

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**NANO METAL OKSİT VE KARBON NANOMALZEMELERİN SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN *IN VITRO* ORTAMDA ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ tarafından hazırlanan “**Nano Metal Oksit ve Karbon Nanomalzemelerin Sitotoksik Etkilerinin *In Vitro* Ortamda Araştırılması**” adlı tez çalışması **27.12.2016** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOKİMYA Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Selma ATEŞ
Gazi Üniversitesi / Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN
Ankara Üniversitesi / Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ali SINAĞ
Ankara Üniversitesi / Fizikokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Handan YAVUZ
Hacettepe Üniversitesi / Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sedat ODABAŞ
Ankara Üniversitesi / Biyokimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27/12/2016

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

ÖZET

Doktora Tezi

NANO METAL OKSİT VE KARBON NANOMALZEMELERİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN *IN VITRO* ORTAMDA ARAŞTIRILMASI

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu çalışma, insan periodontal ligament fibroblast (hPDLF) ve fare dermal fibroblast (mDF) hücrelerinin üç farklı nanoparçacığa (NP) [fulleren (C₆₀), tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT) ve demir (II,III) oksit (Fe₃O₄)] zamana ve doza bağımlı olarak verdikleri hücresel yanıtın xCELLigence sistemi ve *in vitro* toksisite testleri kullanılarak değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla tasarlanmıştır. NP'lar morfoloji, örgü parametresi, yüzey alanı, parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyellerine göre transmisyon elektron mikroskopisi (TEM), X-ışını kırınımı (XRD), Braun-Emmet-Teller yüzey alanı analizörü (BET), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta boyut analizörü (zeta sizer) kullanılarak karakterize edilmiştir. Mössbauer Spektroskopisi Fe₃O₄ NP'larının manyetik olarak karakterize edilmesi için kullanılmıştır. hPDLF ve mDF hücreleri kontrollü koşullar altında farklı derişimlerde hazırlanan NP çözeltileri ile (0,1; 1; 10; 50 ve 100 µg/mL) belirli zaman aralıkları boyunca (6, 24 ve 48 saat) muamele edilmiştir. Ardından, NP'lara maruz bırakılan hücrelerde canlılık, membran bütünlüğü ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu incelenmiştir. Seçilen NP'lara verilen hücresel tepkiler, *in vitro* sitotoksisite testlerine ek olarak gerçek zamanlı empedans ölçümüne dayalı bir biyosensör sistemi olan xCELLigence sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneylerden edinilen bulgular birlikte ele alındığında seçilen NP'ların toksisitelerinin hücre tipine, derişime ve zamana bağımlı olduğu görülmüştür.

Aralık 2016, 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitotoksisite, xCELLigence sistemi, demir (II,III) oksit, tek duvarlı karbon nanotüp, fulleren, *in vitro* toksisite testleri.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF THE *IN VITRO* CYTOTOXICITY OF NANO METAL OXIDE AND CARBON NANOPARTICLES

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

The present study was designed to evaluate and compare the time and dose-dependent cellular response of human periodontal ligament fibroblast (hPDLF) cells and mouse dermal fibroblast (mDF) cells to three different nanoparticles; fullerene (C₆₀), single walled carbon nanotubes (TDKNT) and iron (II,III) oxide (Fe₃O₄) nanoparticles (NPs) via the xCELLigence system and *in vitro* toxicity methods. NPs were characterised according to their morphology, lattice parameter, surface area, particle size distribution and zeta potential by using transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), Braun-Emmet-Teller (BET), dynamic light scattering (DLS) and zeta sizer analysis. The Mössbauer spectroscopy was used in order to magnetically characterize the Fe₃O₄ NPs. The hPDLFs and mDFs were exposed to different concentrations of the NPs (0,1; 1; 10; 50 and 100 µg/mL) for predetermined time intervals (6, 24 and 48 hours) under controlled conditions. Subsequently, NP exposed cells were tested for viability, membrane leakage and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Additional to *in vitro* cytotoxicity assays, the cellular responses to selected NPs were determined in real-time using an impedance based biosensor system; xCELLigence. Taken together, information obtained from all experiments suggests that toxicity of the selected NPs is cell type, concentration and time dependent.

December 2016, 90 pages

Key Words: Cytotoxicity, xCELLigence system, iron (II,III) oxide, single walled carbon nanotube, fullerene, *in vitro* toxicity assays.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında değerli görüş ve yardımları ile yol gösteren, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kimya ABD ve Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü);

Araştırmaların mikroskopiye dayalı bölümleri başta olmak üzere her konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmanın yürütülmesi konusunda bana yol arkadaşı olan ve her konuda destek veren meslektaşım Dr. Şükran Şeker'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) teşekkür etmeyi borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında verdikleri destekle yanımda olan ve bana güç katan sevgili aileme, yine her konuda desteğini esirgemeyen, çalışmaya Mössbauer spektroskopisi konusundaki yardımlarıyla katkıda bulunan değerli eşim Doç. Dr. Hakan GÜNGÜNEŞ'e ve manevi destekleriyle yanımda olan çok değerli çalışma arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki tüm deneyler Elçin Lab'da gerçekleştirilmiştir.

Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

Ankara, Aralık 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 Nanoteknoloji	5
2.2 Nanoparçacıklar	5
2.2.1 Fulleren	6
2.2.2 Tek duvarlı karbon nanotüpler	7
2.2.3 Demir (II,III) oksit (manyetit) nanoparçacıkları	9
2.3 Nanoparçacık Karakterizasyonu	10
2.3.1 BET Yüzey alanı analizi	12
2.3.2 Mössbauer Spektroskopisi	14
2.3.3 Zeta potansiyeli	15
2.3.4 DLS (Dinamik Işık Saçılımı)	18
2.3.5 TEM (Geçirimli Elektron Mikroskopisi)	21
2.3.6 XRD (X-Işımları Kırınım Difraktometresi).....	22
2.4 Nanotoksikoloji.....	23
2.4.1 Nanoparçacık sitotoksitesi ve <i>in vitro</i> sitotoksite testleri.....	24
2.4.1.1 ROT (Reaktif oksijen türleri) ve ROT testi.....	24
2.4.1.2 LDH (Laktat Dehidrogenaz) Testi.....	31
2.4.1.3 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi.....	32
2.4.1.4 Gerçek zamanlı empedans ölçümüne dayalı sitotoksite testi	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1 Madde ve Malzeme	38
3.2 Yöntem	38
3.2.1 Nanoparçacıkların karakterizasyonu	38
3.2.1.1 BET Yüzey alanı analizi	39
3.2.1.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel analizi.....	40
3.2.1.3 X Işımları difraktometresi (XRD) analizi	40
3.2.1.4 Fe ₃ O ₄ NP Mössbauer spektroskopisi.....	41
3.2.1.5 Nanoparçacıkların TEM analizi	42
3.2.2 Hücre kültürü çalışmaları	42
3.2.2.1 hPDLF hücre izolasyonu ve kültürü	42
3.2.2.2 mDF hücre izolasyonu ve kültürü	43
3.2.3 NP stok ve maruziyet çözeltilerinin hazırlanması.....	43
3.2.4 Nanoparçacık maruziyet çalışması.....	45
3.2.5 Hücre morfolojisi	45
3.2.6 NP'ların hücre içine alınması ve lokalizasyonunun incelenmesi	46

3.2.7 Toksik etkinin belirlenmesi	46
3.2.7.1 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi.....	46
3.2.7.2 LDH (Laktat Dehidrogenaz) testi	48
3.2.7.3 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) belirlenmesi	49
3.2.7.4 Empedans ölçümüne dayalı gerçek zamanlı hücre analizörü xCELLigence) ölçümleri	49
3.2.8 İstatistiksel Analiz	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1 NP'ların XRD Analizi Bulguları.....	51
4.2 Fe ₃ O ₄ NP'ların Mössbauer Spektroskopisi.....	52
4.3 Parçacık Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyeli	53
4.4 BET Yüzey Alanı Ölçümü	56
4.5 NP'ların TEM ile Karakterizasyonu	56
4.6 Hücre Morfolojisi	58
4.7 Hücresel Alım, Hücre İçi Birikim ve Morfolojik Değişimler	61
4.8 Mitokondriyal Fonksiyon	63
4.9 LDH Ölçümleri.....	64
4.10 Hücre İçi ROT Ölçümleri.....	65
4.11 Hücresel Empedans (Direnç) Ölçümleri	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	90

KISALTMALAR DİZİNİ

BET	Brunauer–Emmet–Teller
C ₆₀	Fulleren
CI	Hücre indeksi (Cell Index)
DMEM	Dulbecco’nun Modifiye Eagle Besiyeri (Dulbecco’s modified Eagle’s medium)
FWHM	Yarı maksimumdaki tam genişlik (Full-width-at-half-maximum)
hDF	İnsan dermal fibroblastları (Human dermal fibroblasts)
hPDLF	İnsan periodontal ligament fibroblast (Human periodontal ligament fibroblast)
Karboksi-H ₂ DCFDA	5-(ve-6)- karboksi-20,70-diklorodihidrofloresein diasetat
LDH	Laktat dehidrogenaz
mDF	Fare dermal fibroblast (Mouse dermal fibroblast)
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme (Magnetic resonance imaging)
MTT	[3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
NCI	Normalize hücre indeksi (Normalized Cell Index)
NP	Nanoparçacık
ROT	Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)
TDKNT	Tek duvarlı karbon nanotüpler (Single walled carbon nanotubes)
TEM	Geçirimli elektron mikroskopisi (Transmission electron microscopy)
XRD	X-ışını kırınımı (X-ray diffraction)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
EMA	Avrupa İlaç Kurumu (European Medicines Agency)
NIOSH	ABD Ulusal Mesleki Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü (National Institute for Occupational Safety and Health)
OSHA	ABD Mesleki Güvenlik ve Sağlık İdaresi (Occupational Safety and Health Administration)
REL	Tavsiye edilen maruziyet limiti (Recommended Exposure Limit)
PEL	İzin verilebilir maruziyet limiti (Permissible Exposure Limit)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nano ölçekte boyut karşılaştırması	6
Şekil 2.2 Fullerenin 2 boyutlu ve 3 boyutlu yapısı	7
Şekil 2.3 Tek duvarlı karbon nanotüpün yapısı	8
Şekil 2.4 a. Manyetit cevheri b. Manyetit nanoparçacıkları	9
Şekil 2.5 Manyetitin kristal yapısı	10
Şekil 2.6 Parçacık boyutu ile yüzey alanı arasındaki korelasyon	11
Şekil 2.7 BET analiz cihazının şematik gösterimi	13
Şekil 2.8 Farklı adsorbat basınçlarında adsorbatın bir katı partikül üzerine adsorplanma davranışının şematik gösterimi	14
Şekil 2.9 Mössbauer spektroskopisi sisteminin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.10 Çözültü içindeki nanoparçacık yüzeyindeki elektriksel çift tabakanın şematik gösterimi	16
Şekil 2.11 Zeta potansiyelin süspansiyon özellikleri üzerine etkisinin şematik gösterimi	17
Şekil 2.12 Zeta potansiyelin pH'a bağlı olarak değişimi	18
Şekil 2.13 Zeta potansiyeli ölçüm sisteminin şematik gösterimi	19
Şekil 2.14 Hidrodinamik çap	20
Şekil 2.15 DLS sisteminin şematik gösterimi	20
Şekil 2.16 TEM sisteminin şematik gösterimi	21
Şekil 2.17 Bir X ışını difraktometresinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.18 Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının muhtemel sitotoksikite oluşturma mekanizması	27
Şekil 2.19 Manyetit nanoparçacıklarınca tetiklenen muhtemel Fenton/Haber Weiss reaksiyonları	27
Şekil 2.20 TDKNT için muhtemel ROT oluşumu mekanizması	28
Şekil 2.21 Hücre ortamında ışıkla uyarılmış C ₆₀ için muhtemel ROT oluşumu mekanizması ve olası sitotoksik etkiler	29
Şekil 2.22 Karboksi-H ₂ DCFDA ile ROT testinin mekanizması	30
Şekil 2.23 LDH testinin mekanizması	31
Şekil 2.24 MTT testinin mekanizması	33
Şekil 2.25 xCELLigence sisteminin mekanizması.....	35
Şekil 2.26 Empedans ölçümünün prensibinin şematik gösterimi	36
Şekil 3.1 Fare dermal fibroblast hücrelerinin izolasyon aşamaları	44
Şekil 3.2 Nanoparçacık stok ve maruziyet çözeltilerinin hazırlanması	44

Şekil 3.3 a. C ₆₀ , b. TDKNT ve c. Fe ₃ O ₄ 6 saatlik maruziyet sonrası oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	47
Şekil 4.1 a. C ₆₀ , b. TDKNT ve c. Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının XRD desenleri	51
Şekil 4.2 Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının Mössbauer spektrumu	52
Şekil 4.3 a. C ₆₀ , b. TDKNT ve c. Fe ₃ O ₄ NP'lerinin DLS yöntemi ile hücre ortamı içinde elde edilmiş parçacık boyut dağılımları.....	54
Şekil 4.4 a. C ₆₀ , b. TDKNT ve c. Fe ₃ O ₄ NP'lerinin Zeta potansiyel dağılımları.....	55
Şekil 4.5 a. C ₆₀ , b. TDKNT ve c. Fe ₃ O ₄ NP'lerinin TEM mikrografları	57
Şekil 4.6 Kontrol grubu hücreleri a. hPDLF b. mDF	58
Şekil 4.7 Farklı derişimlerdeki C ₆₀ , TDKNT ve Fe ₃ O ₄ NP maruziyeti sonrası hPDLF hücrelerini gösteren faz kontrast mikrografları.	59
Şekil 4.8 Farklı derişimlerdeki C ₆₀ , TDKNT ve Fe ₃ O ₄ NP maruziyeti sonrası mDF hücrelerini gösteren faz kontrast mikrografları.	60
Şekil 4.9 a. hPDLF ve b. mDF kontrol hücreleri; c. C ₆₀ ile muamele edilmiş hPDLF, d. C ₆₀ ile muamele edilmiş mDF, e. TDKNT ile muamele edilmiş hPDLF, f. TDKNT ile muamele edilmiş mDF, g. Fe ₃ O ₄ ile muamele edilmiş hPDLF ve h. Fe ₃ O ₄ ile muamele edilmiş mDF hücrelerinin TEM mikrografları.....	62
Şekil 4.10 hPDLF ve mDF hücrelerinin 6, 24 ve 48 saatlik NP maruziyeti sonrası elde edilen MTT testi sonuçları	63
Şekil 4.11 hPDLF ve mDF hücreleri için 6, 24 ve 48 saatlik NP maruziyeti için LDH ölçüm sonuçları.....	64
Şekil 4.12 hPDLF ve mDF hücrelerinin 6 saatlik NP maruziyeti sonrası ROT ölçüm sonuçları	65
Şekil 4.13 hPDLF ve mDF hücrelerinin TDKNT, C ₆₀ ve Fe ₃ O ₄ maruziyeti sonrası empedans ölçümüne dayalı hücre canlılığı verileri	66
Şekil 4.14 a. hPDLF b. mDF hücreleri için ZnO NP ile yapılan pozitif kontrol deneyi sonuçları	67
Şekil 5.1 a. Periodontal ligament fibroblast hücreleri b. Dental implant	69
Şekil 5.2 Hücre zarı ve NP 'ların oluşturduğu protein koronanın şematik gösterimi	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Nanoparçacık karakterizasyonu için incelenen özellikler ve kullanılan karakterizasyon yöntemleri.....	12
Çizelge 3.1 Nanoparçacık toksisitesini etkileyen parametreler	39
Çizelge 3.2 <i>In vitro</i> sitotoksikite testleri için hücre başına düşen NP miktarı.....	45
Çizelge 3.3 xCELLigence sistemi için hücre başına düşen NP miktarı.....	50
Çizelge 4.1 Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının Mössbauer spektrumunun oda sıcaklığında fit edilmesiyle (uyumlandırılmasıyla) elde edilen aşırı ince yapı (hyperfine) parametreleri.....	53
Çizelge 4.2 Nanoparçacık karakterizasyonu	54
Çizelge 4.3 Periodontal ligament fibroblast ve dermal fibroblast hücreleri için hesaplanan IC 50 değerleri	67

1. GİRİŞ

Nanoteknolojinin sağlık, giyim ve temizlik ürünlerinin de dahil olduğu çeşitli endüstriyel uygulamalarda ve tüketici ürünlerinde hızla yaygınlaşan kullanımına bağlı olarak, çok geniş bir çeşitlilikte ve giderek artan miktarlarda üretilmeye devam edilen nanoparçacıklar (NP) zamanla günlük yaşamın bir parçası haline gelmektedirler. Bu nedenle, insan ve çevre biyogüvenliği için NP'ların kapsamlı ve güvenilir bir nanotoksikolojik değerlendirmeden geçmeleri gerekmektedir. Nano boyutta olmayan (bulk) formlarına göre sahip oldukları büyük yüzey alanı- hacim oranları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan farklı ve ilginç özellikleri NP'ların sanki yeni keşfedilen kimyasallarmış gibi araştırılmalarını gerekli kılmaktadır. Ayrıca, NP'ların küçük boyutları ile insan vücudunun nano ölçek için yetersiz kalan bariyerlerini aşabildikleri bildirilmiştir (Nasterlack vd. 2008, Schulte vd. 2008).

Yeni tasarlanan birçok malzemenin popüler yapıtaşları olan NP'ların boyutları 1-100 nm aralığındadır (Auffan vd. 2009). Bunların arasında Fe_3O_4 NP'lar ile karbon temelli NP'lar olan fulleren (C_{60}) ve tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT) avantajlı özellikleri sayesinde çoğunluğunu insan maruziyeti olasılığının yüksek olduğu biyomedikal uygulamaların oluşturduğu geniş bir yelpazedeki uygulamalar için uygun adaylar olmaları sebebiyle dikkat çekmektedirler.

Fullerenler olağanüstü kimyasal ve fiziksel özellikleriyle malzeme bilimi ve çok çeşitli biyolojik uygulamalar için kullanılmak üzere araştırılmaktadır. Fullerenlerin kozmetik, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi malzemelerini de içeren tüketici ürünlerinin üretiminde kullanılması sebebiyle (Takada vd. 2006, Sitharaman vd. 2007, Lens 2009, Lens 2011, Benn vd. 2011, Inui vd. 2014, Pulicharla vd. 2014) ticari üretiminin çoğalması toksik açıdan ayrıntılı olarak incelenmesini gerekli hale getirmiştir. Ayrıca bazı araştırma grupları (Kanaparthi ve Kanaparthi 2011, Kukreja vd. 2012, Bhardwaj vd. 2014) gelecekte diş hekimliğinin de dahil olduğu biyomedikal alanlarda kullanılmak üzere geliştirilecek nanorobotların üretiminde fullerenlerin kullanılmasını önermektedir.

Fulleren toksisitesi üzerine daha önce yapılmış çalışmalar farklı hücrelerle farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Sayes ve arkadaşları C₆₀'in hDF (human dermal fibroblast- insan dermal fibroblastları) ve HepG2 (insan karaciğer kanseri hücre dizisi) hücreleri üzerindeki toksik etkilerini araştırmış ve 20 ppb seviyesinde toksik etkilerin görüldüğünü belirlemişlerdir (Sayes vd. 2004). Fare orta beyin hücreleri ile yapılan bir başka çalışma ise (Tsuchiya vd. 1996) fullerenlerin doza bağlı olarak hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. Yeni gerçekleştirilen *in vivo* bir çalışmaya göre ise (Shipelin vd. 2015) C₆₀ vücut ağırlığının kg'ı başına 0,1; 1,0 ve 10 mg/kg olacak dozlarda 92 gün boyunca sıçanlara verilmiş ve sadece verilen en yüksek doz olan 10 mg/kg düzeyinde hepatik dokuda toksik etki oluşturmuştur. C₆₀ üzerine yapılan bazı çalışmalar (Gharbi vd. 2005, Levi vd. 2006, Kyzyma vd. 2015) toksik etkinin ya hiç görülmediğini ya da düşük oranlarda görüldüğünü rapor ederken diğer bazı çalışmalar da (Sayes vd. 2004, Shipelin vd. 2015) hücre tipine ve derişime bağlı olarak toksik etkilerin görüldüğünü bildirmiştir; dolayısıyla tüm hücre türleri için C₆₀ toksisitesi üzerinde bir görüş birliği yoktur.

