kullanılan floresan organik boyalara alternatif olarak farklı tipte floresan nanopartikülleri ve diğer nanoyapılar geliştirilmiştir. Bunlar arasında QD'ler, boya katkılı polimer ve silis nanopartikülleri bulunmaktadır (Gaglia *et al.* 2011; Jain 2011).

2.3.3. Paramanyetik ve süperparamanyetik nanopartiküller

Paramanyetik partiküller, hücre sıralama, protein ayırma ve tek molekül ölçümleri için önemli araçlardır. Uygun yüzey kimyasına sahip süper paramanyetik demir oksit nanopartikülleri manyetik rezonans görüntüleme, kontrast artırma, doku onarımı, immünolojik test, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, hipertermi, ilaç dağıtımı, hücre ayrılması gibi sayısız *in vivo* uygulamalarda deneysel olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Gaster *et al.* 2009; Gao *et al.* 2016). Bu uygulamalarda kullanılacak nanopartiküllerin yüksek mıknatıslanma değerlerine ve 100 nm'den küçük dar bir boyut aralığına sahip olması gerekmektedir. Böylece parçacıkların tek tip fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmasını sağlanır. Ek olarak, bu uygulamalar sadece toksik olmayan ve biyoyumlu özelliklerin yanısıra belirli bir alanda parçacık lokalizasyonu ile hedeflenebilir bir teslimat sağlayan manyetik parçacıkların özel yüzey kaplamalarına ihtiyaç duymaktadır (Golub *et al.* 2009; Ghoroghchian *et al.* 2009). Nanopartiküllerin

yüzey kaplamalarının doğası, sadece kolloidin toplam boyutunu belirlemekle kalmaz aynı zamanda nanopartiküllerin vücutta biyokinetiği ve biyodağılımında önemli bir rol oynamaktadır (Goluch *et al.* 2009). Manyetik nanopartiküller; ilaçlara, proteinlere, enzimlere, antikorlara veya nükleotitlere bağlanabilirler. Ayrıca, harici bir manyetik alan kullanılarak bir organ, doku veya tümöre yönlendirilebilir veya hipertermide kullanılmak üzere alternatif manyetik alanlarda ısıtılabilir (Haun *et al.* 2010; Han *et al.* 2013). Hücrelerin manyetik olarak işaretlenmesi, işaretlenmiş hücrelerin canlı organizmadaki hareketlerini MRG ile izleme kabiliyeti sağlar. Süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri kullanarak hücreleri manyetik olarak etiketlemek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (He *et al.* 2012; Heath 2015). Kök hücrelerin ve diğer memeli hücrelerinin manyetik parçacıklarla işaretlenmesi, insanlarda gelecekteki hücre bazlı tedavilere yol göstermesi ve hastalık modellerinde hücre bazlı tedavi etkilerinin değerlendirilmesi için potansiyele sahiptir (Heller *et al.* 2009; Jain 2011).

2.3.4. Biyobelirteçlerin keşfedilmesinde nanobiyoteknolojinin rolü

Biyobelirteç, patolojik bir sürecin ya da terapötik bir müdahaleye farmakolojik bir yanıtın yanı sıra fizyolojik bir gösterge olarak objektif olarak ölçülebilen ve değerlendirilebilen bir özelliktir. Klasik biyobelirteçler kan basıncında, egzersiz sonrası kan laktat seviyelerinde ve diabetes mellitusta kan şekerindeki ölçülebilen değişikliklerdir. Bir hücrenin DNA, RNA, metabolit veya protein seviyeleri üzerindeki herhangi bir spesifik moleküler değişim ise moleküler bir biyobelirteç olarak adlandırılabilir (Jain 2010c; Jain 2017a). Pratik bir bakış açısıyla, biyobelirteç özel ve hassas bir hastalık durumunu yansıtır ve tanı-tedavi sırasında ve sonrasında hastalığı takip etmede kullanılabilir (Jo *et al.* 2007; Jasmin 2011). Günümüzde mevcut moleküler tanı teknolojileri, kanser, metabolik bozukluklar, enfeksiyonlar ve merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların biyobelirteçlerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Nanoteknoloji, biyobelirteçlerin tespitini daha da geliştirmiştir. Ayrıca, bazı biyobelirteçler yenilikçi moleküler teşhis yöntemlerinin temelini oluşturur (John 2010; Jain 2011; Jain 2017b).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ve yüksek yüzey alanları, onları farklı biyobelirteçler geliştirmek için ideal adaylar haline getirmektedir. Mevcut olan nanopartikül teknolojilerinin çeşitliliği göz önüne alındığında; nanopartikül yüzeylerinin bir alt biyolojik belirteç grubunu seçici olarak bağlaması ve yüksek hassasiyetli proteomik testler kullanılarak daha sonraki çalışmalarda kullanmak amacıyla onları ayırmak için uyarlanması mümkündür. Fonksiyonel polimer kaplı nanopartiküller biyobelirteçlerin ve DNA ayrılmasının hızlı bir şekilde tespiti için kullanılmaktadır (Kaittanis *et al.* 2007; Jain 2011).

Şu anda klinik olarak kullanımda olan herhangi bir teknolojiye 1000 kat daha hassas olan manyetik nanosensör biyoteknolojisinin hangi vücut sıvısının analiz edildiğinden bağımsız olarak mevcut herhangi bir yöntemden 3 kat daha geniş bir konsantrasyon aralığında biyobelirteç proteinlerini tespit edebildiği kanıtlanmıştır (Gaster *et al.* 2009; Kong *et al.* 2017). Nanobiyosensör çiplerin aynı zamanda 64 kadar farklı proteini de tespit edebilmesi ve farelerde tümörlerin erken tespitinde etkili olduğunun gösterilmesi, insanlarda en zor kanserlerin bile daha erken saptanmasına olanak sağlayabileceğini öne sürmektedir (Kosaka *et al.* 2011). Manyetik nanobiyosensörler, kanserle ilişkili protein seviyelerinin mevcut standart yöntemle tespit edilebilir konsantrasyonların çok altında olduğu durumlarda farelerde kanserli tümörleri başarılı bir şekilde tespit edebilmektedir. Bu sensörler, kanser dışındaki hastalıkların biyobelirteçlerini tespit etmek için de kullanılabilir (Jain 2011; Kose and Koser 2012).

2.3.5. Nanobiyoteknoloji ve sitogenetik

Sitogenetik terimi klasik olarak, kalıtımın hücresel yönlerinin incelenmesi ve temel olarak kromozom yapısını ve hastalıklarla ilgili anormallikleri tanımlamak için kullanılmıştır. Sitogenetik terimi; yapısal ve fonksiyonel bilginin, tek hücre seviyesindeki dokuların, organların ve organizmaların moleküler hücre fenotip analizi ile elde edildiği anlamına gelen sitomik terimi altına dahil edilebilir (Krishnamurthy *et al.* 2010; Jain 2010a). Hücredeki moleküller nanometre ölçeğinde boyutlarda düzenlenirler. Bu moleküllerde dinamik değişimin görselleştirilmesi ve hücrelerin işlevinin incelenmesi

nanobiyolojideki zorluklardan biridir. Tek bir molekül nihai olarak bir nanoyapıdır. Tek moleküllü mikroskopi ve spektroskopi, tek molekülleri incelemek için kullanılan tekniklerden bazılarıdır (Lee and Kopelman 2012).

2.4. Nanobiyoteknolojinin Farmasötik Uygulamaları

Gelişen teknolojiler arasında nanobiyoteknoloji, ilaç endüstrisinde kullanım için büyük ilgi uyandırmıştır. Nanobiyoteknolojinin önemli uygulamaları genel olarak nanofarmasötik olarak adlandırılan ilaç keşfi, ilaç geliştirme ve ilaç dağıtımı alanlarındadır.

2.4.1. İlaç keşfi ve geliştirilmesinde nanobiyoteknolojinin rolü

Nanobiyoteknoloji, özellikle nanopartiküllerin kullanımı, ilaç keşfi ve geliştirilmesine önemli katkılarda bulunmuştur (Jain 2009a). Küçük moleküllerin nanopartiküllere çok değerlikli bağlanması, spesifik bağlanma afinitesini arttırabilir ve böylece nanomalzemelerin yeni biyolojik özelliklerini ortaya çıkarabilir. Çok değerlikli ilaç tasarımı, antiviral ve anti-enflamatuar ajanlara monovalent ajanlardan daha güçlü özellikler kazandırmaktadır (Bhaskar *et al.* 2009; Agüeros *et al.* 2011; Bawa *et al.* 2012). Nanobiyoteknolojinin ilaç keşfi için kullanımına ilaveten, bazı ilaçlar nanomalzemelerden geliştirilmektedir. Dendrimerler, fullerenler ve nanoantikorlar bunların iyi bilinen örneklerindendir. Düşük moleküler ağırlıklı ilaçlarla dendrimerin konjugasyonu, farmakokinetiği geliştirmek, ilaçları belirli bölgelere hedeflemek ve hücreye alımını kolaylaştırmak için son zamanlarda ilgi çekmektedir (Bondi *et al.* 2010; Brudno *et al.* 2014). Fulleren moleküllerinin önemli bir özelliği, aktif kimyasal grupların üç boyutlu oryantasyonlarda hassas şekilde aşılmasını sağlayan sayısız bağlanma noktalarına sahip olmasıdır. Akıllı ilaç tasarımının ayırt edici özelliği olan bu özellik, fulleren bileşiklerinin biyolojik hedeflerle eşleştirilmesinde pozisyonel kontrol sağlamaktadır (Duceppe *et al.* 2010; Crielgaard *et al.* 2012). Fulleren antioksidanları, dolaşımdaki hücre içi serbest radikalleri bağlamakta ve etkisiz hale getirmektedir. Böylece, serbest radikal yaralanmasını ve aşırı serbest radikal üretiminin neden olduğu

hastalıkların ilerlemesini durdurma konusunda olağandışı güç vermektedir. Doğal olarak meydana gelen tek zincirli antikordlardan türetilen nanoantikorlar, hafif bir zincirin yokluğunda tamamen işlevsel olarak geliştirilen doğal olarak oluşan ağır zincir antikordlarının en küçük parçalarıdır. Geleneksel antikordlara benzer şekilde, nanoantikorlar yüksek hedef özgüllüğü ve düşük doğal toksisite göstermekle birlikte küçük molekülü ilaçlar gibi enzimleri inhibe edebilir ve reseptör yarıklarına erişebilirler (Jain 2011; Eliasof *et al.* 2013).

İlaç ve biyoteknoloji endüstrileri tarafından nanobiyoteknolojinin kullanımının artması beklenmektedir. Nanoteknoloji, ilaçların en uygun şekilde teslimi için oluşturulacak formülasyonlardan klinik deneylerde teşhis uygulamalarına kadar ilaç geliştirmenin tüm aşamalarında uygulanacaktır (Fichter *et al.* 2010; Fang *et al.* 2012). Yakın gelecekte, tek bir hücrenin yapısını ve işlevini nanobiyoteknoloji sistemlerine bağlı bilgisayarlar tarafından tam olarak modellemek mümkün olabilir. Bir hücrenin nasıl işlediğinin bu kadar ayrıntılı bir simülasyonu, bilim insanlarının canlı hayvanlarda herhangi bir deney yapmadan, benzersiz hız ve hassasiyetle yeni ilaçlar geliştirmelerini sağlayabilir (Gassman *et al.* 2010; Jain 2011).

2.4.2. Nanobiyoteknolojiye dayalı ilaç taşınımı

İlaçlarla ilgili en büyük sorunlardan biri, uygulama yolundan bağımsız olarak ilaç etkinliği için önemli bir faktör olan çözünürlüktür. Ayrıca, kimyasal ürünler geliştiren ilaç şirketleri için kimyasal olarak kullanılan yeni ilaçların yaklaşık %50'sinin suda çözünmemesi ya da zayıf biçimde çözünmesi büyük bir zorluk olarak ortaya çıkmaktadır (Geng *et al.* 2007; Harde *et al.* 2011). Bu tür ilaçların yeniden yapılandırılması ve ticari potansiyellerinin artırılması için geliştirilmiş çözünürlük teknolojisi kullanılabilir (Hild *et al.* 2007). Nanobiyoteknoloji, ilaç teslimatındaki karşılaşılan sorunlara aşağıdaki çözümleri sunmaktadır:

- Yüzey alanını arttırmak için partikül büyüklüğü nanometre aralığına düşürülerek ilacın çözünme hızının ve çözünürlüğünün artması sağlanır.

- İnvaziv olmayan uygulama yollarının kullanılmasıyla, ilaçların enjeksiyon yoluyla uygulanmasına duyulan ihtiyacın ortadan kalkması sağlanır.
- İyileştirilmiş stabilite ve raf ömrüne sahip yeni nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi sağlanır.
- Çözünmeyen bileşiklerin ve makromoleküllerin daha iyi emilimini sağlamak için nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi, gelişmiş yanma oranları sayesinde potansiyel olarak gerekli doz miktarını azaltarak ve güvenliği artırarak gelişmiş biyoyararlanım ve salıverme hızları sağlar (Hild *et al.* 2010; Jain 2011; Karchemski *et al.* 2012; Jain 2017a).

İlaçların hedef ligandla doğrudan birleştirilmesi, birleştirme kapasitesini birkaç ilaç molekülü ile sınırlamaktadır. Ancak ilaç taşıyıcı nanosistemlerin ligandlarla birleştirilmesi, bir tane reseptör hedefli ligand vasıtasıyla binlerce ilaç molekülünün taşınmasına olanak sağlamaktadır. Nanosistemler, hastalığa özgü yeni keşfedilen hedeflerle ilaç hedeflemeye ulaşmak için fırsatlar sunmaktadır. Biyobozunur polimer nanopartikülleri, biyobozunurluk, daha iyi kapsülleme, kontrollü salım ve düşük toksisite özelliklerinden dolayı ilaç dağıtım aracı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Kumari *et al.* 2010; Kato *et al.* 2011).

2.4.3. Nanobiyoteknoloji ve ilaç dağıtım cihazları

Bazı ilaç dağıtım cihazları, terapötik maddelerin salınması için vücuda implante edilir. İnsan vücuduna yerleştirilen bu cihazların iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu konuda nanoteknolojinin sunduğu imkanlardan faydalanılabilir. Örneğin, implantlar polimer nanotabakalar tarafından kaplanabilir (Kottke *et al.* 2010; Kojima 2010; Jain 2011).

DNA içeren polimerik nanotaşıyıcılar veya nanokapanlar, kapsüllenmiş bir enzimin konakçı dış ortamlara karşı tam aktivitesini koruyabilir ve sekresyon talebe göre kontrol edilebilir. Asimetrik membranlara sahip nanotaşıyıcılar doğrudan protein yerleştirilmesini ve kimyasal modifikasyonu sağlayabilir (Ladewig *et al.* 2009; Jain 2011).

Düzenli ve kontrollü gözenek yapısına, yüksek yüzey alanı ve gözenek hacmine sahip olan nanogözenekli maddeler implante edilebilir ilaç dağıtım sistemleri için özellikle uygundur. Nanogözenekli alümina ve nanotübüler titanyum gibi elektrokimyasal olarak tasarlanmış nanopor malzemelerde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Nanoporlara sahip cihazlar hormonal tedavide hücre kapsülleme için kullanılabilir. Ayrıca, bu cihazlara monte edilen biyosensörler vasıtasıyla invaziv olmayan sinyallerin tespiti gerçekleştirilebilir (Lam and Ho 2009; Losic and Simovic 2009).

Silikon nanopor membrana implante edilmiş bir titanyum ilaç dağıtım cihazı, kapsüllenmiş bir ilacın neredeyse sabit bir oranda difüzyonuyla salımını kontrol edebilir. Bu yapı, uzun süre boyunca neredeyse sifıra yakın ilaç kinetiği elde edebilir. Ayrıca bu yapı, protein ve peptid ilaçların verilmesi için uygun olmasının yanısıra enjeksiyonlarla ilişkili zayıf farmakokinetiği önleyerek bu bileşikler için optimize edilmiş bir dağıtım yöntemi sağlar (Papasanı *et al.* 2012; Mao *et al.* 2013). İlaç kuru bir toz veya konsantre bir süspansiyon halinde formüle edilebilir ve stabilitesinin korunması sağlanır. Böylece ilaç, ilacı serbest bırakan ancak istenmeyen hücrelerin girişini engelleyen nanopor bir membran tarafından vücudun immünolojik reaksiyonundan korunmaktadır (Jain 2011).

2.5. Biyolojik Tedavilerde Nanobiyoteknolojinin Rolü

Biyolojik tedaviler mevcut terapötiklerde önemli bir rol oynamaktadır ve bu yaklaşımların birçoğu gelecek vaat eden bir gelişme kaydetmektedir. Biyolojik temelli yaklaşımlar; hücre terapisi, gen terapisi, aşılar, RNA etkileşimi ve antisens terapötikleri içerir. Dolayısıyla, nanopartiküller biyolojik tedavilerin uygulanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Bonoiu *et al.* 2009; Bryson *et al.* 2009).

2.5.1. Hücre tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü

Hücre terapisi; seçilmiş, çoğaltılmış ve farmakolojik olarak tedavi edilmiş veya vücut dışında değiştirilmiş hücrelerin uygulanmasıyla hastalıkların önlenmesi veya tedavi edilmesidir. Hücre terapisinin kapsamı, terapötik amaçlar için vücudun intrinsik

hücrelerinin fonksiyonunu değiştirmek amacıyla farmakolojik ve farmakolojik olmayan yöntemleri içerecek şekilde genişletilebilir. Hücre terapisine gösterilen ilginin büyük kısmı kök hücreler etrafında toplanmaktadır (Glover *et al.* 2009; Delyagina *et al.* 2011; Chahal *et al.* 2016). Nanobiyoteknolojinin hücre terapisindeki uygulamalarına ve doku mühendisliği ile ilgili alanlarına aşağıdakiler dahil edilebilir:

- Hücre etiketleme için organik boyalara umut verici alternatifler olarak hizmet eden yarı iletken nanokristallerin kullanılması.
- SPIO nanopartiküllerinin, terapötik olarak vücuda verilen hücreleri izlemek için MRG ile kullanılması.
- Mezenkimal kök hücrelerden kemik oluşumu için nanofiber iskelelerin kullanılması.
- Karbon nanotüplerin nörolojik bozuklukların kök hücre tedavisine yardımcı olmak için kullanılması.
- Nanopartiküllerin, miyokard fonksiyonunun iyileşmesinde rol alması (Jain 2011; Jain 2017a; Jain 2017b).

Nanopartikül kontrastlı etiketli kök hücrelerin izlenmesi, diğer hücre etiketleme teknolojilerine göre önemli avantajlar sunmaktadır. Laboratuvar testleri, hücrelerin normal yüzey belirteçlerini koruduğunu ve etiketleme işleminden sonra hâlâ işlevsel olduklarını göstermiştir (Jayakumar *et al.* 2012). İşaretlenmiş hücrelerin, deney hayvanlarında tümörler çevresinde oluşan kan damarlarına göç ettiği ve bunlara dahil olduğu gösterilmiştir (Jain 2011). Bu özellik, işaretlenmiş nanopartiküllerden gelen benzersiz sinyalleri kullanarak hekimlerin tıbbi tedavilerde kullanılan hücreleri doğrudan izlemelerini sağlamak için klinik uygulamalara çevrilebilir (Jiang *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2015). Bu uygulamalar, tümörleri izlemek, kardiyovasküler problemleri teşhis ve tedavi etmek için faydalı olabilirler.

2.5.2. Gen tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü

Gen tedavisi, belirli bir hastalık durumunu önlemek veya değiştirmek amacıyla tanımlanmış genetik materyalin bir hastanın spesifik hedef hücrelerine aktarılması olarak

tanımlanmaktadır (Kasala *et al.* 2016). Gen terapisinin önemli bir bileşeni, vektör adı verilen sağlıklı geni bir hastanın hücrelerine iletmek için kullanılan taşıyıcı veya iletim aracıdır. Bu amaçlar için kullanılan vektörler genellikle viral olmakla birlikte viral olmayan vektörler de kullanılmaktadır (Kim *et al.* 2008; Kim *et al.* 2016). Genler ve DNA artık vektörler kullanılmadan üretilmekte ve gen transferini yapmadan *in vivo* olarak genlerin fonksiyonlarını değiştirmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Nanopartiküller ve diğer nanoyapılar da viral olmayan gen iletimi için kullanılabilmektedir (Kommareddy and Amiji 2007; Kim *et al.* 2016).

Parçalanabilir nanopartiküller, kontrollü salma özelliklerine sahip hedefe yönelik bir hücre içi teslimat sağlayabilen viral olmayan vektörlerdir. Ayrıca, parçalanabilir nanopartiküllerin parçalanamayan muadillerine göre potansiyel avantajı, azaltılmış toksisiteye sahip olması ve tekrarlanan uygulamadan sonra hedef doku içerisinde birikiminin önlenmesidir (Kim *et al.* 2008). Örneğin; biyouyumlu karbonat apatit inorganik nanopartikülleri, akıllı teslimat için olduğu kadar memeli hücrelerinde genetik materyalin ifadesi için de esasen gerekli olan benzersiz özelliklere sahiptir (Kasala *et al.* 2016). Karbonat apatit nanopartikülleri, hücre zarında etkili bir şekilde taşımak için DNA'yı adsorbe eder. Ayrıca karbonat apatit nanopartiküller endozomal asidik pH'da yüksek bir çözünme hızına sahiptirler ve bu da bağlı DNA'nın daha sonraki bir protein ekspresyonu seviyesi için hızlı salınımına yol açar (Kim *et al.* 2016). Karbonat apatit vücudun doğal bir bileşenidir ve genellikle kemik ve dişler gibi sert dokularda bulunur. Ayrıca, nanoboyutlu yapıları ve düşük pH'a duyarlılıkları sayesinde, karbonat apatit parçacıkları asidik keseciklerindeki hücreler tarafından alındıklarında herhangi bir toksisite belirtisi olmadan hızla bozunurlar. Apatit nanopartikülleri viral olmayan gen iletimi için umut vaat eden adaylardır. Ayrıca, genellikle biyolojik olarak parçalanamayan ve verimsiz olan polimer veya lipid bazlı sistemlerden daha üstündür (Jain 2011).

Nükleik asitlerin nanoölçekte görüntülenmesini sağlayan polimer işaretçiler geliştirilmiştir. Bu işaretçiler plazmid DNA'yı etkin bir şekilde nanopartiküllere bağlayıp sıkıştırmakta ve nükleik asitleri nükleaz hasarına karşı korumaktadır (Kasala *et al.* 2016). Çok yönlülüklerinden dolayı bu işaretçiler *in vitro* nükleik asit transferini izlemek ve

anlamak için olağanüstü bir potansiyele sahiptir. Bu sebepten dolayı, gen terapisi ve teşhis ile terapötik maddeleri birleştirmek için *in vivo* vektörler olarak umut vaat etmektedirler (Jain 2011; Kim *et al.* 2016).

Hücresel taşıyım için virüs benzeri fonksiyonlara sahip yapısal nanopartiküller oluşturmak üzere DNA ile kendi kendine birleşen yeni çok işlevli DNA taşıyıcıları tanımlanmıştır. Nanopartiküller hücreye özgü bir şekilde içselleştirilmekte ve daha sonra endozomdan sitoplazmaya çıkmaktadır (Kim *et al.* 2016; Kasala *et al.* 2016). Nanopartiküller, hücresel nükleer taşıma proteinleri ile etkileşime girerek aktif olarak bölünmeyen hücrelerin hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Böylece lipid ve polietilenimin vektörlerinden daha düşük sitotoksositeye ek olarak hücrelerde üç ila dört kat daha yüksek raportör gen ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (Jain 2011).

2.5.3. Aşılarda nanobiyoteknolojinin rolü

Geleneksel bir adjuvan olarak kullanılan alümin aksine, nanoboncuklara kovalent olarak bağlanmış antijenler orta derecede humoral cevaplarla birlikte önemli hücre aracılı cevapları indüklemektedirler. Bu yöntemle gerçekleştirilen aşılarda deney hayvanlarında immünizasyon bölgesinde herhangi bir ters reaksiyon görülmemiştir (Moon *et al.* 2012). Bu nedenle, veterinerlik türlerinde bulunan nanoboncuk adjuvanları hücre aracılı bir cevabın gerekli olduğu viral patojenlere bağışıklığın uyarılması için faydalı olabilir. Bu aşılar insanlarda hücre içi patojenler için potansiyel bir öneme sahiptir. Çoğu adjuvan, yalnızca belirli bir hastalığa karşı antikorları uyarmaktadır (Muraoka *et al.* 2014). Nanoboncuk teknolojisi ise, virüsleri veya kanseri ortadan kaldırmak için ihtiyaç duyulan T-hücrelerini üreterek bağışıklık sistemine bir destek sağlamaktadır. Hedefli bir sentetik aşı platformu, maksimum bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmak için doğal patojenlerin özelliklerini taklit etmeye yarayan tam entegre sentetik nanopartikül aşıları oluşturmaktadır (Tan *et al.* 2010). Antijenler ve adjuvanlar aynı biyobozunur nanopartikül içinde doğrudan antijen sunan hücrelere verilmektedir. Bu yaklaşım, istenmeyen hedef dışı etkileri en aza indirmekte ve immün tepkiyi de maksimuma çıkarmaktadır (Jain 2011; Moon *et al.* 2012).

2.5.4. Antisens tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü

Antisens molekülleri, spesifik mRNA sekanslarını yansıtmak ve protein üretimini bloke etmek için tasarlanmış DNA veya RNA'nın sentetik segmentleridir. Genetik materyali hedeflemenin bir yolu, mesajın proteine dönüşmesini engelleyen antisens DNA kullanarak mRNA'yı bloke etmektir. Anormal hastalıklarla ilgili proteinleri bloke etmek için antisens ilaçların kullanımı antisens terapötikleri olarak adlandırılmaktadır (Jia *et al.* 2007). DNA veya RNA'nın sentetik kısa bölümlerine oligonükleotitler denir. Tipik ilaçlar proteinleri hedef alırken, antisens gen terapisi yoluyla zararlı proteinlerin kopyalar haline getirilmeden önce genetik materyalin kendisini hedeflemek mümkündür. Antisens ilaçların, geleneksel ilaçlardan daha etkili olma potansiyeli vardır ancak antisens terapisi ile ilgili problemlerden biri bu ilaçların tesliminde yaşanan sorundur (Zhang *et al.* 2009). Antisens oligonükleotitlerin etkinliği doğal oligomerlerin stabilitesinin zayıf ve hücresel alımlarının etkinliğinin düşük olması ile sınırlıdır.

Altın nanopartikül-oligonükleotit kompleksleri, hücrelerde protein ekspresyonunu kontrol etmek için antisens hücre içi gen düzenleme ajanları olarak kullanılmıştır (Jia *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009). Hücrelerin içine girdikten sonra, DNA ile modifiye edilmiş nanopartiküller hedeflerine bağlanan ve proteinlere dönüşmelerini engelleyen mRNA süngerleri olarak işlev görmektedir. Geleneksel antisens oligonükleotitleri üzerinde bir altın nanopartikül yüzeyine çoklu antisens DNA ipliklerinin tutturulmasının çeşitli avantajları vardır;

- DNA daha kararlı hale gelmekte ve bir nanopartiküle bağlı olmayan DNA'dan daha etkili bir şekilde hedef mRNA'ya bağlanabilmektedir.
- Oligonükleotitleri, geleneksel transfeksiyon ajanlarından daha yüksek etkili bir konsantrasyonda verebilmekte ve çalışılan koşullar altında hücrelere toksik etki göstermemektedirler.

Polimetakrilat nanopartikülleri, antisens oligonükleotitlerin iletimi için umut verici bir araç olarak görünmektedir. Oligonükleotidin alımı, nanopartikül konsantrasyonuna da

bağlı olarak nanopartiküller tarafından yüklendiğinde önemli ölçüde artar. Yüksek dozda nanopartikül kullanıldığında hafif bir sitotoksisite ortaya çıkabilir (Jia *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009; Jain 2011).

2.6. Klinik Nanotıp

Klinik nanotıbbın neredeyse tüm hastalıklara yönelik uygulama alanları Çizelge 2.5'te listelenmiştir. En önemli uygulama alanı kanser, nörolojik bozukluklar ve kardiyovasküler bozukluklardır (Smith *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014; Jain 2017c).

Çizelge 2.5. Klinik nanotıbbın uygulama alanları (Jain 2011)

Tanılama
Karbon nanotüp-temelli minyatür X-ışını
Klinik laboratuvar moleküler tanılama
Nano kontrast malzemeleri kullanarak moleküler görüntüleme
Nanoendoskopi
Nanopartiküller kullanarak ultrason görüntüleme
Tıbbın çeşitli uzmanlıklarında uygulama
Kardiyoloji
Şeker hastalığı
Bağışıklık bozuklukları
Bulaşıcı hastalıklar
Nöroloji
Onkoloji
Oftalmoloji
Ortopedi
Ağrı yönetimi
Cilt rahatsızlıkları
Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp
Kök hücre nakli ile nanofiber iskeleler
Nanomalzemeye dayalı dokuların yenilenmesi
Doku mühendisliği ve ilaç dağıtımını birleştirmek için nanomalzemeler
Organ değişimi
Nanocerrahlik
Kateter kullanarak minimal invaziv cerrahi
Nanorobotlar
Nano ölçekli lazer ameliyatı
Teşhis ile tedavinin kombinasyonu
Kişiselleştirilmiş tıbbın gelişimi

2.7. Nanoonkoloji

Nanoonkoloji, nanoteknoloji kullanarak kanserin hem tanısını hem de tedavisini içermektedir. Nanobiyoteknoloji, kanser ilaçlarının dağıtımında da önemli bir rol oynar (Jain 2009b; Arora *et al.* 2012; Ahmed *et al.* 2015; Alibolandi *et al.* 2015).

2.7.1. Kanserde nanoteknoloji bazlı ilaç teslimatı

Halihazırda kanser tedavisinde kullanmak için onaylanmış nanoteknoloji tabanlı iki ürün bulunmaktadır; Doxil ve Abraxane. Kanser tedavisinde kullanmak için geliştirilen ilaçların yaklaşık 150 tanesi nanoteknoloji tabanına dayanmaktadır (Bertrand *et al.* 2014; Baleizão *et al.* 2015)

Kanser tedavisine yönelik ilaç uygulamalarında, ilaçların etkisini optimize etmek ve toksik yan etkileri azaltmak önem arz etmektedir. Kanserde ilaç dağıtımını kolaylaştırmak için çoğunlukla nanopartiküllere dayanan birçok nanobiyoteknolojik çözümler kullanılmıştır. Kanserli hastalarda ilaç dağıtımını için kullanılan nanoteknolojik yöntemlerin sınıflandırması Çizelge 2.6'da gösterilmiştir (Jain 2011; Cadete and Alonso 2016; Cao *et al.* 2016).