TDKNT ultra-yüksek yüzey alanı ve benzersiz yüzey kimyası ile sahip olduğu karakteristik yapısı gibi olağanüstü özellikleri için sentezlenen grafit nano malzemelerdir. Tasarlanan kompozit malzemeleri güçlendirmek amacıyla kullanılmalarının yanı sıra biyomedikal alanlarda da kullanılmaktadırlar. Saf halde ya da modifiye edilmiş olarak biyosensörler (Zelada-Guillen vd. 2013), doku mühendisliği (Sitharaman vd. 2007, Baktur vd. 2011, Gupta vd. 2014, Hernández-Ferrer vd. 2014), kontrollü ilaç salınımı (Madani vd. 2011, Meng vd. 2012), kanser teşhisi ve tedavisi (Andreoli vd. 2014), diş hekimliği (Zhang vd. 2008, Akasaka vd. 2009) gibi çok çeşitli alanlarda ve yara bandajlarında antimikrobiyal ajan olarak (Simmons vd. 2009) kullanılmaktadır.

TDKNT'lerin geniş uygulama alanlarına rağmen, sahip oldukları yüksek en boy oranı ve iğ şekilli yapıları onlara insan vücudunda yüksek hareketlilik ve geçirgenlik sağlayarak potansiyel olarak toksik nanomalzemeler haline getirmektedir. TDKNT toksisitesi üzerine yapılan iki çalışmada (Zhang vd. 2010, Cicchetti vd. 2011) nöral PC12 hücrelerinde ve insan gingival fibroblast hücre dizisinde TDKNT'lerin

sitotoksositeye ve ROT oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir. Meng ve arkadaşlarının He-La hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmaya göre (Meng vd. 2012) TDKNT'ler hücre içine girerek toksik etki oluşturmuştur. Yapılan daha yeni bir çalışmada ise (Kim vd. 2014), TDKNT'ler insan periferel kan lenfositlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir.

Fe₃O₄ NP'ları sadece boyuta bağımlı süperparamanyetizma özelliği ile değil (Buyukhatipoglu ve Clyne 2011) aynı zamanda ucuz ve kolay üretilebilir olması sebebiyle başta biyomedikal alan olmak üzere; hedeflendirilmiş ilaç salınımı (Sadighian vd. 2014), doku mühendisliği (Ito vd. 2004, Shimizu vd. 2007) ve hipertermi tedavisi (Ren vd. 2012) gibi pek çok farklı uygulamada yerini almıştır. Ayrıca manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kontrast madde olarak (Tiefenauer vd. 1996, Jun vd. 2005, Stephen vd. 2011) ve gen aktarımında vektör olarak (Fouriki vd. 2013) kullanımı da yaygındır. Bunlara ek olarak, fonksiyonlandırılmış Fe₃O₄ NP'ları yara pansuman tekstillerinde antifungal ve antimikrobiyal madde olarak (Anghel vd. 2012, Grumezescu vd. 2014) ve diş hekimliğinde periodontit tedavisinde (Di Turi vd. 2012, Chifiriuc vd. 2013) kullanılmıştır.

Bu zamana dek Fe₃O₄ NP'larının toksisitesi üzerine çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bunlardan bazıları Fe₃O₄ NP'larının sitotoksositeye sebep olduğu yönünde görüş bildirirken bir kısmı da toksik olmadığını söylemektedir. Daha önce yapılmış bu çalışmalardan birinde normal, glia ve göğüs kanseri hücreleri Fe₃O₄ NP'larına maruz bırakılmış ve her üç hücre tipi için de 0,1–10 µg/mL aralığında toksik etki oluşturmadığı bulunmuştur (Ankamwar vd. 2010). Bir diğer çalışmada da üç farklı insan hücresi ile [HCM (kalp), BE-2-C (beyin), ve 293T (böbrek)] çalışılmış ve derişime bağımlı olarak toksisitenin olduğu bildirilmiştir (Mahmoudi vd. 2011).

Nanoparçacıkların toksisitesini belirlemek için *in vitro* sitotoksosite testlerini de içeren çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin ölçümüne ya da laktat dehidrogenaz enziminin (LDH) salımına dayalı testler ve benzer *in vitro* sitotoksosite testleri NP'ların potansiyel risklerinin *in vivo* testlere geçilmeden evvel ön

değerlendirilmesinin yapılabilmesi için önemli rol oynamaktadır. Ancak hücrel sitotoksik cevabın nihai biyokimyasal ürünlerinin optik olarak tespitine dayanan *in vitro* test yöntemlerinin incelenen NP'ların test kimyasalları ile etkileşimine bağlı olarak bir takım sınırlamaları ve dezavantajları vardır (Kroll vd. 2012). Bu testler sadece belirli bir zaman noktasındaki hücrel cevabı belirleyebilirler ve bazı NP'ların etiketleme ya da dedeksiyon aşamalarında kullanılan bileşiklerle etkileşimi nedeniyle yanılgıya neden olabilirler. Ayrıca, sitotoksik testlerinin tekrarlanabilirlikleri NP'ların türü, hücre kültürü koşulları, hücre tipi ve kullanılan test yöntemi gibi parametrelerden etkilenir (Patil vd. 2015). Bu durum zaman zaman yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasına sebep olabilir.

In vitro testlerin bahsedilen dezavantajlarını elimine etmek ve herhangi bir karışıklığa engel olmak için bu tez çalışmasında geleneksel *in vitro* testlere ek olarak, hücre canlılığını izlemek için NP'ların testin içerdiği kimyasallarla etkileşimini ortadan kaldıran bir sistem kullanılmıştır (Vetten vd. 2013, Ozturk vd. 2014). Yerinde empedans ölçümüne dayalı bu sistemde, yüzeye tutunan hücreler biyosensör yüzeyinde bölgesel bir yalıtıma neden olarak elektrot ve hücre kültürü ortamı arasında farklı bir ara yüz oluştururlar. Bu durum empedansta artışa sebep olur, yüksek empedans değerleri elektrotlar üzerinde büyümekte olan hücre sayısının da yüksek olduğunu gösterir (Xiao vd. 2005).

Bu tez çalışmanın amacı, hPDLF ve mDF hücrelerinin ticari olarak satılan üç farklı NP'a (C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄) verdiği *in vitro* sitotoksik cevabın karşılaştırılması ve böylece NP toksisitesinin hücre tipine bağımlılığının belirlenmesidir. Üretim yöntemine bağlı olarak yapıda oluşabilecek farklılıkların sitotoksisiteye etkisi düşünülerek ticari olarak satılan NP'lar tercih edilmiştir. Ayrıca geleneksel sitotoksik testlerinin sonuçlarının empedans ölçümüne dayalı xCELLigence sisteminin sonuçları ile karşılaştırılması ve NP toksisitesini belirlemek için kullanılmakta olan sitotoksik tarama testlerinin güvenilirliği hakkında bir fikir oluşturulması da amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Nanoteknoloji

Moleküler düzeydeki mühendislik yöntemleri ile üretilen çok küçük ölçekli (<100 nm) malzemeler olan nanomateriyaller, kendilerine has mekanik, optik, elektriksel ve manyetik özellikleri sebebi ile bilimsel olarak oldukça fazla ilgi görmektedir. Bu nanomateriyallerin kullanımı ile geliştirilen nanoteknoloji uygulamaları ise ticari ve askeri alanların yanı sıra sağlık alanında da artarak devam etmekte ve bu alanda yapılan çalışmalar nanoparçacıkların insan sağlığına ve çevreye verdiği etkilerin araştırılması için yapılan çalışmalarından çok daha hızlı bir şekilde ilerlemektedir.

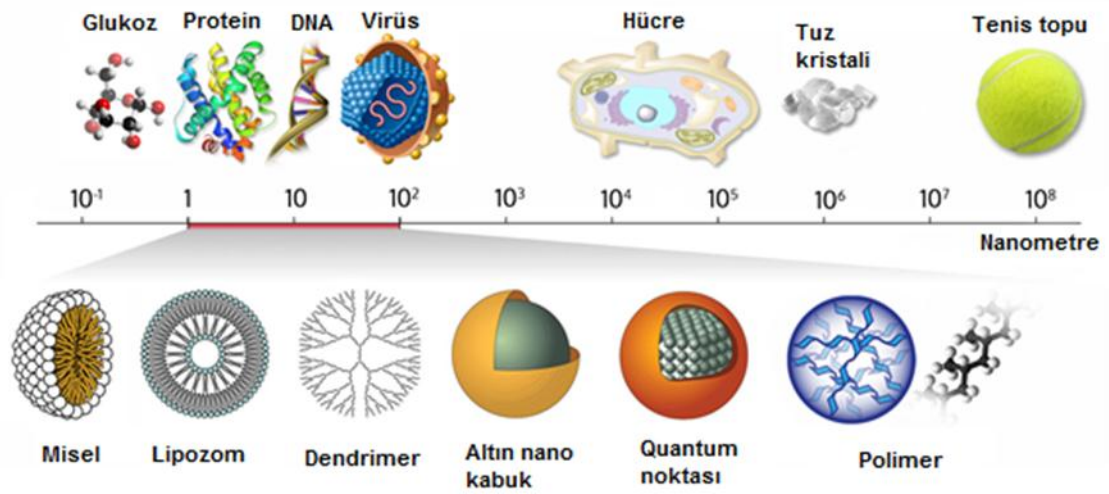
Son zamanlarda yapılan çalışmalar sağlık alanında hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesi için nanoparçacıkların kullanımının olumlu sonuçlar ortaya çıkarabileceğini göstermiştir. Ayrıca doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında özellikle hücre terapisi ve organ rejenarasyonu çalışmalarında da nanoteknoloji kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra nanoteknoloji yöntemleri ile geliştirilen sensör sistemleri de pek çok biyo-uygulamada yerini almıştır. Bu sebeple günümüzde olduğu gibi gelecekte de nanoparçacıklara ve nanoyapılara büyük bir talep olacaktır. Nanomalzemelerin güvenle kullanılabilmesi için bu malzemelerin hangilerinin insan sağlığı açısından risk oluşturabileceğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bunun için de hücresel ve sistemik toksisitenin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

2.2 Nanoparçacıklar

En az bir boyutta 100 nm ya da aşağısında ölçülere sahip olan parçacıklar nanoparçacık olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.1). Bunlar arasında başlıcaları olarak karbon nanotüpler, dendrimerler, quantum noktaları ve nano metal-oksitler sayılabilir.

Nanoparçacıklar boyuta bağımlı olarak kendilerine has bazı özellikler gösterirler. Manyetik malzemelerde süperparamanyetizma ve yarı iletken malzemelerde kuantum sınırlaması bu özelliklere örnek olarak verilebilir. Reaksiyonlar bir malzemenin

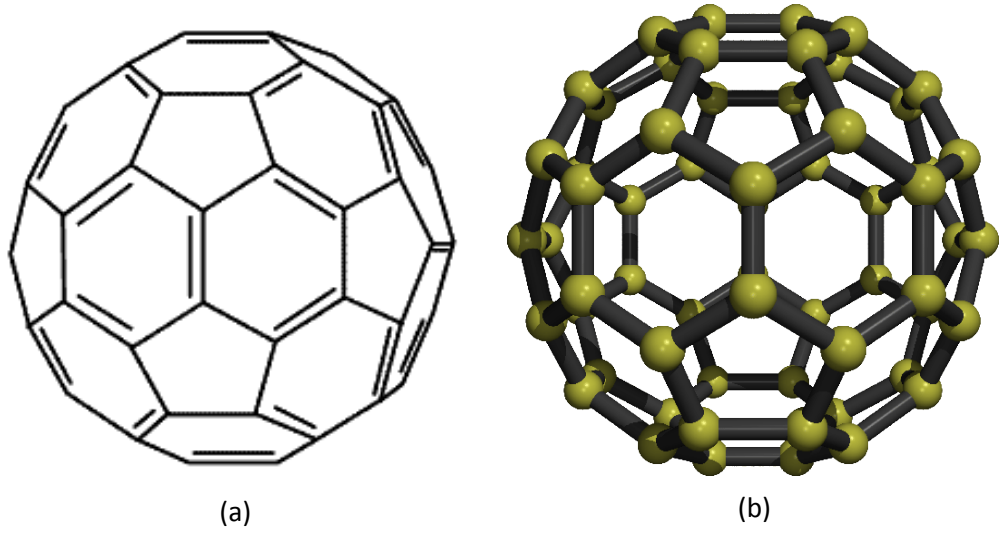
yüzeyinde gerçekleşir, bu sebeple aynı hacim için yüzey alanı ne kadar büyük olursa reaktivite de o kadar fazla olacaktır. Nanoparçacıklar da hacimlerine göre çok büyük bir yüzey alanına sahip oldukları için oldukça yüksek reaktivite gösterirler. Örneğin altın nanoparçacıklar makroboyutta iken inert özellik göstererek pek çok kimyasalla reaksiyon vermezken nanoboyutta oldukça reaktif hale gelerek reaksiyonları hızlandırmak için katalizör olarak kullanılırlar (Thompson 2007).



Şekil 2.1 Nano ölçekte boyut karşılaştırması (<http://www.wichlab.com/wp-content/uploads/2013/04/Size-comparison-Bio-nanoparticles.jpg> 2013 adresinden değiştirilerek alınmıştır).

2.2.1 Fulleren

Bu çalışmada seçilen karbon temelli nanoparçacıklardan biri olan fulleren ya da diğer ismi ile buckminster fulleren (C_{60}), 60 karbon atomundan oluşan 1 nm çapında küresel şekilli bir nanoparçacıktır (Şekil 2.2). Robert Curl tarafından 1985 yılında keşfedilen fulleren; volkanik patlamalar, orman yangınları ve karbon temelli maddelerin yanması gibi doğal ve antropojenik kaynaklardan dolayı doğada da bulunur.



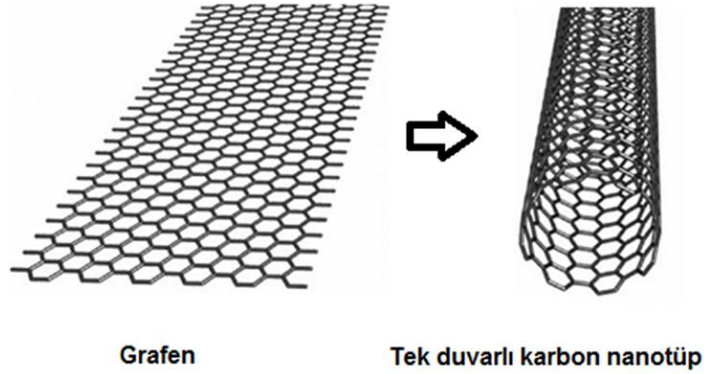
Şekil 2.2 Fullerenin: a. 2 boyutlu, b. 3 boyutlu yapısı
 (http://web.ornl.gov/~pk7/thesis/pkthimg858.gif 2016 ve
 http://cfile24.uf.tistory.com/image/115C114B4D13226D068374 2016
 adreslerinden alınmıştır).

Fulleren 20 heksagonal ve 12 pentagonal halkadan oluşan ikozahedral simetriye sahip bir kapalı kafes yapısındadır. Her karbon atomu 3 diğer karbon atomuna bağlıdır ve sp^2 hibritleşmesi yapmıştır. İki farklı bağ uzunluğuna sahiptir; 6:6 bağları çift bağ olarak kabul edilir ve 6:5 bağlarına oranla daha kısadır. C_{60} pentagonal halkalarda çift bağ yapmadığından süper aromatik değildir, dolayısı ile zayıf bir elektron delokalizasyonu vardır. Bu sebeple elektron eksikliği olan bir alken gibi davranır ve nükleofiller, bazlar, indirgen ajanlar ve radikaller gibi elektronca zengin türlerle kolayca reaksiyona girer. Kararlı bir moleküler yapıya sahiptir (Talbot 1999).

2.2.2 Tek duvarlı karbon nanotüpler

Karbon nanotüpler fulleren ailesinin üyeleridir ve silindirik bir nano yapıya sahip karbon allotroplarıdır. Tek atom kalınlığındaki grafen adı verilen karbon tabakanın sarılmasıyla uzun ve içi boş yapıda tek duvarlı karbon nanotüpler elde edilir (Şekil 2.3).

Çapları 1-100 nm arasında değişir. Nanotüplerin bükülme derecesi ve elektronik özellikleri grafit tabakanın ne şekilde sarıldığına (nanotüp kiralitesi), tüplerin çapına, uzunluğuna ve morfolojisine bağlı olarak değişiklik gösterir (Taczak 2007).



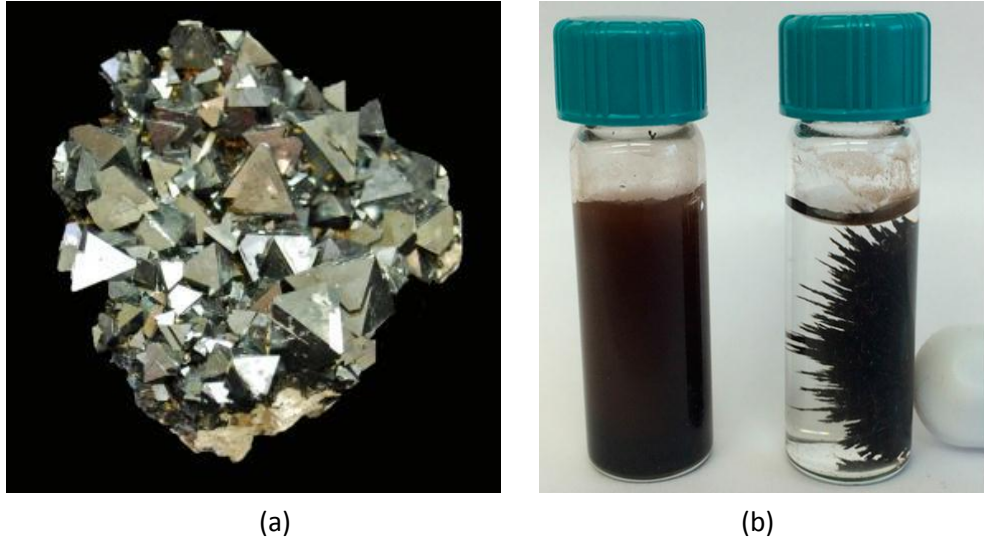
Şekil 2.3 Tek duvarlı karbon nanotüpün yapısı (Kreupl vd. 2002)

Tek duvarlı karbon nanotüpler içi boş ve inert, dışı ve uçları ise reaktif özellikte olan tamamen konjuge poliaromatik makro moleküllerdir. Sahip oldukları pürüzsüz yüzey ve yüksek derecede polarize edilebilirlikleri sayesinde nanotüpler arasında kuvvetli Van der Waals etkileşimleri meydana gelir ve pi istiflenmesine uğrayarak paralel olarak demetler ve ipler halinde öbekler oluştururlar. Nanotüplerdeki kimyasal bağ grafittekine benzer şekilde tamamen sp² bağlarından oluşur. Elmasta ve alkanlarda bulunan sp³ bağlarından daha kuvvetli olan bu bağlar nanotüplerin kendilerine has dayanıklı yapılarının sebebidir. Teorik ve deneysel çalışmalar karbon nanotüplerin oldukça yüksek bir elastik modülü olduğunu ve en dayanıklı çelikten 10-100 kat daha kuvvetli olduğunu göstermiştir (Ganesh 2013)

Bu silindirik karbon molekülleri nanoteknoloji, elektronik, optik ve diğer malzeme bilimi ve teknolojisi alanları için değerli ve alışılmamış özelliklere sahiptir. Olağanüstü termal iletkenlikleri, mekanik ve elektriksel özellikleri ile karbon nanotüpler golf malzemeleri, beyzbol sopaları, araba parçaları gibi hayatın içinde yer alan malzemelerin yapıtaşları olarak da kullanılmaktadır (Britz vd. 2006).