Çizelge 2.6. Kanserde hedefe yönelik ilaçlar için nanobiyoteknoloji yaklaşımları (Jain 2011)

Nanopartiküller
Antikanser ilaçların nanopartikül formülasyonları, örneğin; paklitaksel
Kanser ilaçlarının iletiminde exosomes
Nano kapsülleme ve antikanser ilaçların korunumu
Lipid nanokapsüllerinde ilaçların çevrelenmesi
Hidrojel nanopartiküllerde kapsül yapma ilaçları
Kanserde ilaç teslimi için miseller
Antikanser tedavisinin hedefe yönelik teslimi
Nanopartiküller ile hedeflenen ilaç teslimi
PEG ile nanolipozomal formülasyonu
Folat bağlı nanopartiküller
Kanserde hedefe yönelik ilaç teslimi için karbon manyetik nanopartiküller

Çizelge 2.6. (devam)

Nanopartikül-aptamer biyokonjüгатları ile hedefe yönelik ilaç teslimi
Bölgeye özgü kanser tedavisi için nanodropletler
Lipit bazlı nanotaşıyıcılar
Nanopartiküller kullanarak hedefe yönelik antianjiyogenik tedavi
Beyin tümörlerine ilaç teslimi için nanopartiküller
Nanopartiküllerin radyoterapi ile kombinasyonu
Bor nötron yakalama tedavisi ile kombinasyon
Brakiterapi için nano motorlu silikon
Kanser tedavisinin fiziksel yöntemi ile kombinasyon
Tümörlerin lazer ablasyonu ile kombinasyon
Fotodinamik tedavi ile kombinasyon
Termal ablasyon ile kombinasyon
Ultrason ile kombinasyon
Nanopartikül aracılı gen tedavisi
P53 gen kanseri tedavisi
P53 geninin teslimi için immünolipopleks
Fus1 geninin intravenöz teslimi
Teşhis ve terapötikleri birleştiren stratejiler
Termal tümör ablasyonuna ilave olarak nanokabuklar
Perflorokarbon nanopartiküller
Nanokompozit cihazlar

2.7.2. Kanserde tanı ve tedavi kombinasyonu

Nanopartiküllere çeşitli fonksiyonlar eklenebildiği için nanopartikül temelli teşhis ve terapötikler büyük umut vaat etmektedir. Nanopartiküllerin bu işlevlerinden biri, vücuttaki belirli bölgelere spesifisite gösterme yeteneğidir (Cheng *et al.* 2011; Cavalli *et al.* 2016).

Fototermal terapi, yüzeydeki güçlü elektrik alanlarından dolayı soy metal nanopartiküller tarafından elektromanyetik radyasyonun geliştirilmesine dayanmaktadır. Nanopartiküller lazer ışığını daha kolay bir şekilde soğurmaktadır (Cohen *et al.* 2011; Clark *et al.* 2016). Bu sayede nanopartiküllerle kaplanmış malign hücreler benign hücrelere kıyasla öldürülmek için mevcut durumda kullanılan lazer enerjisinin yarısı yeterli gelmektedir. Bu özellik, sadece kötü huylu hücrelerin yok edilmesinin nispeten daha kolay olmasını

sağlamaktadır. Bu benzersiz özellikler, eş zamanlı moleküler görüntüleme ve fototermal kanser tedavisi için optik olarak yeni aktif reaktifler tasarlama potansiyeli sunmaktadır (Douglas *et al.* 2012; Fan *et al.* 2014). Uygun boyutlara sahip altın nanorotlar, yakın kızıl ötesi bölgede (650-900 nm) güçlü bir şekilde emilebilir ve saçılabilir. Kürelerin çubuklar halinde değiştirilmesi, nanopartiküllerin nanosferlerin kullandığı görünür ışık spektrumundan yakın kızılötesi bölge spektrumuna tepki verme sıklığını azalmaktadır (Fan *et al.* 2016). Bu lazerler cilt altında görünür spektrumdaki lazerlere göre daha derinlere nüfuz edebildiğinden dolayı görünür lazerler ile erişilemeyen tümörlere ulaşabilirler (Jain 2011).

Tümör hedefleyici dendrimerler hem bir görüntüleme maddesi hem de tedavi edici bir madde içermektedir. DNA'ya bağlı bir dendrimer platformu ilaçların, genetik materyallerin ve görüntüleme maddelerinin kanser hücrelerine verilmesini sağlamak ve birleştirici terapötikler geliştirme potansiyeli sunmaktadır. Bir floresan görüntüleme ajanı ve paklitaksele bağlı bir dendrimer, tümör hücrelerini tanımlayabilmekte ve aynı anda onları öldürebilmektedir (Galanza *et al.* 2009; Jain 2017a).

Ameliyat sırasında tümörün tamamen çıkarılması, cerrahın tümörü normal dokudan ayırt edebilme yeteneğine bağlıdır. Hücreye nüfuz eden etkinleştirilebilir peptidler kullanılarak ameliyat sırasında tümörleri görselleştirmek için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde polisikasyonlu hücreye nüfuz eden floresan etiketli peptit, ayrılabilir bir bağlayıcı vasıtasıyla nötrleştirici bir peptide birleştirilir (Gordon *et al.* 2008; Ghosh *et al.* 2014). Bu tekniğin hayvanlarda deneysel tümörlere uygulanması uzun süreli tümörsüz sağkalım oranının, işaretlenmiş nanopartikülleri kullanarak cerrahi işlem uygulanan farelerde geleneksel görüntüleme yöntemleriyle aynı cerrahi işlem uygulananlara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Nguyen *et al.* 2010).

Onkolojide nanobiyoteknolojiyi kullanmanın temel gerekçesi, nanopartiküllerin daha büyük moleküllerde veya bulk materyallerde bulunmayan optik, manyetik veya yapısal özelliklere sahip olmasıdır. Nanopartiküller monoklonal antikolar, peptitler veya küçük moleküller gibi tümör hedefleyici ligandlar ile bağlandığında tümör antijenlerini

(biyobelirteçleri) ve yüksek afiniteli ve özgüllüğü olan tümör vaskülerlerini hedeflemek için kullanılmaktadır (Grabbe *et al.* 2016; Jain 2017b). Boyutları 5 ila 100 nm arasında değişen nanopartiküller, çok sayıda tanısal ve terapötik antikanser ajanına konjüge olabilecek geniş yüzey alanlarına ve fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu alandaki son gelişmeler, moleküler ve hücrel görüntüleme için biyo-afiniteye sahip nanopartikül problemleri ve kanserin erken tespiti ve taraması için kullanabilecek entegre nanocihazların geliştirilmesine imkân sağlamıştır (Grabbe *et al.* 2016; Jain 2017c). Ayrıca, bu gelişmeler biyobelirteçlerin hastaların bireysel moleküler profillerine dayanarak kanseri teşhis ve tedavi etmek için kullanıldığı kişiselleştirilmiş onkoloji tedavileri için fırsatlar sağlamıştır (Jain 2017c).

2.8. Nanonöroloji

Nanonöroloji, nanobiyoteknolojinin getirdiği yeniliklerin nörolojiye uygulanmasıdır. Nanobiyoteknoloji, nörolojik bozuklukların patomekanizmalarını incelemenin yanı sıra teşhis ve tedavilerini incelemek için de yöntemler sunmaktadır (Jain 2009; Baysal *et al.* 2013).

2.8.1. Nörolojik bozuklukların tanısında nanobiyoteknolojinin rolü

Diğer immün yetkin hücrelerle birlikte uyum içinde hareket eden aktive makrofajlar, multipl skleroz, iskemik inme lezyonları ve tümörler gibi merkezi sinir sistemi bozukluklarında bir inflamatuvar/immün reaksiyon göstergesidir. Beyin makrofajlarının manyetik rezonans görüntüleme ile tespiti bireysel nörolojik hastalıkların karakterize edilmesine yardımcı olan kesin mekansal ve zamansal makrofajların varlığını tanımlamaktadır (Fabbro *et al.* 2016; Hernando *et al.* 2016; Jain 2016). Son on yıl boyunca, demir-oksit nanopartiküller aracılığıyla manyetik rezonans görüntüleme tekniği kullanılarak makrofajların izlenmesi pek çok merkezi sinir sistemi hastalıkları için geliştirilmiştir. Hayvan modelleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, beyin makrofajları üzerine manyetik rezonans görüntüleme teknolojisinin klinik uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, serebral lezyon aktivitesinin klinik teşhisi, hastalık

gelişim prognozu için deneysel modellerde ve klinik değerlendirme altında immünomodülatör tedavilerin etkinliğini belirlemek için *in vivo* biyobelirteç olarak araştırılmaktadır (Jain 2009c; Kafa *et al.* 2015; Kozai *et al.* 2016).

Terapötiklerin beyne iletilmesi, nöroterapötiklerde önemli konulardan biridir. Bu sebepten dolayı mevcut stratejilerin çoğu kan-beyin bariyerini aşmaya yöneliktir. Sadece çok küçük nanopartiküller kan-beyin bariyerinden geçebilir, ancak bu şekilde kontrolsüz geçiş istenilen bir durum değildir (Kreuter *et al.* 2014; Lee *et al.* 2016). İlaçların kan-beyin bariyeri boyunca geçişi ile ilgili stratejilerin çoğu nanoteknoloji ile geliştirilebilir. Bazı örnekler aşağıda listelenmiştir;

- Nanopartiküller endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları açmakta ve ilacın kan-beyin bariyerine serbest biçimde veya nano taşıyıcıyla birlikte girmesini sağlamaktadır.
- Nanopartiküller endotel hücreleri tarafından endositozlanmakta ve endotelin abluminal tarafında ekzositozdan meydana gelen aktif bileşenlerin taşınmasına öncül bir adım olarak ilacı hücre içinde salgılamaktadır.
- Nanopartiküller, endotel hücre tabakası boyunca taşınmayı destekleyen bir konsantrasyon gradyanı oluşturarak beyne iletimi geliştirmektedir.
- İlaç taşınımı, endotel hücre zarı lipidlerinin membrann akışkanlaşmasına sebep olan bir yüzey aktif madde ile çözündürülmesiyle arttırılmaktadır.
- Kaplama ajanları (polisorbatlar gibi), transmembran akış sistemini yani P-glikoproteini inhibe etmektedir.
- Nanopartiküller, beyin damarlarında beyin endotel hücrelerinin sınırlı geçirgenliğine izin veren lokal toksik etkiler yaratmaktadır (Jain 2009).

Kan-beyin bariyeri; antibiyotikler, antikanser ajanlar ve özellikle nöropeptitler dahil üzere çeşitli merkezi sinir sistemi ilaçları gibi çok sayıda ilaç için aşılmaz bir engeli temsil etmektedir. Bu engelin üstesinden gelebilecek olasılıklardan biri ilacın nanopartiküller aracılığıyla beyne verilmesidir (Jain 2013; Jain 2016; Jain 2017a).

Kan-beyin bariyeri boyunca nanopartikül aracılı ilaç taşıma mekanizması şu anda tam olarak açıklanamamıştır. En muhtemel mekanizma, beyin kılcal damarlarını kaplayan endotel hücreleri tarafından endositoz aracılığıyla olduğudur. Bu mekanizmada, sıkı kavşak modülasyonu veya P-glikoprotein inhibisyonu gibi başka süreçler de meydana gelebilir. Ayrıca, bu mekanizmalar paralel olarak çalışabilir ya da iş birliği içerisinde beyne ilaç iletimi sağlanabilir (Nilewski *et al.* 2015; Miller *et al.* 2016).

2.8.2. Beyine nanopartikül bazlı ilaç verilmesi

Nanopartiküllerin kan-beyin bariyeri boyunca beyne ilaç vermek için kullanılması, mevcut tedavi yöntemlerine önemli bir avantaj sağlayabilir. Nanopartikül taşıyıcı teknolojisinin birincil avantajı, nanopartiküllerin terapötik ilaç molekülünün kan-beyin bariyerinin sınırlayıcı özelliklerini gizlemesidir. Ayrıca, bu sistem beyindeki ilaç salınımını yavaşlatıp periferik toksisiteyi de azaltabilir. Taşınımını etkileyen çeşitli faktörler arasında polimer veya yüzey aktif madde türü, nanopartikül büyüklüğü ve ilaç molekülü bulunmaktadır (Jain 2011; Jain 2013; Jain 2016; Jain 2017b).

Polimerik nanopartiküllerin, kapsüllenmiş ilaçları hem atılım ve metabolizmadan korumaları hem de bariyerlere zarar vermeden kan-beyin bariyeri boyunca aktif ajanlar sağlamadaki potansiyelleri nedeniyle merkezi sinir sistemi ilaç iletimi için umut verici taşıyıcılar olduğu gösterilmiştir (Jain 2011). Polimer nanopartikül teknolojisi, terapötik moleküllerin kan-beyin bariyeri boyunca iletilmesinde önemli bir vaat gibi görünmektedir (Jain 2016; Jain 2017c).

2.8.3. Nörokoruma için nanopartiküller

Bazı nanopartiküllerin, nörolojik yenilenme ile birlikte nörolojik bozuklukların yönetimi için önemli olan nöroprotektif bir etkisi bulunmaktadır. Kuantum nokta teknolojisi, merkezi sinir sisteminin reaktif gliosis sürecini inceleyerek yaralanmaları veya dejeneratif olayları takiben nöronal rejenerasyona nasıl yatkın hale geldiği hakkında bilgi toplamak için kullanılmıştır (Posadas *et al.* 2010; Jain 2011; Pinto *et al.* 2017). Nöronların

koruyucu hücreleri olan glial hücreleri, yaralanmaları takiben reaktif olmaları için tetiklenebilecek kendi iletişim mekanizmalarına sahiptir. Kuantum noktaları, glial aktiviteleri izlemek için nörobilimciler tarafından kullanımı kolay veri yakalama aygıtları oluşturmak için kullanılmaktadır. Diğer araştırmalar kuantum noktalarına biyoaktif moleküller ekleyerek kuantum noktalarının nöritlerin büyümesini nasıl teşvik edebileceğini araştırmaktadır. Bu şekilde, bu büyümeyi yönlendirilmiş bir şekilde teşvik edecek bir ortam sağlamak mümkün olabilecektir (Posadas *et al.* 2010; Jain 2011; Pinto *et al.* 2017).

2.9. Nanokardiyoloji

Nanokardiyoloji, nanobiyoteknolojinin kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisinde uygulanmasıdır. Bu alanın önemli uygulamaları, teşhis, hedefe yönelik ilaç sunumu ve kardiyovasküler hastalıkların rekonstrüktif cerrahisidir (Chang *et al.* 2013; Cheng *et al.* 2014).

2.9.1. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ile teşhisi birleştirmek

Perflorokarbon nanopartikülleri, kardiyovasküler bozukluklarda moleküler görüntüleme ve lokal ilaç dağıtımını birleştirmek için önemli bir fırsat sağlamaktadır. Monoklonal antikolar ve peptitler gibi ligandlar, vaskülatür içinde eksprese edilen biyolojik belirteçlere aktif hedeflemeyi sağlamak için perflorokarbonun dış yüzeyine çapraz bağlanmaktadır (Clemons *et al.* 2014; Courties *et al.* 2014). Perflorokarbon nanopartikülleri, benzer epitoplara eksprese eden sirkülasyon hedefli olmayan dokularla doğal olarak sınırlandırılır. Hedefe yönelik perflorokarbon nanopartiküllerin kullanımı, yırtılmış plakların teşhisi ve aterosklerotik plakların belirlenmesi ve antianjiyogenik tedavisi dahil olmak üzere hayvan modellerinde çeşitli uygulamaları gösterilmiştir (Jain 2011). Perflorokarbon nanopartiküller ve lipozomlar, fokal anjiyogenezin moleküler manyetik rezonans görüntülemesi için integrin hedefli paramanyetik kontrast ajanları olarak kullanılabilmektedir. Hedefe özgü tasarlanmış perflorokarbon nanopartikülleri

ayrıca moleküler görüntüleme ile kombinasyon halinde lokal ilaç sunumu için fırsat sunmaktadır (Feng *et al.* 2007; Floriano *et al.* 2009; Evans *et al.* 2016).

Kararsız plakların teşhisi ve tedavisi, nanoteknolojinin derhal etkili olabileceği bir alandır. Fibrin spesifik perflorokarbon nanopartikülleri, kalp krizi veya felci önlemek için gelecekteki stratejilerin önemli bir özelliği olabilecek duyarlı hastalarda dengesiz plakların tespitine izin vermektedir (Johnson *et al.* 2010; Hardy *et al.* 2015). Risk altındaki hastaların invazif olmayan tespiti için plak bileşenlerini hedefleyen problemler geliştirmeyi amaçlayan araştırmalar devam etmektedir. Bu yaklaşımın doğrultusunda; hedeflenmiş nanopartiküller, çok işlevli makromoleküller veya nanoteknoloji bazlı cihazlar spesifik bir bölgeye terapi sunmakta ve böylece lokalize ilaç salımı pasif veya aktif olarak elde edilmektedir (Kumar *et al.* 2010; Leuschner *et al.* 2011). Ayrıca, hedeflenmiş nanopartiküller veya cihazlar, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinler gibi bir materyali uzaklaştırarak hassas plakları stabilize edebilmektedir. Kararsız plaklara bağlanabilen, hastaları ve acil sağlık hizmetlerini plak hasarı hakkında uyararak cihazlar tıbbi müdahalenin zamanında yapılmasını kolaylaştıracaktır.

2.9.2. Kardiyovasküler hastalıklarda hedefe yönelik ilaç taşınımı

Hedefe özgü kardiyovasküler ilaç verilmesi için nanocihazları kullanan hedefleme sistemlerinin tasarım ve mühendisliğinde yüksek afiniteli ligand-reseptör etkileşimleri kullanılmıştır. Bahsedilen uygulamanın bir örneği; trombosit aktivasyonunun, yapışmanın ve toplanmanın vasküler trombotik olaylarla yakından ilişkili olduğu bir durum olan aterotromozdur (Feng *et al.* 2007; Saraste *et al.* 2009). Bu nedenle, antitrombotik tedavilerin çoğu trombosit aktivasyon yollarını engelleyen veya ligand bağlayıcı trombosit integrinlerini bloke eden ilaçlara odaklanmıştır (Jain 2011). Bu tedavilerin makul klinik etkinliğine rağmen, hemostatik dengeyi etkilemeden patolojik olarak trombotik ortamı seçici olarak hedef alan tek bir ilaç ve dağıtım sistemi bulunması zordur. Bir nano ölçekli cihaz tarafından taşınan bir anti-integrin/anti-koagülan/anti-enflamatuar ilaç kombinasyonunun kullanılması, patolojik trombojenizin çok faktörlü yapısını tedavi etmek için gerekli olmaktadır (Patra and Barui 2013; Tomkowiak *et al.*

2011). İlâveten, nanolipozomlar da kardiyovasküler terapötiklerin verilmesi için trombosit hedefli cihazlar olarak kullanılmaktadır.

2.9.3. Restenoz tedavisinde nanobiyoteknolojinin rolü

Restenoz (bir atardamarın tekrar kapanması veya daralması) koroner stentler ve balon anjiyoplasti prosedürleriyle ilgili bir endişe olduğu düşünülmektedir. Bir stentin yüzeyinden ayrışan antiproliferatif bileşiklerin kullanılmasıyla ilaç salınımlı yeni nesil stentler, restenoz oranlarında önemli bir azalma sağlamıştır. İlaç salma stentleri için nanokaplama tekniklerinin kullanılmasının yanısıra biyobozunur nanopartiküllerin içine alınmış antiproliferatif ilaçların lokal olarak verilmesi restenozun önlenmesi için umut vaat ettiğini göstermiştir (Brito *et al.* 2007; Feng *et al.* 2007; Jain 2011).

Endotel hücrelerinin tehlikeli skar dokusu oluşturmada stentlere daha iyi bağlanmasını sağlayacak olan yeni malzemelere ihtiyaç vardır. İdeal olarak, endotel hücreleri stentlere hızlı bir şekilde bağlanmalı ve sadece bir hücre katmanı kalınlığında bir kaplama oluşturmalıdır. Nano yapıdaki titanyum stentler, proteinlerin ve doğal dokuların yüzey özelliklerini taklit ederek normal titanyumdan yapılan stentlere kıyasla hücrelerin daha iyi yapışmasını sağlamaktadır (Brito *et al.* 2007; Feng *et al.* 2007; Jain 2011).

2.9.4. Doku mühendisliği ve kardiyovasküler sistemin rejenerasyonu

Nanoteknoloji, kan damarlarının, miyokardın ve miyokard kapaklarının onarımını ve değiştirilmesini kolaylaştırabilir. İskemik kalp hastalığı için terapötik anjiyogenez gibi rejeneratif süreçleri uyarmak için de kullanılabilir. Hücresel fonksiyon bütünsel olarak morfoloji ile ilişkilidir. Bu nedenle doku mühendisliğinde hücre şeklini kontrol etme yeteneği nihai ürünlerde uygun hücresel işlevi sağlamak için esastır (Nesti *et al.* 2008; Paul 2015). Kan damarlarında ve organlarda doku onarımı ve yenilenmeyi yönlendirmek için hassas bir şekilde oluşturulmuş nano iskele ve mikro iskele gereklidir. Nanofiber ağlar, özellikle küçük çaplı sentetik greftlerde yaygın olan açıklık problemlerini önlemek için üstün mekanik özelliklere sahip vasküler greftleri sağlamaktadır (Zhang *et al.* 2010;

McMurray *et al.* 2011). Sitokinler, büyüme faktörleri ve anjiyojenik faktörler, biyolojik olarak parçalanabilir nanopartiküller içinde kapsüllenmekte ve doku yenilenmesini arttırmak için doku iskeleleri ve substratlara yerleştirilmektedir. Hücresel matrisleri taklit edebilen iskeleler, yeni kalp dokusunun büyümesini ve doğrudan revaskülarizasyonu stimüle edebilmelidir (Jain 2011).

2.10. Nanocerrahi

Ameliyatların makrocerrahiden mikrocerrahiye evrimleşmesi nanocerrahi denilen bir alanı ortaya çıkarmaktadır. Nanoteknoloji minyatürize edilmiş biyosensör cihazların yapımında önemli bir rol oynayacaktır. Bu sensörler sonuçları iyileştirmekte, riski azaltmakta ve cerraha gerçek zamanlı veri sağlayarak maliyetleri kontrol etmeye yardımcı olmaktadır (Nair *et al.* 2010).

Cerrahide lazerlerin piyasaya sunulması insan el cihazlarının kapasitelerinin ötesinde manipülasyonlara olanak sağlayarak cerrahi ve deneysel biyolojik prosedürleri geliştirmiştir. Lazer mikrocerrahisi son zamanlarda nanoölçekli lazer cerrahisine dönüşmektedir (Ni *et al.* 2015; Nevala *et al.* 2016). Nanosaniye veya milisaniye darbeleriyle aynı yoğunluğu elde etmek için hücrenin tahrip olacağı çok daha fazla enerji gerekmektedir. Bu teknoloji, iz bırakmadan ameliyat yapmak veya belki de deri yoluyla ilaç dağıtmak için geliştirilebilir (Nevala *et al.* 2016). Yakın kızılötesi femtosaniye lazer darbeleri, canlı hücrelerdeki floresan etiketli yapılar üzerine mikroskopi ve nanocerrahi kombinasyonunda uygulanmıştır. Femtolaser teknolojisi halihazırda kornea ameliyatında kullanılmaktadır (Jain 2011; Jain 2017a).

2.11. Nanorobotik

Robotik bilimi zaten yaşam bilimleri ve tıptaki uygulamalar için kullanılmaktadır. Robotlar rutin cerrahi prosedürleri gerçekleştirmek için programlanabilirler. Nanobiyoteknoloji robotik alanında başka bir boyut ortaya koymakta ve bu da nanobotlar olarak adlandırılan nanorobotların gelişimine yol açmaktadır (Martel *et al.* 2009; Douglas

et al. 2012). Bir cerrah tarafından programlanan bir cerrahi nanobot, insan vücudunun içinde otonom bir cerrah olarak hareket edebilir. Patolojiyi araştırmak, tanı koymak ve nanomanipülasyon ile lezyonun giderilmesi veya iyileştirilmesi gibi çeşitli fonksiyonlar bir bilgisayar tarafından gerçekleştirilebilmekte ve koordine edilebilmektedir. Bir zamanlar bilim kurgu olan bu kavramların şimdi olasılık alanı içinde olduğu düşünülmektedir. Nanobotlar, insan elinin manipülasyon kabiliyetinin ötesinde hassas bir şekilde hücre içi cerrahi işlem gerçekleştirme yeteneğine sahip olacaktır (Watson *et al.* 2009; Jain 2011).

2.12. Kişiselleştirilmiş Tıbbın Gelişmesinde Nanobiyoteknolojinin Rolü

Bireyselleştirilmiş terapi olarak da adlandırılan kişiselleştirilmiş tıp, tedaviye yanıtı etkileyen hem genetik hem de çevresel faktörleri göz önünde bulundurarak, bireye en uygun spesifik tedavilerin ve terapötiklerin uygulanmasını ifade etmektedir (Jain 2009d; Jain 2015). Genomik/proteomik teknolojileri kişiselleştirilmiş ilaçların geliştirilmesini kolaylaştırmıştır. Ayrıca, metabolomik gibi diğer teknolojiler de bu alandaki gelişmelere katkı sağlamıştır (Tripathi *et al.* 2015; Srivastava *et al.* 2016). Nanobiyoteknoloji bu teknolojilerin çoğunun geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Kişiselleştirilmiş tıp, hastalıkların patomekanizmasını anlamak ve hasta yönetimi anlayışını iyileştirmek için yeni biyoteknolojileri tıp uygulamalarına entegre etmenin en iyi yoludur. Nanobiyoteknoloji alanındaki gelişmeler; moleküler tanı/moleküler görüntülemeye mevcut sınırların genişletilmesinin yanısıra ve tanı ve tedavinin entegrasyonu noktalarında kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesini kolaylaştıracaktır (Jain 2009).

Hedefe özgü ilaç dağıtımı ve ilaç etkilerinin etkin şekilde izlenmesini sağlayan nanoteknoloji tabanlı cihazlar kişiselleştirilmiş ilacın gelişimine katkıda bulunmaktadır. Kanser tedavilerinin kişiselleştirilmesi moleküler düzeyde hastalığın daha iyi anlaşılmasına dayandığından dolayı nanoteknoloji bu alanda önemli bir rol oynamaktadır. Nanobiyoteknoloji ile keşfedilen biyobelirteçler, hastaların bireysel moleküler profillerine dayanarak kanseri teşhis ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kanser

tedavisinin kişiselleştirilmesinin en önemli özelliği, aynı nanopartiküllerin tanı ve tedavi için birlikte kullanılabilmesidir (Jain 2009e; Kwon *et al.* 2015; Pinto *et al.* 2017).

Kardiyovasküler tanının geleceği hem patolojiyi teşhis edebilen hem de hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemleriyle tedavi edebilen nanosistemlerden etkilenmektedir. Hem görüntüleme hem de kardiyovasküler hastalıklara ait terapötik ajanların hedefe yönelik olarak verilmesi için nanopartiküllerin çift amaçlı kullanımı bireyselleştirilmiş terapötikler için umut vaat etmektedir (Jain 2015; Jain 2017a).

2.13. Nanopartiküllerin Güvenlik Sorunları

Doğal nanopartiküller, nanoteknoloji çağından çok önce çevremizde vardı. Ancak, nanopartiküllerin atmosfere salınmasına neden olabilecek uygulamalar arttığı için günümüzde bu nanoyapıların güvenlik sorunlarını göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Nanopartiküllerin terapötik özelliklerindeki üstün başarısı küçük boyutlarından kaynaklanmaktadır. Bu özellik de onların olağan inorganik malzemelerin büyük parçacık yapıları nedeniyle vücudumuza girmediği kısımlara girebilmelerini sağlamaktadır. Bu durum, vücudun istenmeyen hedef bölgelerine girebilen küçük partiküllerin toksisitesine sebep olabilmektedir (Jain 2009; Jain 2011; Jain 2015; Jain 2017a).

2.13.1. İnsan vücudunda nanopartiküllerin akıbeti

Teneffüs ettikten sonra ince ve ultra ince parçacıklar akciğerlerin farklı doku bölümlerine nüfuz edebilir ve sonunda kapilerlere ve dolaşımdaki hücrelere veya bileşenlere (örneğin eritrositlere) erişebilir. Daha sonra bu parçacıklar, dolaşım aracılığıyla karaciğer, dalak, böbrekler, kalp ve beyin dahil olmak üzere diğer organlara geçebilir (Jain 2006; Jain 2008). Sıçanlar üzerinde parçacık büyüklüğünün küresel şekilli altın nanopartiküllerin *in vivo* doku dağılımı üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan kinetik çalışmalar, altın nanopartiküllerinin çoğunun karaciğerde ve dalakta yoğunlaştığını göstermektedir (Jain 2011; Jain 2012). 10 nm boyutundaki partiküllerin ve daha büyük boyutlu partiküllerin dağılımı arasında belirgin bir fark gözlenmiştir. 10 nm boyutundaki partiküller kan,

karaciğer, dalak, böbrek, testis, timus, kalp, akciğer ve beyin gibi çeşitli organ sistemlerinde bulunurken, daha büyük boyutlu partiküller sadece kanda, karaciğerde ve dalakta tespit edilmiştir. Küçük boyutlu nanopartiküller daha uzun süre dolaşımda bulunabilir ve bazı durumlarda beyne yerleşmek için kan beyin bariyerini geçebilirler (Jain 2011; Jain 2013; Jain 2014). Böylece, vücuttaki ortalama bir inorganik mineralin ulaşamadığı yerlere girebilir, kılcal damarlardan sızabilir ve hücreler arasındaki sıvılara ulaşabilirler. Bu etkiler, kanserde nanopartikül bazlı tedavinin hedefe yönelik verilmesi durumunda endişe nedeni olmayabilir. Nanopartikül bazlı tedaviyi kullanmanın nihai kararı, risk-fayda değerlendirmesine bağlı olabilir (Jain 2009a; Jain 2017b).

2.13.2. Nanopartiküllerin insan sağlığına etkisi

Günümüzde insanlar, hayatın pek çok alanında günlük olarak kayda değer miktarda nanopartikül solumaktadır. Nanopartiküller endüstriyel işlemlerde giderek daha fazla kullanıldığı için toksisite ve hava kirliliğinin sağlığa olumsuz etkileri üzerine katkıda bulunan önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (Oberdorster 2004; Oberdorster *et al.* 2005; Li *et al.* 2016). Küçük boyutları, geniş bir yüzey alanı ve reaktif oksijen türleri üretebilme yeteneğine sahip olması, nanopartiküllerin akciğer hasarına neden olmasında rol oynamaktadır.

Nanopartiküllerin biyolojik etkileri boyutuna, kimyasal bileşimine, yüzey yapısına, çözünürlük, şekil ve kümelenmesine bağlıdır. Bu parametreler hücresel alım, protein bağlanması, maddelerin giriş bölgesinden hedef bölgeye translokasyonu ve doku hasarına neden olma olasılığını değiştirebilir (Oberdorster 2004; Oberdorster *et al.* 2005; Li *et al.* 2016). Nanopartiküllerin etkileri, tanısal ve terapötik amaçlar için gastrointestinal sistem, cilt, akciğer ve sistemik uygulamayı içeren maruz kalma yollarına bağlıdır. Nanopartiküllerin hücreler, vücut sıvıları ve proteinlerle etkileşimleri biyolojik etkilerinde ve vücutta dağılma yeteneklerinde rol oynamaktadır. Nanopartikül yüzeyindeki hızlandırılmış protein denatürasyonu veya bozulması, enzim fonksiyonunda fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olabilir (Jain 2015; Jain 2017c).

Partiküllerin insan sağlığı üzerindeki etkileri daha önce toksikologlar tarafından araştırılmıştır. İmplantların vücutta aşınması sonucu oluşan daha büyük partiküllerin ve her boyuttaki aerosol haline getirilmiş partiküllerin etkileri incelenmiştir. Solunan partiküllerin çoğu sistemik dolaşıma girmekte ve eğer boyutları 50 nm'den büyükse idrarla atılmaktadırlar (Park *et al.* 2009; Li *et al.* 2016). Bununla birlikte, hücrelere girebilen 50 nm altındaki daha küçük nanopartiküllerin sağlığa etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Nanopartiküllerin canlı vücudu üzerindeki etkileri hakkında hala cevaplanmamış pek çok soru vardır. Kullanılan malzemelerin çeşitliliği ve nanopartiküllerin boyutlarındaki geniş çeşitlilik nedeniyle bu etkiler değişmektedir. Bazı malzemelerin belirli boyutlarının toksik etkilere yol açabileceği düşünülmektedir (Berlo *et al.* 2012; Li *et al.* 2016). Bu veriler doğrultusunda, nanopartiküllerin güvenliği hakkında kategorik bir açıklama yapılması ve nanopartiküllerin tamamen güvenli olduğu veya tehlikeli olduğunun söylenmesi çok doğru bir yaklaşım olarak görülmemektedir.

2.13.3. Nanopartiküllerin toksisite sorunlarını çözme önlemleri

Mevcut araştırmalar, bir nanopartikülün toksisitesinin derecesini kontrol etmenin yollarını bulmaya odaklanmaktadır. Bu kontrol, partikülün kanseri tedavi etme gibi istenen bazı durumlar altında toksik olabileceği anlamına gelmektedir. Hedefe yönelik dağıtım ve parçalanabilir nanopartiküllerin kullanımı toksisite ile ilgili bazı sorunların üstesinden gelmektedir (Jain 2014; Jain 2015; Jain 2017a).

2.14. Nanobiyoteknolojinin Gelecek Beklentileri

Gelecek on yılda, vücuda karşı toksisitelerini azaltmak için nanopartiküllerin nasıl kaplanacağını veya kimyasal olarak nasıl değiştirileceğinin daha iyi anlaşılması hastalık teşhisi ve ilaç sunumu için kullanımlarının genişlemesini sağlayacaktır. Ayrıca, nanocihazlar tedavilerin daha etkili bir şekilde uygulanması için hastalık mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına imkân sağlamaktadır (Jain 2013; Jain 2014; Jain 2015). Nanobiyoteknoloji, hastalık sebeplerini iyileştirmek amacıyla hücre düzeyinde terapötik müdahaleler sağlamaktadır. Bir insan hücresinden çok daha küçük olan nanoölçekli

bilgisayar kontrollü moleküler araçların yapımı ve bu sayede spesifik ilaç moleküllerinin oluşturulması mümkün olmaktadır. Son olarak, nanobiyoteknoloji kişiselleştirilmiş tıbbın uygulanması için birçok araç sağlamaktadır (Jain 2014; Jain 2015; Jain 2017a).

2.15. Nanopartikül Sentez Yöntemleri

Nanopartikül sentezi için genel olarak bottom up (aşağıdan yukarıya) ve top down (yukarıdan aşağıya) olmak üzere iki yaklaşım önerilmiştir. Top-Down (yukarıdan aşağıya yaklaşımı), büyük makroskopik partiküllerin aşınmasını veya yıpranmasını içerir. Bu yaklaşım başlangıçta büyük ölçekli desenlerin sentezlenmesini ve ardından plastik deformasyonla nanoölçekli seviyeye indirgenmesini içermektedir. Bu teknik, nanopartiküllerin büyük ölçekli üretimlerinde pahalı ve yavaş bir süreç olduklarından dolayı tercih edilmemektedir (Arasu 2010). İnterferometrik litografi tekniği (IL) nanomalzeme sentezi için top-down (yukarıdan aşağıya) uygulamalarında kullanılan en yaygın tekniktir (Vitor *et al.* 2015). Bu teknik, nanopartiküllerin minyatürize edilmiş atomik bileşenlerinden kendinden montaj yoluyla sentezini içermektedir. İnterferometrik litografi tekniği, fiziksel ve kimyasal yollarla oluşumlarını içermelerinden dolayı nispeten ucuz bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem kinetik ve termodinamik denge yaklaşımı ilkelerine dayanmaktadır (Imtiaz *et al.* 2017). Kinetik yaklaşım, moleküler ışın epitaksisini (molecular beam epitax) içinde barındırmaktadır.

Nanopartiküllerin biyosentezi, mikroorganizmalar ve biyomedikal uygulamalara sahip bitkiler kullanılarak nanopartiküllerin sentezlenmesi yaklaşımıdır. Bu sentez yaklaşımı; uygun maliyetli, çevre dostu, biyo-uyumlu, güvenli ve yeşil bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır (Abdul *et al.* 2014). Bakteriler, funguslar ve bitkiler aracılığıyla nanopartiküllerin sentezlenmesi yeşil sentez olarak da adlandırılmaktadır. Yeşil sentez yaklaşımı ile ZnO partiküllerinin büyük ölçekli üretimlerine izin vermektedir (Yuvakkumar *et al.* 2014). Biyomimetik yaklaşımlar aracılığıyla sentezlenen nanopartiküller daha fazla katalitik aktivite göstermektedirler. Ayrıca, yeşil sentez yaklaşımı sentez sürecinde pahalı ve toksik kimyasalların kullanımını ortadan kaldırmaktadır (Agarwal *et al.* 2017). Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan bu doğal

suşlar ve bitki özütleri hem indirgeyici ajan hem de capping veya dengeleyici ajan gibi davranan bazı fitokimyasallar salgılamaktadır.

Gerçekleştirilen bir çalışmada, *Aspergillus fumigatus* TFR-8 suşu kullanılarak 1.2 ila 6.8 nm arasında değişen ebatlarda küresel ve altıgen şekilli ZnO nanopartikülleri sentezlenmiştir (Holmes *et al.* 2003). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada, Mannar Körfezi'nden elde edilen bir deniz yosunu olan *Sargassum myriocystum*'dan (mikroalg) 36 nm boyutlarında ZnO nanopartikülleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Bu çalışmaya ait FTIR sonuçları ile, mikroalgden salgılanan fukoidan çözünür pigmentlerin NP'lerin indirgenmesinden ve stabilizasyonundan sorumlu olduğu doğrulanmıştır (Agarwal *et al.* 2017).

Kökler, yapraklar, saplar, tohumlar, meyveler gibi bitkinin farklı kısımları, ekstraktları hem indirgeyici hem de stabilizasyon maddesi olarak işlev gören fitokimyasallar bakımından zengin olduğu için nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılmıştır (Gnanajobitha *et al.* 2013; Nagajyothi *et al.* 2014; Zong *et al.* 2014; Xiao *et al.* 2016; Rajeshkumar *et al.* 2016). *Trifolium pratense* çiçek ekstraktı kullanılarak ZnO nanopartikülleri sentezlenmiş ve UV-Vis spektrofotometre aracılığıyla oluşan nanopartiküllerin stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Dobručka and Długaszewska 2016). Benzer şekilde, *Rosa canina*'nın meyve özütünün, sentezlenmiş ZnO NP'leri için hem indirgeyici hem de dengeleyici ajan olarak rol aldığı FTIR çalışmaları ile doğrulanmıştır (Agarwal *et al.* 2017).

Yeşil yöntemlerin artan popüleritesi nedeniyle, ZnO nanopartiküllerini bakteri, mantar, alg ve bitki özütleri gibi farklı doğal kaynaklar kullanarak sentezlemek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Demir 2015).

Ürettikleri özel fitokimyasallar nedeniyle kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum gibi bitki kısımları ZnO nanopartiküllerinin sentezini gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Nanopartikül sentezinde bitki kısımlarının doğal özütlerini kullanmak oldukça çevre dostu ve ucuz bir işlemdir. Ayrıca; sentez süresinin kısa olması ve maliyetli ekipman ve

ilave kimyasal madde kullanımı gerektirmemesi bu yöntemin önemli avantajlarından (Heinlaan *et al.* 2008). Değişik şekillerde ve boyutlardaki nanopartiküllerin büyük ölçekli ve kararlı üretimine öncülük ettiklerinden dolayı bitkiler nanopartikül sentezinde en çok tercih edilen doğal kaynaklar olmuşlardır (Qu *et al.* 2011). Biyoredüksiyon, bitkilerden salgılanan polisakkaritler, polifenolik bileşikler, vitaminler, amino asitler, alkaloidler, terpenoidler gibi fitokimyasalların yardımıyla metal iyonlarının veya metal oksitlerin 0 değerlikli metal nanopartiküllerine indirgenmesini içermektedir (Heinlaan *et al.* 2008; Qu *et al.* 2011). ZnO nanopartiküllerinin yaprak veya çiçeklerden basitçe veya kolayca hazırlanması için en yaygın olarak kullanılan yöntem, bitki kısmının musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra iki kez saf su kullanılarak sterilize edildiği yöntemdir. Daha sonra sırasıyla, bitki kısımlarının oda sıcaklığında kurutulması, ağırlıklarının tartılması ve havan kullanılarak bitki kısımlarının öğütülmesi aşamaları bulunmaktadır. İstenilen konsantrasyona göre bitki kısımlarına distile su eklenerek karışımın manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılması sağlanmaktadır (Heinlaan *et al.* 2008; Qu *et al.* 2011; Ochieng *et al.* 2015; Rajeshkumar *et al.* 2016). Çözelti, Whatman filtre kâğıdı kullanılarak süzülür ve elde edilen berrak çözelti sentez çalışmalarında bitki özütü olarak kullanılmaktadır. Takip edilen bu yöntemde sıcaklık, pH, ekstrakt konsantrasyonu ve kaynatma süresi gibi parametrelerde optimizasyon gerçekleştirilebilmektedir. İnkübasyon süresi karışımın renginin sarıya dönüşmesine neden olmakta ve bu değişim görsel olarak nanopartiküllerin sentezlendiğini işaret etmektedir (Ochieng *et al.* 2015; Rajeshkumar *et al.* 2016). Daha sonra nanopartikül sentezinin başarılı olduğunu doğrulamak için UV-Vis spektrofotometrisi kullanılmaktadır. Ayrıca, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve X-ışınının Enerji Dağılım Analizi (EDAX) teknikleri kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir (Rajeshkumar *et al.* 2016).

Lamiaceae familyasına ait bitkiler; *Anisochilus carnosus* (Anbuvaran *et al.* 2015), *Plectranthus amboinicus* (Fu and Fu 2015) ve *Vitex negundo* (Ambika and Sundrarajan 2015) gibi kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve küresel, yarı küresel, altıgen, çubuk şeklindeki aglomeralar gibi değişik boyutlarda ve şekillerde nanopartikül oluşumu gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmadan elde edilen sonuçlar, sentezlenen

nanopartiküllerin bitki ekstraktının artan konsantrasyonu ile boyutunun azaldığını göstermiştir (Anbuvarannan *et al.* 2015; Fu and Fu 2015; Ambika and Sundrarajan 2015). Bu çalışmaya ait karakterizasyon sonuçları, FE-SEM, TEM, XRD gibi farklı tekniklerle gözlemlenen boyut aralıklarının da benzer aralık değerlerine sahip olduğunu göstermiştir (Fu and Fu 2015; Ambika and Sundrarajan 2015). Çalışmaya ait SEM ve EDAX analizleri benzer sonuçlar göstermiştir. *Vitex negundo*'nun yaprak ve çiçek ekstraktlarından sentezlenen nanopartiküller Debye-Scherrer denklemi ile hesaplanmış ve XRD analiziyle teyit edilen 38.17 nm'lik benzer bir boyut göstermiştir (Ambika and Sundrarajan 2015). Meliaceae familyasından *Azadirachta indica*'nın yaprakları ZnO nanopartiküllerinin sentezi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bhuyan *et al.* 2015; Madan *et al.* 2016). Bu çalışmalarda; nanopartiküllerin oluşumunda alkol, amid, amin, alkan, karboksilik asit ve karbonat gruplarının rol aldığı FTIR çalışmaları ile doğrulanarak açıklığa kavuşturulmuştur (Qian *et al.* 2015; Ali *et al.* 2016).

ZnO, n-tipi bir yarı iletken metal oksittir. Çinko oksit nanopartikülü; elektronik, optik ve biyomedikal alanındaki geniş uygulama yelpazesi nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmuştur (Gunalan *et al.* 2012; Anbuvarannan *et al.* 2015). Metal oksit nanopartiküller içerisinde ZnO nanopartikülleri üretimleri ucuz, kolay ve güvenli olduğundan dolayı ayrı bir öneme sahiptir (Jayaseelan *et al.* 2012). ABD'de bulunan "Gıda ve İlaç İdaresi" (FDA), ZnO nanopartikülünü genellikle güvenli metal oksit kategorisinde sınıflandırmaktadır (Pulit *et al.* 2016). ZnO nanopartikülleri geniş bant aralığı nedeniyle mükemmel bir yarı iletken özellik (3.37 eV) sergilemektedir. Ayrıca, yüksek hızlı bağlanma enerjisi (60 meV), yüksek katalitik aktivite, optik, UV filtreleme, iltihap önleyici, yara iyileştirici gibi önemli özelliklere sahiptir (Sheikhloo *et al.* 2011; Sangeetha *et al.* 2011; Sherly *et al.* 2014; Elumalai and Velmurugan 2015; Patel *et al.* 2015; Mirzaei and Darroudi 2017). UV filtreleme özelliği sayesinde güneşten koruyucu losyonlar gibi kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wodka *et al.* 2010). İlaç salınımı, antikanser, antidiyabetik, antibakteriyel, antifungal gibi çok çeşitli biyomedikal uygulamalara sahiptir (Sangani *et al.* 2015). ZnO nanopartikülü, hedefe yönelik ilaç salınımı (drug delivery) gibi uygulamalarda kullanılmasına rağmen hala tam olarak aydınlatılmamış olan sitotoksikite sınırlamasına sahiptir (Ma *et al.* 2013). Yapılan

alışmalar neticesinde alınan sonuçlara göre; ZnO nanopartiküllerinin gram negatif ve gram pozitif bakteri konsantrasyonunda çok güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Hazra *et al.* 2013; Vimala *et al.* 2014). İlavenen, biyosentetik olarak sentezlenmiş ZnO nanopartikülleri, kimyasal olarak sentezlenen ZnO nanopartiküllerinden daha güçlü antibakteriyel etki gstermiştirler (Hazra *et al.* 2013; Vimala *et al.* 2014). Aynı zamanda kauçuk üretimi, boya, sudan kükürt ve arseniğin uzaklaştırılması, protein adsorpsiyonu ve diş uygulamalarında kullanılmıştır. ZnO nanopartikülleri avantajlı piezoelektrik ve piroelektrik özelliklere de sahiptir (Jha 2007; Nagajyothi *et al.* 2014). ZnO nanopartiküllerinin; çeşitli alanlarda kullanılabilen nanopul, nanoçiçek, nanokemer, nanoçubuk ve nanotel gibi farklı morfolojilerinin olduğu da bilinmektedir (Paulkumar *et al.* 2013; Rajeshkumar *et al.* 2014).

2.16. Biyosentez Sonrası Güvenlik Testleri

2.16.1. Ames/Salmonella test sistemi

Mutasyonları indükleyebilen maddelerin tanımlanması güvenlik değerlendirmesinde önemli bir prosedür haline gelmiştir. Mutasyonları tetikleyebilen kimyasallar, gelecek nesillerde üreme problemlerine ve mutasyonlara yol açarak üreme hücrelerine zarar verebilir. Mutajenik kimyasalların kanseri indkleyebilme endişesi mutajenik test programlarının çoğunu yönlendirmektedir. Mutasyonlar; sadece tek bir bazın modifiye edildiği gen (nokta) mutasyonları veya bir veya nispeten az bazın eklendiği veya silindiği DNA'nın büyük delesyonları veya yeniden düzenlemeleri, kromozom kırıkları veya yeniden düzenlemeleri, bütün kromozomların kazanım veya kaybı şeklinde meydana gelebilir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

Gen mutasyonları bakteri ve diğer hücre sistemlerinde hücrenin büyüme gereksinimlerinde bir değişikliğe neden olduklarında kolayca ölçülürken, memeli hücrelerinde kromozom hasarı tipik olarak kırılma veya yeniden düzenleme için hücrenin kromozomları büyütme altında gözlemlenerek ölçülmektedir. *Salmonella typhimurium*/microsome assay (*Salmonella* test; Ames test) deneyi, gen mutasyonlarına

yol açan genetik hasar üretebilecek maddeleri tanımlamak için yaygın olarak kabul edilen kısa süreli bir bakteri deneyidir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000). Bu yöntemde önceden var olan bakterilerin gerekli aminoasit ve histidinleri sentezlemesini önleyen ve böylece büyümesini ve koloni oluşturmalarını engelleyen mutasyonlara sahip bir dizi *Salmonella* suşu kullanılmaktadır. Bu önceden var olan mutasyonların bölgesinde veya genlerin yakınında bulunan yeni mutasyonlar, genin fonksiyonunu geri yükleyerek hücrelerin histidini sentezlemelerine izin vermektedir. Böylece mutasyona uğramış yeni hücreler, histidin yokluğunda büyümekte ve koloniler oluşturmaktadır. Bu sebepten dolayı bu yöntem genellikle “tersine çevirme” olarak adlandırılmaktadır (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

Testte kullanılan *Salmonella* suşları, histidin operonunda çeşitli genlerde farklı mutasyonlara sahiptir. Bu mutasyonların her biri, farklı mekanizmalara karşı etki eden mutajenlere duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca, çok çeşitli maddelere karşı daha duyarlı olmaları için bu türlere ilave mutasyonlar eklenmiştir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

Salmonella mutajenite testi, kimyasal olarak indüklenen mutajenezin saptanması için özel olarak tasarlanmıştır. Yıllar geçtikçe, bu yöntemin değeri bilim toplulukları, devlet kurumları ve şirketler tarafından anlaşılmıştır. Ames testi, mutajenik bir cevap elde edildiğinde karsinojenite hakkında oldukça yüksek bir tahmini değer sunduğu için dünya genelinde yeni kimyasalların ve ilaçların mutajenik potansiyelini belirlemek amacıyla bir başlangıç yöntemi olarak kullanılmaktadır (Mortelmans and Riccio 2000). İlaçlar ve biyositler de dahil olmak üzere birçok kimyasal maddenin tescili veya kabulü için verilerin düzenleyici kurumlara sunulmasından önce test prosedürlerinin eşitliğini sağlamak için şirketler ve test laboratuvarları tarafından kullanılmak üzere uluslararası kılavuzlar geliştirilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000).

2.16.2. *Escherichia coli* WP2 test sistemi

Escherichia coli WP2 suşları ile birlikte bakteri triptofan ters mutasyon testi, bazı laboratuvarlar tarafından Ames *Salmonella* testi ile birlikte kimyasalların mutajenik aktivitelerini araştırmak için kullanılmaktadır. Ayrıca, *E. coli* WP2 testi düzenleyici kurumlara veri sunumu için *Salmonella* testi ile birlikte önerilmektedir. Bu mutajenlik analizlerinin gerçekleştirilmesi için ulusal ve uluslararası kurallar ajanslar tarafından belirlenmektedir (Mortelmans and Riccio 2000).

Yukarıda belirtilen kurallara göre, bir bakteriyel ters mutasyon test yöntemi hem *Salmonella* hem de *E. coli* WP2 suşlarının kullanımını ifade etmektedir. Histidin operonunda farklı benzersiz hedef DNA sekanslarına sahip olan *Salmonella* suşlarının aksine, en sık kullanılan dört WP2 suşu aynı triptofan markörü *trpE*'yi taşımaktadır. *E. coli* triptofan bağımlı bakteri ile gerçekleştirilen mutagenез tahlil prosedürleri, üst agara histidin yerine sınırlı triptofan eklenmesi haricinde Ames testinde *Salmonella* suşları için kullanılanlarla aynıdır (Mortelmans and Riccio 2000).

2.16.3. Maya delesyon testi (Yeast DEL Assay)

Maya delesyon testi, homolog intrakromozomal rekombinasyonla bozulan *his3* geninin ters çevrilme sıklığını ölçmek için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir. Histidin prototrofisine ters çevrilmesi, bozucu sekansın silinmesine neden olmaktadır. Maya delesyon testi, DNA'ya zarar veren maddelerin rekombinasyon sıklığı üzerindeki çeşitli etkilerini incelemek için kullanılmış ve bu yöntemin bakteriyel mutajenite ve diğer kısa süreli genotoksik analiz yöntemleri ile belirlenmesi zor olan kanserojenlere karşı yüksek hassasiyet ve özgüllük seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, Maya delesyon yöntemi genotoksisite ve karsinojenite çalışmalarında kullanılan tahmine dayalı testlerin çeşitliliğine katkı sağlamıştır (Brennan and Schiestl 2004; Howlett and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005).

2.16.4. RAPD

Moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler, neredeyse sınırsız sayıda DNA markırı ortaya çıkmasını sağlamıştır. DNA-bazlı markırlar genellikle DNA-bazlı polimorfizmi ortaya çıkarmada önemli bir avantaj sağlamaktadır. Halen, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi birçok türün genetik çeşitliliğinin ölçülmesinde ve genetik bağlantı haritası oluşturulmasında önemli bir seçenek olmuştur (Bardakcı 2001). Bununla birlikte, DNA polimorfizmini DNA hibridizasyonu ile birleştğinde kısıtlama enzimi sindirimi yoluyla tespit eden bir RFLP yöntemi genel olarak zaman alıcı ve zahmetlidir. 2000’li yıllarda, polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisi yaygın bir araştırma tekniği haline gelmiş ve DNA’nın seçici amplifikasyonuna dayanan birkaç yeni genetik analizin geliştirilmesine yol açmıştır (Erlich 1989). PCR’in bu popülaritesi temel olarak belirgin basitliği ve yüksek başarı olasılığından kaynaklanmaktadır. Ne yazık ki, DNA dizi bilgisine duyulan ihtiyaç PCR uygulamalarının sınırlı hale gelmesine sebep olmuştur. Herhangi bir genomda rastgele dağıtılmış bir lokus kümesini büyütme için rastgele primerlere sahip PCR’nin kullanılabileceği keşfi, çeşitli amaçlar için genetik markörlerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1990). Bu sayede RAPD tekniğinin basitliği ve uygulanabilirliği birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir. RAPD analizinin başarısının belki de en büyük nedeni, söz konusu türün genomunun klonlanması, dizilenmesi veya başka herhangi bir şekilde moleküler karakterizasyon gerektirmeksizin az miktarlarda DNA gerektiren çok sayıda genetik markırın elde edilmesidir (Bardakcı 2001).

Standart RAPD teknolojisi, düşük bağlanma sıcaklıklarında PCR ile toplam genomik DNA miktarlarını arttırmak için primer olarak rastgele dizilerin kısa sentetik oligonükleotitlerini kullanmaktadır. Amplifikasyon ürünleri genellikle agaroz jeller üzerinde ayrıştırılmakta ve etidyum bromür ile boyanmaktadır.

2.16.5. MTT

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi, MTT'nin mitokondriyal aktiviteyi belirleyen canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanmaktadır. Çoğu hücre popülasyonu için toplam mitokondriyal aktivite canlı hücrelerin sayısı ile ilişkili olduğundan dolayı bu yöntem maddelerin hücre hatları veya primer hasta hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkilerini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (van Meerloo *et al.* 2011).

MTT testinin genel amacı, ayrıntılı hücre sayımına ihtiyaç duyulmadan canlı hücrelerin nispeten yüksek verimlilikte (96 kuyucuklu plate) ölçülmesidir. Böylece bu yöntem, yaygın olarak farklı maddelerin çeşitli konsantrasyonlarda sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. MTT yönteminin prensibi, canlı hücrelerin çoğunda mitokondriyal aktivitenin sabit olduğu ve böylece canlı hücrelerin sayısındaki bir artışın veya azalmanın mitokondriyal aktivite ile doğrusal olarak ilişkili olduğu temeline dayanmaktadır. Bu yöntemle hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ve dolayısı ile canlılığı tetrazolyum tuzu olan MTT'nin homojen ölçüm için çözünebilen formazan kristallerine dönüştürülmesiyle belirlenir. Böylece, canlı sayısındaki herhangi bir artış veya azalma 540 ve 720 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunlukta yansıtılan formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle tespit edilmektedir. Maddelere karşı duyarlılık ölçümleri yapılırken, maddelerle inkübe edilmiş hücrelere sahip kuyucukların optik yoğunluk değerleri ile maddelere maruz kalmayan hücrelere sahip kuyucukların optik yoğunluğu karşılaştırılmaktadır (van Meerloo *et al.* 2011).

MTT yöntemi, primer hücrelerin yanı sıra yerleşik hücre hatlarında madde hassasiyetinin ölçümü için uygundur. Bölünen hücreler için hücre sayısındaki azalma hücre büyümesi inhibisyonunu yansıtmaktadır. Test maddesine karşı hassasiyet daha sonra genellikle muamele edilmemiş kontrolün büyümesine kıyasla %50 büyüme inhibisyonu elde etmek için gereken ilacın konsantrasyonu olarak belirtilmektedir (%50 inhibe edici konsantrasyon, IC₅₀). Primer hücreler için ilaç test maddesi duyarlılığı muamele edilmemiş hücrelerde yaygın olarak görülen hücrelerin kaybına kıyasla muamele edilmiş

hücrelerin hücre ölümündeki artış olarak ölçülmektedir (%50 öldürücü konsantrasyon, LC₅₀) (van Meerloo *et al.* 2011).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin temini

Bu çalışmada biyosentez aşamasında kullanılan *Symphoricarpos albus* bitkisi Atatürk Üniversitesi kampüsünden temin edilmiştir.

Çalışmanın RAPD aşamalarında bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen *Triticum aestivum* tohumlarının çimlendirilmesiyle elde edilen kök, gövde ve yapraklar kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattının temini

Bu çalışmada kullanılan fibroblast hücre hattı (HDFa) (ATCC® PCS-201-012™) Atatürk Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan mutant organizmalar

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535 (ATTC® Numarası: 29629) ve TA1537 (ATTC® Numarası: 29630) mutant bakteri suşları ATTC® (The American Type Culture Collection – Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A.)'den; *Escherichia coli* WP2uvrA (ATTC® Numarası: 49979) mutant bakteri suşu LGC Standarts (Middlesex, U.K.)'tan; *Saccharomyces cerevisiae* RS112 Prof. Dr. Robert H. Schiestl (Departments of Pathology, Environmental Health and Radiation Oncology, Geffen School of Medicine and School of Public Health UCLA, CA 90095, USA)'den sağlanmıştır.

3.1.4. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan ve doğrudan etki gösterebilen mutajenik ajanlardan sodyum azid (NaN_3) Sigma-Aldrich®’ten, 9-Aminoakridin (9-AA) Merck®’ten ve N-Metil-N’-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ABCR GmbH & Co. KG®’den temin edilmiştir. Bakteriyel mutajenite ve antimutajenite çalışmalarının çeşitli aşamalarında kullanılan kimyasal maddelerden D-glukoz (dekstroz) ve Nutrient Broth No.2 Oxoid®’ten; Nutrient Agar ve Bacto Agar Difco®’dan; L-triptofan, magnezyum sülfat (MgSO_4) ve potasyum fostaf dibasic (K_2HPO_4) Merck®’ten; Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$), D-biyotin, L-histidin HCl, kristal viyole, sitrik asit monohidrat ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O}$), sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4) ve sodyum fosfat dibasic (Na_2HPO_4) Sigma-Aldrich®’ten temin edilmiştir.

3.1.5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar ve besiyerleri aşağıda belirtilmiştir.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (A769586 627), KH_2PO_4 (A850773 723), K_2HPO_4 (A851201 714) Merck®’ten, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (022001), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (228737) Sigma-Aldrich®’ten, ZnCl_2 (229997), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (383317) Aldrich®’ten, Nutrient Broth (CM0001) Oxoid®’ten, Trypticase Soy Agar (236950) Difco™’dan, DMEM (D0547) Sigma-Aldrich®’ten, DPBS (D5652) Sigma-Aldrich®’ten, FBS (F9665) Sigma-Aldrich®’ten, PSA (A5955) Sigma-Aldrich®’ten, DMSO (D2650-D4540) Sigma-Aldrich®’ten Tripsin-EDTA (T4049) Sigma-Aldrich®’ten temin edilmiştir.

3.1.6. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Çalkalamalı İnkübatör	: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B

Derin Dondurucu	: Nuaire, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316 PK
Hassas Terazı	: Mettler Toledo, CHINA, AL204
İnkübatör	: Binder, GERMANY, BD53
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Mini Karıştırıcı	: IKA, U.S.A., M51, SN 03017581
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Saf Su Cihazı	: GFL, GERMANY, 2004
Ultra Saf Su Cihazı	: Millipore Direct-Q® 3 UV
Steril Kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
Spektrofotometre	: Shimadzu, JAPAN, RC 232C
pH Metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
Santrifüj	: Hettich EBA 21, GERMANY
Ultra Santrifüj	: Beckman Coulter™ Allegra 64R Centrifuge, USA
Taramalı Elektron	: Zeiss EVO LS 10, GERMANY
Mikroskobu	
EDAX	: Zeiss EVO LS 10, GERMANY
Heat Block	: WiseThem®, KOREA
Mikropipet	: Eppendorf, GERMANY
Vortex	: IKA, U.S.A., MS2

3.1.7. Çözeltiler ve besiyerleri

Hücre kültürü medyumı: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Fetal bovine serum	15 ml
Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin	1,5 ml
L-glutamine	2 ml
DMEM	90 ml

75 ml hazır hücre kültürü medyumunu, 15 ml fetal bovine serum, 1,5 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B, 2 ml L-glutamine eklenerek hücre kültürü medyumunu hazır hale getirilir.

Vogel-Bonner medyum E (50×): Bu çözelti, minimal glukoz agar besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$)	8,7 g
Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat ($NaNH_4HPO_4 + 4H_2O$)	175 g
Potasyum fostaf dibasic (K_2HPO_4)	500 g
Sitrik asit monohidrat ($HOC(COOH)(CH_2COOH)_2 + H_2O$)	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında belirtilen maddeler, sıcaklığı $50^\circ C$ 'ye ayarlanmış olan 650 ml distile su içerisine sırasıyla eklenir ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanır. Çözeltinin son hacmi, distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanır. Daha sonra çözelti 20 ml hacimli cam deney tüplerine aktarılır ve $121^\circ C$ 'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra oda ısısında karanlık bir ortamda saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

%10'luk D-glukoz çözeltisi: Bu çözelti, minimal glukoz agar besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
D-glukoz (Dekstroz)	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 100 g D-glukoz 700 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözünmesi sağlanır ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Daha sonra çözelti 50 ml hacimli cam deney tüplerine aktarılır ve $121^\circ C$ 'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra ve $+4^\circ C$ 'de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Minimal glukoz agar: Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında temel alt besiyeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca minimal glukoz agar modifiye edilerek, test suşlarının biyotin, histidin ve triptofan oksotrofilerini araştırmak amacıyla da kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50×)	20 ml
%10'luk D-glukoz çözeltisi	50 ml

Bu besiyerinin hazırlanmasında 15 g agar 930 ml distile su içerisine eklenir ve çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir. Sterilizasyonun ardından, sıcaklığı 45-65°C arasında olan çözeltiye daha önceden steril edilmiş Vogel-Bonner medyum E (50×) ve %10'luk D-glukoz çözeltisi eklenir, steril kabinde yavaşça çalkalanarak karışması sağlanır. Çözelti uygun dökme ısıya geldiğinde yaklaşık 25-30 ml besiyeri olacak şekilde petrilere dökülür. Bu besiyeri oda sıcaklığındaki steril ortamlarda muhafaza edilmelidir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Histidin/Biyotin çözeltili top agar: *S. typhimurium* suşlarıyla gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen bir şekilde etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g
0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi	100 ml

Bu çözeltinin hazırlanırken 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine ilave edilir. Oluşan bu çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir. Çalışmada kullanılmadan önce, mikrodalga fırında çözünmesi sağlanır ve içerisine 100 ml 0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi ilave edilir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Triptofan çözeltili top agar: *E. coli* bakteri suşuyla gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen bir şekilde etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g
0,5 mM Triptofan çözeltisi	100 ml

Bu çözeltinin hazırlanırken 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine eklenir. Oluşan bu çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir. Çalışmada kullanılmadan önce, mikrodalga fırında çözünmesi sağlanır ve içerisine 100 ml 0,5 mM triptofan çözeltisi ilave edilir (Mortelmans and Riccio 2000).