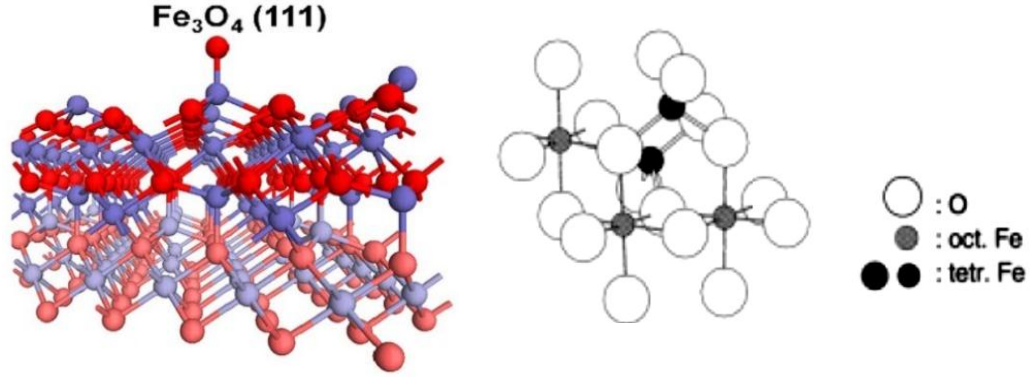
2.2.3 Demir (II, III) oksit (manyetit) nanoparçacıkları

Demir (II,III) Oksit ya da diğer adı ile manyetit; Fe^{II} ve Fe^{III} türlerinin her ikisini de içeren ferrimanyetik, siyah bir mineraldir (Şekil 2.4). Önemli bir demir cevheridir. Titanomanyetit ile birlikte kayaların manyetik özelliklerinden sorumludur. Diğer isimleri siyah demir oksit, manyetik demir cevheri, demir ^{2, 3} oksit, mıknatıs taşı, tri demir tetraoksit ve ferröz ferrit olarak sayılabilir.



Şekil 2.4.a. Manyetit cevheri (https://nhmu.utah.edu/sites/default/files/styles/content-node-img/public/collection-object/a2805_Magnetite_0.jpg?itok=Ut_cn-gC// 2016), b. Manyetit nanoparçacıkları (Dissanayake vd. 2015).

Kristal yapısı invers spineldir, yüzey merkezli kübik birim hücrelerine 32 O^{2-} anyonu, 16 Fe^{3+} katyonu ve 8 Fe^{+2} katyonu düzenli ve kübik biçimde yerleşmiştir (Şekil 2.5). Manyetit hem divalent hem de trivalent demir içerdiği için diğer demir oksitlerden ayrılır. Formülü $\text{Y}[\text{XY}]\text{O}_4$ şeklinde yazılır; formülde $\text{X}:\text{Fe}^2$, $\text{Y}:\text{Fe}^3$ ve parantezler de oktahedral bölgelere karşılık gelir. Sekiz tetrahedral bölge Fe^2 ve Fe^3 arasında dağılmıştır, trivalent iyonlar hem tetrahedral hem de oktahedral bölgede bulunur. Manyetit çoğunlukla tam oransızdır (non-stoichiometrik), yani katyon eksikliği olan bir Fe^3 altörgüsüne sahiptir (Cornell ve Schwertman 2001). Ayrıca iyi bir iletken olan manyetitin Fe^2 ve Fe^3 merkezleri arasındaki elektron değişimi sayesinde elektriksel iletkenliği hematite göre 10^6 kat daha fazladır (Greenwood ve Earnshaw 2012)



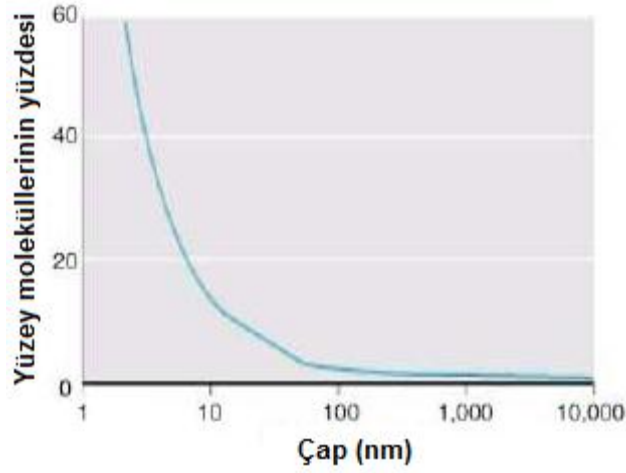
Şekil 2.5 Manyetitin kristal yapısı
(<https://discovery.kaust.edu.sa/cms/figure/index/5687c00e140ba025318b4568>. 2016)

Manyetit çeşitli kaya türlerinde doğal olarak oluşan bir faz olmasının yanı sıra magnetotaktik bakteriler tarafından da sentezlenmektedir. Ayrıca siyah yazıcı tonerleri gibi pek çok sentetik ürünün de içeriğini oluşturmaktadır. Biyolojik ve medikal alanda da diğer manyetik malzemelere göre üstün biyoyumluğu, fizyolojik ortamdaki kimyasal kararlılığı, kolay ve ekonomik sentezlenebilirliği gibi özelliklerinden dolayı çok ilgi gören manyetit, ilaç hedeflendirme çalışmalarında, MRI taramalarında kontrast ajan olarak ve çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak da kullanılmaktadır (Könczöl vd. 2011).

2.3 Nanoparçacık Karakterizasyonu

Nanoparçacıklara maruz kalan hücre tipinin yanı sıra, nanoparçacıkların boyut, şekil gibi özellikleri sitotoksistede önemli rol oynar. Daha önce yapılan pek çok çalışma (Pan vd. 2007, Carlson vd. 2008, Karlsson vd. 2009, Xie vd. 2016) nanoparçacık özelliklerinin biyokinetik ve biyolojik etkilerinin toksisiteye etki ettiğini göstermiştir. Bu özelliklerin nanoparçacıkların hücre içine alım, protein adsorpsiyonu, organellerde birikim ve vücutta dağılım gibi davranışlarını belirlediği gösterilmiştir (Kong vd. 2011).

Bu etkilerin önemli bir nedeni, parçacık boyutu ile yüzey alanı arasındaki korelasyondur. Parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanı büyür ve yüzeydeki toplam atom ya da molekül sayısının oranı da üstel olarak artar. Örneğin, parçacık boyutu 30 nm'den 3 nm'ye düşürüldüğünde yüzeydeki molekül sayısı oransal olarak %10'dan %50'ye artış gösterir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Parçacık boyutu ile yüzey alanı arasındaki korelasyon (Oberdöster vd. 2005'ten değiştirilerek alınmıştır).

Boyutun küçülmesi kimyasal reaktiviteyi artırır, ancak aynı zamanda nanoparçacıkların yüksek yüzey enerjisinden dolayı öbek oluşturma eğilimi de artar. Öbek oluşumu nanoparçacığın orijinal şeklini ve boyutunu önemli ölçüde değiştirir. Bu da toksik cevabın değişmesine sebep olur. Zayıf bağlarla öbekselen nanoparçacıklar ultrasonikasyon ya da vorteksleme yöntemi ile çözelti içinde kolayca yeniden dağıtılabılırler ancak, kuvvetli bağlarla öbekselen nanoparçacıkların orijinal şekil ve boyutlarına döndürülmeleri oldukça zordur. Bu tür nanoparçacıkların hücre ile etkileşimleri de bu öbekselenmeden etkilenir. Bu sebeple toksisitenin doğru biçimde anlaşılabilmesi için nanoparçacıkların karakterizasyonunun ayrıntılı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Aşağıdaki çizelgede bu çalışmada araştırılan nanoparçacıkların karakterizasyonu için incelenen nanoparçacık özellikleri ve kullanılan yöntemler listelenmiştir (Çizelge 2.1).

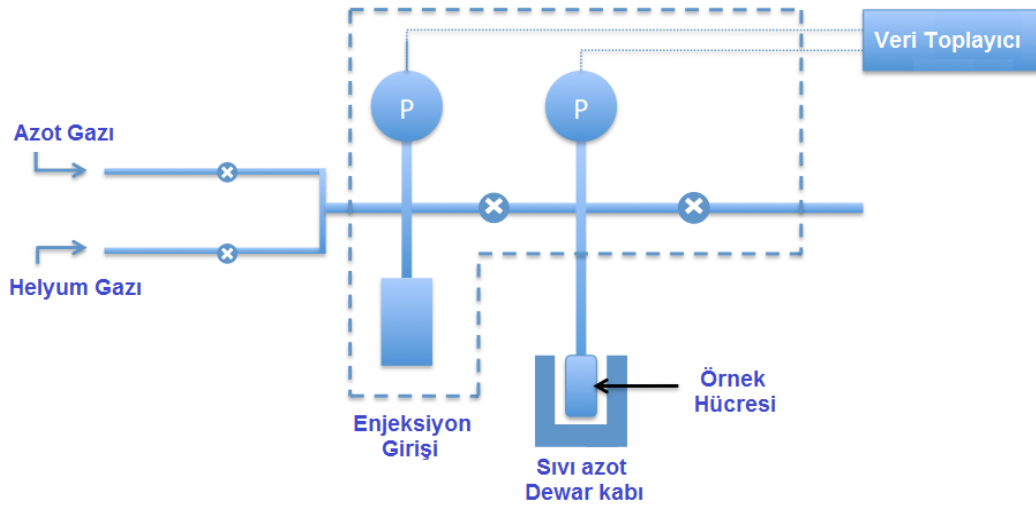
Çizelge 2.1 Nanoparçacık karakterizasyonu için incelenen özellikler ve kullanılan karakterizasyon yöntemleri

Nanoparçacık özellikleri	Kullanılan karakterizasyon yöntemi
Hücre içine giriş	TEM
Boyut ve şekil	TEM, DLS
Aglomerasyon-agregasyon (öbekleşme) davranışı, kararlılık	DLS
Kristal yapı ve örgü parametresi	XRD
Yüzey kimyası, yük, yüzey alanı, gözenek boyutu	BET, ZETA Potansiyeli
Manyetik özellik, kristal yapı, yük	Mössbauer Spektroskopisi

2.3.1 BET yüzey alanı analizi

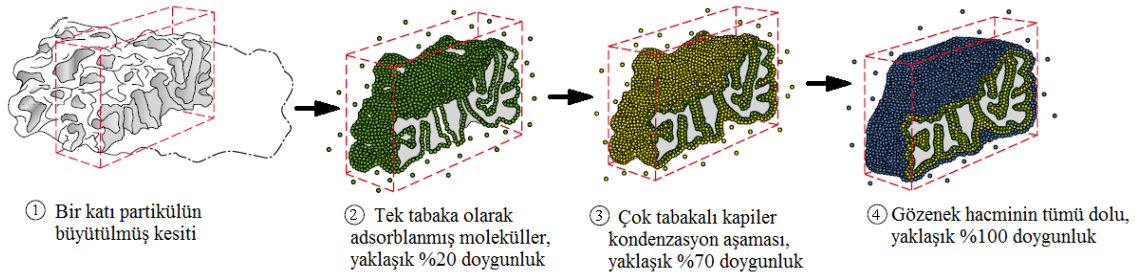
Brauner-Emmet-Teller (BET) analizi kuru toz örnekler için spesifik yüzey alanının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu ölçüm tekniği, düşük ve sabit sıcaklıklarda azot ya da helyum gazının fiziksel adsorpsiyonuna dayanır. Katı maddeler yüzey enerjileri nedeniyle atmosferdeki gaz moleküllerini adsorplarlar. BET teorisine göre, artan adsorbat kısmi basıncı kuru toz örnek üzerindeki tek ve çok tabakalı adsorpsiyonu artırır. BET tekniğinde örnek yüzeyini tek bir moleküler tabaka ile kaplamak için gerekli gaz miktarı tayin edilerek yüzey alanı hesaplanır (Dąbrowski 2001).

Parçacık yüzeyine adsorplanan gazın hacmi azotun kaynama noktasında (-196°C) ölçülür. Adsorplanan gaz miktarı parçacığın yüzey gözeneklerinin hacmini de içeren toplam yüzey alanı ile ilişkilidir. Yüzey alanı BET teorisine göre hesaplanır. Genellikle adsorbat olarak azot gazı kullanılır. Gaz adsorpsiyonu aynı zamanda mikro gözeneklerin boyutunun ve hacimsel dağılımının belirlenmesini de sağlar.



Şekil 2.7 BET analiz cihazının şematik gösterimi (<http://archive.cnx.org/contents/f5c058e0-41f2-4ef6-878b-2fdc07760129@1/bet-surface-area-analysis-of-nanoparticles>. 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

Gaz adsorpsiyonu öncesinde parçacık yüzeyinin su, yağ gibi kontaminantlardan arındırılması gerekir. Bu amaçla, numunenin bir hücre içinde vakum altında ya da gaz akışı altında ısıtılması ile yüzey temizliği (degaz işlemi) gerçekleştirilir. Yüzey temizliğinden sonra, örnek sabit sıcaklığa getirilir ve vakumlanmış numune hücresine küçük miktarlarda adsorban gaz gönderilir (Şekil 2.7). Katı yüzeye tutunan gaz molekülleri ince bir tabaka oluşturur. Çok tabakalı adsorpsiyonu tanımlayan ve Langmuir izoterminin her bir tabakaya uygulanmış şekli olan BET modeline göre (Brunauer vd. 1938) örnek yüzeyinin tek bir tabaka adsorban molekülü ile kaplanması için gereken molekül sayısı hesaplanabilir. Gaz moleküllerinin hücre içine gönderilmesine devam edildiğinde tek tabakanın üzerine ikinci, üçüncü tabaka gaz molekülleri adsorplanmaya başlar. Bu adsorplanma kapiler kondenzasyon ile birlikte gerçekleşir. Denge adsorbat basıncı doyumluğa yaklaştıkça gözenekler adsorbat molekülleri ile tamamen dolu hale gelir (Şekil 2.8). Adsorbatın yoğunluğu kullanılarak kapladığı hacim ve dolayısıyla örneğin toplam gözenek hacmi hesaplanır.



Şekil 2.8 Farklı adsorbat basınçlarında adsorbatın bir katı partikül üzerine adsorplanma davranışının şematik gösterimi (<http://www.istcgroup.com/pdf/NOVA%20Series.pdf> 2016'dan değiştirilerek alınmıştır.)

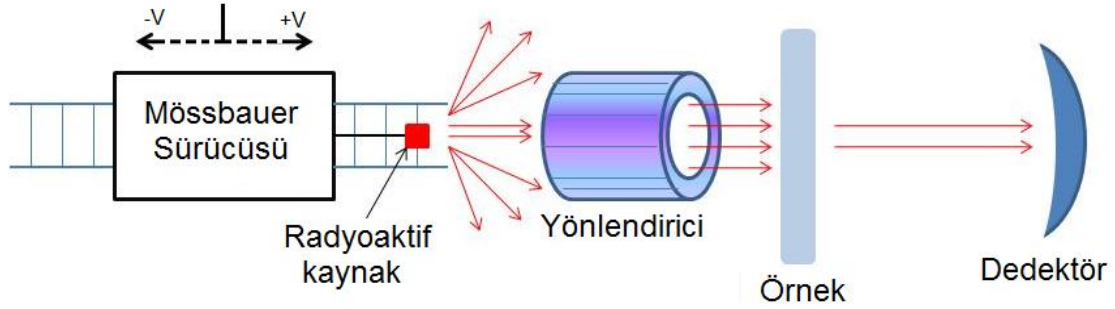
2.3.2 Mössbauer Spektroskopisi

Mössbauer spektroskopisi, Mössbauer etkisine dayalı, katılarda gama ışınlarının geri tepmesiz ve rezonant olarak yayınımlı ve soğurulması ile ilgili spektroskopik bir tekniktir. Nanometre ölçeğinde manyetik malzemelerin yapısal ve manyetik özelliklerini belirlemek için kullanılır. Kristal örgü içerisindeki bir çekirdek tarafından enerji kaybı olmadan fotonun salınması Mössbauer etkisi olarak bilinir ve 1957'de R. L. Mössbauer tarafından keşfedilmiştir (Yoshida ve Langouche 2013).

Mössbauer spektroskopisi, bir çekirdeğin içinde bulunduğu fiziksel veya kimyasal ortamın özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan, gama ışınlarının yüksek enerjisi ve aşırı dar çizgi genişliği sebebiyle ileri derecede duyarlı bir tekniktir. Radyoaktif bir kaynağın çekirdeğinden yayılan gama ışınları kullanılarak örneğin çekirdeği etrafında bulunan elektronların oluşturduğu elektromanyetik alandaki küçük enerji değişimlerinin incelenmesini sağlar.

Kaynak, katı bir matris içine gömülü olarak Mössbauer izotopunun ana çekirdeğini içerir. Mössbauer sürücüsü kaynağı değişik hızlarla ileri-geri hareket ettirir. Bu hareket Doppler etkisi yaratır ve kaynaktan yayımlanan ışınlarda enerji kaymasına sebep olur. Yayımlanan gama ışınları bir ışın yönlendiriciden (kolimatör) geçtikten sonra incelenen materyalden (soğurucudan) geçirilir. Soğurucudan geçen ışınlar dedektöre gelir. Dedektör, kaynağın hızına bağımlı olarak örnekten geçen ışınları tespit eder ve sayar (Şekil 2.9).

Eğer kaynağın çekirdeği ve soğurucu aynı ortamda ise (örn. her iki çekirdekteki nükleer geçiş enerjisi eşitse) gama ışınları rezonant olarak soğurulur ve bir absorpsiyon piki



(Mössbauer piki) gözlemlenir.

Şekil 2.9 Mössbauer spektroskopi sisteminin şematik gösterimi (<https://orgspectroscopyint.blogspot.com.tr/p/mossbauer-spectroscopy-spectroscopic.html> 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

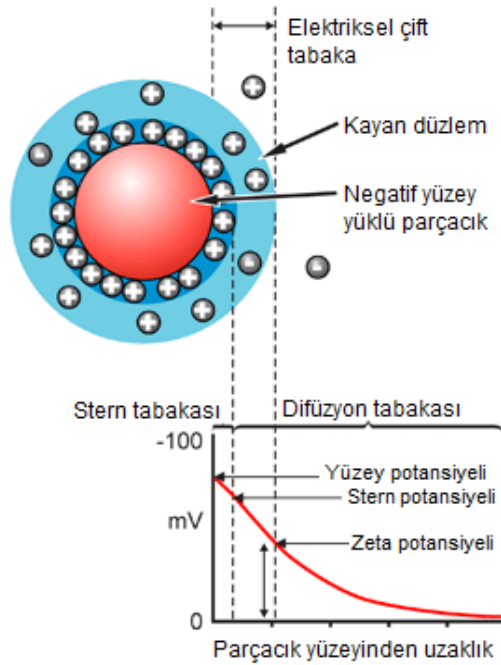
Bir çekirdek ile onu çevreleyen ortam arasındaki etkileşim aşırı ince (hyperfine) etkileşim olarak bilinir. Bu etkileşimler çekirdeğin kendisi ile karşılaştırıldığında çok küçüktür ancak Mössbauer etkisinin ileri seviyedeki enerji ayırma duyarlılığı bu etkileşimlerin incelenbilmesini olanaklı kılar. Bu teknik ile çekirdeğin iç manyetik alanı (Hf), çekirdeğin s elektron yoğunluğu hakkında bilgi veren izomer kayma değeri (IS), çekirdeğin simetrisi hakkında bilgi veren kuadrupol yarılmı (QS) ve çekirdeğin yük durumu hakkında bilgi edinilebilir. Ayrıca, bu yöntem örnek içinde oluşan manyetik fazların hacimce yüzdeleri hakkında yüksek duyarlılıkta bilgi vermektedir.

2.3.3 Zeta potansiyeli

Pek çok nanoparçacık ya da kolloidal partikül süspansiyon içinde yüzey yüküne sahiptir. Zeta potansiyeli (elektrokinetik potansiyel) nanoparçacık yüzeyindeki etkin elektrik yükünün bir ölçüsüdür ve kolloidal nanoparçacıkların yük kararlılığını ifade eder. Bir nanoparçacık net bir yüzey yüküne sahip olduğunda, nanoparçacık yüzeyine yakın bölgede bir karşıt yüklü iyon topluluğu tarafından çevrelenir. Parçacık yüzeyine

yakın olan karışit yüklü iyonlar (Stern tabakası) parçacığa sıkıca bağlanırlar. İkinci tabaka ise zayıf bağlanan iyonlardan (difüzyon tabakası) oluşur.

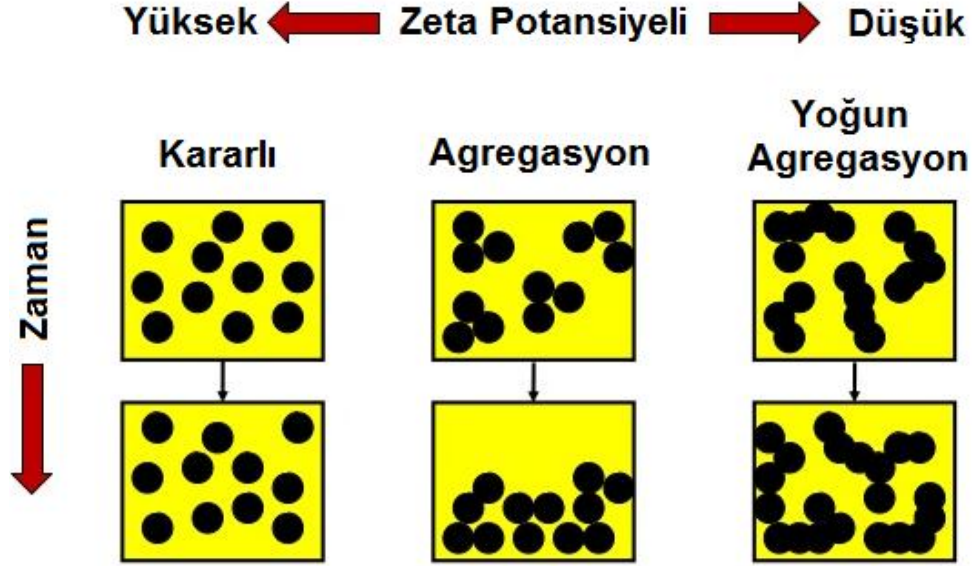
Bu karışit yüklü iyonlar nanoparçacık ile birlikte hareket eder ve yüzey yükü ile beraber karışit yüklü iyon topluluğuna elektriksel çift tabaka adı verilir (Şekil 2.10). Parçacıkların dağıldığı sıvı ortam ile parçacık arasında bir potansiyel farkı oluşur. Bu potansiyel farkı elektriksel çift tabakanın kalınlığı ile değışir. Bu potansiyele zeta potansiyel adı verilir. Simgesi ζ , birimi volt'tur (Hunter 2013).



Şekil 2.10 Çözelti içindeki nanoparçacık yüzeyindeki elektriksel çift tabakanın şematik gösterimi (<http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques> 2016 adresinden değıştirilerek alınmıştır.)

Zeta potansiyeli, bir partikülün içinde dağıldığı sıvı kütlesi ile nanoparçacık yüzeyindeki karışit yüklü iyonları içeren sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsüdür. Pozitif bir zeta potansiyele sahip olan partiküller negatif yüklü yüzeylere, negatif zeta potansiyelli olanlar ise pozitif yüzeylere bağlanır. Zeta potansiyelinin büyüklüğü partikül kararlılığı hakkında bilgi verir ve partikül yüzeyindeki yük karakteristiğini belirlemek için kullanılır. Yüksek zeta potansiyel değıerleri elektrostatik

itme kuvvetinin fazla olması anlamına gelir, bu da süspansiyon kararlılığını artırır ve düşük viskoziteli, iyi dağılmış bir süspansiyon oluşturur (Şekil 2.11).

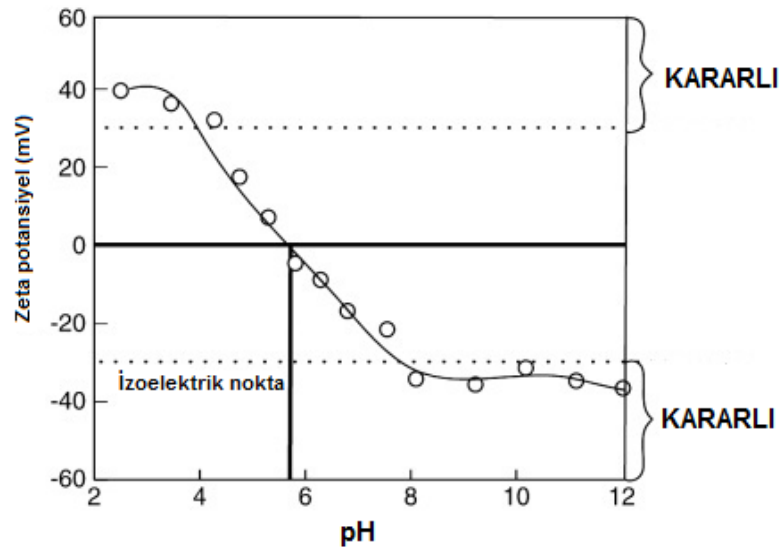


Şekil 2.11 Zeta potansiyelin süspansiyon özellikleri üzerine etkisinin şematik gösterimi (<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/139288-An-Overview-of-the-Zeta-Potential-Part-3-Uses-and-Applications/>, An Overview of the Zeta Potential - Part 1: The Concept, American pharmaceuticals review 2013'den değiştirilerek alınmıştır.)

Zeta potansiyel partiküllerin elektriksel potansiyelini yansıtır ve partikül kompozisyonundan ve partikülün içinde dağılmış olduğu ortamdan etkilenir. Nanoparçacık yüzeyindeki yükün büyüklüğü çözeltinin pH'ı ile değişkenlik gösterir. Yüzey yükünün sıfırlandığı pH değerine izoelektronik nokta adı verilir ve süspansiyonun en kararsız olduğu pH'dır (Şekil 2.12).

(+/-) 30 mV üzerinde zeta potansiyeline sahip nanoparçacıklar süspansiyon içinde kararlıdır çünkü yüzey yükleri partiküllerin agregasyonunu engeller.

- 0-5 mV : Yığınlar oluşturma ya da öbikleşme eğiliminde partiküller
- 5-20 mV : Minimal partikül kararlılığı
- 20-40 mV : Orta derecede partikül kararlılığı
- 40+ mV : Yüksek partikül kararlılığı



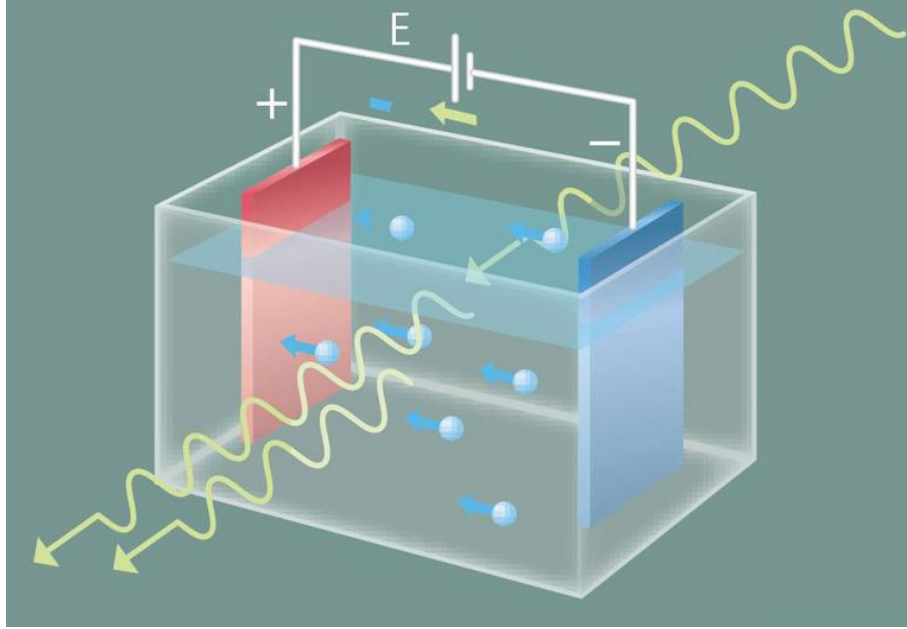
Şekil 2.12 Zeta potansiyelin pH'a bağlı olarak değişimi (Information about Zeta Potential K. Khoshnevisan, M. Barkhi, Institute of Agricultural Biotechnology, Nano Department, Karaj, Tehran, Iran- https://www.researchgate.net/publication/275834023_Zeta_potential 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

Zeta potansiyeli ölçümü için iki altın elektrot içeren bir hücre içine çözelti eklenir ve elektrota bir gerilim uygulanır. Uygulanan gerilimin etkisiyle partiküller zıt yüklü elektroda doğru hareket eder. Hareketin yönü ve hızı parçacığın yüküne, süspansiyon ortamına ve elektrik alanının kuvvetine bağlıdır. Parçacığın hızı, kayma düzlemindeki elektriksel potansiyeli (zeta potansiyeli) ile orantılıdır. Zeta potansiyeli, parçacıkların hareket hızı bir lazer sistemi yardımıyla farklı gerilimler altında optik olarak ölçülerek hesaplanır (Şekil 2.13).

2.3.4 DLS (Dinamik Işık Saçılımı)

Dinamik ışık saçılımı (foton korelasyon spektroskopisi, yarı elastik ışık saçılımı) bir sıvı içinde süspansiyon edilmiş parçacıkların alt mikron bölgesindeki boyutunu (mikron düzeyindeki parçacıklar, nano büyüklükteki parçacıklar ve makromoleküller) ölçmek için kullanılan bir tekniktir. DLS tekniği Brownian hareketleri ölçerek parçacıkların boyutu ile ilişkilendirir. Parçacıkların kendilerini çevreleyen solvent molekülleri ile çarpışması sonucu rasgele hareketlerine Brownian hareket adı verilir. Parçacık boyutu ne kadar büyükse, Brownian hareket o kadar yavaş olur. Parçacık boyutu küçük olduğunda ise solvent molekülleri ile çarpıştıklarında daha uzağa fırlarlar ve dolayısıyla

daha hızlı hareket ederler. Brownian hareketin hızı çevrimsel difüzyon katsayısı (D) adı verilen bir kavramla ifade edilir (Hoo vd. 2008).



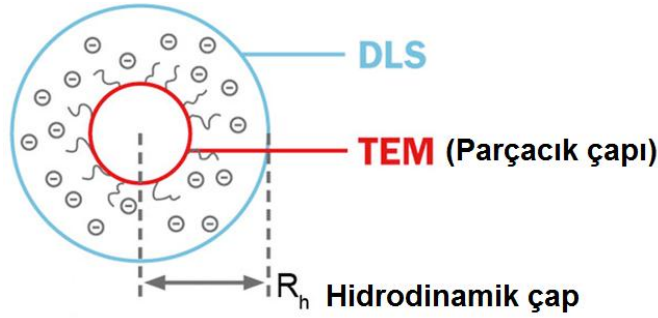
Şekil 2.13 Zeta potansiyeli ölçüm sisteminin şematik gösterimi (<http://laser.spbu.ru/en/research-eng/dzeta-eng.html> 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

DLS tekniğinde ölçülen çapın büyüklüğü, bir parçacığın sıvı içinde ne şekilde difüzlendiğine bağlıdır. Yani aslında ölçülen çap, parçacık ile birlikte difüzlenendiği varsayılan, parçacıkla aynı çevrimsel difüzyon katsayısına sahip olan bir kürenin çapıdır ve bu sebeple hidrodinamik çap (Stokes çapı) olarak adlandırılır. Hidrodinamik çap, parçacığın etrafında oluşan elektriksel çift tabaka ile birlikte oluşturduğu büyüklüktür. O yüzden hidrodinamik çap her zaman parçacık boyutundan daha büyüktür (Şekil 2.14).

DLS sisteminde, sıvı içinde süspanse edilen nanoparçacıklar bir lazerin optik yolu üzerine yerleştirilir ve lazer ışığının süspansiyon içindeki parçacıklarla etkileşmesi sağlanır. Brownian hareketi sergilemekte olan nanoparçacıklara çarpan lazer ışınları saçılır (Şekil 2.15). Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine, buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır. Saçılan ışınlar bir dedektör yardımıyla tutularak difüzyon hızı belirlenir ve Stokes-Einstein eşitliği yardımıyla ortalama hidrodinamik parçacık boyutu hesaplanır.

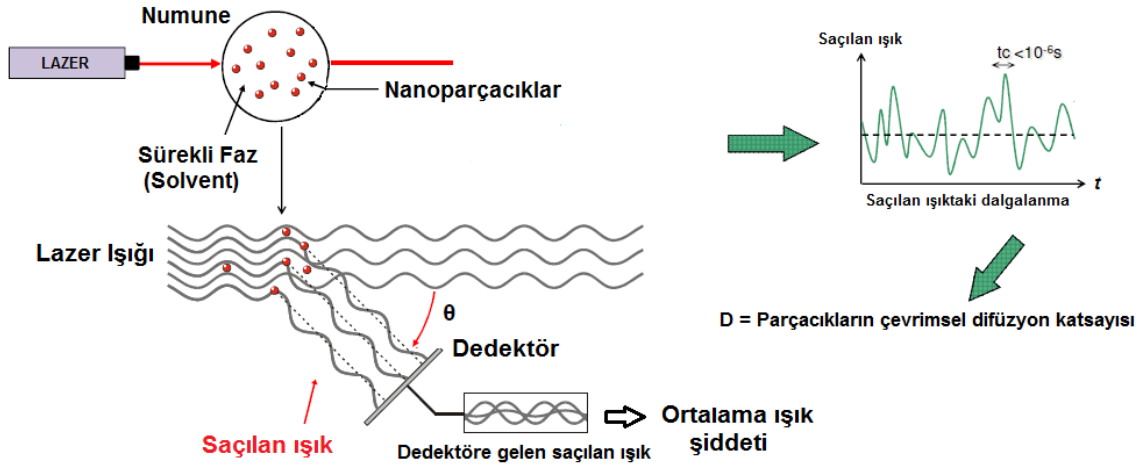
Stokes- Einstein eşitliği: $d(H) = kT/3\pi\eta D$

Burada; $d(H)$: Hidrodinamik çapı, k : Boltzmann sabitini, T : Mutlak sıcaklığı, η : Viskoziteyi ve D : Çevrimsel difüzyon katsayısını ifade eder.



Şekil 2. 14 Hidrodinamik çap (<http://www.fritsch-international.com/particle-sizing/fritsch-knowledge/hydrodynamic-diameter/2016> adresinden değiştirilerek alınmıştır).

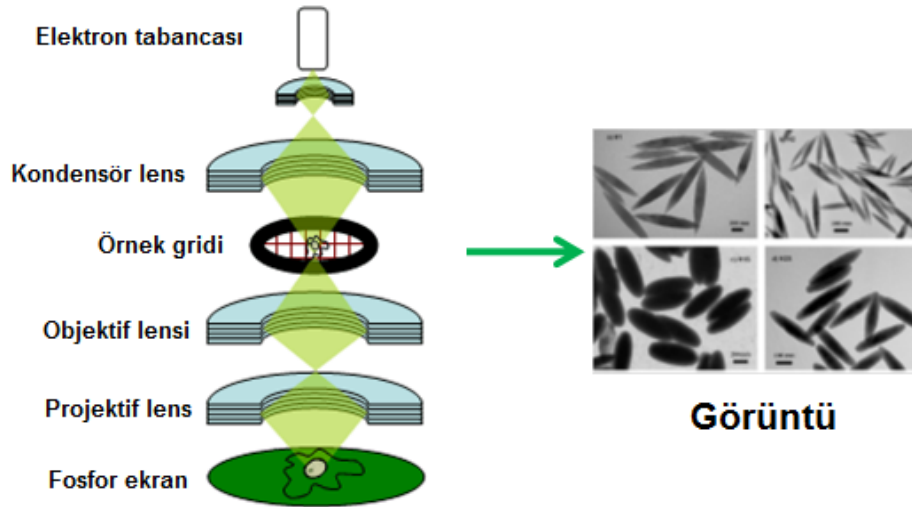
DLS yöntemi, saçılan ışık şiddetinin zamana bağlı dalgalanmalarını ölçerek hidrodinamik büyüklük, difüzyon katsayısı, dağılım indeksi ve parçacık büyüklüğü dağılımının elde edilmesinde kullanılır.



Şekil 2.15 DLS sisteminin şematik gösterimi (Malvern Instruments Ltd. Printed in England, 2008. Zetasizer Nano User Manual'dan değiştirilerek alınmıştır.)

2.3.5 TEM (Geçirimli Elektron Mikroskopisi)

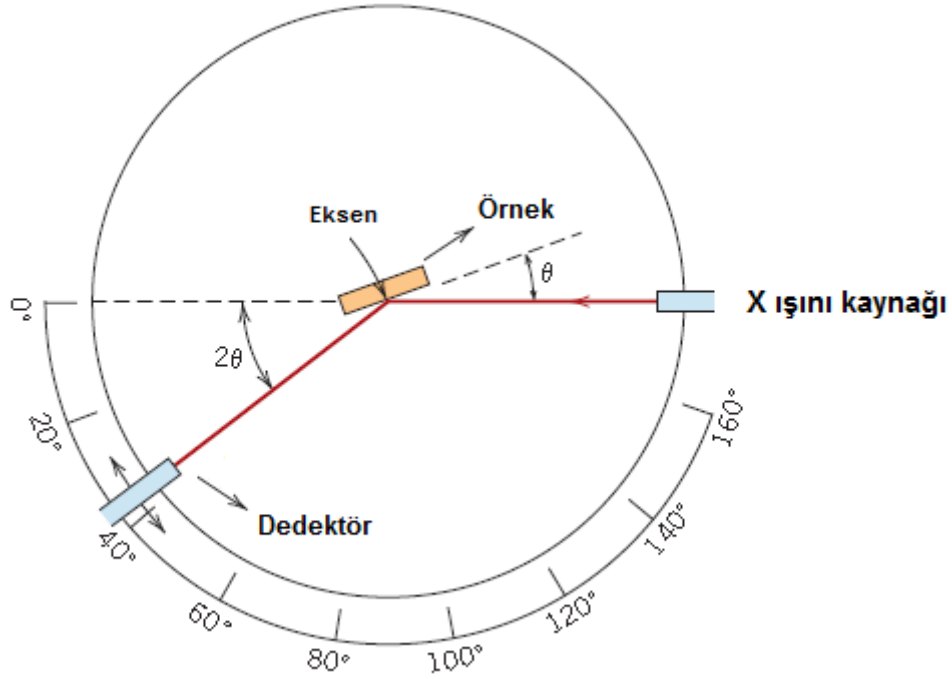
TEM (Geçirimli Elektron Mikroskopisi) optik ışığın yerine yüksek enerjili bir elektron demetini kullanan bir mikroskopi türüdür. Elektron tabancasından gelen yüksek enerjili bir elektron demeti ışık toplayıcı lens aracılığıyla çok ince bir örnekten geçirilir. Örneğe çarpan ışının bir kısmı örneğin kalınlığı ve elektron geçirgenliğine bağlı olarak örneğin içinden geçer, geçiş sırasında da örnekle etkileşir (Şekil 2.16). Elektronların örnekle etkileşimi sonucu oluşan görüntü büyütülür ve bir görüntüleme cihazı (fotoğraf filmi, floresan ekran ya da CCD kamera) üzerine odaklanır. Elektronların örneğin içinden geçebilmesi için, örnek kalınlığının çok ince (genellikle 10 nm'den ince) olması gerekir. Geçirimli elektron mikroskobu, ışık mikroskobundan belirgin şekilde daha yüksek çözünürlüğe sahiptir çünkü elektronun görünür ışıktan çok daha küçük bir de Broglie dalga boyu vardır.