0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi: Bu çözelti *S. typhimurium* suşları ile gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında; histidin ve biyotin oksotrofu olan test bakterilerinin birkaç kez bölünmesine imkân vererek, bu bakterileri mutajen ve antimutajen ajanlara karşı daha hassas kılmak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
D-Biyotin	124 mg
L-Histidin	96 mg

Bu çözeltinin hazırlanmasında yukarıda verilen maddeler kaynama sıcaklığındaki 1000 ml distile su içerisine eklenir ve manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözünmesi sağlanır. 0,45 µM membran filtre kullanılarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra +4°C’de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

0,5 mM Triptofan çözeltisi: Bu çözelti *E. coli* suşu kullanılarak gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında; triptofan oksotrofu olan test bakterilerinin

birkaç kez bölünmesine imkân vererek, bu bakterileri mutajen ve antimutajen ajanlara karşı daha hassas kılmak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
L-Triptofan	102 mg

Bu çözelti hazırlanırken 102 mg L-Triptofan kaynama sıcaklığındaki 1000 ml distile su içerisine eklenir ve manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözünmesi sağlanır. 0,45 μ M membran filtre kullanılarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra +4°C’de saklanır (Mortelmans and Riccio 2000).

0,1 mM Sodyum fosfat tamponu (pH: 7,4): Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında çözelti ortamının pH dengesini sağlamak, test materyali, mutajen ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
1. Çözelti: 1000 ml distile suda 11,9 g sodyum fosfat monobasic (NaH ₂ PO ₄) çözülerek hazırlanır.	120 ml
2. Çözelti: 1000 ml distile suda 12,6 g sodyum fosfat dibasic (Na ₂ HPO ₄) çözülerek hazırlanır.	880 ml

Bu çözeltinin hazırlanmasında 1 ve 2 numaralı çözeltiler belirtilen miktarlarda hazırlanır ve gerektiğinde ortama 1 numaralı çözeltilerden ilave edilerek pH: 7,4 olacak şekilde ayarlanır. Bu işlemlerin ardından çözelti 20 ml hacimli cam deney tüplerine aktarıldıktan sonra 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirilir ve oda ısısında karanlıkta saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Nutrient broth: Test bakterilerinin canlandırılması ve gecelik kültürlerinin hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth No:2	23 g

Bu çözeltinin hazırlanmasında 23 g Nutrient broth kaynama sıcaklığındaki 1000 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla homojen bir şekilde çözülür. Hazırlanan çözelti 10 ml hacimli cam deney tüplerine aktarıldıktan sonra 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir ve +4°C’de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Nutrient agar: Bu besiyeri, canlandırılan test bakterilerinden tek kolonilerin elde edilmesinde ve *E. coli* mutant bakterileri ırkının *uvrA* mutasyonunu ile *S. typhimurium* mutant bakterilerinin *rfa* ve *uvrB* mutasyonlarının genetik kontrolünde kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Difco nutrient agar	28 g

Bu çözeltinin hazırlanmasında 28 g Nutrient agar kaynama sıcaklığındaki 1000 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla homojen bir şekilde çözülür. Hazırlanmış olan çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde 25-30 ml besiyeri olacak şekilde petrilere paylaştırılır. Besiyerinin oda sıcaklığında steril ortamlarda muhafaza edilmesi gereklidir (Mortelmans and Zeiger 2000).

%0,1’lik Kristal viyole çözeltisi: *rfa* mutasyonu taşıyan mutant *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolünde kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Kristal viyole	100 mg

Çözelti 100 ml distile su içerisinde 100 mg kristal viyolenin çözülmesiyle hazırlanır. Hazırlanan çözelti ışık geçirmeyecek şişelerde +4°C’de muhafaza edilir (Mortelmans and Zeiger 2000).

%0,01’lik Biotin çözeltisi: Biotin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolünde kullanılmıştır.

İçerik

100 ml için

D-Biyotin

10 mg

Çözelti kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile suda 10 mg D-biyotinin çözülmesiyle hazırlanır. Hazırlanan çözelti 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edilir ve +4°C’de muhafaza edilir (Mortelmans and Zeiger 2000).

%0,5’lik Histidin çözeltisi: Histidin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolünde kullanılmıştır.

İçerik

100 ml için

L-Histidin

500 mg

Çözelti kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile suda 500 mg L-histidinin çözülmesiyle hazırlanır. Hazırlanan çözelti 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve +4°C’de muhafaza edilir (Mortelmans and Zeiger 2000).

%0,4’lük Triptofan çözeltisi: Triptofan oksotrofu olan *E. coli* bakterilerinin genetik kontrolünde kullanılmıştır.

İçerik

100 ml için

L-Triptofan

400 mg

Bu çözelti kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile suda 500 mg L-triptofanın çözülmesiyle hazırlanır. Hazırlanan çözelti 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edilir ve +4°C’de muhafaza edilir (Mortelmans and Riccio 2000).

Yeast Extract-Peptide-Dextrose besiyeri: Test organizmasının canlandırılması amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>600 ml için</u>
Distile su	600 ml
Fluka Yeast Extract-Peptide-Dekstroz	42 g

Besiyerinin hazırlanmasında 600 ml distile su içerisine 42 g Yeast Extract-Peptide-Dekstroz ilave edilerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra dökme ısisına geldiğinde 25-30 ml olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Aminoasit çözeltileri: Bu çözeltiler mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılacak besiyerlerine gerekli miktarlarda eklenmiştir.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
L- arjinin	0,6 g
Homoserin	3 g
L-lizin	0,9 g
L-triptofan	1,2 g
L- fenilalalin	1,5 g
L-metiyonin	0,6 g
L-izolösin	0,9 g
L-valin	4,5 g
L- lösin	0,9 g
L-histidin – HCl	0,6 g

Her bir amino asit yukarıda verilen miktarlarda 100'er ml distile su içerisinde eklenerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla homojen bir şekilde çözülmüştür. Bu işlemin ardından 20 ml hacimli cam deney tüplerine aktararak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sentetik tamamlayıcı besiyeri: Bu besiyeri test organizmasının canlandırılması, tek koloni eldesinde ve % yaşam oranının tespitinde için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>600 ml için</u>
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L- fenilalalin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L- lösin	2340 µl
L-histidin – HCl	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L- adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g Agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat kaynama sıcaklığındaki 583 ml distile su içerisinde eklenerek manyetik aracılığıyla homojen bir şekilde çözülmüştür.

Elde edilen çözelti 121 °C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra dökme ısısına geldiğinde 25-30 ml olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri: Test organizmasının lösün amino asidinin sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığını teyit etmek amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>600 ml için</u>
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L- fenilalalin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösün	2340 µl
L-valin	2340 µl
L-histidin – HCl	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L- adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösün, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösün, 2340 µl L-histidin – HCl, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat 583 ml distile su içerisine eklenerek manyetik aracılığıyla homojen bir şekilde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra dökme ısısına geldiğinde 25-30 ml olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri: Test organizmasının lösün amino asidinin sentezinden sorumlu gen bölgesini bulunduran suşun çalışma için çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Bu besiyeri agar içermemesi ile lösinsiz sentetik tamamlayıcı besiyerinden ayrılır. Elde edilen besiyeri 250 ml hacimli vida kapaklı cam tüplere aktarıldıktan sonra 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Histidinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri: Test organizmasının pozitif mutajen varlığında histidin amino asit gen bölgesinin kırıldığını gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>600 ml için</u>
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L- fenilalalin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösün	2340 µl
L-valin	2340 µl
L- lösün	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg
L- adein hemisülfat	21 mg

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L- adein hemisülfat 581 ml distile su içerisine eklenerek manyetik aracılığıyla homojen bir şekilde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra dökme ısısına geldiğinde 25-30 ml olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Adeninsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri: Test organizmasının adenin bazının sentezin ile sorumlu olan gen bölgesini taşıdığını teyit etmek amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>600 ml için</u>
Distile su	583 ml
Amino asitsiz azot kaynağı	4 g
Dekstroz	12 g
Agar	10 g
L- arjinin	235 µl
Homoserin	235 µl
L-lizin	235 µl
L-triptofan	2340 µl
L- fenilalalin	2340 µl
L-metiyonin	2340 µl
L-izolösin	2340 µl
L-valin	2340 µl
L- lösin	2340 µl
L-histidin – HCl	2340 µl
L-tirozin	21 mg
Urasil	14 mg

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 12 g glukoz, 10 g Agar, 235 µl L- arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-

fenilalalinin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 2340 µl L-histidin – HCl, 21 mg L-tirozin ve 14 mg urasil 583 ml distile su içerisine eklenerek manyetik aracılığıyla homojen bir şekilde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra dökme ısısına geldiğinde 25-30 ml olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Top agar: Bu çözelti etken maddenin *S. cerevisiae* suşu kullanılarak gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında uygulanan test materyalinin ve diğer kimyasalların homojen bir şekilde etkileşmelerini sağlamak için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g
Distile su	900 ml

Bu çözeltinin hazırlanmasında 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çözelti çalışmada kullanılmadan önce mikrodalga fırında eritilmiş ve uygulama yapılmıştır.

DNA ekstraksiyon tamponu: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaCl, %2 SDS (w/v), %2 β-mercaptoethanol (v/v), %1 PVP (w/v) bileşenlerinden hazırlanmıştır.

CTAB/NaCl: 0,7 M NaCl, %10 CTAB (Setil trimetil amonyum bromür) maddelerinden hazırlanmıştır.

Fenol:Kloroform:İzoamil alkol: 25:24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, 77617).

Kloroform:İzoamil alkol: 24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Fluka, 25666).

TE tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0) çözeltilerinden hazırlanmıştır.

Ethidium bromür çözeltisi: 500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür eklenerek hazırlanmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>500 ml için</u>
0,5xTBE	500 ml
Ethidium bromür	300 µl

Bovine serum albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albümin çözülerek hazırlanmış ve -20°C’de saklanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1 ml için</u>
Bovine serum albümin	20 mg
Steril distile su	1 ml

Bromfenol blue çözeltisi: 0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol toplam hacim 100 ml olacak şekilde tamamlanarak hazırlanmış ve çözelti otoklavlanarak steril edildikten sonra +4°C’de saklanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Bromfenol blue	0,25 g
Gliserol	30 ml
Distile su	70 ml

0,5X TBE tamponu: Bu çalışmada kullanılan 10X TBE olarak satın alınmış olan TBE tamponu 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su olacak şekilde 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması: Bu çalışmada kullanılan primerler üretici firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu hazırlandıktan sonra uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

%3'lük NaClO: 97 ml distile su ve 3 ml NaClO olacak şekilde 100 ml'lik balon jodede hazırlanır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
NaClO	3 ml
Distile su	97 ml

%70'lik Etil Alkol: 70 ml etanol ve 30 ml distile su olacak şekilde 100 ml'lik balon jodede hazırlanır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Etil alkol	70 ml
Distile su	30 ml

Çinko Nitrat $Zn(NO_3)_2$: 0,15 gr Zn tuzu tartılır. 500 ml'lik balon jodede distile su ile çözülerek manyetik karıştırıcı üzerinde 5 dk. boyunca karıştırılır.

<u>İçerik</u>	<u>500 ml için</u>
$Zn(NO_3)_2$	0,15 gr
Distile su	500 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyosentez çalışmaları

3.2.1.a. *Symphoricarpos albus* bitki ekstraktının eldesi

30 g taze üzüksü tohum tartılır, saf su ile yıkanır ve havanda ezilir. Daha sonra örnekler 300 ml distile su içeren erlen içersine aktarılır ve 2 saat boyunca 100°C’de kaynatılır. Kaynama işleminden sonra Whatmann filtre kâğıdı ile süzme işlemi yapılarak bitki ekstraktı elde edilmiş olur.

3.2.1.b. Biyosentez işleminin gerçekleştirilmesi

Elde edilen bitki özütünden 10 ml alınarak, 40 ml Zn nitrat tuzu çözeltisine (1 mM, pH=8) damla damla eklenir. Karışım 80°C’de 15 dk. boyunca kaynatılır.

3.2.1.c. Elde edilen ürünlerin saflaştırılması

Biyosentez sürecinin sonunda elde edilen karışım 14.000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilir. Süpernatant atılır, presipitat (çökelti) önce alkolle sonrasında ise distile su ile 3 kez yıkanır. Süpernatant uzaklaştırılır ve inkübatörde 50°C’de kurutulur ve bir havan yardımıyla ince toz haline getirilir.

3.2.1.d. Elde edilen ürünlerin karakterizasyonu

Çalışmamızda biyosentezlenen ZnO nanopartiküllerinin karakterizasyonu Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Mutajenite çalışmaları

3.2.2.a. Çalışmada kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü

Histidin/Biyotin gereksinimi: Bu kontrol, Ames çalışmalarında kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşlarının histidin ve biyotine gereksinim duyduklarını göstermek için gerçekleştirilmiştir. Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda elde edilen bakterilerin minimal glukoz agar, histidinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA + 8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi), biyotinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA + 8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) ve histidin/biyotinli minimal glukoz agar (1000 ml MGA + 8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi + 8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) içeren petrilere ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda bakterilerin üreme durumu takip edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerden sadece histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrilerinde üremenin gözlemlenmesi, kullanılan test organizmalarının histidin/biyotin oksotrofu olduğunu ortaya koymaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Triptofan gereksinimi: Bu kontrol, *E. coli* WP2 çalışmalarında kullanılan *E. coli* WP2uvrA mutant bakteri suşunun triptofana gereksinim duyduklarını göstermek için gerçekleştirilmiştir. Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda elde edilen bakterilerin minimal glukoz agar ve triptofanlı minimal glukoz agar (1000 ml MGA + 8 ml %0,4'lük Triptofan çözeltisi) içeren petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda bakterilerin üreme durumu takip edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerden sadece triptofanlı minimal glukoz agar petrilerinde üremenin gözlemlenmesi kullanılan test organizmasının triptofan oksotrofu olduğunu ortaya koymaktadır (Mortelmans and Riccio 2000).

uvrA ve uvrB mutasyonları: Kullanılan test bakterilerinden *E. coli* mutant suşu *uvrA*, *S. typhimurium* suşları ise *uvrB* mutasyonunu bulundurmaktadır. Bu suşlarda *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarının varlığının belirlenmesi ultra viyole ışınlar karşı duyarlılık testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada, gecelik kültür sonrası elde edilen bakteriler nutrient

agar besiyeri içeren petrilere yüzeyin tamamını kapsayacak şekilde ekilmişlerdir. Steril kabin içerisinde petrilerin kapakları açılmış ve her bir petrinin yarısı U.V. ışınlarını geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Petriler 10 saniye boyunca 30 watt gücündeki U.V. ışınlarına maruz bırakılmıştır. Daha sonra, petrilerin kapakları tekrardan kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda bakterilerin üremeleri incelenmiştir. U.V. ışınlarına maruz bırakılan bölgede üreme olmaması, alüminyum folyo ile kapatılmış bölgede ise üremenin olması test organizmalarının *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarına sahip olduklarını göstermektedir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

rfa mutasyonu: Bu kontrol, Ames çalışmalarında kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşlarının *rfa* mutasyonuna sahip olduklarını göstermek için gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada, gecelik kültür sonrası elde edilen bakteriler nutrient agar besiyeri içeren petrilere yüzeyin tamamını kapsayacak şekilde ekilmişlerdir. Filtre kağıdından diskler hazırlanmış ve hazırlanan disklerle 10 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisi emdirilmiştir. Kristal viyole ile muamele edilen diskler petrilerin ortalarına yerleştirilmiş ve petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde disklerin etrafında görülen üreme gerçekleşmemiş şeffaf bölge test bakterilerinin *rfa* mutasyonuna sahip olduğunu göstermektedir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Histidin gereksinimi: Bu kontrol, maya delesyon testinde kullanılan *S. cerevisiae* RS112 mutant maya ırkının, histidine gereksinim duyduğunu göstermek için gerçekleştirilmiştir. Gecelik kültürleri hazırlanmış mayaların, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L- fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adenin hemisülfat 581 ml distile su içeriğinden oluşan, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri bulunduran sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekimi yapılmıştır. 30°C'de 2-3 gün inkübasyon süresinin sonunda petrilerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerden yalnızca sentetik tamamlayıcı agar içeren

petrilerde üremenin gözlemlenmesi, kullanılan test organizmasının histidine gereksinim duyduğunu göstermiştir.

Lösin gereksinimi: Bu kontrol *S. cerevisiae* RS112 mutant maya ırkının lösine gereksinim duyduğunu göstermek için gerçekleştirilmiştir. Gecelik kültürleri hazırlanmış mayaların, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-histidin – HCl, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adein hemisülfat 581 ml distile su içeriğinden oluşan, lösinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri bulunduran sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekimi yapılmıştır. 30°C’de 2-3 gün inkübasyon süresinin sonunda petrillerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerden yalnızca sentetik tamamlayıcı agar içeren petrilere üremenin gözlemlenmesi, kullanılan test organizmasının lösine gereksinim duyduğunu göstermiştir.

Adenin gereksinimi: Benzer şekilde *S. cerevisiae* RS112 mutant maya ırkının adenine gereksinim duyduğunu göstermek için bu uygulama gerçekleştirilmiştir. Gecelik kültürleri hazırlanmış mayaların, 4 g amino asitsiz azot kaynağı, 10 g agar, 12 g glukoz, 235 µl L-arjinin, 235 µl homoserin, 235 µl L-lizin, 2340 µl L-triptofan, 2340 µl L-fenilalalin, 2340 µl L-metiyonin, 2340 µl L-izolösin, 2340 µl L-valin, 2340 µl L-histidin – HCl, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 2340 µl L-lösin, 583 ml distile su içeriğinden oluşan, adeninsiz sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri ile tüm amino asitleri bulunduran sentetik tamamlayıcı agarlı besiyeri içeren petrilere ekimi yapılmıştır. 30°C’de 2-3 gün inkübasyon süresinin sonunda petrillerdeki üreme durumu kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerden yalnızca sentetik tamamlayıcı agar içeren petrilere üremenin gözlemlenmesi, kullanılan test organizmasının adenine gereksinim duyduğunu göstermiştir.

3.2.2.b. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Kültürler canlandırılırken çok az bir oranda kendiliğinden ortaya çıkan mutasyonlar (spontan mutasyon) kültürde bulunan bazı bakterilerin oksotrof formdan (*S. typhimurium* için his⁻, *E. coli* için trp⁻) prototrof forma (*S. typhimurium* için his⁺, *E. coli* için trp⁺) dönüşmesine sebep olabilmektedir. Bu sebepten dolayı mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlar elde etmek amacıyla her çalışmadan önce çalışma kültürlerindeki spontan geri dönen koloni sayılarının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 45°C sıcaklıkta eritilmiş 2 ml histidin/biyotin çözeltisi top agar içeren tüplerin her birine gecelik kültürlerden (O.D.₅₄₀ – 0,1-0,2) 100 µl ilave edilir. Çözelti homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra minimal glukoz agar içeren petrilere aktarılır. Petri içerisindeki karışım yüzeye tamamen yayıldıktan sonra petriler 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresinin sonunda petrilere gelişen kolonilerin sayılarak her bir bakteri suşu için “kendiliğinden geri dönen koloni sayısı” belirlenir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

Benzer şekilde, *S. cerevisiae* RS112 mutant maya ırkının spontan geri dönen koloni sayıları, yapılan bütün çalışmalarda sürekli olarak ölçülmüş ve her uygulama için ± kendiliğinden geri dönen maya sayısı olarak ifade belirtilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda, gecelik kültürleri hazırlanmış mutant maya hücreleri 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda 0,1-0,2 değerlerine sahip kültürlerden 100 µl alınmış ve 4900 µl lözinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri içeren tüplere aktarılmıştır. Yeni hazırlanmış olan bu kültürler, 30°C, 250 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürler 5000 rpm’de 3 dk santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pelet 5 ml steril distile suda yıkanmıştır. Besiyerini tamamen uzaklaştırmak maksadıyla bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Besiyerinden arındırılan maya hücreleri 5 ml distile su içerisinde tekrardan çözündürülmüştür. Bu çözeltiden alınan 100 µl maya örneği sıcaklığı 45°C olan 2 ml top agar içerisinde homojen bir şekilde dağıtılmış ve histidinsiz sentetik tamamlayıcı agar besiyeri içeren petrilere aktarılmıştır. Bu basamağın ardından, petriler 30°C’de 2-3 gün

inkübasyona bırakılmış ve ardından kendiliğinden geriye dönen koloniler sayılmıştır (Brennan and Schiestl 2004).

3.2.2.c. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan *E. coli* WP2uvrA, *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri ırkları için sırasıyla *N*-Metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG), sodyum azid (NaN₃) ve 9-Aminoakridin (9-AA) maddeleri pozitif mutajenler olarak kullanılmıştır. Gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarından elde edilecek sonuçları sağlıklı bir şekilde değerlendirmek için pozitif mutajen uygulandıktan 48 saat sonra petrilerde gözlemlenen koloni sayısının 300-700 arasında olması gerekmektedir. İstenilen miktarda koloni sayısını elde etmek amacıyla farklı yoğunluklarda hazırlanan mutajen çözeltiler ve test organizmalarına uygulanmıştır. Bu çalışmalarda 45°C sıcaklıkta eritilmiş 2 ml histidin/biyotin çözeltisi top agar içeren deney tüplerine gecelik kültürlerden 50 µl ve 100 µl değişik konsantrasyonlardaki mutajen çözeltiler eklenir. Çözelti homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra minimal glukoz agar içeren petrilere aktarılır. Petri içerisindeki karışım yüzeye tamamen yayıldıktan sonra petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda petrilerde gelişen kolonilerin sayılarak her bir mutajen için uygun konsantrasyon belirlenmiş olur.

Ayrıca mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılacak olan maddelerin test organizmaları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu maddelerin çalışmalarda kullanılabilecek en uygun dozlarını bulmak amacıyla sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan gecelik bakteri kültürleri her petriye yaklaşık 1000 koloni düşecek şekilde seyreltilmiştir. Ardından 45°C sıcaklıkta eritilmiş 2 ml histidin/biyotin çözeltisi top agar içeren tüplere bu kültürlerden 100 µl ve farklı konsantrasyonlardaki test materyali eklenir. Elde edilen bu çözelti nutrient agar petrilere aktarıldıktan sonra yüzeye homojen bir şekilde yayılması sağlanır ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Bu yöntemde, uygulanan maddelerin organizma üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için negatif kontrol gruplarının da

hazırlanması gerekmektedir. Uygulama grupları ile negatif kontrol gruplarının hazırlanması arasındaki tek fark test materyalinin kontrol grubuna eklenmemesidir. 48 saat inkübasyon süresinin sonunda deney gruplarında ve kontrol gruplarında gelişen kolonilerin sayımı yapılır. İki grubun birbiri ile kıyaslanması sonucunda test materyalinin uygulanan konsantrasyonlarının çalışılan bakteriler üzerine olan sitotoksik etkisi belirlenir. Negatif kontrol grubundaki koloni sayısının %80'inden daha az koloni gelişmesine imkân sağlayan test maddesi konsantrasyonları sitotoksik olarak tanımlanmış ve çalışmalarda kullanılmamıştır (Edenharder and Grünhage 2003).

Maya delesyon test sistemi ile gerçekleştirilen çalışmalarda etil metan sülfonat ve acridine maddeleri *S. cerevisiae* RS112 mutant maya ırkı için pozitif mutajenler olarak uygulanmıştır. Bu test sisteminde elde edilecek sonuçları sağlıklı bir şekilde değerlendirebilmek için farklı konsantrasyonlardaki pozitif mutajen madde uygulamalarının ardından maya hücreleri sentetik tamamlayıcı besiyerlerine ekilmiş ve 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından petrilere oluşan maya kolonilerinin sayılmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılması maya hücrelerinin % canlılık oranları tespit edilerek her mutajen için çalışmada kullanılabilecek uygun doz belirlenmiştir.

Ayrıca mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılacak olan maddelerin test organizmaları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu maddelerin çalışmalarda kullanılabilecek en uygun dozlarını bulmak amacıyla sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla maya test organizması değişik etken madde konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol ve deney gruplarında gelişen koloniler sayılmış ve iki grup birbiri ile kıyaslanarak test maddesinin farklı konsantrasyonlarının maya suşu üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir (Brennan and Schiestl 2004).

3.2.2.d. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

E. coli ve *S. typhimurium* mutant bakterilerin uzun süreli saklanabilmesi uygun prosedürlerle -87°C 'de dondurulmaları ile sağlanmaktadır. Genetik özellikleri doğrulanmış olan bakteriler nutrient broth besiyerinde yoğunluğu $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml ($\text{O.D.}_{540} = 0,1-0,2$) olacak şekilde geliştirilir. Ardından ortama son konsantrasyonu %10 olacak şekilde gliserol eklenir ve homojen bir şekilde karışması sağlanır. Hazırlanan kültür 1 ml olacak şekilde bölünerek steril eppendorf tüplere aktarılır. Daha sonra bu tüpler kuru buz içerisinde dondurulur ve -87°C 'de saklanır.

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılacak gecelik kültürler daha önce stoğa alınmış olan -87°C 'deki stoklardan hazırlanır. Bu işlem için öncelikle stok kültür oda sıcaklığında çözündürülür ve daha sonra nutrient broth besiyeri içerisine inoküle edilir. İnokülasyon yapıldıktan sonra taze kültürler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 4 saat bekletilir. Bu sürenin ardından kültür 37°C 120 rpm'de yaklaşık bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübe edilir. Süre bitiminde inkübatörden çıkarılan kültürler daha sonra kullanılmak üzere oda ısısında karanlıkta bekletilirler (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000).

Benzer şekilde *S. cerevisiae* RS112 mutant suşunun uzun süreli saklanabilmesi uygun prosedürlerle -87°C 'de dondurulmaları ile sağlanmaktadır. Genetik özellikleri doğrulanmış olan test suşu, lözinsiz sentetik tamamlayıcı besiyerinde ml'sinde 1×10^7 maya suşu bulunacak şekilde çoğaltılmıştır. Maya kültürüne, kültürün her ml'sinde 0,09 ml olacak şekilde gliserol eklenerek ve karıştırılmıştır. Hazırlanan kültür 1 ml olacak şekilde bölünerek steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra tüpler kuru buz içerisinde yaklaşık 30 dk bekletildikten sonra -87°C 'lik dondurucuya kaldırılmıştır.

Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında kullanılacak gecelik kültürler daha önce stoğa alınmış olan -87°C 'deki stoklardan hazırlanmıştır. Bu işlem için stok kültür oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra lözinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri içerisine inoküle edilmiştir ve 30°C , 250 rpm'de yaklaşık bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübe

edilmiştir. Süre bitiminde inkübatörden çıkarılan kültürler daha sonra kullanılmak üzere oda ısısında karanlıkta bekletilmiştir.

3.2.2.e. Mutajenite

S. typhimurium mutant bakteri ırkları ile gerçekleştirilen mutajenite çalışmalarında; 45°C sıcaklıkta eritilmiş 2 ml histidin/biyotin çözeltisi top agar içeren tüplere 50 µl test maddesi, 500 µl sodyum fosfat çözeltisi, 100 µl gecelik bakteri kültürü eklendikten sonra 2-3 saniye düşük hızda vortexlenerek karışması sağlanmıştır. Elde edilen bu karışım minimal glukoz agarlı içeren petrilere aktarılmış ve homojen bir şekilde petri yüzeyine yayılmıştır. Petriler 37°C’de 48 saatlik inkübasyona bırakılmış ve daha sonra petrilerde oluşan kolonilerin sayılarak sonuçlar yorumlanmıştır.

Ames/*Salmonella* testi için belirtilen mutajenite çalışmalarında kullanılan protokoller *E. coli* WP2 test sistemi için de kullanılabilir niteliktedir (Mortelmans and Riccio 2000). *E. coli* WP2 test suşu ile gerçekleştirilen mutajenite ve antimutajenite çalışmalarındaki fark, Ames/*Salmonella* testinde histidin/biyotin çözeltisi top agar kullanılması *E. coli* WP2 test sisteminde ise triptofan çözeltisi top agar kullanılmasıdır.

Çalışmada kullanılan negatif kontroller test maddesinin yerine aynı hacimde uygulama maddesinin çözücüsü eklenerek, pozitif kontroller ise test maddesinin yerine aynı hacimde bakteri suşuna spesifik mutajen madde çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır.

Maya delesyon test sistemi kullanılarak gerçekleştirilen mutajenite çalışmalarında, önceden hazırlanmış maya kültürlerinden 100 µl ve test maddelerinin farklı konsantrasyonlarından 400 µl, 4500 µl lōsinsiz sentetik tamamlayıcı besiyeri içeren tüplere aktarılmıştır. Bu yeni kültür, 30°C, 250 rpm’de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kültürler 5000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz atılmış ve kalan pelet 5 ml steril saf suda yıkanmıştır. Maya hücrelerini besiyerinden tamamen arındırmak amacıyla yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Son yıkama basamağından sonra maya hücreleri 5 ml distile su içerisinde süspanse edilerek

bu süspansiyondan mutajenite çalışmalarında kullanılacak olan dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlar hazırlanırken, maya süspansiyonundan 100 µl alınmış ve 900 µl distile su bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu basamakların sonucunda 10^{-1} - 10^{-5} aralıklarındaki maya dilüsyonları elde edilmiştir. Hazırlanan dilüsyonlar; mutant maya hücrelerinin % canlılık, kromozom içi rekombinasyon ve kromozomlar arası parça değişimi oranlarını belirlemek amacıyla sırasıyla sentetik tamamlayıcı agar, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agar ve adeninsiz sentetik tamamlayıcı agar içeren petrilere ekilmiş ve 30°C’de 2-3 gün inkübe edilmiştir. Bu çalışmalarda, maya dilüsyonlarından alınan 100 µl örnekler 45°C sıcaklığa sahip 2 ml top agar içerisinde homojen olarak karıştırılmış ve petrilere aktarılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde petrillerdeki koloniler sayılarak sonuçlar yorumlanmıştır (Orhan 2010).

3.2.2.f. Sonuçların değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen mutajenite deneylerinden elde edilen sonuçlar Mortelmans ve Zeiger tarafından ileri sürülen “standard plate incorporation” yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu yöntemde; her örnek için mutajenite deneylerinden elde edilen koloni sayım sonuçları aynı deneylerin negatif kontrolleri ile kıyaslanarak % mutasyon oranları hesaplanmıştır.