Şekil 2.16 TEM sisteminin şematik gösterimi (<http://frimat.unifr.ch/frimat/en/page/485/> 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

2.3.6 XRD (X-Işınları Kırınım Difraktometresi)

X- ışınları elektromanyetik ışımanın yüksek enerjili ve kısa dalga boylu bir türüdür. X ışınlarının dalga boyu, katılardaki atomik boşlukların boyutu ile aynı mertebededir ve bu özellik sayesinde kristalin atomik ve moleküler yapısını incelemek için kullanılır.



Şekil 2.17 Bir X ışını difraktometresinin şematik gösterimi (Callister ve Rethwisch 2007'den değiştirilerek alınmıştır.)

Bir x-ışını demeti katı bir materyal üzerine yöneltildiğinde ışının bir kısmı ışın yolu üzerinde bulunan atom ya da iyonlara ait elektronlar tarafından her yöne saçılır. Kırınımına uğrayan bu demetlerin açıları ve genlikleri kristaldeki elektron yoğunluğunun 3 boyutlu görüntüsünü verir. Böylece kristalin birim hücre parametreleri, kristaldeki atomların kimyasal bağları, kristal yapıdaki düzensizlikler ve atomik düzlemler gibi özellikleri aydınlatılabilir (Callister ve Rethwisch 2007).

Düz bir plaka formundaki örnek eksen etrafında dönebilecek şekilde yerleştirilir. Örnek, x-ışını kaynağı ve dedektör aynı düzlem üzerinde yer alırlar (Şekil 2.17). X-ışığı kaynağı ve dedektörler, 0°'den 90°'ye kadar döndürülür

Monokromatik x-ışını demeti örnek üzerine gönderilir. Dedektör kırılan ışınların yoğunluğunu tespit ederek 2θ 'nın bir fonksiyonu olarak kaydeder ve bu verilerden x-ışını difraktogramı elde edilir. 2θ deneysel olarak belirlenir ve kırınım açısı olarak adlandırılır (Callister ve Rethwisch 2007).

Atomların birbirine paralel ve komşu düzlemleri arasındaki mesafenin büyüklüğü (düzlemler arası boşluk) Miller indislerinin (h , k ve l) ve aynı zamanda örgü parametresinin (s) bir fonksiyonudur. X-ışını kırınımından, Bragg yasasına uygun olarak 2θ açısına karşılık gelen h , k , l Miller indisleri belirlenir. Bu sayede kristal yapının örgü parametresi olan a değeri hesaplanabilir.

2.4 Nanotoksikoloji

Boyut ve şekli nano ölçekte tasarlanmış malzeme ve cihazların nanoboyutun getirdiği fiziksel, elektriksel ve mekanik özelliklerden faydalanarak dizaynı, sentezi ve uygulaması nanoteknoloji olarak tanımlanır. Nanoteknolojinin ortaya çıkması ile birlikte nanomalzeme bilimi de popüler hale gelmiştir. Nanomalzeme biliminin hızla gelişmesi ve ilerlemesi sonucu nano malzemelerin toksik etkilerinin araştırılması da bir ihtiyaç haline gelmiştir. Malzemelerin nano boyuta indirilmesiyle birlikte malzemenin kimyasal ve fiziksel özellikleri de çoğunlukla değişime uğramakta ve dolayısıyla daha önce büyük boyutlu malzemelerde görülmeyen bir takım yeni toksik etkiler oluşabilmektedir. Ayrıca boyutun küçülmesiyle beraber bu malzemelerin hücre içine girmesi de kolaylaşmakta ve toksik etki yaratma ihtimali artmaktadır. Bu etkilerin araştırılması ve nanomalzemelerin güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için toksikoloji ve nanomalzeme biliminin ortak çalışması gerekmekte ve bu çalışmalar da nanotoksikoloji çalışmaları olarak adlandırılmaktadır. Her geçen gün yeni bir nanomalzemenin sentezlendiği ve mevcut nanomalzeme üretiminin artarak devam ettiği düşünüldüğünde nanotoksikoloji çalışmaları kapsamında nanomalzemelerin ayrıntılı karakterizasyonunun yapılması, hücrelerle ve dokularla etkileşiminin araştırılması insan sağlığı ve çevre güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır.

2.4.1 Nanoparçacık sitotoksitesi ve *in vitro* sitotoksite testleri

Bir malzemenin hücre vücut içinde nasıl davranacağını anlaşılmaya yönelik ilk adım genellikle hücre kültürü çalışmalarını içerir. Hayvan çalışmaları ile karşılaştırıldığında etik olarak daha avantajlı, kontrolü, tekrarlanabilirliği daha kolay ve daha ekonomiktir. Malzemelerin kontrollü koşullarda doğrudan hücrelerle etkileştirilmesi ve oluşan toksik cevabın değerlendirilmesi sitotoksite çalışmalarının temelini oluşturur.

Sitotoksite çalışmalarında hücre kültürlerinin test edilen malzemeye ek olarak sıcaklık, pH, besin ve atık konsantrasyonundaki değişimlere duyarlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple deneysel koşulların kontrol altında tutulması, ölçülen hücre tepkisinin kültüre eklenen nanoparçacığın toksik etkisini yansıttığını kesinleştirmek/garantilemek açısından çok önemlidir. Ayrıca nanoparçacıklar boyaları adsorplayabilir ve redox reaksiyonlarına yol açabilirler, bu sebeple her nanoparçacık için uygun testleri belirlemek gerekir. Sağlıklı sonuçlar almak için birden fazla sitotoksite testini uygulayarak karşılaştırma yapmak avantaj sağlar (Lewinski vd. 2008).

Hücre türüne göre elde edilen toksik etki değişkenlik gösterebilir. Bunun sebebi, farklı hücrelerdeki hücre fizyolojisindeki (örn. epitel ya da lenfoid), membran-fagosit karakteristiğindeki ve proliferasyon aşamasındaki (tümoral ya da istirahatteki hücreler) farklılıklardır (Diaz vd. 2008). Örneğin kanser hücreleri artan proliferasyon hızı ve metabolik aktivite sebebiyle nanoparçacık toksisitesine daha dirençlidir (Nan vd. 2008).

2.4.1.1 ROT (Reaktif Oksijen Türleri) ve ROT testi

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içerdiklerinden yüksek bir reaktivite gösteren ve kararlı olmayan bileşiklerdir. Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijen iyonlarını, serbest radikalleri ve peroksitleri içeren çok küçük moleküllerdir. ROT'u oluşturan başlıca radikaller süperoksit anyonu (O_2^-),

hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl) ve alkoksi ($\text{RO}^\cdot$) radikalleridir (Manke vd. 2013).

ROT normal oksijen metabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak oluşur ve hücre sinyalizasyonunda önemli role sahiptir ancak, çevresel stresin arttığı zamanlarda ROT seviyeleri önemli ölçüde artarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi hücresel yapılara hasar verebilir. Yüksek ROT seviyeleri oksidatif stres olarak tanımlanır.

Oksidatif stres, ROT oluşumu ile biyolojik sistemin detoksifikasyon yeteneği ya da oluşan hasarı onarma potansiyeli arasındaki bir dengesizlik sonucunda oluşur. ROT artışını dengelemek için hücreler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerini aktive edebilirler ancak bu sistemler yetersiz kaldığında oksidatif stres toksik seviyelere yükselebilir. Bu yükselme proteinlerin oksidatif modifikasyonu ile protein radikallerinin oluşumuna, mitokondriyal membran hasarına ve elektron zincirinin fonksiyonsuz kalmasına, lipid peroksidasyonuna, DNA'da zincir kırılmalarına, nükleik asitlerin modifikasyonuna, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktive olması ile gen ifadesinin değişmesine ve sinyal transdüksiyonu aracılığı ile inflamatuvar tepkinin değişmesi sonucu genotoksik etkilere ve hücre ölümüne sebep olur.

ROT ve oksidatif stresin kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, Alzheimer, Parkinson, şeker, bağışıklık sisteminde zayıflama ve sinir sistemi hastalıkları gibi yaşlanma ile ilgili pek çok dejeneratif hastalıkla ilgisi olduğu belirlenmiştir (Fu vd. 2014).

Nanoparçacıklar farklı şekillerde ROT oluşumuna sebep olabilir. Küçük boyut, yüksek yüzey alanı ve yüksek yüzey reaktivitesi nanoparçacıkların ROT oluşumuna ve sitotoksisiteye yol açan başlıca özellikleridir. Boyutun küçülmesi nanoparçacıkların hücre membranlarından ve diğer hücresel bariyerlerden geçerek hücre içine alınmasını kolaylaştırır ve hücre içinde ROT oluşturma ihtimali ile birlikte sitotoksisite oluşturma ihtimalini de arttırır.

Nanoparçacıkların boyutu kadar kimyasal doğası da ROT oluşumu açısından önemli bir etkidir. Nanoparçacık yüzeyindeki serbest radikaller ROT oluşturabilir. Fe, Ni, Cu ve Cr gibi geçiş metallerinden sentezlenen nanoparçacıklar Fenton türü hidroksil radikalleri oluşturan reaksiyonlar için katalizör görevi görerek ROT oluşumuna yol açabilir. Ayrıca bu geçiş metalleri Fenton benzeri reaksiyonların ve Haber Weiss reaksiyonlarının da (aşağıda verilmiştir) katalizörlüğünü yaparak DNA hasarına sebep olabilecek hidroksil radikalleri oluşturabilirler. Diğer bir ihtimal ise, nanoparçacık alımının mitokondriyal fonksiyonları değiştirmesi ya da fiziksel olarak mitokondri membranına hasar vermesi sonucu ROT oluşumuna ve oksidatif strese yol açmasıdır (Petersen ve Nelson 2010).

Fenton Reaksiyonu



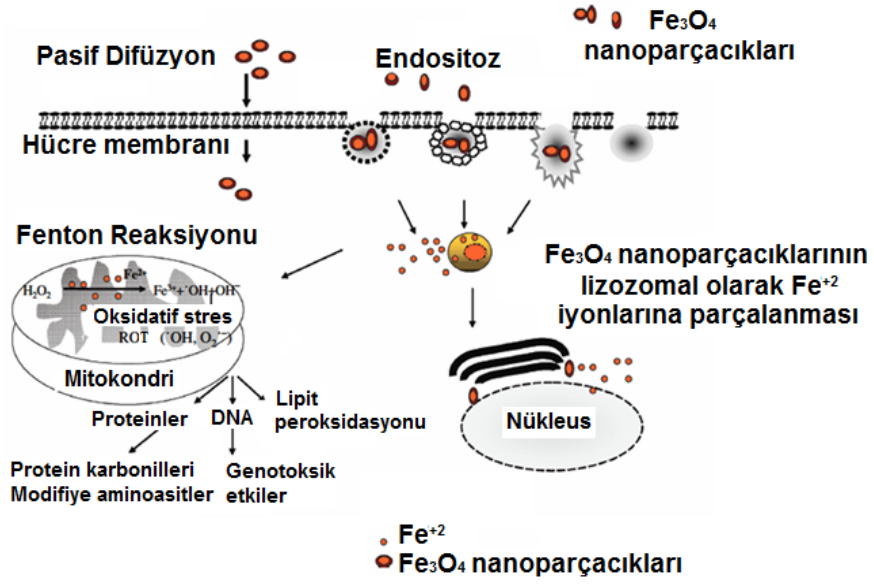
Fenton Benzeri Reaksiyon



Haber-Weiss Reaksiyonu

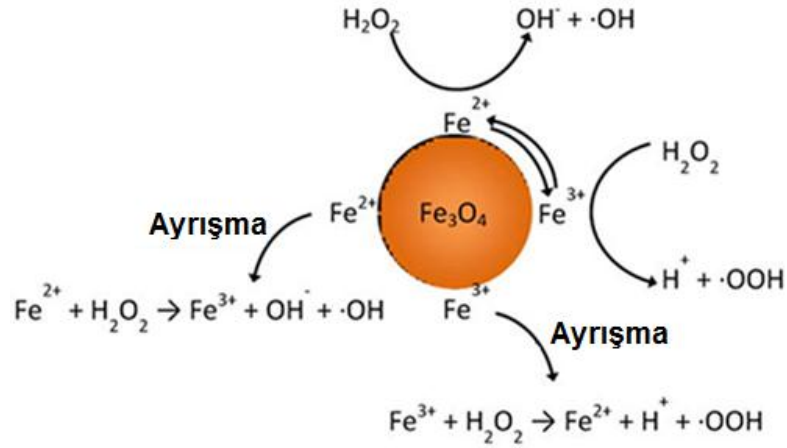


Bu çalışmada incelenen NP'lerden özellikle manyetit in sitotoksikite oluşturma mekanizmasında da Fenton reaksiyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Farklı şekillerde (pasif difüzyon, endositoz) hücre içine alınan manyetit, yüksek ihtimalle lizozomlarda hidroliz enzimlerinin etkisi ile demir iyonlarına parçalanır. Oluşan bu serbest demir iyonları (Fe^{2+}) nükleer ya da mitokondriyal membrandan geçerek hidrojen peroksitle ve mitokondride oluşan oksijen ile etkileşebilir ve Fenton reaksiyonları aracılığı ile hidroksil radikalleri ile ferrik iyonların (Fe^{3+}) oluşumuna sebep olabilir. Yani, H_2O_2 'in hidroksil ya da süperoksit radikallerine dönüşümü manyetit in hücre içinde oluşturduğu $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ iyonları tarafından katalizlenir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Fe_3O_4 nanoparçacıklarının muhtemel sitotoksikite oluşturma mekanizması (Singh vd. 2010'dan değiştirilerek alınmıştır)

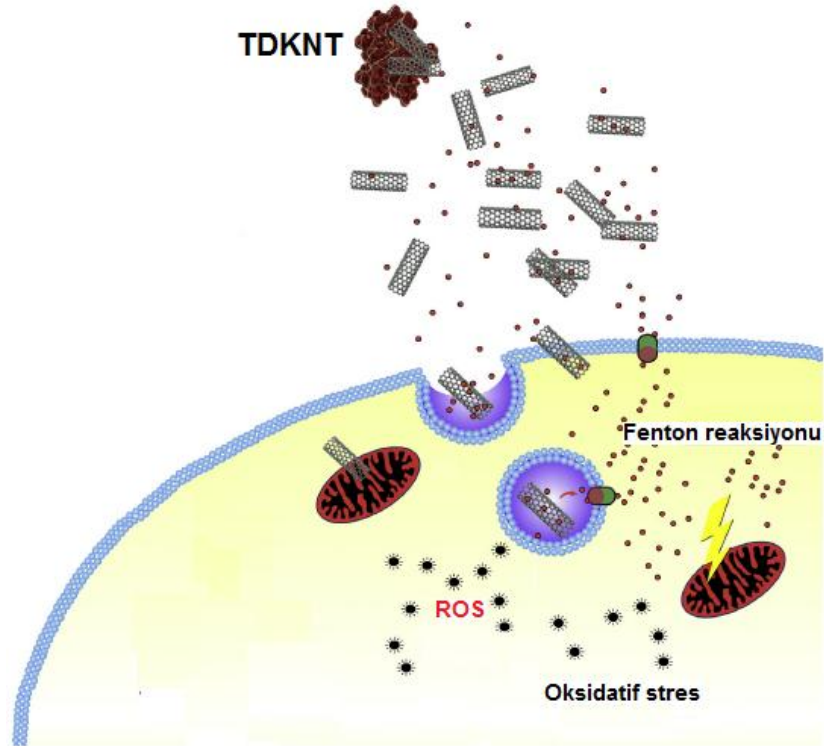
Oluşan radikaller de hücre içi yapılara ve hücre membranına zarar verme potansiyeline sahiptir (Singh vd. 2010). Manyetit nanoparçacıklarının yüzey kimyası ve hücre içinde tetiklenen muhtemel Fenton/Haber Weiss reaksiyonları şekil 2.19'da verilmiştir.



Şekil 2.19 Manyetit nanoparçacıklarınca tetiklenen muhtemel Fenton/Haber Weiss reaksiyonları (Wydra vd. 2015'ten değiştirilerek alınmıştır)

Manyetitten ayrılan demir iyonları hidrojen peroksitle etkileşerek yüksek reaktivite gösteren hidroksil ve süperoksit radikallerini oluşturur (Wydra vd. 2015)

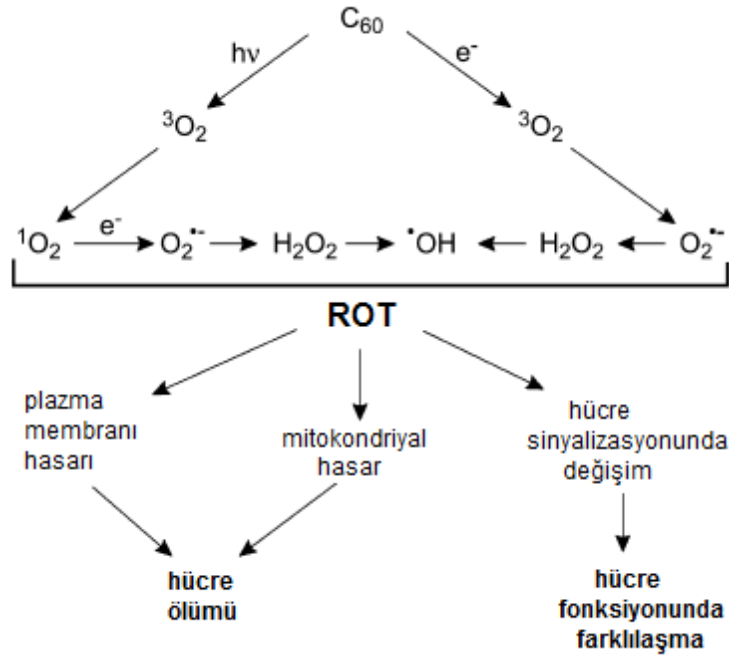
TDKNT için de muhtemelen manyetite benzer bir ROT oluşumu mekanizmasından bahsetmek mümkündür. Çeşitli şekillerde hücre içine giren TDKNT içindeki safsızlıklar ve metal iyonları lizozimlerde ayrılarak hücre içine salınır ve Fenton reaksiyonlarına neden olabilir (Şekil 2.20). TDKNT üzerine adsorplanmış metal safsızlıklar (örn. Co) ROT oluşumuna ve oksidatif strese sebep olabilir. Ayrıca ROT mitokondriye kimyasal hasar verirken TDKNT de fiziksel hasar vererek fonksiyonsuz kalmasına neden olabilir.



Şekil 2.20 Hücre ortamında TDKNT için muhtemel ROT oluşumu mekanizması (Rodríguez-Yáñez vd. 2015' den değiştirilerek alınmıştır)

C₆₀'ın biyolojik açıdan en önemli özelliklerinden biri, çeşitli serbest radikalleri geleneksel antioksidanlardan daha etkin bir şekilde söndürme ve "serbest radikal giderici" olarak işlev yapma kabiliyetidir. Ancak fullerenler ultraviyole (UV) ışığı kuvvetli şekilde ve spektrumun görünen bölgelerini orta derecede soğurur.

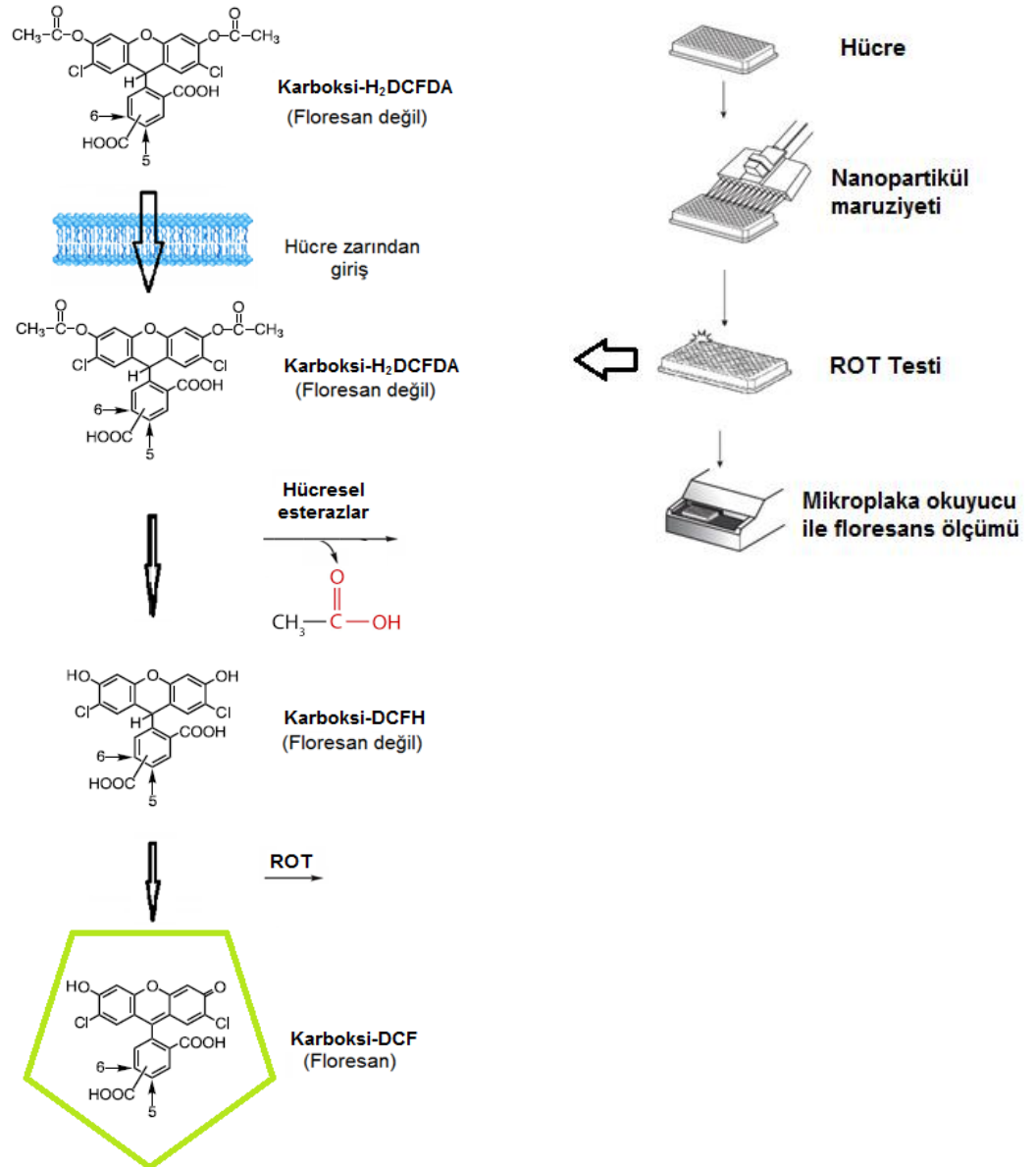
Bu da C₆₀ yüzeyinin uyarılmasına sebep olur ve ROT oluşumunu tetikler. C₆₀'ın ROT oluşturmada fotokimyasal mekanizma ile gerçekleşmektedir. Tip II fotokimyasal mekanizma ile C₆₀'tan moleküler oksijene enerji aktarımı ile oluşan tekli oksijen (¹O₂); lipitler, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi biyolojik moleküllerle doğrudan etkileşerek hücre hasarına ya da fonksiyonlarında değişimlere sebep olabilir. NADH gibi indirgen moleküller içeren hücreler arası boşluk gibi karmaşık bir ortamda fulleren radikal anyonundan moleküler oksijene ya da doğrudan indirgeyici molekülden tekli oksijene tip I fotokimyasal mekanizma ile elektron aktarımı süper oksit oluşumunu tetikleyerek hidrojen peroksit ya da hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir (Şekil 2.21) (Markovic ve Trajkovic 2008).



Şekil 2.21 Hücre ortamında ışıkla uyarılmış C₆₀ için muhtemel ROT oluşumu mekanizması ve olası sitotoksik etkiler (Markovic ve Trajkovic 2008'den değiştirilerek alınmıştır)

Bu çalışmada ROT seviyesini belirlemek için en yaygın indikatörlerden biri olan 6-karboksi-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (Karboksi-H₂DCFDA) kullanılmıştır. Karboksi-H₂DCFDA, floreseinin indirgenmiş ve asetillenmiş formudur. Başlangıçta floresan özellikte olmayan karboksi-H₂DCFDA, hücre zarından geçebilir ve hücre içinde esteraazların etkisiyle hidrolizlenerek karboksi-diklorofloreseine (Karboksi-DCFH) dönüşür. Karboksillenmiş olması fizyolojik pH'da moleküle iki negatif yük

kazandırır ki bu, molekülün hücre dışına sızmasını engeller. Karboksi-DCFH hücrel peroksidazların varlığında ROT ile reaksiyona giren bir indikatördür. Bu sebeple oksidatif stresin ölçülmesi için genel bir test olarak kullanılır. ROT ile reaksiyona girdiğinde floresan özellikteki karboksi-DCF'ye dönüşür ve oksidasyon ürünleri, floresanstaki artışın bir mikropilaka okuyucu ile takip edilmesi ile belirlenir (Şekil 2.22).



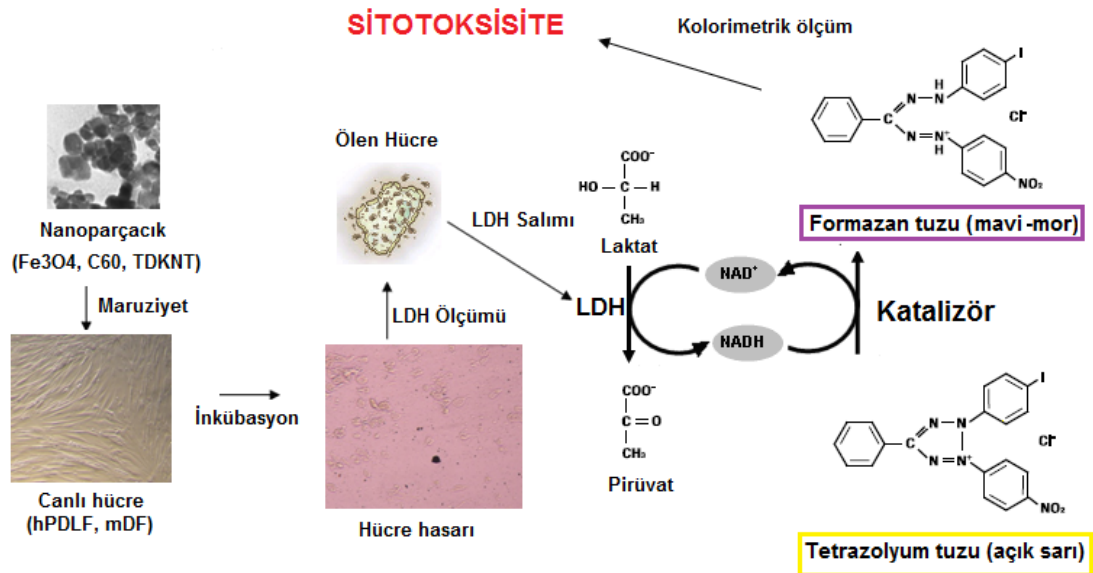
Şekil 2.22 Karboksi-H₂DCFDA ile ROT testinin mekanizması

6-karboksi-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (Karboksi-H₂DCFDA) floreseinin indirgenmiş ve asetillenmiş formudur ve hücrelerdeki reaktif oksijen türleri (ROT) için

bir indikatör olarak kullanılır. Floresan olmayan bu molekül, asetat grupları hücre içi esterazlar ve ROT'lerinin sebep olduğu oksidasyon sebebiyle uzaklaştırıldığında yeşil floresan forma dönüşür.

2.4.1.2 LDH (Laktat Dehidrogenaz) testi

Hücre membranı bütünlüğü bozulduğunda LDH hücre sitoplazmasından kültür ortamına sızar. Bu sebeple, kültür ortamına geçen LDH miktarı hücre ölümünün bir göstergesi olarak kabul edilir çünkü bu genellikle geri dönüşümsüz bir sitotoksik olaydır. Bu çalışmada uygulanan *in vitro* LDH testi, iki aşamalı bir testtir. İlk aşamada LDH NAD^+ 'ı indirgeyerek $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ 'a dönüştürür. Aynı zamanda laktat ta piruvata yükseltgenir. İkinci enzimatik reaksiyonda ise bir katalizör yardımıyla $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ 'dan tetrazolyum tuzuna (2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür) 2 H aktarılır ve açık sarı renkteki tetrazolyum tuzu kırmızı renkli formazan tuzuna dönüştürülür (Şekil 2.23)

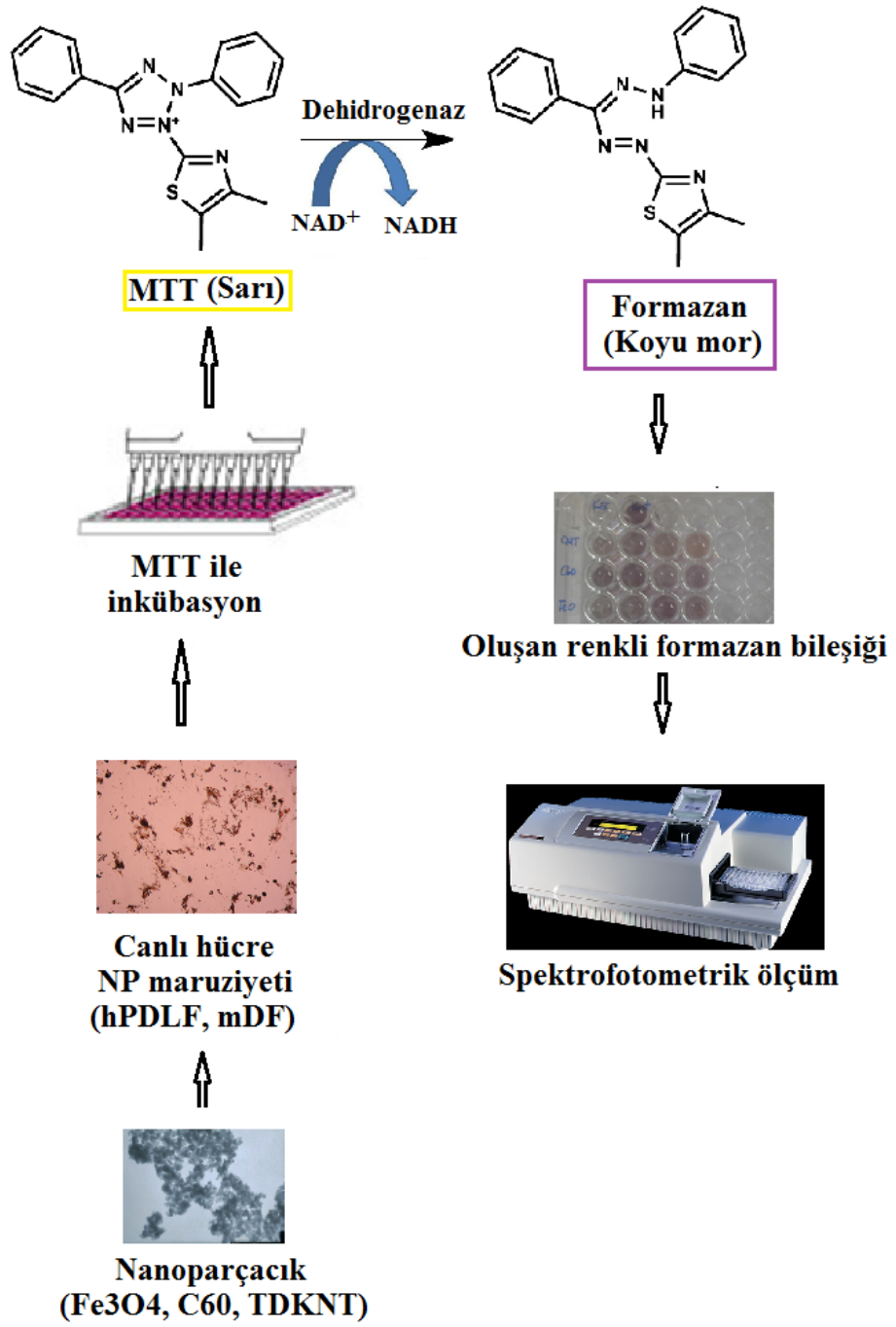


Şekil 2.23 LDH testinin mekanizması

Oluşan renkli formazan tuzu suda çözünür özelliktedir ve 490 nm civarında maksimum absorbans gösterir ancak tetrazolyum tuzu bu aralıkta absorbans vermez. Test sonucunda oluşan formazan tuzu spektrofotometrik bir mikropilaka okuyucu yardımıyla ölçülür. Hücre ölümünün derecesi kontrol grubunun absorbans değerleri ile NP'a maruz bırakılmış hücrelerin absorbans değerlerinin yüzde olarak oranlanması ile ifade edilir. LDH miktarındaki artış plazma membranının bütünlüğünü koruyamadığını gösterir ve sitotoksik bir cevap olarak ifade edilir.

2.4.1.3 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi

MTT testi, canlı hücrelerin suda çözünür özellikteki tetrazolyum tuzunu çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürme kabiliyetini belirleyen kolorimetrik bir testtir. Tetrazolyum tuzları NADH ve NADPH gibi oksitlenmiş substratlardan ya da uygun enzimlerden elektron alırlar. MTT mitokondriyal elektron transfer sistemindeki ubikinon ve sitokrom b and c bölgelerinde indirgenir ve bu indirgenme metabolik olarak aktif canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon sarı renkteki tetrazolyum tuzlarının mavi-mor renkteki formazan kristallerine dönüşümüne sebep olur. Ölü hücreler bu dönüşümü gerçekleştiremez. Oluşan kristaller suda çözünmez ancak organik bir çözücüde çözünebilir ve derişim spektrofotometrik olarak belirlenir. (Şekil 2.24) MTT testi, hücre proliferasyon hızını ya da metabolik olaylar apoptoz ya da nekrozu tetiklediğinde hücre canlılığındaki azalmayı ölçmeye olanak sağlar.



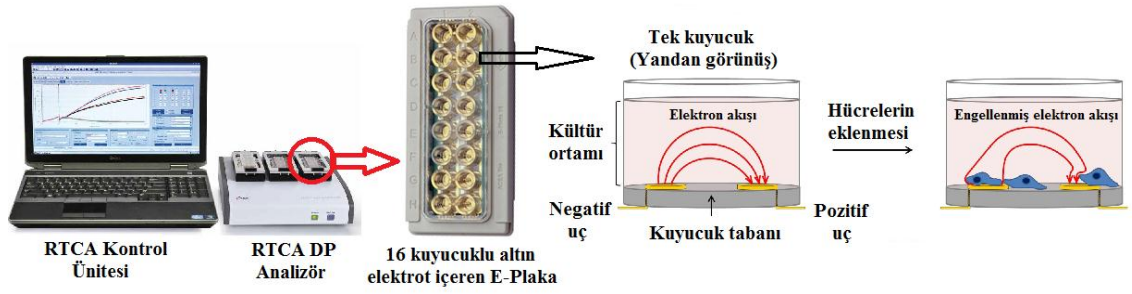
Şekil 2.24 MTT testinin mekanizması

2.4.1.4 Gerçek zamanlı empedans ölçümüne dayalı sitotoksosite testi

In vitro sitotoksosite testlerinin sahip olduğu dezavantajlar ve sınırlayıcı özellikler sebebiyle empedans ölçümüne dayalı, yüksek verimlilikle çalışan sistemler son zamanlarda toksikoloji çalışmaları için ilgi çekici hale gelmiştir; çünkü hücre adezyonu, yayılması, çoğalması ve ölümü gibi morfolojik değişikliklerin uzun vadeli, etiketlemeye gerek olmadan ve dinamik olarak izlenmesine olanak sağlarlar (Xing vd. 2006, Urcan vd. 2010).

Hücre canlılığı ve proliferasyonunun ölçülmesi için, klasik *in vitro* sitotoksosite testlerinden farklı olarak nanoparçacıkların test materyali ile etkileşimini ortadan kaldıran ve optik ölçüme değil empedans ölçümüne dayalı bir sistem olan xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizörü (xCELLigence RTCA DP-sistemi-Roche Applied Science, Penzberg, Germany) kullanılmıştır. Çalışma plakası olarak 16 kuyucuklu E-plaka (E-plates, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) seçilmiştir.