Mutajenite çalışmaları değerlendirilirken test maddelerinin her bir konsantrasyonu için mutajenik indeks; sayımlar sonucunda elde edilen koloni ortalamasının negatif kontrol gruplarındaki koloni ortalamalarına bölünerek hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol ile mukayese edildiğinde dozlara bağımlı olarak en az 2 kat artışın gözlemlendiği test maddeleri mutajenik olarak kabul edilmiştir (Varella *et al.* 2004; Evandri *et al.* 2005; Santos *et al.* 2008; Gulluce *et al.* 2010).

Bu deneydeki tüm çalışmalar en az iki kez iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiki önemleri SPSS 17.0 istatistik programı ile ANOVA ve Tukey istatistik testleri kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.3. RAPD çalışmaları

3.2.3.a. Nanopartiküllerin bitkiye uygulanması

Eşit boyutlarda *Triticum aestivum* tohumları seçilmiş ve %2,5/w/v'lik NaOCl'de 3 dakika süreyle steril edilmiştir. Tohumlar dört defa saf su ile durulandıktan sonra daha önceden steril edilmiş olan filtre kâğıdı ile kurutulmuştur. Daha sonra steril tohumlar 1 saat saf su içerisinde bekletilmiştir. Ardından, her petri için 15 adet steril tohum dört kat steril whatman 1 numaralı filtre kâğıdı bulunan 15 cm çapındaki petri kaplarına çimlendirilmek üzere alınmıştır. Test maddesinin *T. aestivum* üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla; sırasıyla 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/ml konsantrasyonlarda ZnO nanopartikül çözeltisi petrilere eklenmiştir. Dozlar uygulandıktan sonra tohumların çimlendirilmesi amacıyla 25°C'de karanlık bir ortamda çimlendirilmek üzere 10 gün bekletilmiştir. Çimlendirme süresi sonunda uygulama yapılan petrilere ve kontrol grubundan bitki örnekleri toplanarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır (Arslan 2012; Nardemir 2012).

3.2.3.b. DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

DNA izolasyon protokolü olarak Nardemir (2012), Arslan (2012) ve Özkan (2018) esas alınmıştır.

1. Daha önce sıvı azotta parçalanmış bitki materyalleri 2 ml'lik tüplerde muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla bu tüplerin içerisine 1000 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmıştır. 65°C'ye aralanmış su banyosunda 10-60 dk bekletilmiştir.
2. Ardından örnekler 12000 g, 4°C'de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.
3. Bu yeni tüpün içerisine 1000 µl Fenol:Kloroform:İzoamil alkol ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Tekrardan 12000 g, 4°C'de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.

4. Elde edilen yeni süpernatantın üzerine 1/10 oranında CTAB/NaCl çözeltisinden ilave edilmiş ve ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.
5. Ardından örneğin üzerine 1000 µl Kloroform:İzoamil alkol ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Tekrardan 12000 g, 4°C’de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatli bir şekilde yeni tüpe aktarılmıştır.
6. Daha sonra DNA’yı çöktürmek amacıyla 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenmiş -20°C’de 10 dk beklemeye bırakılmıştır.
7. Bekleme süresinin ardından örnek 12000 g, 4°C’de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır.
8. Tüp içerisinde kalan pelet önce %100 ve daha sonra %70’lik soğuk etanol ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işleminin ardından pelet bir gece kurutulmaya bırakılmıştır. Bu aşamalar sonucunda elde ettiğimiz DNA örneği 100 µl TE tamponunda içerisinde çözülmüş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Elde etmiş olduğumuz DNA 250 kat (3 µl DNA + 747 µl TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm’deki absorbans değerleri ölçülmüştür. 260/280 nm’deki okuma değerinin 1,1 ile 1,8 arasında olması DNA’nın saf olduğuna işaret etmektedir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD260 formülünden faydalanılarak stokta bulunan DNA miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra bu stok DNA’dan 50 ng/µl DNA içerecek şekilde çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.3.c. RAPD primerleri

Çalışmada 12 RAPD primeri (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. RAPD primerleri

Primer	Baz Dizilimi 5'→3'
OPA-4	AATCGGGCTG
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-2	TGCCGAGCTG
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPH-19	CTGACCAGCC
OPY-6	AAGGCTCACC
OPY-1	GTGGCATCTC
OPY-11	AGACGATGGG
OPY-13	GGGTCTCGGT
OPY-16	GGGCCAATGT
OPW-1	CTCAGTGTCC
OPW-7	CTGGACGTCA

3.2.3.d. PCR protokolü

Bu çalışmada 12 adet RAPD primeri (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılmıştır.

PCR işleminde kullanılan protokol şu şekildedir; 0,2 ml hacimli pcr tüplerine 3 µl 10X PCR tamponu, 1,8 µl BSA (10 mg/ml), 1,2 µl dNTP (10 mM), 1,2 µl MgCl₂ (25 mM), 3 µl DNA (100 ng/µl), 1,2 µl primer (5 µM), 0,4 µl 5Unit/µl Taq DNA polimeraz ve 17,4 µl distile su ilave edilerek hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Belirtilen miktarlar doğrultusunda her bir DNA örneği ve RAPD primerlerine için ayrı pcr tüpleri hazırlanmıştır.

PCR aşamasını gerçekleştirmek amacıyla hazırlanmış olan örnek thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. PCR koşulları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR işleminin sonunda örnekler 4°C’de muhafaza edilmiştir.

1.	94°C, 5 dk	
2.	94°C, 90 s 37°C, 90 s 72°C, 3 dk	4 döngü
3.	94°C, 1 dk 36°C, 1 dk 42°C, 1 dk 72°C, 3 dk	41 döngü
4.	72°C, 7 dk	

3.2.3.e. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminin ardından primerlerin hibridize olup olmadığı kontrol etmek amacıyla örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu aşamada aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

1. Jel içerisindeki agar konsantrasyonu %1,5 olacak şekilde agaroz tartıldıktan sonra mikrodalga fırında 0,5X TBE tampon içerisinde çözündürülmesi sağlanır.
2. Daha sonra bu karışımın içerisine 0,5 µg/ml olacak şekilde Et-Br eklenmiştir.
3. Hazırlanmış olan jel elektroforez tankına dökülmüş ve örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturmak amacıyla taraklar yerleştirilmiştir.
4. Jelin donması sağlandıktan sonra yerleştirilmiş olan taraklar uzaklaştırılmıştır. Bu kuyucukların içerisine her bir örnek için ayrı olacak şekilde 3 µl bromfenol mavisi + 7 µl PCR ürünü yüklenmiştir.
5. Yüklemiş olduğumuz örnekler 70 V elektrik akımı altında 120 dk boyunca elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Sürenin sonunda örneklerin yürütüldüğü jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.f. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (%GTS) belirlenmesi

RAPD profillerinde gözlenen polimorfizmin değerlendirilmesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolması fikri

esas alınmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda, genomik kalıp sabitliliği belirlenirken Ateizar (1999)'ın $100-(100*a/n)$ eşitliğinden istifade edilmiştir. Eşitlikte bulunan a her örnek için tespit edilen RAPD polimorfik profillerini, n ise negatif kontrol grubu ve primerlerden elde edilen DNA toplam bant sayısını göstermektedir.

3.2.4. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.4.a. Hücrelerin çözünmesi ve ekiminin yapılması

1. Stoktan alınan kriyovial 37°C 'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritilir.
2. Kriyoviyalin içindeki hücre süspansiyonu 3 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarılır.
3. Falkon 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve pelete 1 ml besiyeri ilave edilir.
4. Hücreler 1 ml içinde iyice çözüldükten sonra üzerine 4 ml besiyeri eklenir. 5 ml'lik hücre süspansiyonu 60 mm'lik besiyeri bulunan flaska aktarılır. %5 CO_2 içeren ve 37°C sıcaklıktaki etüvde steril şartlarda inkübe edilir.
5. Sonraki gün besiyeri değiştirilir. Flask invert mikroskop ile kontrol edilir ve hücreler besiyerini kapladıkları gün pasajlanabilir.

3.2.4.b. Hücrelerin pasajlanması

1. Pasajlama yapılabilmesi için hücrelerin flaskın yüzeyin tamamen kaplamaları (konfluent) gerekir.
2. Konfluent petrilerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
3. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır.
4. PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.
5. Tripsin hacminin en az iki katı kadar serumlu besiyeri ile inhibe edilir.
6. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve falkon tüpe aktarılır. Falkon içerisine 2-3 ml daha besiyeri ilave edilir.
7. Hücre süspansiyonu 1000-1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir ve süpernatant uzaklaştırılır.

8. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılır. Daha sonra flasklara ekimler yapılır 37°C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılır.

3.2.4.c. Hücre sayılarının hesaplanması

Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınır ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak karışmaları sağlanır. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına konulur ve mikroskopta lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanır. Ekim yapılırken, hesaplanan bu sayı dikkate alınır ve hücrelerin petriye ekimleri yapılır. Böylece her 100 mm²’lik kültür petrisine 5x10⁶ hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 5000 hücre transferi sağlanır.

3.2.4.d. ZnO nanopartiküllerinin hücrelere uygulanması

Biyosentezlenen ZnO nanopartikül uygulaması için 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin denenmesi amacıyla besiyeri ve kuyucuk başına 5000 hücre içeren iki adet 96’lık plak hazırlandı. Eşit sayıda hücre bulunan kuyucuklardan her birine sırasıyla 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde dozlar uygulandı ve inkübasyona bırakıldı.

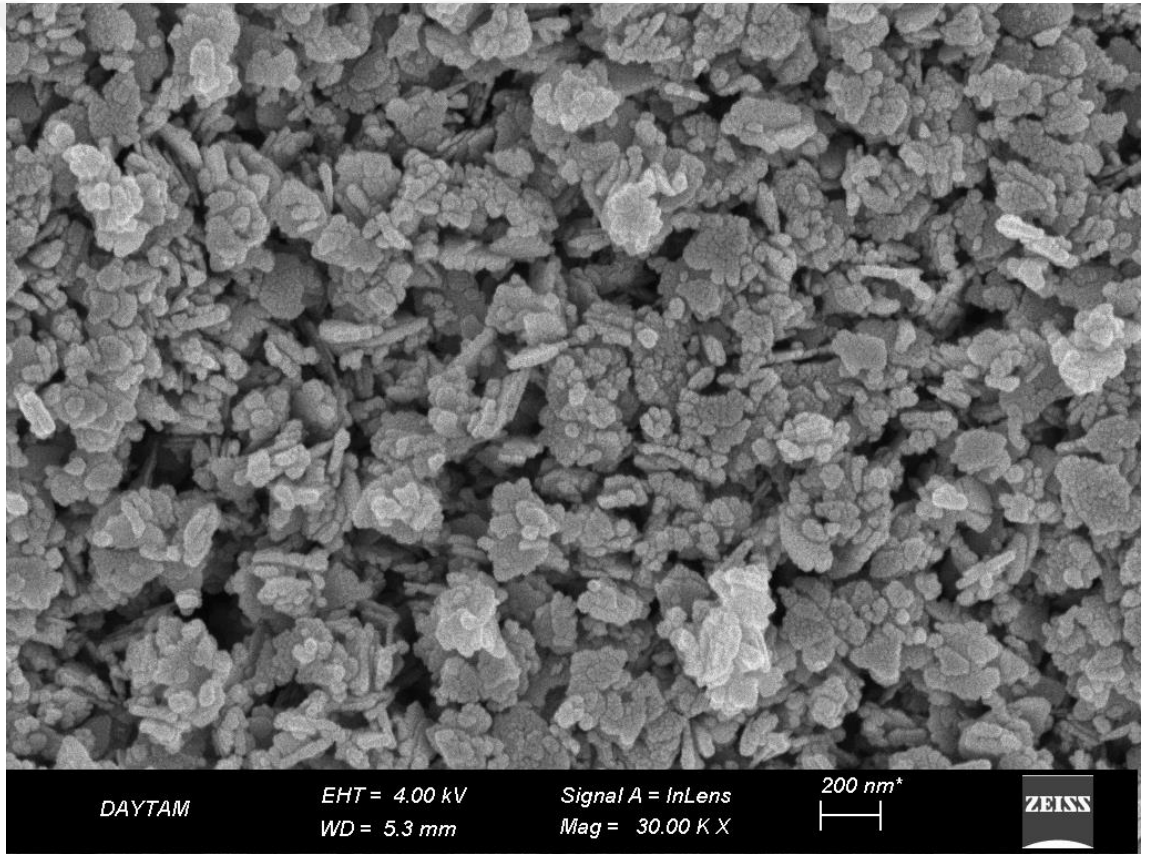
3.2.5. MTT çalışmaları

İnkübasyon süresinin sonunda 200 µl’lik besiyerinin 100 µl’lik miktarı pipetle uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 100 µl’lik besiyeri için 20 µl ilave edildi. Plate 37°C’de karanlıkta 4 saat boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MTT ile muamele edilmiş tüm kuyulara 50 µl DMSO eklendi ve 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra 570 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Excel programı yardımı ile uygulanan doza karşı % hücre-sitotoksosite eğrisi çizilerek, %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

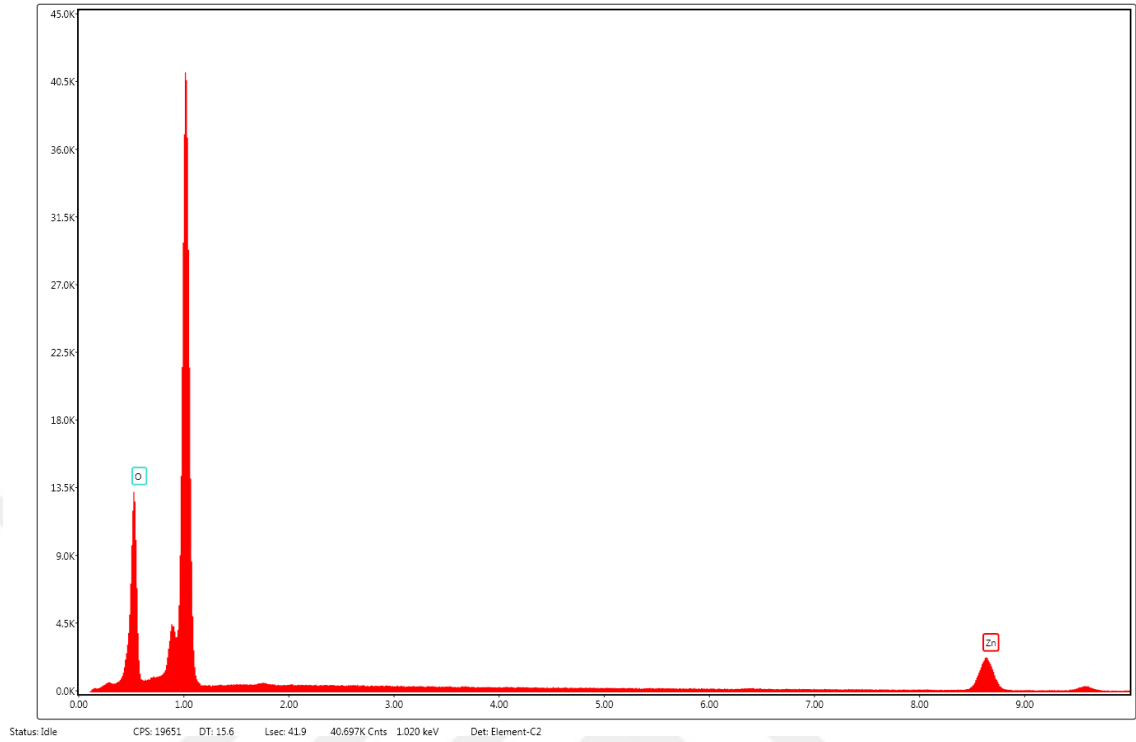
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Bitki ekstraktı aracılığıyla ZnO nanopartiküllerinin biyosentez işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünlerin karakterizasyonu SEM ve EDAX yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1, 4.2).



Şekil 4.1. ZnO nanopartikülüne ait SEM görüntüsü



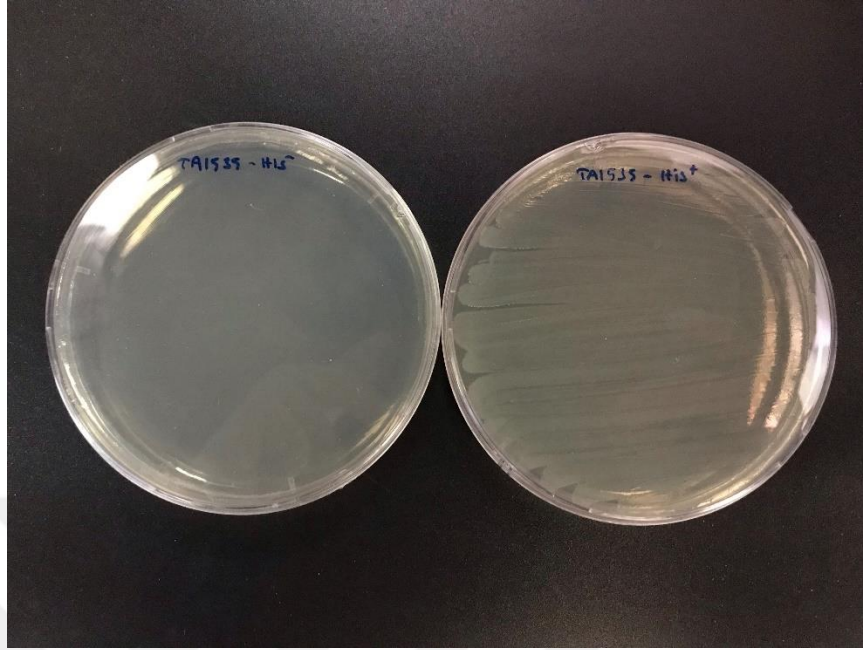
Şekil 4.2. ZnO nanopartikülüne ait EDAX görüntüsü

4.2. Mutajenite Çalışmaları

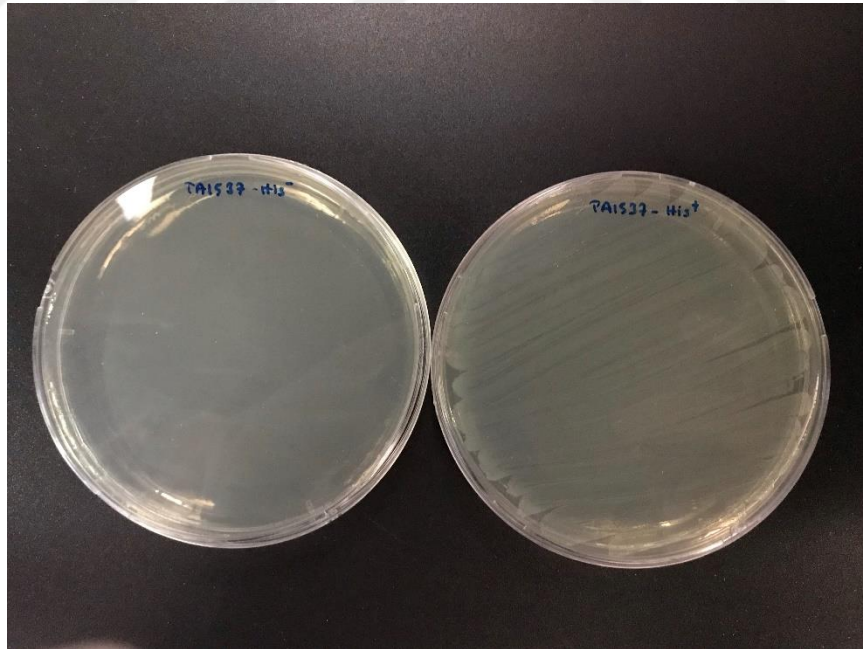
4.2.1. Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant organizmaların genetik özelliklerinin kontrolü

4.2.1.a. Histidin/biyotin gereksinimi

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 bakteri suşları ile histidinli, biyotinli ve histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrileri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda yalnızca histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrilerinde üreme görülmesi kullanılan test bakterilerinin histidin/biyotin oksotrofu olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



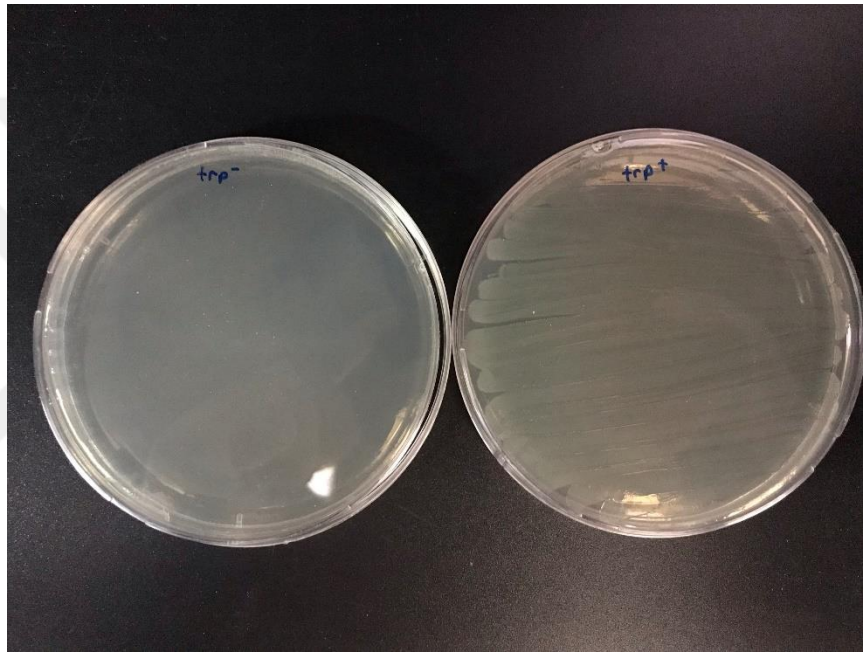
Şekil 4.3. *S. typhimurium* TA1535 suşunda üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi



Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA1537 suşunda üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi

4.2.1.b. Triptofan gereksinimi

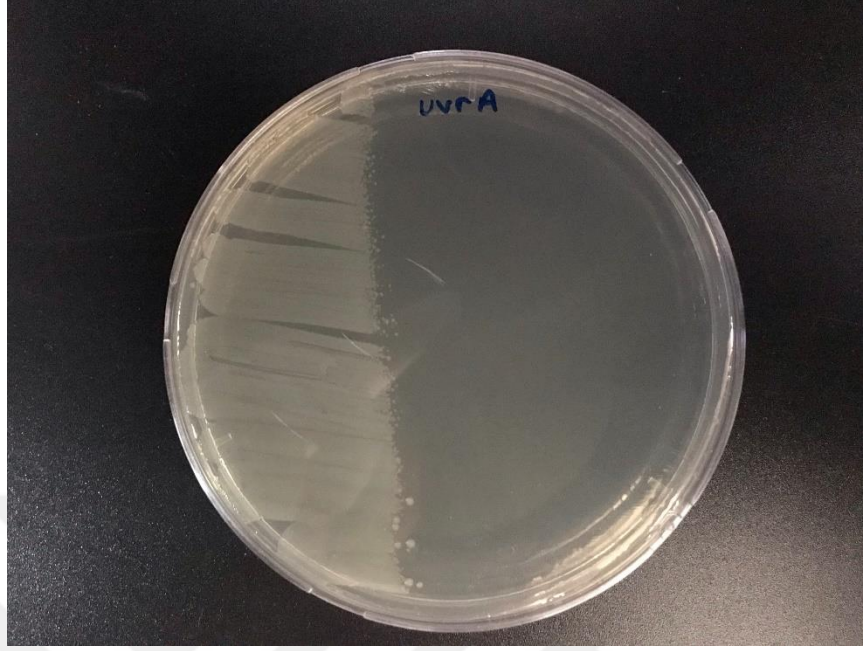
E. coli WP2*uvrA* bakteri suşu ile triptofansız ve triptofanlı minimal glukoz agar petrileri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda yalnızca triptofanlı minimal glukoz agar petrilerinde üreme görülmesi kullanılan test bakterisinin triptofan oksotrofu olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 4.5).



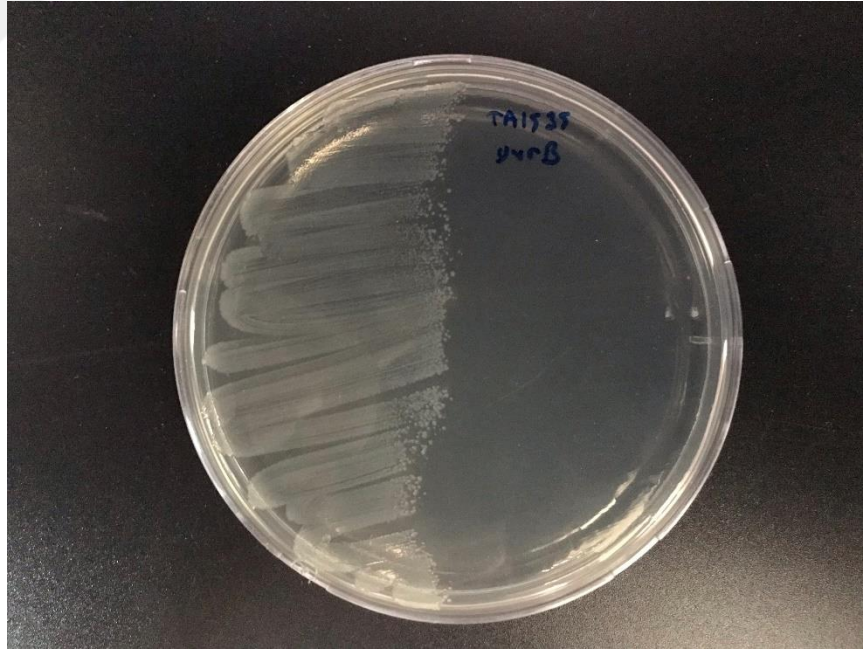
Şekil 4.5. *E. coli* WP2*uvrA* suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi

4.2.1.c. *uvrA* ve *uvrB* mutasyonları

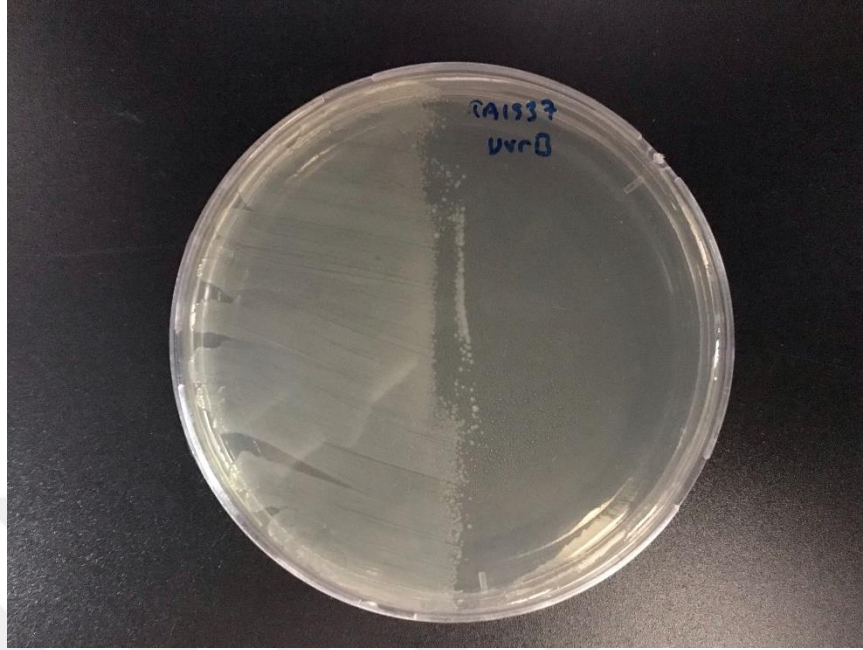
E. coli WP2 ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının nutrient agar besiyeri içeren petrilere ekilmeleri ve kısmen UV ışığa maruz bırakılmaları esasına dayanan testler sonucunda UV ışınlarından korunan bölgelerde üreme olmasına karşın bu ışınlara maruz kalan bölgelerde bakteri üremesinin görülmemesi; test suşlarından *E. coli* WP2'nin *uvrA* ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının *uvrB* mutasyonu taşıdığını kanıtlamıştır (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



Şekil 4.6. *E. coli* WP2 test suşunun *uvrA* mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi



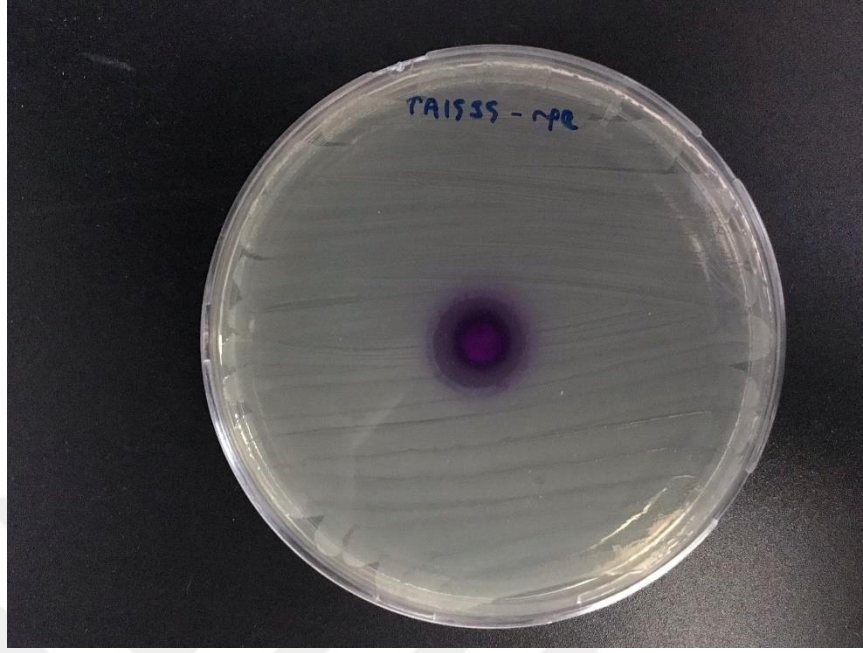
Şekil 4.7. *S. typhimurium* TA1535 test suşunun *uvrB* mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi



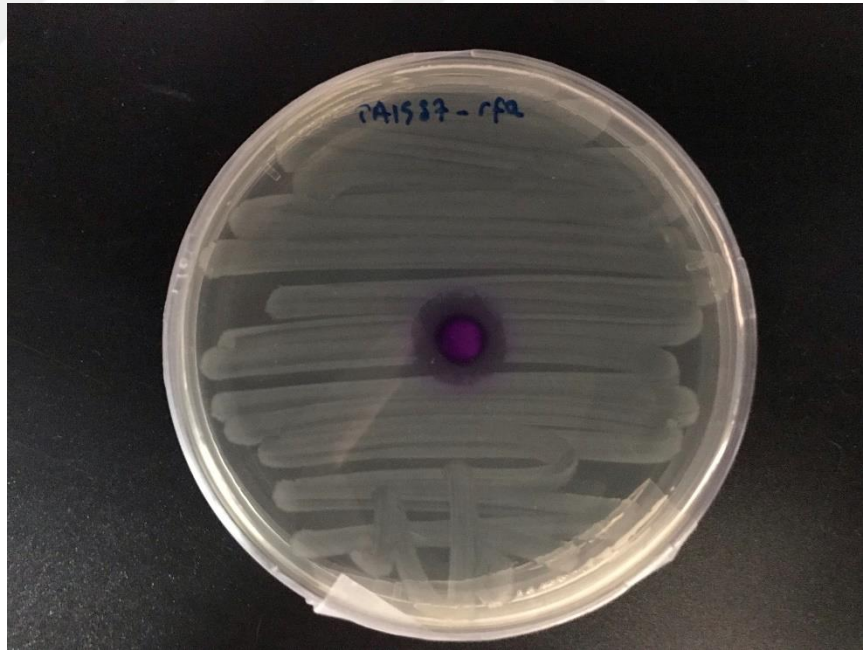
Şekil 4.8. *S. typhimurium* TA1537 test suşunun *uvrB* mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi

4.2.1.d. *rfa* mutasyonu

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 bakteri suşlarının nutrient agar besiyeri içeren petrilere ekilmeleri ve kısmen kristal viyoleye maruz bırakılmaları esasına dayanan testler sonucunda boya bulunan bölgelerde bakteri üremesinin olmadığı şeffaf alanların oluşması test bakterilerinin *rfa* mutasyonu taşıdıklarını kanıtlamıştır (Şekil 4.9, Şekil 4.10).



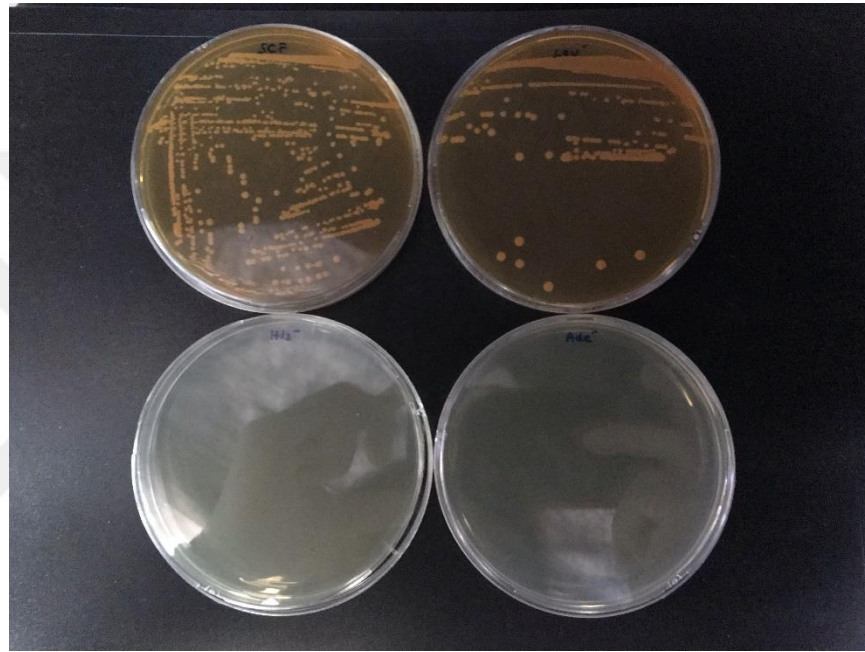
Şekil 4.9. *S. typhimurium* TA1535 suşunda *rfa* mutasyonunun gösterilmesi



Şekil 4.10. *S. typhimurium* TA1537 suşunda *rfa* mutasyonunun gösterilmesi

4.2.1.e. Histidin gereksinimi

Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiş, histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde ürememiştir. Suşun his^- karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *S. cerevisiae* RS112 suşunda histidin, lösin, adenin gereksiniminin gösterilmesi

4.2.1.f. Lösin gereksinimi

Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu sentetik tamamlayıcı ve lösinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiştir. Suşun leu^+ karakteri bakımından prototrof olduğu kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.11).

4.2.1.g. Adenin gereksinimi

Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde üremiş, adeninsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde ürememiştir. Suşların ade^- karakteri kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.11).

4.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Yapılan kontrol testleri ile mutant bakteri suşlarında meydana gelen spontan mutasyonların göstergesi olan kendiliğinden geri dönen koloni sayıları her bir suş için belirlenmiştir. Ayrıca bu testlere ilaveten yapılan tüm deneylerde kendiliğinden geri dönen koloni sayılarını belirleyen negatif kontroller kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları

	±
<i>E. coli</i> WP2uvrA	28,67 ± 1,03
<i>S. typhimurium</i> TA1535	39,33 ± 1,03
<i>S. typhimurium</i> TA1537	32,33 ± 1,63

S. cerevisiae RS112 suşunun histidinsiz sentetik tamamlayıcı agarlı petrilerde kendiliğinden geriye dönen his^+ revertantlar gözlenmiştir. Test suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları her denemede rutin olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Test suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayıları

	±
RS112	34,24 ± 01,38

4.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

Pozitif mutajenlerin uygun konsantrasyonlarını belirleme amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bu maddelerin uygulama konsantrasyonları *N*-Metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) için 1 µg/petri, sodyum azid (NaN₃) için 1 µg/petri, 9-Aminoakridin (9-AA) için 40 µg/petri ve etil metan sülfonat (EMS) için 100 µl/petri olarak belirlenmiştir.

4.2.4. ZnO nanopartiküllerinin mutajenik özellikleri

E. coli WP2uvrA, *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları kullanılarak yapılan mutajenite deneylerinde nanopartikül uygulanan test konsantrasyonlarına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.3. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları (*E. coli* WP2uvrA)

Test Maddesi Konsantrasyonu (µg/plaka)	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı
640	27	29	28	31	25	28
320	29	31	30	30	27	27
160	29	28	28	28	31	30
80	28	29	31	30	33	30
40	29	31	27	28	29	30
20	31	32	28	28	28	28
10	29	31	28	28	30	30
5	29	28	27	28	28	29
1	31	30	31	32	27	28
0,5	30	30	31	29	27	27
Kontroller						
Negatif Kontrol	28	29	29	30	27	29
Pozitif Kontrol	414	427	422	419	420	420

Çizelge 4.4. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları (*S. typhimurium* TA1535)

Test Maddesi Konsantrasyonu (µg/plaka)	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı
640	40	42	41	39	39	41
320	39	40	40	41	42	38
160	40	39	37	37	41	38
80	39	38	39	38	42	40
40	39	39	39	41	40	43
20	40	40	41	37	39	38
10	40	39	38	40	37	38
5	40	39	37	37	41	40
1	39	37	37	38	40	42
0,5	39	41	41	41	40	41
Kontroller						
Negatif Kontrol	38	40	39	39	39	41
Pozitif Kontrol	511	500	509	517	512	511

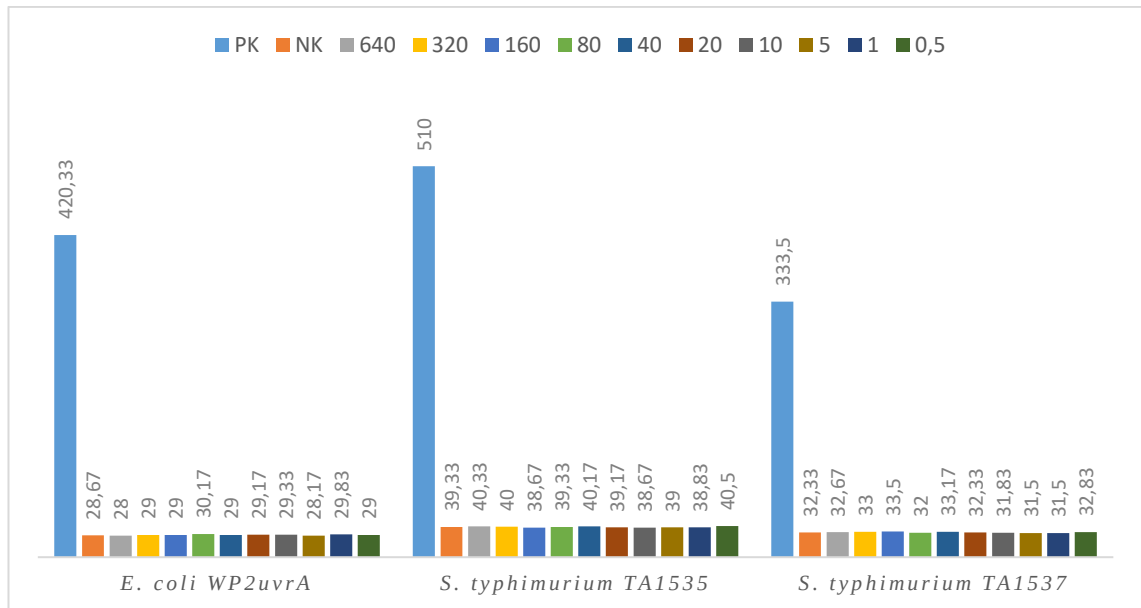
Çizelge 4.5. ZnO nanopartiküllerinin mutajenite testi sayım sonuçları (*S. typhimurium* TA1537)

Test Maddesi Konsantrasyonu (µg/plaka)	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı
640	31	33	32	34	33	33
320	31	33	33	32	34	35
160	32	33	33	36	34	33
80	31	32	32	32	34	31
40	33	34	34	35	33	30
20	32	31	31	33	34	33
10	35	33	32	30	30	31
5	32	33	32	32	30	30
1	34	33	30	30	31	31
0,5	34	34	33	32	33	31
Kontroller						
Negatif Kontrol	35	30	32	32	32	33
Pozitif Kontrol	331	327	336	340	344	323

Çizelge 4.6. ZnO nanopartiküllerinin bakteriyel mutajenite testi sonuçları

Test Grubu	Konsantrasyon (µg/plate)	Geri Dönen Koloni Dayısı		
		<i>E. coli</i> WP2uvrA	<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>S. typhimurium</i> TA1537
		Ortalama ± S.D	Ortalama ± S.D.	Ortalama ± S.D
Biyosentetik ZnO nanopartikülü	640	28,00 ± 2,00	40,33 ± 1,21	32,67 ± 1,03
	320	29,00 ± 1,67	40,00 ± 1,41	33,00 ± 1,41
	160	29,00 ± 1,26	38,67 ± 1,63	33,50 ± 1,38
	80	30,17 ± 1,72	39,33 ± 1,51	32,00 ± 1,10
	40	29,00 ± 1,41	40,17 ± 1,60	33,17 ± 1,72
	20	29,17 ± 1,83	39,17 ± 1,47	32,33 ± 1,21
	10	29,33 ± 1,21	38,67 ± 1,21	31,83 ± 1,94
	5	28,17 ± 0,75	39,00 ± 1,67	31,50 ± 1,22
	1	29,83 ± 1,94	38,83 ± 1,94	31,50 ± 1,64
	0,5	29,00 ± 1,67	40,50 ± 0,84	32,83 ± 1,17
Kontroller	MNNG ^a	420,33 ± 4,23		
	NaN ₃ ^a		510,00 ± 5,59	
	9-AA ^a			333,50 ± 7,97
	Su ^a (µl/plate)	28,67 ± 1,03	39,33 ± 1,03	32,33 ± 1,63

^a MNNG (1 µg/plate), NaN₃ (1 µg/plate) ve 9-AA (40 µg/plate), *E. coli* WP2uvrA, *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 için pozitif kontrol olarak, DMSO (dimethylsulfoxide; 100 µl/plate) ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. ^b p<0,05.



Şekil 4.12. ZnO nanopartiküllerin bakteriyel mutajenite test sonuçları

S. cerevisiae RS112 mutant maya suşu kullanılarak yapılan mutajenite deneylerinde nanopartikül uygulanan test konsantrasyonlarına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.7, 4.8, 4.9 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.7. ZnO nanopartiküllerinin kromozom içi kırılma mutajenite testi sayım sonuçları (*S. cerevisiae* RS112)

Test Maddesi Konsantrasyonu (µg/plaka)	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı
640	55	51	54	57	50	58
320	55	59	59	59	59	50
160	56	55	58	50	60	55
80	51	54	58	59	58	52
40	59	60	58	57	53	56
20	52	51	55	53	50	55
10	54	57	56	51	52	59
5	55	57	52	58	52	50
1	52	60	59	55	58	51
0,5	54	55	53	60	54	50
Kontroller						
Negatif Kontrol	56	54	54	54	57	51
Pozitif Kontrol	465	459	450	456	464	464

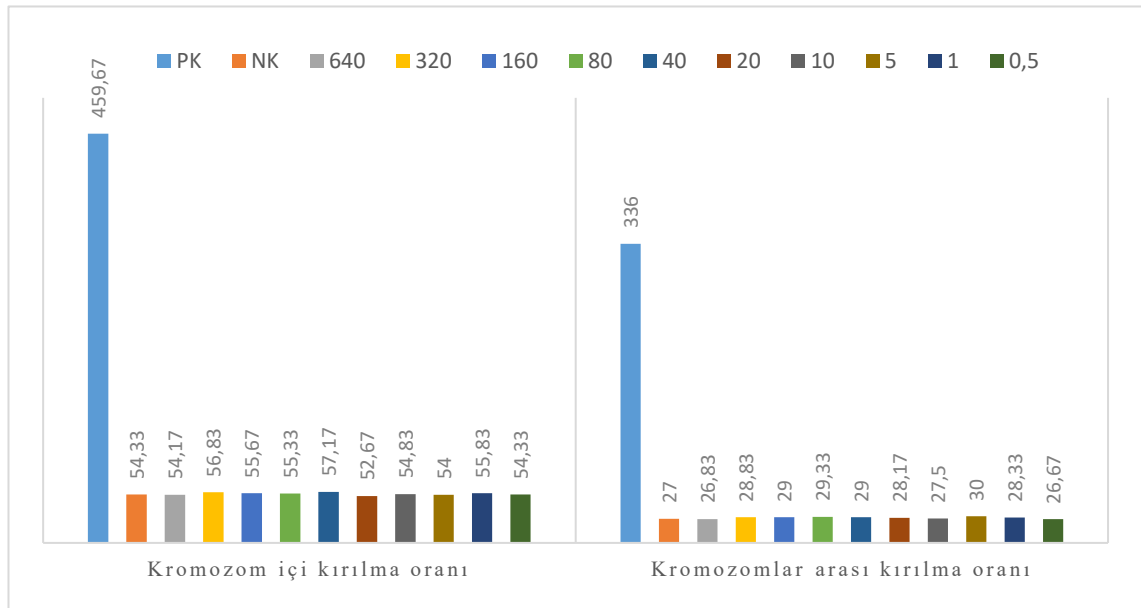
Çizelge 4.8. ZnO nanopartiküllerinin kromozomlar arası mutajenite testi sayım sonuçları (*S. cerevisiae* RS112)

Test Maddesi Konsantrasyonu (µg/plaka)	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	I. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı	II. Plaka: Geri Dönen Koloni Sayısı
640	26	30	27	26	26	26
320	32	27	29	25	31	29
160	28	30	31	26	32	27
80	30	25	32	31	30	28
40	27	25	32	31	29	30
20	29	25	30	28	25	32
10	26	30	29	25	27	28
5	29	32	25	31	32	31
1	29	30	29	25	32	25
0,5	25	25	29	27	28	26
Kontroller						
Negatif Kontrol	335	335	333	345	342	326
Pozitif Kontrol	465	459	450	456	464	464

Çizelge 4.9. ZnO nanopartiküllerinin maya delesyon mutajenite testi sonuçları

Test Grubu	Konsantrasyon (µg/plate)	Maya Delesyon Testi (<i>S. cerevisiae</i> RS112)		
		<i>Yaşama Oranı</i>	<i>Kromozom İçi Kırılma Oranı</i>	<i>Kromozomlar Arası Kırılma Oranı</i>
		%	Ortalama ± S.D.	Ortalama ± S.D.
Biyosentetik ZnO nanopartikülü	640	95	54,17 ± 3,19	26,83 ± 1,60
	320	99	56,83 ± 3,71	28,83 ± 2,56
	160	87	55,67 ± 3,39	29,00 ± 2,37
	80	94	55,33 ± 3,44	29,33 ± 2,50
	40	95	57,17 ± 2,48	29,00 ± 2,61
	20	96	52,67 ± 2,07	28,17 ± 2,79
	10	90	54,83 ± 3,06	27,50 ± 1,87
	5	90	54,00 ± 3,16	30,00 ± 2,68
	1	96	55,83 ± 3,76	28,33 ± 2,80
	0,5	98	54,33 ± 3,27	26,67 ± 1,63
Kontroller	EMS ^a	97	459,67 ± 5,89	336,00 ± 6,75
	Su ^a (µl/plate)	100	54,33 ± 2,07	27,00 ± 2,68

^a EMS (100 µl/plate) pozitif kontrol olarak, su (100 µl/plate) ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. ^b p<0,05.

**Şekil 4.13.** ZnO nanopartiküllerinin maya delesyon mutajenite testi sonuçları

4.3. RAPD Çalışmaları

4.3.1. RAPD sonuçlarının değerlendirilmesi

ZnO nanopartiküllerinin çeşitli konsantrasyonlarının (0, 40, 80, 160, 320 ve 640 µg/ml) *Triticum aestivum* cv. genomu üzerindeki genetiksel etkilerini test etmek için toplam 32 RAPD primeri denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 12 primer seçilerek GTS değerlerinin hesaplanabilmesi için değerlendirilmeye alınmıştır. GTS oranı üzerine uygulanan dozların ana etkileri karşılaştırıldığında hiçbir test grubunun GTS oranında dikkate değer bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. Bu çalışmaya ait GTS verileri Çizelge 4.10'da özetlenmiştir.

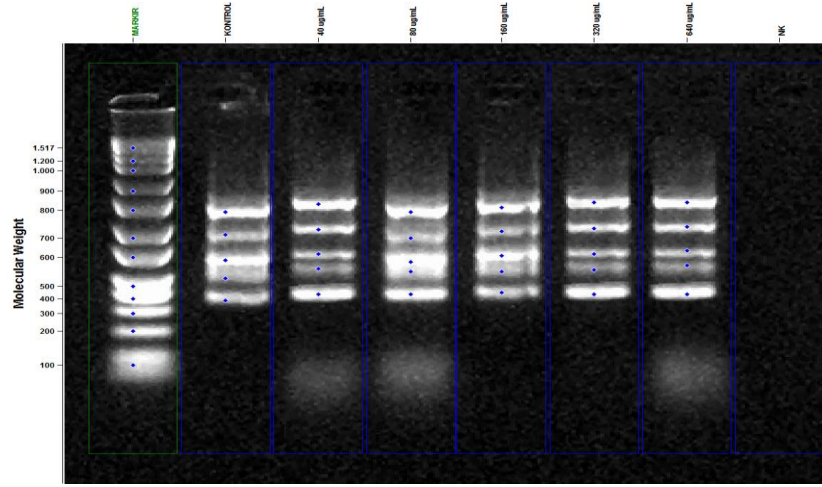
Çizelge 4.10. Genomik kalıp sabitliliği (%GTS)

Primer	K	G1	G2	G3	G4	G5	K1	K2	K3	K4	K5
OPA-4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPA-12	100	100	100	100	100	100	100	75	100	100	100
OPA-2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPA-1	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPY-6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPY-11	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100
OPY-13	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPH-19	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100
OPY-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPY-16	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPW-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
OPA-4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ortalama	99,2	100	98,3	100	99,2	100	100	97,9	100	100	100

*(K: Kontrol, G1: 40 µg/ml, G2: 80 µg/ml, G3: 160 µg/ml, G4: 320 µg/ml, G5: 640 µg/ml, K1: 40 µg/ml, K2: 80 µg/ml, K3: 160 µg/ml, K4: 320 µg/ml K5: 640 µg/ml)

4.3.2. RAPD jel görüntüsü

Çalışmamızda gerçekleştirilen RAPD değerlendirmelerine ait örnek jel görüntüsü Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



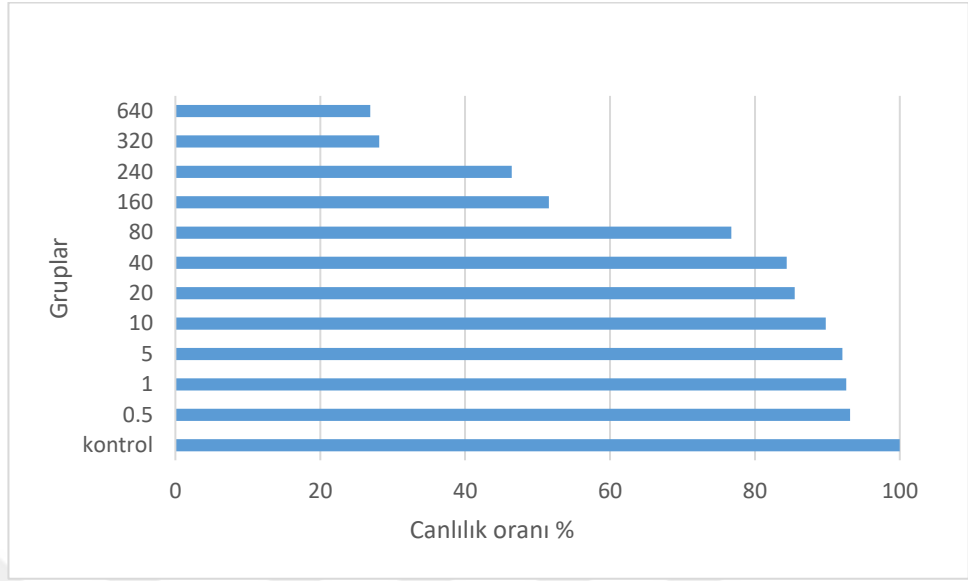
Şekil 4.14. OPW-7 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

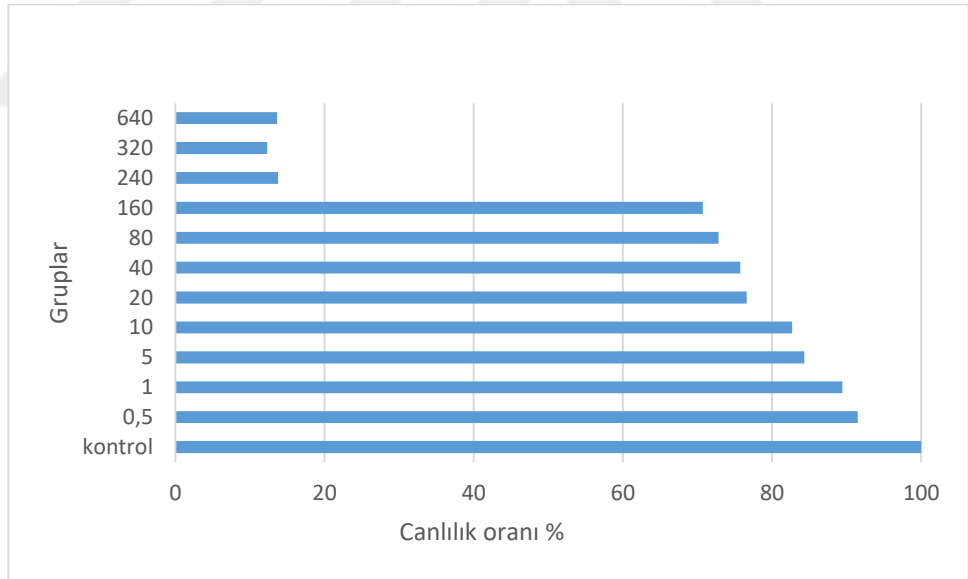
4.4.1. Hücre canlılık sonuçları

ZnO nanopartikül uygulaması yapılan HDFa hücre hatlarında MTT ile yapılan analizlerde 24 saat inkübasyon sonuçlarına göre; hiçbir uygulama yapılmayan HDFa hücrelerinin canlılığının en yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda uygulanan ZnO nanopartiküllerinin hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. En düşük hücre canlılığı oranının 640 µg/ml madde uygulanan grupta olduğu gözlemlenmiş ve bu dozun HDFa hücreleri için toksik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).

ZnO nanopartikül uygulaması yapılan HDFa hücre hatlarında MTT ile yapılan analizlerde 72 saat inkübasyon sonuçlarına göre; hiçbir uygulama yapılmayan HDFa hücrelerinin canlılığının en yüksek olduğu belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda uygulanan ZnO nanopartiküllerinin hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. En düşük hücre canlılığı oranının 320 µg/ml madde uygulanan grupta olduğu gözlemlenmiş ve bu dozun HDFa hücreleri için toksik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Farklı dozlarda 24 ve 72 saat süre ile ZnO nanopartikülü uygulanan HDFa hücrelerine ait sitotoksikite değerleri Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. 24 saat süreli ZnO uygulaması yapılan HDFa hücrelerine ait hücre canlılığı analizi sonuçları



Şekil 4.16. 72 saat süreli ZnO uygulaması yapılan HDFa hücrelerine ait hücre canlılığı analizi sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çoğu prokaryotik ve ökaryotik canlının yapısına katılan en temel eser elementlerden birisi olarak kabul edilen çinko; homeostazi, immun-cevap, oksidatif stres, hücre farklılaşması ve yaşlanma gibi birçok kritik metabolik yolağın işleyişi için hayati öneme sahiptir (Mocchegiani *et al.* 2000; Beyersmann 2002; Stefaniodu *et al.* 2006). Dahası çeşitli hücrelerde memeli androjen reseptörlerin işlevini sürdürebilmesi, yeni nükleik asit moleküllerinin sentezlenmesi ve bu moleküllerin stabiliteilerinin arttırılması, birçok enzimin aktivasyonu ve transkripsiyonun regülasyonu gibi olaylar çinko türevlerine ihtiyaç duyar. Tüm bu değerli özellikleri göz önünde bulundurulduğunda Zn odaklı araştırmaların popülaritesinin yüksek oluşu şaşırtıcı değildir (Urnov *et al.* 2005; Mocchegiani and Malavolta 2008; Bialek and Zyska 2014).

Öte yandan, yaşamsal faaliyetlerdeki önemli rollerinin yanı sıra, deneysel olarak üretilen Zn türevi bileşikler zirai, çevresel, endüstriyel ve sağlık uygulamaları için sahip oldukları eşsiz özelliklerinden dolayı son yıllarda daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır (Singh *et al.* 2009; Ma and Williams 2013; Wang *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014). Bu bileşikler arasında özellikle ZnO nanopartikülleri piezoelektrik, yarı iletkenlik ve optik özellikleri aynı anda bulunduran nadir bileşikler arasında yer alır (Sangeetha *et al.* 2011; Rouhi *et al.* 2013; Yan *et al.* 2016; Omri *et al.* 2016). Dahası, antimikrobiyal, dermatolojik, elektronik, optik ve fotokatalitik aktiviteler gibi pek çok kıymetli özelliği barındırmalarından dolayı kozmetik, tıp, eczacılık ve tekstil gibi pek çok alanda geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Demir 2015).

Bu durum ZnO nanopartiküllerinin kısa zamanda çeşitlendirilmesi ve yoğun miktarlarda üretilmesiyle sonuçlanmıştır. Öte yandan bu bileşiklerin son yıllarda canlılar ve çevre üzerine zararlı etkiler gösterebileceklerinin keşfedilmesi bilimsel ve toplumsal camialarda kaygılara sebep olmuştur (Baskar *et al.* 2013; Adam *et al.* 2014; Yusan *et al.* 2016). Özellikle kimyasal ve fiziksel üretim yollarını içeren geleneksel yöntemlerin ana ve yan ürünlerinin önemli toksik potansiyele sahip olabileceğinin anlaşılması bu alandaki araştırmaları daha güvenli son ve yan ürünler üreten alternatif üretim

teknolojileri geliştirmeye yöneltmiştir (Landa *et al.* 2012; Gunawan *et al.* 2013; Majedia *et al.* 2014; Gonzalez-Estrella *et al.* 2015).

Bu konuda en umut vaat eden yaklaşım mevcut çalışmamızın da konusunu oluşturan yeşil sentez uygulamaları olmuştur. Bu bilgiler ışığında hem nanopartiküllerin yeşil sentezi için gerekli özellikleri sağlayan hem de literatürde daha önce benzer bir çalışmada kullanılmamış olan *S. albus* bitkisi tez çalışmamızda ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentezi için bitki materyali olarak seçilmiştir.

Bu çerçevede, bitki materyalimizin sulu ekstraktı ve çinko nitrat öncüsü yeşil sentez uygulaması için kullanılmış ve reaksiyon sonrasında elde edilen ürün yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla analiz edilmiştir. Buna göre SEM ve EDAX bulguları ortalama 30 nm çapında çoğunlukla pürüzsüz yüzeyli küresel nanopartiküllerin başarıyla sentezlenebildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu bulgular *S. albus* bitkisinin ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentezinde kullanılabileceği hipotezimizi deneysel olarak desteklemektedir.

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda yeşil sentez yaklaşımlarıyla üretilmiş nanopatiküllerin de sanılanın aksine canlılara ve çevreye zarar verebilme potansiyellerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Dimkpa *et al.* 2012; Song *et al.* 2014; Zukiene and Snitka 2015). Bu durum nanopartiküller yeşil sentezle sentezlenmiş olsalar bile kullanımlarından önce toksikoloji testleriyle değerlendirilmelerini zorunlu kılmıştır. Bunun neticesi olarak tez çalışmamıza da sentez ve karakterizasyon basamaklarını takip edecek güvenlik testleri dahil edilmiştir.

E. coli WP2uvra, *S. typhimurium* TA1535 ve 1537 mutant bakteri ırkları ile yapılan canlılık testlerinde sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin 640 µg/ml konsantrasyona kadar herhangi bir toksik etkinlik göstermediği açıkça görülmüştür. Bu sonuç, test materyalimizin prokaryotik organizmalar üzerinde güvenle kullanılabileceğine işaret etmektedir. Yine aynı test mikroorganizmaları ile yapılan genotoksisite testlerinde de sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin herhangi bir mutajenik potansiyele sahip

olmadıkları, dolayısıyla bu biyosentetik preparatın prokaryotik organizmalar için 640 µg/ml konsantrasyona kadar olan maruziyetlerde genotoksik açıdan güvenli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar daha detaylı değerlendirilecek ve literatür bilgileri ile kıyaslanacak olursa test maddesinin non-mutajenik doğasının aydınlatılmasına yönelik üç temel yaklaşım öne sürülebilir.