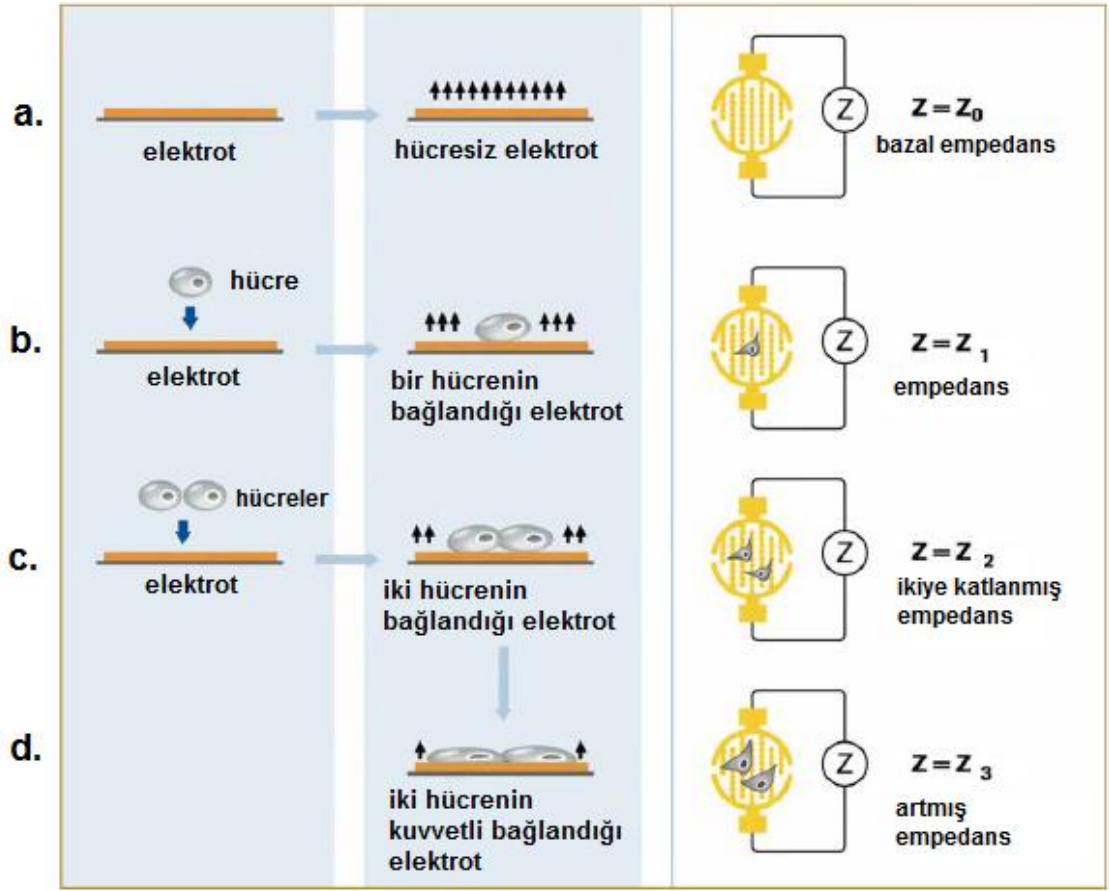
Bir biyosensör yüzeyi içeren bu sistemde, hücrelerin varlığı ve/veya hücrelerde meydana gelen değişimler sensör yüzeyindeki elektronların ve iyonların geçişini etkiler. Sensör yüzeyinin elektronik özelliklerinin ölçülmesi sensör yüzeyindeki hücrelerin biyolojik durumu hakkında önemli bilgiler verir. Bu prensiple çalışan sistemin ana bileşeni E-plaka adı verilen 16 kuyucuklu plakanın tabanına yerleştirilmiş mikroelektronik hücre sensörleridir (Şekil 2.25). Bu sensör elektrotlarının elektronik empedansının ölçülmesi suretiyle elektrotlar üzerindeki hücrelerdeki değişiklikler izlenerek tespit edilebilir. Elektrot empedansını etkileyen bu değişiklikler hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve hücre bağlanmasının derecesi olarak sayılabilir.



Şekil 2.25 xCELLigence sisteminin mekanizması (<http://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigence-Tech-Overview-Fig-1.jpg> 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır)

Elektrotlar üzerindeki hücrelerin varlığı, elektrot/çözelti ara yüzündeki bölgesel iyonik çevreyi etkiler ve empedansta artışa sebep olur. Elektrot yüzeyine bağlanan hücre sayısı arttıkça empedans ta artar. Ayrıca, empedans elektrotlarla hücrelerin nasıl etkileştiği ile ilgili olarak değişkenlik gösterir. Örneğin, artan hücre bağlanması ve yayılması daha büyük bir hücre/elektrot temas yüzeyi oluşturacağından empedansta daha büyük bir değişim yaratır. Bu sayede empedans değerleri hücrelerin durumu ile ilgili anlamlı bir veri oluşturur.

Tek bir kuyucuk içinde elektrotlar arasında ölçülen empedans değerleri, elektrotun geometrisine, kuyucuk içindeki iyonik derişime ve hücrelerin elektrot yüzeyine bağlanmış ya da bağlanmamış olmasına göre değişiklik gösterir. Hücreler olmadığında, elektrot empedansı büyük ölçüde elektrot/çözelti ara yüzündeki ve çözeltinin tamamındaki iyonik çevreye bağlıdır. Yani ortamda hücre bulunmadığında, sensörün elektronik özelliği kayda değer bir değişim göstermez ve ölçülen düşük empedans değeri bazal empedans olarak adlandırılır (Şekil 2.26). Hücrelerin varlığında, elektrot yüzeyine bağlanan hücreler yalıtkan olarak görev yaparlar ve iyonik çevreyi değiştirerek empedansta bir artışa sebep olurlar. Elektrot yüzeyinde ne kadar fazla hücre olursa empedanstaki değişim de o kadar fazla olur. Ancak hücre ölümü ya da toksisite hücrelerin yüzeyden ayrılmasına sebep olur ve empedans değeri düşer.



Şekil 2.26 Empedans ölçümünün prensibinin şematik gösterimi. (http://www.aceabio.com.cn/images/cartoon_pic.jpg 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır)

a. Elektrot yüzeyinde hücre olmadığında ölçülen bazal empedanstır. b. Bir hücre elektrot yüzeyine tutunduğunda yalıtkan olarak davranarak devredeki elektrik akımını kısmen engeller ve empedansta artışa sebep olur. c. İki hücre elektrot yüzeyine tutunduğunda elektrik akımının geçişini daha fazla engeller ve b’de ölçülen empedansın iki katı bir empedans oluşturur. d. İki hücre elektrot yüzeyine c’de olduğundan daha kuvvetli şekilde bağlandığında c’dekine kıyasla daha fazla empedansın oluşmasına sebep olur. Hücreler elektrot yüzeyinden ayrıldığında ya da öldüklerinde ise empedans değeri azalır.

Yani temel olarak ölçülen empedans değerindeki değişiklik iki faktöre bağlıdır; elektrot yüzeyine bağlanmış hücre sayısı ve yüzeye bağlanan hücrelerin boyutsal değişimi. Yüzeye bağlanan hücre sayısı aynı olsa da bağlanmış hücrelerin boyutsal değişimi empedans değerlerini değiştirir. Hücre bağlanmasındaki ya da hücrenin yüzeye yayılmasındaki artış daha yüksek empedans değerlerinin okunmasına neden olur.

Toksisite hücrelerin yayılma ya da yığın oluşturma davranışlarını ve dolayısıyla hücre yüzeyi/sensör temasını etkileyeceğinden empedans değerlerinin de değişmesine yol

açar. Toksik bileşikler çoğunlukla hücrelerin yuvarlaklaşmasına ve/veya yüzeyden ayrılmasına sebep olarak empedans değerini düşürürler (Urcan vd. 2010).

Elektriksel empedansın hücrenin durumuna göre bağlı değişimini ifade etmek için birimsiz bir parametre olarak hücre indeksi (CI) kullanılır. CI değeri ölçülen empedansların oranlanması ile hesaplandığı için bağıl ve boyutsuz bir parametredir ve elektrot/çözelti ara yüzündeki iyonik çevrenin durumunu yansıtır. CI değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$CI = (Z_i - Z_0)/15 \text{ }\zeta$$

(Z_i : Deney sırasında her hangi bir zamandaki empedans değeri, Z_0 : Deneyin başlangıcındaki empedans değeri)

Normalize hücre indeksi (NCI) ise belirli bir zaman noktasındaki (örn. Hücrelerin uyarıldığı ya da toksik maddenin eklendiği an) CI değerlerinin 1,0 (% 100 değer) olarak kabul edilerek hesaplanması ile elde edilen bir değerdir. Böylece tüm değerler seçilen zaman noktasındaki CI değerine oranlanarak verilmiş olur. NCI hücrelerin yüzeye bağlanma derecesini yüzde olarak ifade eder, bu sebeple hücre canlılığı ile ilgili olarak bilgi verir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Madde ve Malzeme

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) L-glutaminli, yüksek glikoz içeren besiyeri Lonza'dan (Biowhittaker, Verviers, Belçika), karboksi-H₂DCFDA Invitrogen'den (Invitrogen-Molecular Probes, Inc. Eugene, OR), MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] ve LDH tespit kiti Sigma'dan, Fe₃O₄ NP ve C₆₀ Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Elicarb® TDKNT ise Thomas Swan (Consett, İngiltere) firmasından kuru toz olarak temin edilmiştir.

Hücre izolasyonu, ekimi ve maruziyet çalışmaları laminar akışlı steril kabinde (Nuaire, Class II, Plymouth, Minnesota, ABD), hücre kültürlerinin inkübasyonu ise 37 °C, % 5 CO₂, % 95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Heracell 240®, Waltham, Massachusetts, ABD) gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Nanoparçacıkların karakterizasyonu

Nanoparçacık toksisitesinin belirlenmesinde karakterizasyonun önemi büyüktür çünkü toksik cevap nanoparçacıkla ilgili pek çok parametreden etkilenmektedir. Nanoparçacık toksisitesini etkileyen parametreler çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Nanoparçacık toksisitesini etkileyen parametreler (Ostiguy vd. 2009)

Spesifik yüzey alanı	Çözünürlük
Partikül sayısı	Şekil, gözeneklilik
Boyut ve granulometrik dağılım	Aglomerasyon/agregasyon derecesi
Derişim	Biyokararlılık
Kimyasal bileşim (Saflık derecesi ve safsızlıklar)	Kristal yapı
Yüzey özellikleri	Hidrofiliklik/hidrofobiklik
Zeta potansiyel ve reaktivite	Partikül yaşı
Fonksiyonel gruplar	Malzemenin kaynağı ve üreticisi
Metallerin varlığı/ Redoks potansiyeli	Malzemenin sentez yöntemi
Serbest radikal oluşturma potansiyeli	Yüzey kaplaması
Spesifik yüzey alanı	

3.2.1.1 BET yüzey alanı analizi

BET metodu katı numunelerde gözenek boyutu, gözenek boyutu dağılımı ve yüzey alanının tespiti için kullanılan bir yöntemdir. Prensip olarak atmosferdeki gaz moleküllerinin katı madde yüzeyine fiziksel adsorpsiyonu temel alınarak ölçüm gerçekleştirilir. Numune yüzeyini moleküler olarak tek tabaka kaplamak için sarf edilen gaz miktarı tayin edilir ve Brunauer, Emmett ve Teller (BET) teorisi kullanılarak numunenin yüzey alanı hesaplanır.

Bu çalışmada nanoparçacıkların Braun-Emmet-Teller (BET) yüzey alanları NOVA 2200e volumetrik gaz adsorpsiyon cihazı (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA) kullanılarak başka bir yayında tarif edilen prosedüre göre (Yagmur vd. 2008) belirlenmiştir. Adsorpsiyon için azot gazı kullanılmıştır.

3.2.1.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel analizi

Nanoparçacık boyut analizi için foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinen dinamik ışık saçılımı yöntemine dayalı olarak ölçüm yapan Malvern NanoZetasizer-ZS (Worcestershire, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta potansiyeli ölçümleri de aynı cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için NP'ler hücre kültürü ortamında 100 µg/mL derişimde süspanse edilmiştir. Elde edilen süspanسیونlar aglomerasyonu engellemek ve homojeniteyi sağlamak üzere 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda (Fisher Scientific, FB15060) bekletilmiştir. Ölçümler tek kullanımlık küvetler içerisinde 25 °C'lik oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Her NP için toplamda 13 ardışık ölçüm yapılmıştır.

3.2.1.3 X Işınları difraktometresi (XRD) analizi

NP'lerin kristal yapı ve örgü parametresi analizleri Rigaku (RadB-DMAX II) X-ışınları toz difraktometre cihazı ile 2θ : 20–80° tarama aralığında Cu K α radyasyon ortamında (30 kV, 15 mA, $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$), 2°/dak tarama hızı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. NP'lerin ortalama kristalit boyutları (D_{hkl}), gözlemlenen çizgi genişlikleri kullanılarak aşağıda verilen Debye–Scherrer formülüne göre (Cullity vd. 2001) hesaplanmıştır.

Debye-Scherrer formülü:

$$D_{hkl} = 0,9 \lambda / \beta \cos \theta \quad (3.1)$$

Burada D, ortalama kristalit boyutu, β , radyan cinsinden XRD kırınım pikinin yarı maksimumdaki tam genişlik (FWHM) değeri; λ , kullanılan X-ışınlarının dalga boyu (0,154056 nm) ve θ , XRD pikinin Bragg kırınım açısıdır.

Parçacık boyutu ise NP'lerin XRD pikleri için hesaplanan boyutların ortalaması alınarak elde edilmiştir. Örgü parametresi "a" aşağıda verilen Bragg yasasına göre (El Ghandoor vd. 2012) belirlenmiştir.

Bragg yasası:

$$d_{hkl} = \lambda / 2 \sin \theta \quad (3.2)$$

$$d_{hkl} = a / \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad (3.3)$$

Örgü gerinimi ve kristal boyutu, kırınım piklerinin FWHM değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\beta \cos \theta / \lambda = 1/\varepsilon + \eta \sin \theta / \lambda \quad (3.4)$$

Burada β , radyan cinsinden XRD kırınım pikinin yarı maksimumdaki tam genişlik (FWHM) değeri; λ , kullanılan X-ışınlarının dalga boyu (0,154056 nm), θ , XRD pikinin Bragg kırınım açısı, ε , etkin parçacık boyutu ve η ise gerinim miktarıdır.

3.2.1.4 Fe₃O₄ NP Mössbauer spektroskopisi

Fe₃O₄ NP'ların içerdiği manyetik fazlar sabit hızlanma modunda çalışan bir Wissel Mössbauer ölçüm sistemi ile belirlenmiştir. Mössbauer spektrumu oda sıcaklığında sabit hızlanma modunda çalışan bir spektrometre ile Rh (rodyum) matriks içindeki 50 mCi aktiviteye sahip ⁵⁷Co (kobalt) kaynağı kullanılarak elde edilmiştir. Hız kalibrasyonu WissEl GmbH'den alınan Wissel MVC 450 model bir lazer kalibrasyon cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca oda sıcaklığında α -demir folyonun ⁵⁷Fe Mössbauer spektrumu alınarak ölçülen hız değerleri valide edilmiştir. Ölçüm için ~40 mg Fe₃O₄ NP numunesi 1 cm² kesit alanlı naylon örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Herhangi bir dış manyetik alan uygulanmamıştır.

Spektrum, Win Normos için Igor yazılım paketi (ver. 6.36) kullanılarak en küçük kareler yöntemi ile Lorentzian fonksiyonlarına uydurularak aşırı ince yapı (hyperfine) parametreleri; izomer kayma (IS), kuadrupol yarıllama (QS) ve yarı maksimumdaki tam genişlik (W) değerleri mms⁻¹ cinsinden elde edilmiştir. İzomer kayma değerleri oda sıcaklığındaki α -demirine göre verilmiştir.

3.2.1.5 Nanoparçacıkların TEM analizi

Nanoparçacıkların şekil, boyut ve morfolojileri JEOL 100 CX (Tokyo, Japan) TEM kullanılarak incelenmiştir. NP'ler uygun dispersiyon ortamında süspanse edilerek problu sonikatör yardımıyla 3 dakika boyunca sonike edilmiş ve ardından karbon kaplı elektron mikroskobu gridleri üzerine damlatılmıştır. Gridler tozdan arındırılmış ortamda kurutulmuş ve TEM mikrografları çekilmiştir. C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ için kullanılan dispersiyon ortamı sırasıyla toluen, saf su ve etanoldür

3.2.2 Hücre kültürü çalışmaları

3.2.2.1 hPDLF hücre izolasyonu ve kültürü

hPDLF hücreleri laboratuvarımızda daha önce tarif edilmiş bir metoda göre (Albandar vd. 2005, Inanç vd. 2007) izole edilmiş ve dondurulmuştur. Bu çalışma için dondurulmuş hücreler çözülerek kültüre edilmiş ve maruziyet deneylerinde kullanılmıştır. Tüm deneylerde 8. ile 10. pasajlar arasındaki hücreler kullanılmıştır.

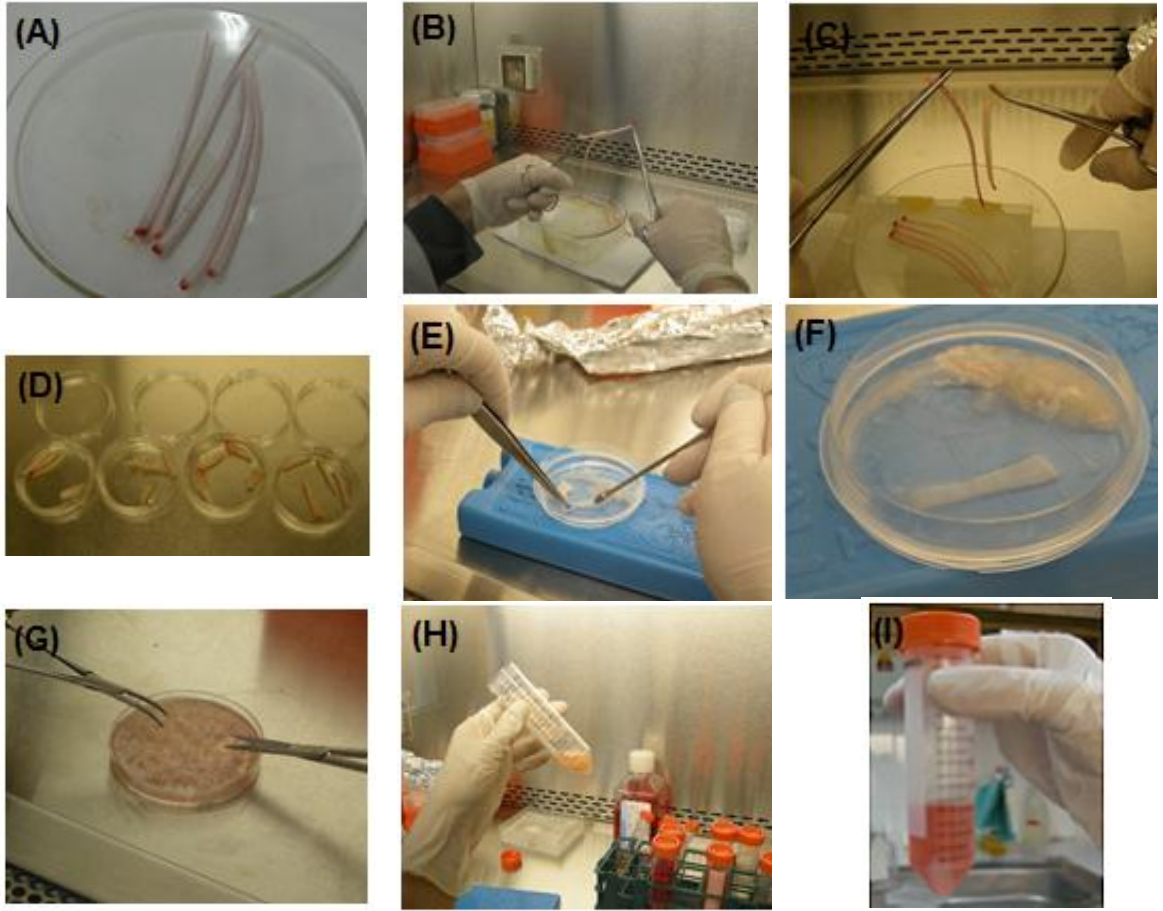
Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışma için Inanç vd. tarafından gerçekleştirilen hPDLF izolasyonu için çürüksüz ve restorasyonsuz premolar diş (küçük azı diş) kök yüzeyi hücre kaynağı olarak kullanılmıştır. Dişler yalnız ortodontik amaçla çekilmiştir. hPDLF hücre izolasyonu için donörlerden bilgilendirilmiş gönüllü onam formu ve ayrıca etik kurul onayı alınmıştır. Kullanılan izolasyon metoduna göre, periodontal ligament dokusu steril bir bistüri ile parçalara ayrılmış ve %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 esansiyel olmayan amino asit stok çözeltisi ve 2 mM L-glutamin (tümü Lonza'dan) ile desteklenmiş DMEM içeren kültür şişesi içine tohumlanmıştır. Eksplantlar %95 nem, %5 CO₂ içeren, 37°C'deki inkübatörde hücreler konfluent olana kadar (çoğaldıkları yüzeyi tam olarak doldurana kadar) inkübe edilmiştir.