Bu yaklaşımlardan birincisi mutant *E. coli* WP2uvrA test suşunun kullanıldığı mutajenite test sisteminden elde edilmiştir. Önemli bakteriyel geri mutasyon testlerinden biri olan bu test sistemi, ilk kez 1976 yılında Green ve Muriel isimli araştırmacılar tarafından; kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırılması amacıyla geliştirilmiştir (Green ve Muriel 1976). Bu test sisteminde triptofan oksotrofu olan *E. coli* bakteri suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar ile yapılan genomik düzeydeki araştırmalar; her bir test suşunun, triptofan sentezindeki önemli enzimlerden birini kodlayan *trpE* geninde A=T baz değişimi nokta mutasyonu taşıdığını göstermiştir (Mortelmans and Riccio 2000). Bu mutasyonu taşıyan *E. coli* test suşlarında görülen triptofan oksotrofluğunun sebebi; meydana gelen AT baz değişiminin, *trpE* gen bölgesinde bir ochre (anlamsız, non-sense) mutasyonla sonuçlanması ile açıklamaktadır (Mortelmans and Riccio 2000). Bu test sisteminde test maddesinin mutajenik potansiyelinin belirlenmesinde çalışan mekanizma ise oksotrof mutant hücrelerde bahsi geçen A=T baz değişimi nokta mutasyonunun ortaya çıkacak mutajenik etki sonucunda geriye döndürülmesi (geri mutasyon) ve nihayetinde triptofan prototroflarının gözlenmesi esaslarına dayanır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010). Benzer şekilde tez çalışmamızda da triptofan oksotrofu olan *E. coli* WP2uvrA test suşuna biyosentetik ZnO nanopartikül solüsyonu bir seri konsantrasyonda (0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ve 640 µg/ml) uygulanmış ve uygulama sonrasında geri dönen prototrofların sayısı model genotoksik ajan olarak *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) kullanılarak hazırlanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslanarak nihai değerlendirmeler yapılmıştır (Karadayı 2010). Burada kullanılan MNNG iyi bilinen bir karsinojendir ve mutajenik etki mekanizması metabolik yollar sonucunda 7-methylguanine (N7-MeG), 3-methyladenine (N3-MeA) ve O6-methylguanine (O6-MeG) ara ürünlerinin hücre içinde ortaya çıkması esasına dayanır. Bu noktada *S. albus* sulu ekstraktı kullanılarak yeşil

sentez ile üretilen ZnO nanopartiküllerinin MNNG'ye benzer mekanizmaları uyarmadığı ve bu yüzden mutajenik etkiye sahip olmadığı öne sürülebilir. Öte yandan test suşunun prototrof hale dönebilmek için geri nokta mutasyon geçirmesi gereken hedef bölgesinin A=T baz çiftinden oluşması bu test suşunu oksidatif mekanizmaları tetikleyerek etki gösteren zayıf mutajenleri bile hassas bir şekilde tespit edebilecek hassasiyete yükseltmiştir. Bu bilgi ışığında yine test materyalimizin oksidatif yolları da uyarabilecek herhangi bir etkiye sahip olmadığı ortaya konulmuştur (Mortelmans and Riccio 2000).

Benzer şekilde olan ikinci yaklaşım da *S. typhimurium* TA1535 test suşunun kullanıldığı mutajenite test sisteminden elde edilmiştir. Ames *Salmonella* Test sistemi içerisinde yer alan bu test suşu histidin operonunda *hisG* geninde meydana getirilen bir baz değişimi nokta mutasyonu sonucunda histidin oksotrofu haline dönüşmüştür. *E. coli* WP2uvrA test suşuna benzer şekilde, bu test sisteminde de test maddesinin mutajenik potansiyelinin belirlenmesinde çalışan mekanizma oksotrof mutant hücrelerde bulunan baz değişimi nokta mutasyonunun ortaya çıkacak mutajenik etki sonucunda geriye döndürülmesi (geri mutasyon) ve nihayetinde prototrofların gözlenmesi esaslarına dayanır. Bu test suşu geri mutasyonun gerçekleşeceği hedef bölgede A=T yerine G=C baz çiftinin olması ve bunun bir sonucu olarak geri mutasyon olaylarının indüklenmesi için daha kuvvetli mutajenik etkilere ihtiyaç duyması ile *E. coli* WP2uvrA test suşundan farklılık göstermektedir. Nitekim çalışmamızda da *S. typhimurium* TA1535 test suşunun pozitif kontrol grubunun hazırlanabilmesi için model mutajen olarak sodyum azid (NaN_3) kullanılmıştır. Aynı test sistemi, test suşu ve mutajen ile yapılan benzer literatür çalışmaları, sodyum azidin mutajenik etkisinin ortaya çıkmasında metabolik yollar sonucunda L-azidoalanine ara ürünlerinin hücre içinde ortaya çıkması ve genomik materyalle etkileşime girmesi temeline dayandığını ortaya koymuştur. Buna göre çalışmamız kapsamında yeşil sentez ile üretilen ZnO nanopartiküllerinin NaN_3 'e benzer mekanizmaları uyarmadığı ve bu yüzden mutajenik etkiye sahip olmadığı ön görülebilir. Öte yandan hedef gen bölgesindeki G=C baz çiftinin geri mutasyona uğramak için nispeten daha fazla etki gücüne sahip mutajen maddelerin indüksiyonuna ihtiyaç duyması

gerçeğinden yola çıkılarak, test maddemizin uygulanan konsantrasyonlarda böyle bir aktiviteden yoksun olduğu hipotezi öne sürülebilir.

Test materyalimizin prokaryotik organizmalar üzerine olan non-mutajenik potansiyelinin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik son yaklaşım ise *S. typhimurium* TA1537 test suşu ile yapılan mutajenite denemelerinden elde edilmiştir. Burada kullanılan test suşu histidin operonunda *hisC* geninde meydana getirilen bir çerçeve kayması (-C-C-C-, +1) sonucunda histidin oksotrofu haline dönüşmesiyle karakterize edilmektedir. Gen mutasyonlarının ikinci önemli grubunu oluşturan çerçeve kayması tipi mutasyonlar hem oluşum hem de etki mekanizmaları bakımından baz değişimi nokta mutasyonlarından oldukça farklıdır. Dolayısıyla test maddelerinin gen mutasyonlarına sebep olabilme potansiyellerinin tam olarak anlaşılabilmesi için baz değişimi nokta mutasyonlarına sebep olan ajanların tespit edilmesine olanak sağlayan *E. coli* WP2uvrA ve *S. typhimurium* TA1535 test suşları ile yapılan mutajenite testlerine ilaveten *S. typhimurium* TA1537 test suşu ile yapılan çalışmaların da bulguları eklenmelidir. Bu ilke çerçevesinde kurgulanan çalışmamızda da *S. typhimurium* TA1537 test suşu yeşil sentez ile üretilen ZnO nanopartikülü solüsyonunun 0,5-640 µg/ml arasında değişen konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve bulguların analiz edilmesiyle 9-aminoakridinin bilinen mutajen olarak kullanıldığı pozitif kontrol grubunun haricinde herhangi bir mutajenik etkinliğe rastlanmamıştır. 9-aminoakridin en çok araştırılan ve en yaygın kullanılan interkalasyon ajanlarının başında gelmektedir. Yapılan çalışmalar 9-aminoakridinin mutajenik etkinliğinin ortaya çıkmasının temelinde bu bileşiğin DNA ile non-kovalent bağlanmasının ve bunun sonucunda özellikle guanin tekrarlarının olduğu bölgelerde çerçeve kaymalarına sebep olmasının bulunduğu bilinmektedir. Buna göre test bileşiğimizin interkalasyon ajanları gibi davranmadığı ve çerçeve kayması tipi mutagenezi uyarmadığı öne sürülebilir.

Çalışmamızda aynı zamanda, biyosentez ile üretilen ZnO nanopartiküllerinin ökaryotik organizmalar üzerine olan güvenlilik potansiyeli araştırmaları da yapılmıştır. Bu araştırmalardan ilki diploid *S. cerevisiae* RS112 ırkının kullanıldığı canlılık ve genotoksisite denemeleridir (Brennan and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005; Sobol *et*

al. 2007; Rodriguez *et al.* 2008). Bu bağlamda canlılık testlerinden elde edilen bulgular, test materyalimizin 640 µg/ml konsantrasyonuna kadar maya hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, aynı test ırkıyla gerçekleştirilen genotoksisite çalışmalarında uygulanan test maddesinin farklı konsantrasyonlarının tamamı için DEL rekombinasyon ve gen konversiyon frekanslarında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Test maddesinin böyle bir artışa sebep olmaması; rekombinasyon, delesyon ve karsinogenezis arasındaki yakın ilişkinin bilinmesinden dolayı üretilecek teknolojilerin güvenli bir şekilde kullanıma sunulması için oldukça arzu edilen bir durumdur. Bu noktada genomik delesyonlar (DEL) ile sonuçlanan intrakromozomal homolog rekombinasyonların ve interkromozomal gen konversiyonların frekanslarını ölçebilen güvenilir bir test sistemi olan maya delesyon testinin en iyi karakterize edilmiş test suşu *S. cerevisiae* RS112'dir (Brennan and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005). Bu ırk ADE 2 lokusunda da heteroallelik mutasyonlar taşır ve hem histidin hem de adenin oksotrofudur. Bu yüzden RS112, aynı anda hem intrakromozomal hem de interkromozomal dönüşümlerin frekanslarının belirlenmesinde kolaylıkla kullanılabilir (Sobol *et al.* 2007; Rodriguez *et al.* 2008). Bu iki rekombinasyon çeşidinin birbirinden oldukça farklı oluşum mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda çeşitli karsinojen maddelerin etki mekanizmalarının araştırılmasında önemli avantaj sağlayacağı aşikardır. Ayrıca bu çalışmada pozitif kontrol gruplarının hazırlanmasında kullanılan etil metan sülfonat önemli bir model mutajenik ajandır. Bu mutajenin etkisini özellikle pürin bazlarını doğrudan alkilemek suretiyle ortaya çıkardığı bilinmektedir (Kirpnick *et al.* 2005). Sonuç olarak bahsi geçen bilimsel verilerin ışığında test maddemizin alkilleyici potansiyelinin olmadığını, dahası mutant *S. cerevisiae* RS112 test suşunda intrakromozomal ya da interkromozomal dönüşümler açısından 640 µg/ml uygulama konsantrasyonuna kadar güvenli kabul edilebileceği öne sürülebilir.

Çalışmamızda mikrobiyal test yöntemlerinin yanısıra, elde edilen nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla bitkilerde genom profillerindeki farklılıkları tespit edebilen hassas bir yöntem olan RAPD analizleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde RAPD ve genotoksisite konu başlıklarını kapsayacak çok sayıda çalışma olmasına karşın özellikle RAPD tekniği kullanılarak nanopartiküllerin

genotoksisitesini belirlemeyi konu alan araştırma sayısı oldukça azdır. Salama *et al.* (2019) tarafından gerçekleştirilen güncel bir çalışmada ZnO nanopartiküllerinin doza bağımlı bir şekilde *Phaseolus vulgaris* bitki genomu ve proteinleri kodlayan bazı genlerin ekspresyonu üzerine genotoksik etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir. Buna karşın mevcut çalışmamızdaki RAPD analizlerinden elde ettiğimiz bulgular, yeşil sentez ile üretilen ZnO nanopartiküllerinin bitki genomları üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadıklarına işaret etmektedir.

Ayrıca çalışmamızda son olarak biyosentez yolu ile üretilen nanopartiküllerin biyoyumluluklarını kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amacıyla fibroblast hücre hattı (HDFa) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda, hücre hatlarına farklı dozlarda (0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/ml) 24 ve 72 saatlik iki farklı kültürde ZnO nanopartikülleri uygulanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarından elde ettiğimiz toksisite bulguları, test maddemizin 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml dozlarında düşük bir sitotoksosite gösterdiğini ve artan konsantrasyonlarda ise (160, 320, 640 µg/ml) doza bağımlı bir şekilde artan bir sitotoksosite gösterdiğini ortaya koymuştur. Deng *et al.* (2009); Hsiao and Huang (2011); Hackenberg *et al.* (2011); Fukui *et al.* (2012); Pujalte *et al.* (2011); Li *et al.* (2012); Valdiglesias *et al.* (2013) tarafından ZnO nanopartiküllerinin farklı hücre hatları üzerine toksik etkileri araştırılmış ve uygulanan doz miktarlarına bağlı olarak bu nanopartiküllerin toksik etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulguların literatür verilerine benzer olması, ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentez ile üretilmiş olsalar bile kullanımlarından önce kapsamlı güvenlik testlerine tabi tutulma gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu noktada çevre ve canlılar için güvenli maruziyet konsantrasyonlarının belirlenmesine olanak sağlayacak doz deneme çalışmalarının da önemi göz ardı edilmemelidir.

Özetlenecek olursa, tez çalışmamız ile 30 nm çaplı küresel ZnO nanopartiküllerinin *S. albus* meyvelerinden elde edilen sulu ekstrakt kullanılarak yapılan yeşil sentez uygulaması sonucunda daha ucuz, çevreci, güvenli ve sürdürülebilir özelliklerde üretilebileceği ortaya konulmuştur. Dahası yapılan biyoyumluluk testlerinden Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2, maya delesyon ve RAPD test sistemleri elde edilen

nanopartiküllerin prokaryotik mikroorganizmalar, ökaryotik mikroorganizmalar ve gelişmiş bitkiler üzerine 640 µg/ml konsantrasyona kadar toksik veya genotoksik etkinliğe sebep olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte MTT test sisteminde artan doza bağımlı olarak ortaya çıkan sitotoksik etki, üretilen nanopartiküllerin güvenliklerinin daha gelişmiş test sistemleriyle de doğrulanması gerekliliğine işaret etmektedir. Sonuç olarak mevcut tez çalışmamız hem yeşil sentez adımlarını içermesi hem de biyoyumluluk ile ilişkili öncü sonuçları içermesi yönüyle ZnO nanopartiküllerinin gelecekte yapılacak endüstriyel ölçekli üretim araştırmalarına kaynak sağlayacak niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Abdul, H., Sivaraj, R. and Venckatesh, R., 2014. Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles from *Ocimum Basilicum* L. Var. Purpurascens Benth.-Lamiaceae Leaf Extract, Mater Lett, (131), 16–18.
- Adam, N., Schmitt, C., Galceran, J., Companys, E., Vakurov, A., Wallace, R., Knapen D. and Blust, R., 2014. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. Nanotoxicology, 8, 709–717.
- Agarwal, H., Venkat Kumar, S., and Rajeshkumar, S., 2017. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles an eco-friendly approach. Resource Efficient Technologies, 3, 406–413.
- Agüeros, M., Espuelas, S. and Esparza, I., 2011. Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. Expert Opin Drug Deliv, 8, 721–734.
- Ahmed, M., Pan, D.W. and Davis M.E., 2015. Lack of *in vivo* antibody dependent cellular cytotoxicity with antibody containing gold nanoparticles. Bioconjug Chem, 26, 812–816.
- Alam, S.R., Shah, A.S. and Richards, J., 2012. Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in patients with acute myocardial infarction: early clinical experience. Circ Cardiovasc Imaging, 5, 559–565.
- Algar, W.R., Tavares, A.J. and Krull, U.J., 2010. Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. Anal Chim Acta. (673), 1–25.
- Ali, K., Dwivedi, S., Azam, A., Saquib, Q., Al-said, M.S and Alkhedhairi, A.A., 2016. *Aloe vera* Extract Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles as Nanoantibiotics Against Multi-Drug Resistant Clinical Bacterial Isolates. J. Colloid Interface Sci, (472), 145–156.
- Alibolandi, M., Ramezani, M., and Abnous, K., 2015. *In vitro* and *in vivo* evaluation of therapy targeting epithelial-cell adhesion-molecule aptamers for non-small cell lung cancer. J Control Release, 209, 88–100.
- Almutairi, A., Rossin, R., and Shokeen, M., 2009. Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobe for the noninvasive imaging of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci, 106, 685–690.
- Ambika, S., Sundrarajan, M., 2015. Antibacterial Behaviour of *Vitex negundo* Extract Assisted Zno Nanoparticles Against Pathogenic Bacteria. J. Photochem. Photobiol. B Biol, (146), 52–57.
- Anbuvaran, M., Ramesh, M., Viruthagiri, G., Shanmugam, N. and Kannadasan, N., 2015. Synthesis, Characterization and Photocatalytic Activity of Zno Nanoparticles Prepared by Biological Method. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc, (143), 304–308.
- Arasu, T., 2010. Stable Silver Nanoparticle Synthesizing Methods and Its Applications. J. Biosci. Res, (1), 259–270.
- Arora, H.C., Jensen, M.P. and Yuan, Y., 2012. Nanocarriers enhance doxorubicin uptake in drug-resistant ovarian cancer cells. Cancer Res, 72, 769–778.

- Arslan, E., 2012. Kuraklık Stresine Maruz Kalan Buğdayda (*Triticum aestivum*) Genetik ve Epigenetik Değişiklikler Üzerine Putresinin Etkisinin Moleküler Yöntemler İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Avci, O., Ünlü, N.L., Özkumur, A.Y. and Ünlü, M.S., 2015. Interferometric reflectance imaging sensor (IRIS) – a platform technology for multiplexed diagnostics and digital detection. *Sensors (Basel)*, 15, 17649–17665.
- Baalousha, M., Prasad, A. and Lead, J.R., 2014. Quantitative measurement of the nanoparticle size and number concentration from liquid suspensions by atomic force microscopy. *Environ Sci Process Impacts*, (16), 1338–1347.
- Baleizão, C. and Farinha, J.P., 2015. Hybrid smart mesoporous silica nanoparticles for theranostics. *Nanomedicine*, 10, 2311–2314.
- Bardakcı, F., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk J Biol*, 25, 185–196.
- Baskar, G., Chandhuru, J., Fahad, K.S. and Praveen, A.S., 2013. Mycological Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Asian J. Pharm. Tech*, 3, 142–146.
- Bawa, R., Fung, S.Y. and Shiozaki, A., 2012. Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. *Nanomedicine*, 8, 647–654.
- Baysal, I., Yabanoglu-Ciftci, S., Tunc-Sarisozen, Y., Ulubayram, K. and Ucar, G., 2013. Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils. *J Neural Transm*, 120, 903–910.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. and Farokhzad, O.C., 2014. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*, 66, 2–25.
- Beyersmann, D., 2002. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Mat. Wiss. Werkstofftech*, 33, 764–769.
- Bhaskar, K., Anbu, J., and Ravichandiran, V., 2009. Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies. *Lipids Health Dis*, 8, 6.
- Bhuyan, T., Mishra, K., Khanuja, M., Prasad, R. and Varma, A., 2015. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from *Azadirachta indica* for Antibacterial And Photocatalytic Applications. *Mater. Sci. Semicond. Process*, (32), 55–61.
- Białek, M. and Zyska, A., 2014. The biomedical role of zinc in the functioning of the human organism. *Pol. J. Public Health*, 124, 160–163.
- Blom, H. and Brismar, H., 2014. STED microscopy: increased resolution for medical research? *J Int Med*, (276), 560–78.
- Bonaccorso, F., Colombo, L., and Yu, G., 2015. 2D materials: Graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems for energy conversion and storage. *Science*, (347), 1246501.
- Bondi, M.L., and Craparo, E.F., 2010. Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 7–18.
- Bonoiu, A.C., Mahajan, S.D. and Ding, H., 2009. Nanotechnology approach for drug addiction therapy: gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 5546–5550.
- Breitenstein, M., Holzel, R. and Bier, F.F., 2010. Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy. *J Nanobiotechnol*, 8, 10.

- Brennan, R.J., and Schiestl, R.H., 2004. Detecting Carcinogens With the Yeast DEL Assay. *Methods in Molecular Biology*, 262, 111–124.
- Brito, L. and Amiji, M., 2007. Nanoparticulate carriers for the treatment of coronary restenosis. *Int J Nanomedicine*, 2, 143–161.
- Brudno, Y., Silva, E.A. and Kearney, C.J., 2014. Refilling drug delivery depots through the blood. *Proc Natl Acad Sci*, 111, 12722–12727.
- Bryson, J.M., Fichter, K.M. and Chu, W.J., 2009. Polymer beacons for luminescence and magnetic resonance imaging of DNA delivery. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 16913–16918.
- Butler, T.Z., Pavlenok, M. and Derrington, I.M., 2008. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proc Natl Acad Sci*, 105, 20647–20652.
- Byers, R.J. and Hitchman, E.R., 2011. Quantum dots brighten biological imaging. *Prog Histochem Cytochem*, 45, 201–237.
- Cadete, A. and Alonso, M.J., 2016. Targeting cancer with hyaluronic acid-based nanocarriers: recent advances and translational perspectives. *Nanomedicine*, 11, 2341–2357.
- Cao, L., Liang, Y. and Zhao, F., 2016. Chelerythrine and Fe₃O₄ loaded multi-walled carbon nanotubes for targeted cancer therapy. *J Biomed Nanotechnol*, 12, 1312–1322.
- Carbonaro, A., Mohanty, S.K., and Huang, H., 2008. Cell characterization using a protein-functionalized pore. *Lab Chip*, 8, 1478–1485.
- Cardinale, D., Carette, N. and Michon, T., 2012. Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends Biotechnol*, (30), 369–76.
- Castaneda, R.T., Khurana, A., Khan, R. and Daldrup-Link, H.E., 2011. Labeling stem cells with ferumoxytol, an FDA-approved iron oxide nanoparticle. *J Vis Exp*, 57, 3482.
- Cavalli, R., Soster, M. and Argenziano, M., 2016. Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery. *Ther Deliv*, 7, 117–138.
- Chahal, J.S., Khan, O.F. and Cooper, C.L., 2016. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci*, 113, 4133–4142.
- Chang, M.Y., Yang, Y.J. and Chang, C.H., 2013. Functionalized nanoparticles provide early cardioprotection after acute myocardial infarction. *J Control Release*, 170, 287–294.
- Chatterjee, D.K., Rufaihah, A.J., and Zhang, Y., 2008. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*, (29), 937–43.
- Chen, J., Abell, J., Huang, Y.W. and Zhao, Y., 2012. On-chip ultra-thin layer chromatography and surface enhanced raman spectroscopy. *Lab Chip*, 12, 3096–3102.
- Cheng, K., Shen, D. and Hensley, M.T., 2014. Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting. *Nat Commun*, 5, 4880.
- Cheng, Y., Zhao, L., Li, Y. and Xu, T., 2011. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem Soc Rev*, 40, 2673–2703.

- Clark, A.J., Wileya, D.T. and Zuckerman, J.E., 2016. CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing. *Proc Natl Acad Sci*, 113, 3850–3854.
- Clemons, T.D., Viola, H.M. and House, M.J., 2013. Examining efficacy of “TAT-less” delivery of a peptide against the L-type calcium channel in cardiac ischemia reperfusion injury. *ACS Nano*, 7, 2212–2220.
- Cohen, S.M., Mukerji, R. and Cai, S., 2011. Subcutaneous delivery of nanoconjugated doxorubicin and cisplatin for locally advanced breast cancer demonstrates improved efficacy and decreased toxicity at lower doses than standard systemic combination therapy *in vivo*. *Am J Surg*, 202, 646–653.
- Corstjens, P.L., de Dood, C.J., and van der Ploeg-van Schip, J.J., 2011. Lateral flow assay for simultaneous detection of cellular and humoral immune responses. *Clin Biochem*, 44, 1241–1246.
- Cotte, Y., Toy, F. and Jourdain, P., 2011. Marker-free phase nanoscopy. *Nat Photonics*, 7, 113–117.
- Courties, G., Heidt, T. and Sebas, M., 2014. *In vivo* silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing. *J Am Coll Cardiol*, 63, 1556–1566.
- Crielaard, B.J., Rijcken, C.J. and Quan, L., 2012. Glucocorticoid-loaded core-cross-linked polymeric micelles with tailorable release kinetics for targeted therapy of rheumatoid arthritis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51, 7254–7258.
- Cunningham, B.T., 2010. Photonic crystal surfaces as a general purpose platform for label-free and fluorescent assays. *Jala Charlottesville Va*, 15, 120–135.
- Dantham, V.R., Holler, S. and Barbre, C., 2013. Label-free detection of single protein using a nanoplasmonic photonic hybrid microcavity. *Nano Lett*, 13, 3347–3351.
- Debbage, P. and Jaschke, W., 2008. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *J Histochem Cell Biol*, 130, 845–875.
- Degen, C.L., Poggio, M., and Mamin, H.J., 2009. Nanoscale magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci*, (106), 1313–7.
- Delogu, L.G., Gemma, L. and Vidili, G., 2012. Functionalized multiwalled carbon nanotubes as ultrasocontrast agents. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 16612–16617.
- Delyagina, E., Li, W., Ma, N. and Steinhoff, G., 2011. Magnetic targeting strategies in gene delivery. *Nanomedicine*, 6(9), 1593–1604.
- Demir, A.Y., 2015. *Rhodococcus erythropolis* K85 Kullanılarak Çinko Oksit (ZnO) Nanopartiküllerinin Biyosentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Deng, H., Xu, Y. and Liu, Y., 2012. Gold nanoparticles with asymmetric polymerase chain reaction for colorimetric detection of DNA sequence. *Anal Chem*, 84, 1253–1258.
- Dimkpa, C.O., Mclean, J.E., Britt, D.W. and Anderson, A.J., 2012. CuO and ZnO nanoparticles differently affect the secretion of fluorescent siderophores in the beneficial root colonizer, *Pseudomonas chlororaphis* O6, *Nanotoxicology*, 6, 635–642.
- Dina, M.S., Samira, A., Osman, M.E., El-Aziz, A., Mohamed, S.A., Elwahedd, A., and Shaabane, E.A., 2019. Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth, genomic DNA, production and the quality of common dry bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101083.

- Dobrucka, R. and Długaszewska, J., 2016. Biosynthesis and Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles Using *Trifolium pratense* Flower Extract. *Saudi J Biol Sci*, (23), 517–523.
- Donaldson, K., Li, X.Y. and MacNee, W. 1998. Ultrafine (Nanometre) Particle Mediated Lung Injury. *Journal of Aerosol Science*, 29(5), 553–560.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W. and Borm, P.J.A., 2004. *Nanotoxicology*, BMJ Publishing Group
- Dong, B., Almassalha, L.M., Stypula-Cyrus, Y., 2016. Superresolution intrinsic fluorescence imaging of chromatin utilizing native, unmodified nucleic acids for contrast. *Proc Natl Acad Sci*, 113, 9716–9721.
- Dosev, D., Nichkova, M., and Kennedy, I.M., 2008. Inorganic lanthanide nanophosphors in biotechnology. *J Nanosci Nanotechnol*, 8, 1052–1067.
- Douglas, S.M., Bachelet, I. and Church, G.M., 2012. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 335, 831–834.
- Dragavon, J., Blazquez, S. and Rekiki, A., 2012. *In vivo* excitation of nanoparticles using luminescent bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 8890–8895.
- Du, X., An, H. and Jin, B., 2014. Carbon nanotubes altering specificity of repeated PCR and DNA integrity properties. *J Nanosci Nanotechnol*, 14, 5547–5551.
- Duceppe, N. and Tabrizian, M., 2010. Advances in using chitosan-based nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 1191–1207.
- Edenharder, R. and Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, 540, 1–18.
- Edwards, K.A., Wang, Y., and Baeumner, A.J., 2010. Aptamer sandwich assays: human α -thrombin detection using liposome enhancement. *Anal Bioanal Chem*, 398, 2645–2654.
- Eliasof, S., Lazarus, D. and Peters, C.G., 2013. Correlating preclinical animal studies and human clinical trials of a multifunctional, polymeric nanoparticle. *Proc Natl Acad Sci*, 110, 15127–15132.
- Elumalai, K., Velmurugan, S., Ravi, S., Kathiravan, V. and Raj, G.A., 2015. Bio-approach: Plant mediated synthesis of ZnO nanoparticles and their catalytic reduction of methylene blue and antimicrobial activity. *Adv. Powder Technol*, 26, 1639–1651.
- Erlich, H.A., 1989. *PCR Technology Principles and Applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York.
- Esfandyarpour, R., Yang, L., and Koochak, Z., 2016. Nanoelectronic three-dimensional (3D) nanotip sensing array for real-time, sensitive, label-free sequence specific detection of nucleic acids. *Biomed Microdevices*, 18(1), 7.
- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. and Mazzanti G., 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1381–1387.
- Evans, C.W., Iyer, K.S. and Hool, L.C., 2016. The potential for nanotechnology to improve delivery of therapy to the acute ischemic heart. *Nanomedicine*, 11, 817–832.

- Fabbro, A., Scaini, D. and León, V., 2016. Graphene-based interfaces do not alter target nerve cells. *ACS Nano*, 10, 615–623.
- Fan, L., Lou, D., Zhang, Y., and Gu, N., 2014. Rituximab-Au nanoprobe for simultaneous dark-field imaging and DAB staining of CD20 over-expressed on Raji cells. *Analyst*, 139, 5660–5663.
- Fan, Z., Sun, L. and Huang, Y., 2016. Bioinspired fluorescent dipeptide nanoparticles for targeted cancer cell imaging and real-time monitoring of drug release. *Nat Nanotechnol*, 11, 388–394.
- Fang, R.H., Hu, C.M. and Zhang, L., 2012. Nanoparticles disguised as red blood cells to evade the immune system. *Expert Opin Biol Ther*, 12, 385–389.
- Fantner, G.E., Schumann, W. and Barbero, R.J., 2009. Use of self-actuating and self-sensing cantilevers for imaging biological samples in fluid. *Nanotechnology*, 20, 434003.
- Feng, S., dos Santos, M.C. and Carvalho, B.R., 2016. Ultrasensitive molecular sensor using N-doped graphene through enhanced Raman scattering. *Sci Adv*, 2(7), e1600322.
- Feng, S.S., Zeng, W., Teng Lim, Y., 2007. Vitamin E TPGS-emulsified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for cardiovascular restenosis treatment. *Nanomedicine*, 2, 333–344.
- Fichter, K.M., Flajolet, M., Greengard, P. and Vu, T.Q., 2010. Kinetics of G-protein coupled receptor endosomal trafficking pathways revealed by single quantum dots. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 18658–18663.
- Floriano, P.N., Christodoulides, N. and Miller, C.S., 2009. Use of saliva-based nanobiochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem*, 55, 1530–1538.
- Franco, M.A.R., 2018. Development of an Integrative Framework to Assess the Environmental Impacts of Engineered Nanomaterials. Ph.D. Thesis, Environmental Health Sciences, University of California, Los Angeles.
- Fu, L. and Fu, Z., 2015. *Plectranthus amboinicus* Leaf Extract-Assisted Biosynthesis of ZnO Nanoparticles And Their Photocatalytic Activity. *Ceram. Int*, (41), 2492–2496.
- Fukui, H., Horie, M., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., and Nishio, K., 2012. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem Biol Interact*; 198, 29–37.
- Gaglia, J.L., Guimaraes, A.R. and Harisinghani, M., 2011. Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients. *J Clin Invest*, 121, 442–445.
- Galanzha, E.I., Shashkov, E.V. and Kelly, T., 2009. *In vivo* magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat Nanotechnol*, 4, 855–860.
- Gao, N., Gao, T. and Yang, X., 2016. Specific detection of biomolecules in physiological solutions using graphene transistor biosensors. *Proc Natl Acad Sci*, 113, 14633–14638.
- Gassman, N.R., Nelli, J.P., and Dutta, S., 2010. Selection of bead-displayed, PNA-encoded chemicals. *J Mol Recognit*, 23, 414–422.
- Gaster, R.S., Hall, D.A., Nielsen, C.H., Sebastian, J.O., Heng, Y., Kathleen, E.M., Robert, J.W., Boris, M., Joseph, C.L., Sanjiv, S.G., and Shan, W., 2009. Matrix-

- insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine. *Nature Medicine*, (15), 1327–1332.
- Geng, Y., Dalhaimer, P. and Cai, S., 2007. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol*, 2, 249–255.
- Ghoroghchian, P.P., Therien, M.J. and Hammer, D.A., 2009. *In vivo* fluorescence imaging: personal perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1, 156–167.
- Ghosh, D., Bagley, A.F. and Deep, N.Y.J., 2014. Noninvasive imaging and surgical guidance of submillimeter tumors using targeted M13-stabilized single-walled carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci*, 111, 13948–13953.
- Glover, D.J., Ng, S.M. and Mechler, A., 2009. Multifunctional protein nanocarriers for targeted nuclear gene delivery in nondividing cells. *Faseb J*, 23, 2996–3006.
- Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Annadurai, G., and Kannan, C., 2013. Fruit-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Vitis vinifera* and Evaluation of Their Antimicrobial Efficacy. *J*, 3, 67, 1–6.
- Golub, E., Pelossof, G. and Freeman, R., 2009. Electrochemical, photoelectrochemical, and surface plasmon resonance detection of cocaine using supramolecular aptamer complexes and metallic or semiconductor nanoparticles. *Anal Chem*, 81, 9291–9298.
- Goluch, E.D., Stoeva, S.I. and Lee, J.S., 2009. A microfluidic detection system based upon a surface immobilized biobarcode assay. *Biosens Bioelectron*, 24, 2397–2403.
- Gonzalez-Estrella, J., Puyol, D., Sierra-Alvarez, R., and Field, J.A., 2015. Role of biogenic sulfide in attenuating zinc oxide and copper nanoparticle toxicity to acetoclastic methanogenesis. *J. Hazard. Mater*, 283, 755–763.
- Gordon, E.M., Levy, J.P., Reed, R.A., 2008. Targeting metastatic cancer from the inside: a new generation of targeted gene delivery vectors enables personalized cancer vaccination *in situ*. *Int J Oncol*, 33, 665–675.
- Grabbe, S., Landfester, K. and Schuppan, D., 2016. Nanoparticles and the immune system: challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 11, 2723–2734.
- Green, M.H.L. and Muriel, W.J., 1976. Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 39, 3–32.
- Grotjohann, T., Testa, I., and Reuss, M., 2012. rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells. *Elife*, 1, 00248.
- Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F. and Sahin, F., 2010. Mutagenic and Antimutagenic Effects of Hexane Extract of some *Astragalus* species Grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Phytotherapy Research*, 24, 1014–1018.
- Gunalan, S., Sivaraj, R. and Rajendran, V., 2012. Green Synthesized ZnO Nanoparticles Against Bacterial and Fungal Pathogens. *Prog Nat Sci Mater Int*, (22), 693–700.
- Gunawan, C., Sirimanoonphan, A., Teoh, W.Y., Marquis, C.P., and Amal, R., 2013. Submicron and nano formulations of titanium dioxide and zinc oxide stimulate unique cellular toxicological responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Hazard. Mater*, 260, 984–992.
- Gupta, A., Avci, P. and Sadasivam, M., 2013. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotechnol Adv*, 31, 607–631.

- Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., and Ginzkey, C., 2011. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells *in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 25, 657–663.
- Hall, D.A., Wang, S.X., Murmann, B. and Gaster, R.S., 2010. Portable biomarker detection with magnetic nanotags. *Conf Proc (Midwest Symp Circuits Syst)*, 1779–1782.
- Han, J.H., Kim, H.J. and Sudheendra, L., 2013. Electrophoretic build-up of multi nanoparticle array for a highly sensitive immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 41, 302–308.
- Harde, H., Das, M. and Jain, S., 2011. Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle. *Expert Opin Drug Deliv*, 8, 1407–1424.
- Hardy, N., Viola, H.M. and Johnstone, V.P., 2015. Nanoparticle mediated dual delivery of an antioxidant and a peptide against the L-type Ca^{2+} channel enables simultaneous reduction of cardiac ischemiareperfusion injury. *ACS Nano*, 9, 279–289.
- Haun, J.B., Yoon, T.J., Lee, H. and Weissleder, R., 2010. Magnetic nanoparticle biosensors. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2, 291–304.
- Hazra, C., Kundu, D., Chaudhari, and A., Tushar, J., 2013. Biogenic Synthesis, Characterization, Toxicity and Photocatalysis of Zinc Sulfide Nanoparticles Using Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BS01 as Capping and Stabilizing Agent. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 88, 6, 1039–1048.
- He, J., Evers, D.L., O’Leary, T.J. and Mason, J.T., 2012. Immunoliposome-PCR: a generic ultrasensitive quantitative antigen detection system. *J Nanobiotechnol*, 10, 26.
- Heath, J.R., 2015. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. *Proc Natl Acad Sci*, 112, 14436–14443.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. and Kahru, A., 2008. Toxicity of Nanosized and Bulk ZnO, CuO and TiO_2 to Bacteria *Vibrio fischeri* and Crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, (71), 1308–1316.
- Heller, D.A., Jin, H., Martinez, B.M., 2009. Multimodal optical sensing and analyte specificity using single-walled carbon nanotubes. *Nat Nanotechnol*, 4, 114–120.
- Hernando, S., Gartzandia, O. and Herran, E., 2016. Advances in nanomedicine for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nanomedicine*, 11, 1267–1285.
- Hild, W., Pollinger, K. and Caporale, A., 2010. G protein-coupled receptors function as logic gates for nanoparticle binding and cell uptake. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 10667–10672.
- Holmes, J.D., Lyons, D.M. and Ziegler, K.J., 2003. Supercritical Fluid Synthesis of Metal and Semiconductor Nanomaterials, *Chem. A Eur J*, (9), 2144–2150.
- Horacio, B., 2015. Cytotoxicology of Nanocomposites. *Bio-Nanoparticles Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications*. Om V. Singh, Wiley Blackwell United States, 273–302.
- Hoskins, C., Min, Y. and Gueorguieva, M., 2012. Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application. *J Nanobiotechnol*, 10, 27.

- Howlett, N.G., Schiestl, R.H., 2004. Nucleotide excision repair deficiency causes elevated levels of chromosome gain in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3, 127–134.
- Hsiao, I.L., and Huang, Y., 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *J Sci Total Environ*, 409, 1219–1228.
- Imtiaz, M., Shahzad, T., Shahid, M., Ismail, I.M.I., Mustafa, G. and Almeelbi, T., 2017. Zinc Oxide Nanoparticles Affect Carbon and Nitrogen Mineralization of Phoenix Dactylifera Leaf Litter in A Sandy Soil. *J. Hazard. Mater*, (324), 298–305.
- Jain, K.K. and Jain, V., 2006. Impact of nanotechnology on healthcare. *Nanotechnol Law Bus*, 3, 411–418.
- Jain, K.K., 2008. *A Handbook of Nanomedicine*. Humana/Springer, Tatowa.
- Jain, K.K., 2009a. *A Textbook of Personalized Medicine*. NY: Springer Science, New York.
- Jain, K.K., 2009b. Role of Nanobiotechnology in the Development of Personalized Medicine. *Nanomedicine*, (4), 249–252.
- Jain, K.K., 2009c. Current Status and Future Prospects of Nanoneurology. *Journal of Nanoneuroscience*, (1), 56–64.
- Jain, K.K., 2009d. *Application of Nanobiotechnology in Cancer Therapeutic. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Springer, New York, 245–268.
- Jain, K.K., 2009e. Role of Nanobiotechnology in Drug Discovery. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (655), 37–43.
- Jain, K.K., 2010a. *Cytogenetics*. Basel: Jain Pharmabiotech Publications, 1–220.
- Jain, K.K., 2010b. *Nanobiotechnology: Applications, Markets and Companies*. Basel: Jain Pharma Biotech Publications, 1–750.
- Jain, K.K., 2010c. *A Handbook of Biomarkers*. Humana Press, 492 p, New York.
- Jain, K.K., 2011. *Nanobiotechnology*. Moo-Young, M., *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier Netherlands, 599–614.
- Jain, K.K., 2013. *Applications of biotechnology in neurology*. Springer, New York.
- Jain, K.K., 2015. *Textbook of personalized medicine*. Humana Press, 659 p, New York.
- Jain, K.K., 2016. *Regenerative therapy for central nervous system trauma*. Steinhoff, G., *Regenerative medicine*. Springer, London.
- Jain, K.K., 2017a. *Nanobiotechnology: applications, markets and companies*. Basel: Jain Pharma Biotech Publications, Switzerland.
- Jain, K.K., 2017b. *Molecular diagnostics: technologies, markets and companies*. Basel: Jain Pharma Biotech Publications, Switzerland.
- Jain, K.K., 2017c. *Biochips & Microarrays. Technologies, markets and companies*. Basel: Jain Pharma Biotech Publications, Switzerland.
- Jain, N., Bhargava, A. and Panwar, J., 2014. Enhanced Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Using Biologically Synthesized “Protein-Capped” ZnO Nanoparticles. *Chem. Eng. J*, (243), 549–555.
- Jasmin, T.A.L. and Nunes, H.M., 2011. Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and *in vivo* visualization by magnetic resonance imaging. *J Nanobiotechnology*, 9, 4.

- Jayakumar, M.K., Idris, N.M. and Zhang, Y., 2012. Remote activation of biomolecules in deep tissues using nearinfrared to UV upconversion nanotransducers. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 8483–8488.
- Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Kirthi, A.V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A., Gaurav, K., Karthik, L. and Rao, K.V., 2012. Novel Microbial Route to Synthesize ZnO Nanoparticles Using *Aeromonas hydrophila* and Their Activity Against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, (90), 78–84.
- Jha, A.K., 2007. Microbe-Mediated Nanotransformation: Cadmium. *Nano*, (2), 239–242.
- Jia, N., Lian, Q., and Shen, H., 2007. Intracellular delivery of quantum dots tagged antisense oligodeoxynucleotides by functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Nano Lett*, 7, 2976–2980.
- Jiang, X., Qu, W. and Pan, D., 2013. Plasmid-templated shape control of condensed DNA-block copolymer nanoparticles. *Adv Mater*, 25, 227–232.
- Jo, K., Dhingra, D.M. and Odijk, T., 2007. A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci*, 104, 2673–2678.
- John, R., Rezaeipoor, R. and Adie, S.G., 2010. *In vivo* magnetomotive optical molecular imaging using targeted magnetic nanoprobe. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 8085–8090.
- Johnson, P.E., Muttill, P., and MacKenzie, D., 2015. Spray-dried multiscale nanobiocomposites containing living cells. *ACS Nano*, 9, 6961–6977.
- Johnson, T.A., Stasko, N.A. and Matthews, J.L., 2010. Reduced ischemia/reperfusion injury via glutathioneinitiated nitric oxide-releasing dendrimers. *Nitric Oxide*, 22, 30–36.
- Kafa, H., Wang, J.T. and Rubio, N., 2015. The interaction of carbon nanotubes with an *in vitro* blood-brain barrier model and mouse brain *in vivo*. *Biomaterials*, 53, 437–452.
- Kaittanis, C., Naser, S.A. and Perez, J.M., 2007. One-step, nanoparticle-mediated bacterial detection with magnetic relaxation. *Nano Lett*, 7, 380–383.
- Karadayı, M., 2010. *Origanum Vulgare* L. Ssp. *Vulgare*’den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve *E. Coli* Wp2 Test Sistemleri İle Mutajen Ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Karami, Z. and Hamidi, M., 2016. Cubosomes: remarkable drug delivery potential. *Drug Discov Today*, 21, 789–801.
- Karchemski, F., Zucker, D., Barenholz, Y. and Regev, O., 2012. Carbon nanotubes-liposomes conjugate as a platform for drug delivery into cells. *J Control Release*, 160, 339–345.
- Kasala, D., Yoon, A.R. and Hong, J., 2016. Evolving lessons on nanomaterial-coated viral vectors for local and systemic gene therapy. *Nanomedicine*, 11, 1689–1713.
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., and Miwa, N., 2011. Fullerene-C60 incorporated in liposome exerts persistent hydroxyl radical-scavenging activity and cytoprotection in UVA/B-irradiated keratinocytes. *J Nanosci Nanotechnol*, 11, 3814–3823.
- Kim, J.S., Kang, S.J. and Jeong, H.Y., 2016. Anti-EGFR immunonanoparticles containing IL12 and salmosin genes for targeted cancer gene therapy. *Int J Oncol*, 49, 1130–1138.

- Kim, S.H., Jeong, J.H., Lee, S.H., 2008. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J Control Release*, 129, 107–116.
- Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J., Schiestl, R.H., 2005. Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research*, 582, 116–134.
- Kojima, C., 2010. Design of stimuli-responsive dendrimers. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 307–319.
- Koltonow, A.R., and Huang, J., 2016. Two-dimensional nanofluidics. *Science*, 351, 1395–1396.
- Kommareddy, S. and Amiji, M., 2007. Antiangiogenic gene therapy with systemically administered sFlt-1 plasmid DNA in engineered gelatin-based nanovectors. *Cancer Gene Ther*, 14, 488–498.
- Kong, J., Zhu, J. and Keyser, U.F., 2017. Single molecule based SNP detection using designed DNA carriers and solid-state nanopores. *Chem Commun*, 53, 436–439.
- Kosaka, N., Mitsunaga, M., and Bhattacharyya, S., 2011. Self-illuminating *in vivo* lymphatic imaging using a bioluminescence resonance energy transfer quantum dot nano-particle. *Contrast Media Mol Imaging*, 6, 55–59.
- Kose, A.R. and Koser, H., 2012. Ferrofluid mediated nanocytometry. *Lab Chip*, 12, 190–196.
- Kottke, P.A., Degertekin, F.L. and Fedorov, A.G., 2010. Scanning mass spectrometry probe: a scanning probe electrospray ion source for imaging mass spectrometry of submerged interfaces and transient events in solution. *Anal Chem*, 82, 19–22.
- Kozai, T.D., Catt, K. and Du, Z., 2016. Chronic *in vivo* evaluation of PEDOT/CNT for stable neural recordings. *Trans Biomed Eng*, 63, 111–119.
- Kreuter, J., 2014. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv Drug Deliv Rev*, 71, 2–14.
- Krishnamurthy, V., Monfared, S.M. and Cornell, B., 2010. Ion-channel biosensors part I: construction, operation, and clinical studies. *Transactions Nanotechnol*, 9, 303–312.
- Kumar, A., Jena, P.K. and Behera, S., 2010. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery. *Nanomedicine*, 6, 64–69.
- Kumari, A., Yadav, S.K. and Yadav, S.C., 2010. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (75), 1–18.
- Kwon, E.J., Lo, J.H. and Bhatia, S.N., 2015. Smart nanosystems: bio-inspired technologies that interact with the host environment. *Proc Natl Acad Sci*, 112, 14460–14466.
- Ladewig, K., Xu, Z.P. and Lu, G.Q., 2009. Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 6, 907–922.
- Lam, R. and Ho, D., 2009. Nanodiamonds as vehicles for systemic and localized drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 6, 883–895.
- Landa P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., White, J.C., and Vanek, T., 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot, *J Hazard Mater*, 241–242.

- Lee, S.M., Kim, J.H. and Park C., 2016. Self-adhesive and capacitive carbon nanotube-based electrode to record electroencephalograph signals from the hairy scalp. *Trans Biomed Eng*, 63, 138–147.
- Lee, Y.E. and Kopelman, R., 2012. Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells. *Methods Enzymol*, 504, 419–470.
- Leuschner, F., Dutta, P. and Gorbatov, R., 2011. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol*, 29, 1005–1110.
- Li, C., Liu, H. and Sun, Y., 2009. PAMAM nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the Akt-TSC2-mTOR signaling pathway. *J Mol Cell Biol*, 1, 37–45.
- Li, J., Li, J.P., Zhang, X., Lu Z., Yu, S.P. and Wei, L., 2012. Expression of Heparanase in Vascular Cells and Astrocytes of the Mouse Brain After Focal Cerebral Ischemia. *Brain Research*, (1), 137–144.
- Li, N., Georas, S., Alexis, N., Fritz, P., Xia, T., Williams, M.A., Horner, E. and Nel, A., 2016. A Work Group Report on Ultrafine Particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why Ambient Ultrafine and Engineered Nanoparticles Should Receive Special Attention for Possible Adverse Health Outcomes in Human Subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138(2), 386-396.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J. and Nel A., 2003. Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Environmental Health Perspectives* 111(4), 455-460.
- Losic, D. and Simovic, S., 2009. Self-Ordered Nanopore and Nanotube Platforms For Drug Delivery Applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, (6), 1363–1381.
- Ma, H., Williams, P.L. and Diamond, S.A., 2013. Ecotoxicity of Manufactured ZnO Nanoparticles –A Review. *Environ. Pollut.*, (172), 76–85
- Madan, H.R., Sharma, S.C., Udayabhanu, Suresh, D., Vidya, Y.S., Nagabhushana, H., Rajanaik, H., Anantharaju, K.S., Prashantha, S.C. and Sadananda Maiya, P., 2016. Facile Green Fabrication of Nanostructure Zno Plates, Bullets, Flower, Prismatitip, Closed Pine Cone: Their Antibacterial, Antioxidant, Photoluminescent and Photocatalytic Properties, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, (152), 404–416.
- Majedia, S.M., Kelly, B.C., and Lee, H.K., 2014. Role of combinatorial environmental factors in the behavior and fate of ZnO nanoparticles in aqueous systems: A multiparametric analysis. *J Hazard Mater*, 264, 370–379.
- Mao, Y.T., Hua, H.Y. and Zhang, X.G., 2013. Ethosomes as delivery system for transdermal administration of vinpocetine. *Pharmazie*, 68, 381–382.
- Martel, J. and Young, J.D., 2008. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*, 105, 5549–5554.
- McMurray, R.J., Gadegaard, N. and Tsimbouri, P.M., 2011. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat Mater*, 10, 637–644.
- Miller, K., Dixit, S. and Bredlau, A.L., 2016. Delivery of a drug cache to glioma cells overexpressing platelet-derived growth factor receptor using lipid nanocarriers. *Nanomedicine*, (11), 581–95.

- Mirzaei, H. and Darroudi, M., 2017. Zinc Oxide Nanoparticles: Biological Synthesis and Biomedical Applications. *Ceram. Int.*, (43), 907–914.
- Mocchegiani, E. and Malavolta, M., 2008. Zinc–gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing. *Genes Nutr*, 3, 61–75.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M. and Giacconi, R., 2000. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol. Sci*, 21, 205–208.
- Moon, J.J., Suh, H. and Li, A.V., 2012. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 1080–1085.
- Mortelmans, K. and Riccio, E.S., 2000. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, 455, 61–69.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29–60.
- Muraoka, D., Harada, N., Hayashi, T., 2014. Nanogel-based immunologically stealth vaccine targets macrophages in the medulla of lymph node and induces potent antitumor immunity. *ACS Nano*, 8, 9209–9218.
- Nagajyothi, P.C., Sreekanth, T.V.M., Tettey, C.O., Jun, Y.I. and Mook, S.H., 2014. Characterization, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of ZnO Nanoparticles Using *Coptidis rhizoma*. *Bioorg. Med. Chem Lett*, (24), 4298–4303.
- Nair, B.G., Nagaoka, Y., and Morimoto, H., 2010. Aptamer conjugated magnetic nanoparticles as nanosurgeons. *Nanotechnology*, 21, 455102.
- Nardemir, G., 2012. Malathion ve Glifosatın *Triticum aestivum* (Buğday) Üzerindeki Genetik ve Epigenetik Etkilerinin Moleküler Yöntemler İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nesti, L.J., Li, W.J., and Shanti, R.M., 2008. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam. *Tissue Eng Part A*, 14, 1527–1537.
- Nevala, W.K., Buhrow, S.A., and Knauer, D.J., 2016. Antibody-targeted chemotherapy for the treatment of melanoma. *Cancer Res*, 76, 3954–3964.
- Nguyen, Q.T., Olson, E.S., Aguilera, T.A., Tao, J., Miriam, S., Lesley, G.E., and Roger, Y.T., 2010. Surgery with Molecular Fluorescence Imaging Using Activatable Cell-Penetrating Peptides Decreases Residual Cancer and Improves Survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (107), 4317–4322.
- Ni, M., Xiong, M., and Zhang, X., 2015. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells. *Int J Nanomedicine*, 10, 2537–2554.
- Nilewski, L.G., Sikkema, W.K., Kent, T.A, and Tour, J.M., 2015. Carbon nanoparticles and oxidative stress: could an injection stop brain damage in minutes? *Nanomedicine*, 10, 1677–1579.
- Oberdörster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*, 112, 1058–1062. **Andler buraya kadar**
- Oberdörster, G., Celein, R.M., Ferin, J., and Weiss, B., 1995. Association of Particulate Air Pollution and Acute Mortality: Involvement of Ultrafine Particles? *Inhalation Toxicology*, 7(1):111-124.

- Oberdörster, G., Maynard, A., and Castranova, V., 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol, 2, 8.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives, 113(7), 823-839.
- Ochieng, P.E., Iwuoha, E., Michira, I., Masikini, M., Ondiek, J., Githira, P., and Kamau, G.N., 2015. Green Route Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using *Spathodea campanulata*. Int. J. Biochem. Phys., (23), 53–61.
- Om Singh, V., 2015. Bionanoparticles Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications. Wiley Blackwell, 361, United States.
- Omri, K., Najeh, I. and Mir, L.E., 2016. Influence of annealing temperature on the microstructure and dielectric properties of ZnO nanoparticles. Ceram. Int, in press, doi:10.1016/j.ceramint, 02, 151.
- Orhan F., 2010. *Mentha longifolia* L. Hudson Ssp. Longifoli'dan Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve Maya Delesyon Test Sistemleri İle Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özkan, G., 2018. İspir Kuru Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinde SSR Moleküler Belirteçleri Kullanılarak Genetik Biyoçeşitliliğin Belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Papasani, M.R., Wang, G., and Hill, R.A., 2012. Gold nanoparticles: the importance of physiological principles to devise strategies for targeted drug delivery. Nanomedicine, 8, 804–814.
- Park, M.V., Lankveld, D.P., van Loveren, H., and de Jong, W.H., 2009. The status of *in vitro* toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. Nanomedicine, 4, 669–685.
- Patel, V.R., and Agrawal, Y.K., 2011. Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs. J Adv Pharm Technol Res, 2, 81–87.
- Patra, C.R., Barui, A.K., 2013. Nanoflowers: a future therapy for cardiac and ischemic disease? Nanomedicine, 8, 1735–1738.
- Paul, A., 2015. Nanocomposite hydrogels: an emerging biomimetic platform for myocardial therapy and tissue engineering. Nanomedicine, 10, 1371–1374.
- Paulkumar, K., Rajeshkumar, S., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Malarkodi, and C., Annadurai, G., 2013. Biosynthesis of Silver Chloride Nanoparticles Using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and Assessment of Its Antifungal Activity, ISRN Nanomater, 1–8.
- Peters, A., Wichmann, H.E., Tuch, T., Heinrich, J., and Heyder, J., 1997. Respiratory Effects Are Associated with the Number of Ultrafine Particles. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 155(4), 1376-1383.
- Pinto, M.P., Arce, M., Yameen, B., and Vilos, C., 2017. Targeted brain delivery nanoparticles for malignant gliomas. Nanomedicine, 12, 59–72.
- Posadas, I., Guerra, F.J., and Ceña, V., 2010. Nonviral vectors for the delivery of small interfering RNAs to the CNS. Nanomedicine, 5, 1219–1236.
- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., and Ohayon-Courtès, C., 2011. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Part Fibre Toxicol, 8, 10.

- Pulit-prociak, J., Chwastowski, J., Kucharski, A., and Banach, M., 2016. Applied Surface Science Functionalization of Textiles With Silver and Zinc Oxide Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.*, (385), 543–553.
- Qian, Y., Yao, J., Russel, M., Chen, K., and Wang, X., 2015. Characterization of green synthesized nano-formulation (ZnO-A. vera) and their antibacterial activity against pathogens. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, (39), 736–746.
- Qu, J., Yuan, X., Wang, X., and Shao, P., 2011. Zinc Accumulation and Synthesis of ZnO Nanoparticles Using *Physalis alkekengi* L. *Environ Pollut.*, (159), 1783–1788.
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., and Annadurai, G., 2014. Algae mediated green fabrication of silver nanoparticles and examination of its antifungal activity against clinical pathogens. *Int J Met.*, 1–8.
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Vanaja, M., Annadurai, G., 2016. Anticancer and Enhanced Antimicrobial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles Against Clinical Pathogens. *J. Mol. Struct.*, (1116), 165–173.
- Rodriguez, C.E., Sobol, Z., and Schiestl, R.H., 2008. 9,10-Phenanthrenequinone induces DNA deletions and forward mutations via oxidative mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 22, 296–300.
- Rouhi, J., Mahmud, S., Naderi, N., Ooi, C.H.R. and Mahmood, M.R., 2013. Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods. *Nanoscale Res Lett*, 364, 1–6.
- Sangani, M.H., Moghaddam, M.N., and Mahdi, M., 2015. Inhibitory Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofilm Formation, Nanomed J.*, (2), 121–128.
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S. and Venckatesh, R., 2011. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *aloe barbadensis miller* leaf extract: Structure and optical properties. *Mater. Sci Res Int*, 46, 2560–2566.
- Santamaria, A., 2012. Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology. *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, 1-12.
- Santos, F.V., Tubaldini, F.R., Cólus, I.M.S., Andréo, M.A., Bauab, T.M., Leite, C.Q.F., Vilegas, W. and Varanda, E.A., 2008. Mutagenicity of Mouriri pusa Gardner and Mouriri elliptica Martius. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2721–2727.
- Santos, H.A., Mäkilä, E., and Airaksinen, A.J., 2014. Porous silicon nanoparticles for nanomedicine: preparation and biomedical applications. *Nanomedicine*, 9, 535–554.
- Saraste, A., Nekolla, S.G., and Schwaiger, M., 2009. Cardiovascular molecular imaging: an overview. *Cardiovasc Res*, 83, 643–652.
- Sheikhloo, Z., Salouti, M., and Katiraei, F., 2011. Biological Synthesis of Gold Nanoparticles by Fungus *Epicoccum nigrum*. *J Clust Sci.*, (22), 661–665.
- Singh, A.K., Viswanath, V. and Janu, V.C., 2009. Synthesis, effect of capping agents, structural, optical and photoluminescence properties of ZnO nanoparticles. *J. Lumin.*, 129, 874–878.
- Smith, D., Schüller, V., and Engst, C., 2013. Nucleic acid nanostructures for biomedical applications. *Nanomedicine*, 8, 105–121.
- Sobol, Z., Engel, M.E., Rubitski, E., Ku, W.W., Aubrecht, J., and Schiestl, R.H., 2007. Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. *Mutation Research*, 633, 80–94.

- Song, Y., Guana, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., and Chen X., 2014. *In vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.*, 769, 113–118.
- Srivastava, A., Babu, A., and Filant, J., 2016. Exploitation of exosomes as nanocarriers for gene, chemo, and immune-therapy of cancer. *J Biomed Nanotechnol*, 12, 1159–1173.
- Stefaniodu, M., Maravelias, C., Dona, A., and Spiliopoulou, C., 2006. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol*, 80, 1–9.
- Tan, A., De La Peña, H., and Seifalian, A.M., 2010. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine*, 5, 889–900.
- Tomkowiak, M.T., Klein, A.J., and Vigen, K.K., 2011. Targeted transendocardial therapeutic delivery guided by MRI-x-ray image fusion. *Catheter Cardiovasc Interv*, 78, 468–478.
- Tripathi, S.K., Kaur, G., and Khurana, R.K., 2015. Quantum dots and their potential role in cancer theranostics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 32, 461–502.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y., Beasujour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D. and Holmes, M.C., 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435, 646–651.
- Valdiglesias, V., Costa, C., Kiliç, G., Costa, S., Pásaro, E., and Laffon, B., 2013. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ Int*, 55, 92–100.
- van Berlo, D., Clift, M.J.D., Albrecht, C., and Schins, R.P.F., 2012. Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss Med Wkly*, 142, 13698.
- van Meerloo, J., Gertjan, J., Kaspers, L. and Cloos, J., 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, Ian A. Cree. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Second Edition, Methods in Molecular Biology. Humana Press, United States, 237–245.
- Varella, S.D., Pozetti, G.L., Vilages, W. and Varanda, E.A., 2004. Mutagenic activity in waste from an aluminum products factory in *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro*, 18, 895–900.
- Vimala, K., Sundarraj, S., Paulpandi, M., Vengatesan, S., and Kannan, S., 2014. Green Synthesized Doxorubicin Loaded Zinc Oxide Nanoparticles Regulates the Bax And Bcl-2 Expression in Breast and Colon Carcinoma. *Process Biochem.*, (49), 160–172.
- Vitor, G., Palma, T.C., Vieira, B., Lourenço, J.P., Barros, R.J., and Costa, M.C., 2015. Start-Up, Adjustment and Long-Term Performance of A Two-Stage Bioremediation Process, Treating Real Acid Mine Drainage, Coupled With Biosynthesis of Zns Nanoparticles and ZnS/TiO₂ Nanocomposites. *Miner. Eng.*, (75), 85–93.
- Wang, M., Zhou, F. and Zhang, B., 2014. Surfactant-assisted synthesis of monodispersed ZnO nanorods at low temperature. *Mater Lett*, 114, 84–87.
- Watson, B., Friend, J., and Yeo, L., 2009. Piezoelectric ultrasonic resonant motor with stator diameter less than 250 µm: the Proteus motor. *J Micromech Microeng*, 19, 022001.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18, 7213–7218.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 6531–6535.
- Wodka, D., Bielaniska, E., Socha, R.P., Elzbieciak-Wodka, M., Gurgul, J., Nowak, P., Warszyński, and P., Kumakiri, I., 2010. Photocatalytic Activity of Titanium Dioxide Modified by Silver Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, (2), 1945–1953.
- Xiao, Y., Hong, H., and Javadi, A., 2012. Multifunctional unimolecular micelles for cancer-targeted drug delivery and positron emission tomography imaging. *Biomaterials*, 33, 3071–3082.
- Yan, H., Song, P., Zhang, S. Yang, Z. and Wang, Q., 2016. Facile synthesis, characterization and gas sensing performance of ZnO nanoparticles-coated MoS₂ nanosheets. *J. Alloy. Compd*, 662, 118–125.
- Yusan, S., Bampaiti, A., Aytas, S., Erenturkc, S., and Aslani, M.A.A., 2016. Synthesis and structural properties of ZnO and diatomite-supported ZnO nanostructures. *Ceram. Int*, 42, 2158–2163.
- Yuvakkumar, R., Suresh, J., Nathanael, A.J., Sundrarajan, M., and Hong, S.I., 2014. Novel Green Synthetic Strategy to Prepare Zno Nanocrystals Using Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Peel Extract and Its Antibacterial Applications. *Mater. Sci. Eng.C.*, (41), 17–27.
- Zhang, C., Newsome J.T., and Mewani, R., 2009. Systemic delivery and pre-clinical evaluation of nanoparticles containing antisense oligonucleotides and siRNAs. *Methods Mol Biol*, (480), 65–83.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, L., Povey, M., Alex, J. O., and David, W.Y., 2010. Mechanistic Investigation into Antibacterial Behaviour of Suspensions of Zno Nanoparticles Against *E. Coli*, *Journal of Nanopartical Research*, (12), 1625–1636.
- Zhang, W., Tu, G., Zhang, H., Zheng, Y., and Yang, L., 2014. Synthesis and antibacterial activity of mesoporous zinc oxide particle with high specific surface area. *Mater. Lett*, (114), 119–121
- Zong, Y., Li, Z., Wang, X., Ma, J., and Men, Y., 2014. Synthesis and High Photocatalytic Activity of Eu-Doped Zno Nanoparticles. *Ceram. Int*, (40), 10375–10382.
- Zukiene, R. and Snitka, V., 2015. Zinc oxide nanoparticle and bovine serum albumin interaction andnanoparticles influence on cytotoxicity *in vitro*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 135, 316–323.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İzmir’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 2008 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012’de Biyolog olarak mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2015 yılında yüksek lisans tezini tamamladı ve aynı yıl içerisinde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora öğrenimine başladı. Ayrıca, 2015 yılından itibaren Atatürk Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi’nde çalışmaktadır.