3.2.2.2 mDF hücre izolasyonu ve kültürü

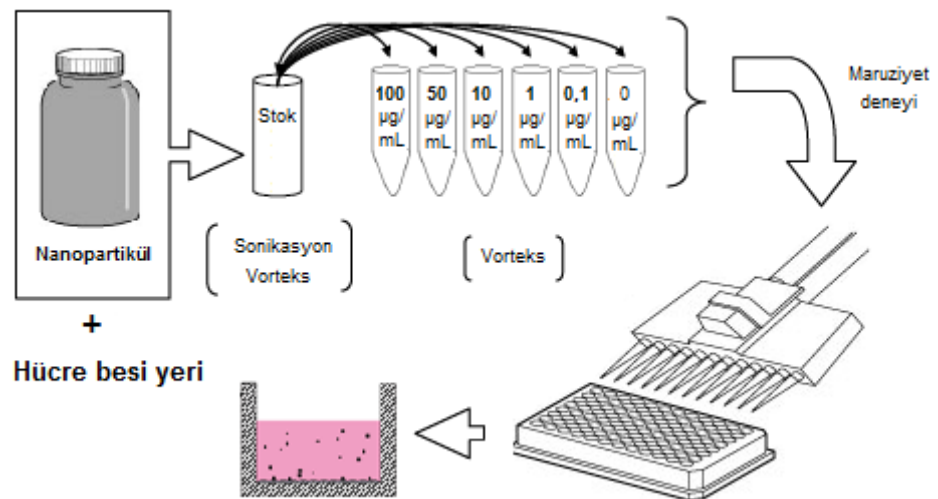
mDF hücreleri 8-10 haftalık erişkin fareden daha önce yayınlanmış bir metotta (Lichti vd. 2008) tarif edilen yöntemle göre izole edilmiştir. Hücre kaynağı olarak, intraperitoneal olarak avertin ile uyuşturulmuş farelerden alınan kuyruk derisi kullanılmıştır. Kuyruklar alınmadan önce %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir. 10-15 adet kuyruk bütün olarak kesilmiş ve kuyruk derisi soyularak kuyruktan ayrılmıştır (Şekil 3.1 a, b, c). Ayrılan kuyruk derisi antisepsi koşullarında küçük kare parçalara ayrılarak 20 mL tripsin çözeltisi içeren steril bir petri kabına (60 x 15 mm) aktarılmıştır (Şekil 3.1 d). Petri kapları bir gece boyunca 4°C’de bekletilerek epidermisin dermisten ayrılması sağlanmıştır (Şekil 3.1 e, f, g). Ayrılan dermal eksplantlar; %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 1% esansiyel olmayan amino asit çözeltisi ile desteklenmiş yüksek glikozlu DMEM kültür ortamı içinde inkübe edilmiştir (Şekil 3.1 h, ı). İnkübe edilen hücreler 37°C’de nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosferine sahip ortamda 48 saat boyunca bekletilmiş ve kültür kabı yüzeyine tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Yüzeye tutunan hücreler ise kültüre edilmiş ve besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

3.2.3 NP stok ve maruziyet çözeltilerinin hazırlanması

NP’lar kullanım öncesi UV radyasyonu altında (254 nm) 30 dk. boyunca sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında NP’lar hücre kültürü ortamında 100 µg/mL konsantrasyonda süspanse edilerek stok çözeltiler elde edilmiştir. Seyreltme öncesinde, NP’ların çözelti içinde topaklanmalarını önlemek amacıyla stok çözeltiler 30 dk. boyunca sonikatörde bekletilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler hücre besi yeri ile önceden belirlenmiş maruziyet konsantrasyonlarına seyreltilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.1 Fare dermal fibroblast hücrelerinin izolasyon aşamaları



Şekil 3.2 Nanoparçacık stok ve maruziyet çözeltilerinin hazırlanması

3.2.4 Nanoparçacık maruziyet çalışması

Hücreler önceden belirlenmiş zaman aralıkları boyunca (6, 24 ve 48 saat) farklı derişimlerde (0,1; 1; 10; 50, 100 µg/mL) hazırlanan C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ NP çözeltileri ile inkübe edilmiştir. Bu amaçla, hücreler % 0.25 tripsin-EDTA çözeltisi (Sigma) ile tripsinize edilerek 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyu başına 1x10⁴ hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hücre kültürü, 37°C’de ve nemlendirilmiş %5 CO₂ içeren atmosferde bir gece boyunca devam ettirilmiştir. Ardından hücre kültürü ortamı NP eklenmiş kültür ortamı ile değiştirilerek 6, 24 ve 48 saatlik maruziyet deneyleri gerçekleştirilmiştir. NP içermeyen hücre kültürü ortamında aynı koşullarda ve yoğunlukta inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. *In vitro* sitotoksosite testleri için hücre başına düşen NP miktarları çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 *In vitro* sitotoksosite testleri için hücre başına düşen NP miktarı

NP Maruziyet konsantrasyonu	Hücre başına NP miktarı (1,0 x10 ⁴ hücre /kuyucuk)
0,1 µg/mL	1,0x10 ⁻⁶ µg NP/hücre
1,0 µg/mL	1,0x10 ⁻⁵ µg NP/hücre
10 µg/mL	1,0 x10 ⁻⁴ µg NP/hücre
50 µg/mL	5,0 x10 ⁻⁴ µg NP/hücre
100 µg/mL	1,0 x10 ⁻³ µg NP/hücre

3.2.5 Hücre morfolojisi

Hücresel toksisitenin morfolojik belirtileri Primo Vert model dijital ters faz-kontrast mikroskop (Zeiss, Jena, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. hPDLF ve mDF hücreleri NP’lar ile etkileştirilmiş ve 48 saatlik maruziyet sonrasında faz kontrast fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6 NP' ların hücre içine alınması ve lokalizasyonunun incelenmesi

NP'ların hücre içine alınması ve lokalizasyonunun gözlemlenebilmesi için hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 5 mL besi ortamında kuyucuk başına $0,3 \times 10^6$ hücre yoğunluğu olacak şekilde ekilmiştir. C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ için IC 50 değerleri hesaplanmıştır. Her bir NP için kendi IC 50 değerine eşit konsantrasyonda NP süspansiyonları hazırlanarak 3 günlük inkübasyon sonrasında ~%70 konfluent olan hücreler ile 48 saat süresince etkileştirilmiştir. NP ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Hücreler maruziyet sonunda üç kez besi ortamı ile yıkanmış ve tripsinize edilmiştir. Ardından hücreler 5 dk. boyunca 1100 rpm'de santrifüjlenerek incelenmek üzere toplanmıştır. Hücreler TEM analizi için daha önce tarif edilen bir yöntemle göre (Elçin vd. 2003) hazırlanmıştır. Bu yöntemle göre, hücreler santrifüj sonrası toplanmış, % 2,5 gluteraldehit ile ön tespit yapılmış, % 1 osmiyum tetraoksit ile ikinci tespit yapılmış, ardından dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiş ve epoksi reçine içine gömülmüştür. Leica (Ultracut UCT, Viyana, Avusturya) marka bir ultramikrotom kullanılarak hazırlanan örneklerden ince kesitler alınmıştır. %1 toluidin mavisi ile ön boyama ve uranil asetat ve kurşun hidroksit ile ikinci boyama uygulanan örnekler Jeol marka 100 CX model (Tokyo, Japonya) bir taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.2.7 Toksik Etkinin Belirlenmesi

3.2.7.1 MTT [3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi

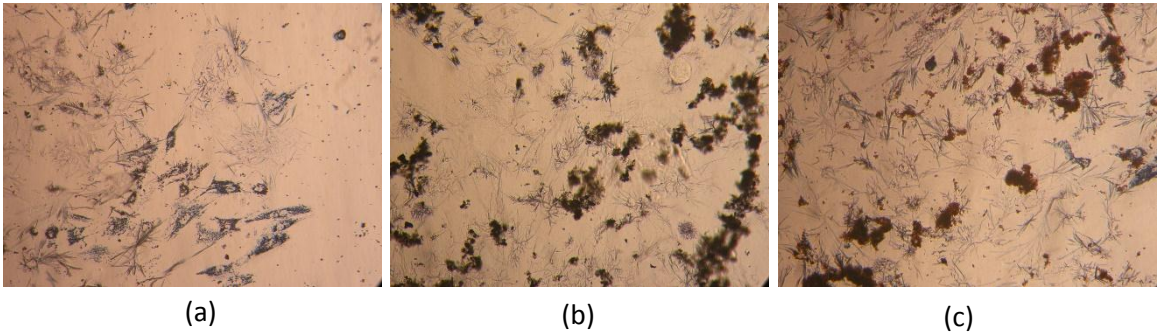
DF ve hPDLF hücrelerinin metabolik aktiviteleri 6, 24 ve 48 saatlik süreler boyunca farklı derişimlerdeki NP'lar ile etkileştirildikten sonra kolorimetrik MTT testi (Sigma) kullanılarak incelenmiştir. Özetle, hücreler belirlenen derişimlerdeki C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ NP'lara maruz bırakılmış ve maruziyet süreleri sonunda NP'ların uzaklaştırılması amacıyla besi ortamı aspire edilerek hücreler tahrip edilmeden üç kez serumsuz besi ortamı ile yıkanmıştır. Ardından her kuyucuğa 20 µL taze hazırlanmış MTT çözeltisi (5 mg/mL) ve 180 µL DMEM (serumsuz) eklenmiş ve hücreler 37°C'de, %95 nem içeren %5 CO₂ atmosferinde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında ortam dikkatli bir şekilde aspire edilmiş ve her kuyucuk içine 200 µl MTT çözücüsü (susuz izopropanol içinde 0,1 N HCl) eklenerek oluşan mavi formazan kristallerinin (Şekil 3.3) çözünmesi sağlanmıştır. Ardından kalan NP'ları uzaklaştırmak amacı ile 96 kuyucuklu hücre kültürü kapları 25°C'de 5 dk. boyunca 250 × g'de santrifüjlenmiş ve süpernatantlar yeni 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına aktarılmıştır. Oluşan formazan miktarı SpectraMax M5 mikroparka okuyucu (Molecular Devices) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür (Emin vd. 2008). Ölçülen absorbans [A] miktarı ile belirlenen formazan ürününün artan konsantrasyonu kültür içindeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Bağıl hücre canlılığı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$[A]_{\text{örnek}} / [A]_{\text{kontrol}} \times 100$$

Burada $[A]_{\text{örnek}}$ test numunesinin absorbansı ve $[A]_{\text{kontrol}}$ ise kontrol numunesinin absorbansıdır.



Şekil 3.3 a. C₆₀, b. TDKNT ve c. Fe₃O₄ 6 saatlik maruziyet sonrası oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.

3.2.7.2 LDH (Laktat Dehidrogenaz) testi

Hücre membranı bütünlüğü sitoplazmaya sızan LDH miktarının ticari bir enzimatik LDH ölçüm kiti aracılığı ile tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Farklı derişimlerde C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ NP'lara maruz bırakılan mDF ve hPDLF hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 6, 24 ve 48 saatlik maruziyet süreleri boyunca inkübe edilmiştir

Maruziyet süresinin sonunda test materyali ile herhangi bir girişimi önlemek amacı ile NP'lar 250 x g'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüjlenerek test ortamından uzaklaştırılmıştır.

Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere santrifüjden 45 dk. önce NP'lara maruz bırakılmayan hücrelerin bulunduğu kontrol kuyucuklarının her birine 10 µL lizis solüsyonu eklenmiştir. Elde edilen süpernatantlar bir başka temiz 96 kuyucuklu plaka içerisinde taze hazırlanan LDH test karışımına (substrat/boya/kofaktör) eklenmiştir. 50 µL süpernatant 100 µL LDH test karışımına eklenerek oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak üzere her kuyucuğa 15 µL, 1 N HCl eklenmiştir. Son olarak, 490 nm'deki absorbans değerleri bir mikropilaka okuyucu aracılığı ile kaydedilmiştir. Enzimatik analiz adımlarının tümü ışıktan korunarak gerçekleştirilmiş ve her örnek üç tekrarlı olarak okunmuştur. 690 nm'de okunan zemin (background) ölçümleri 490 nm'de okunan birincil ölçüm değerlerinden çıkarılarak örneğin ve kontrolün gerçek absorbans değerleri elde edilmiştir.

LDH aktivitesinin pozitif kontrole göre % olarak hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$([A]_{\text{örnek}} - [A]_{\text{negatif}})/([A]_{\text{pozitif}} - [A]_{\text{negatif}}) \times 100$$

Burada [A]_{pozitif} lizise uğramış kontrol hücreleri için ölçülen ortalama absorbansı; [A]_{negatif} NP'lar ile etkileştirilmemiş kontrol hücreleri için ölçülen ortalama absorbansı ve [A]_{örnek} NP'lara maruz bırakılmış hücreleri için ölçülen ortalama absorbansıdır.

3.2.7.3 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) belirlenmesi

Hücre içi ROT sebepli hücre ölümünün tespiti 5-(ve-6)-karboksi-2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (karboksi-H₂DCFDA) (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon öncesinde hücreler farklı derişimlerdeki (0,1; 1; 10; 50; 100 µg/mL) NP'lara maruz bırakılmıştır

NP'ların karboksi-H₂DCFDA ile etkileşimini mümkün olduğunca en aza indirmek amacıyla, hücrelerin ardışık olarak üç kez PBS ile yıkanması suretiyle NP'lar test ortamından uzaklaştırılmıştır. Hücreler daha sonra 20 µM karboksi-H₂DCFDA ile etkileştirilerek oluşan floresans yoğunluğu 485 nm eksitasyon ve 520 nm emisyonunda mikropilaka okuyucusu kullanılarak ölçülmüştür.

NP içermeyen kültür ortamı içinde inkübe edilen hücreler negatif kontrol olarak, 400 mM H₂O₂ içeren kültür ortamı içinde inkübe edilen hücreler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.7.4 Empedans ölçümüne dayalı gerçek zamanlı hücre analizörü (xCELLigence) ölçümleri

hPDLF ve mDF hücrelerinin sitotoksik yanıtını gerçek zamanlı olarak ölçmek için hücreler sırasıyla 6.25×10^3 ve 12.50×10^3 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 16 kuyucuklu mikropilakaların zeminine yerleştirilmiş altın mikro-elektrotlar (E-plates, Roche Diagnostics, Basel, İsviçre) üzerine ekilmiştir. Sonrasında mikropilakalar inkübatör içine yerleştirilerek hücreler 37°C ve % 5 CO₂ koşullarında log fazına ulaşana kadar inkübe edilmiştir (Şeker vd. 2014). Bu aşamada hücreler NP'ların farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılarak meydana gelen empedans değişimleri xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP-sistemi (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya) ile 15 dakika aralıklarla eş zamanlı olarak ölçülmüştür. Hücre başına düşen NP miktarları çizelge 3.3'te verilmiştir. NP içermeyen hücre kültürü ortamı ile inkübe edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak, bilinen bir toksik etkiye neden olan ZnO NP'ları (100 µg/mL) ile hücreler etkileştirilmiştir. Hücre içermeyen, sadece besi yeri ortamı içinde NP'ların en yüksek konsantrasyonunun bulunduğu örnek kuyucukları ise oluşabilecek herhangi bir potansiyel girişim için test edilmiştir. NP'ların yarı-maksimal inhibisyon derişimlerinin (IC50) hesaplanması için xCELLigence yazılımı kullanılmıştır. IC50 değeri hücre çoğalmasını %50 oranında baskılayan ya da inhibe eden madde miktarıdır.

Çizelge 3.3 xCELLigence sistemi için hücre başına düşen NP miktarı

NP Maruziyet konsantrasyonu	hPDLF Hücre başına NP miktarı (6,25 x10 ³ hücre /kuyucuk)	mDF Hücre başına NP miktarı (12,50 x10 ³ hücre /kuyucuk)
0,1 µg/mL	1,6x 10 ⁻⁶ µg NP/hücre	8 x 10 ⁻⁷ µg NP/hücre
1,0 µg/mL	1,6x 10 ⁻⁵ µg NP/hücre	8 x 10 ⁻⁶ µg NP/hücre
10 µg/mL	1,6x 10 ⁻⁴ µg NP/hücre	8 x 10 ⁻⁵ µg NP/hücre
50 µg/mL	8 x10 ⁻⁴ µg NP/hücre	4 x10 ⁻⁴ µg NP/hücre
100 µg/mL	1,6x 10 ⁻³ µg NP/hücre	8 x10 ⁻⁴ µg NP/hücre

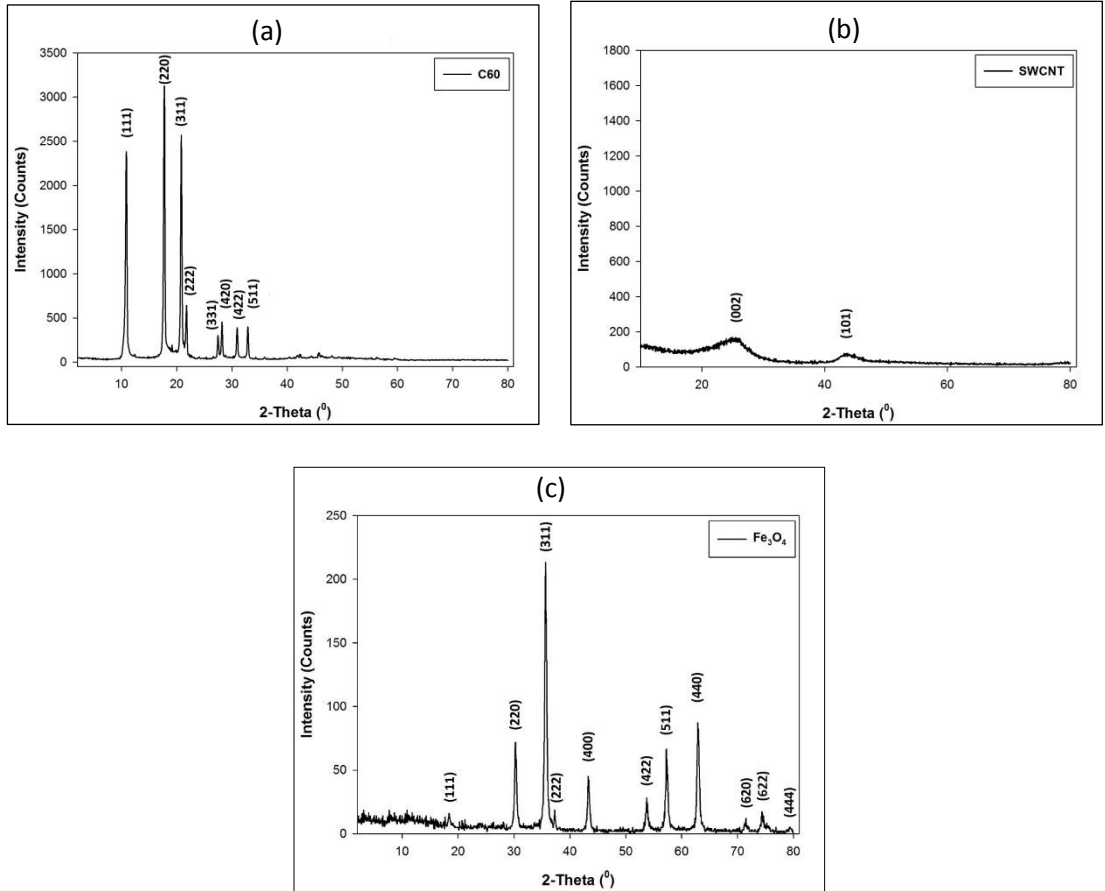
3.2.8 İstatistiksel analiz

Deneylerden elde edilen tüm veriler birbirinden bağımsız üç deney sonucunda elde edilmiştir ve ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Student's T dağılımının çift yönlü (two-tailed) testi kullanılarak elde edilen sonuçların anlamlılık düzeyleri test edilmiş ve $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 NP' ların XRD Analizi Bulguları

C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ NP'ların toz XRD desenleri, sırasıyla şekil 4.1 a, b ve c'de gösterilmiştir.



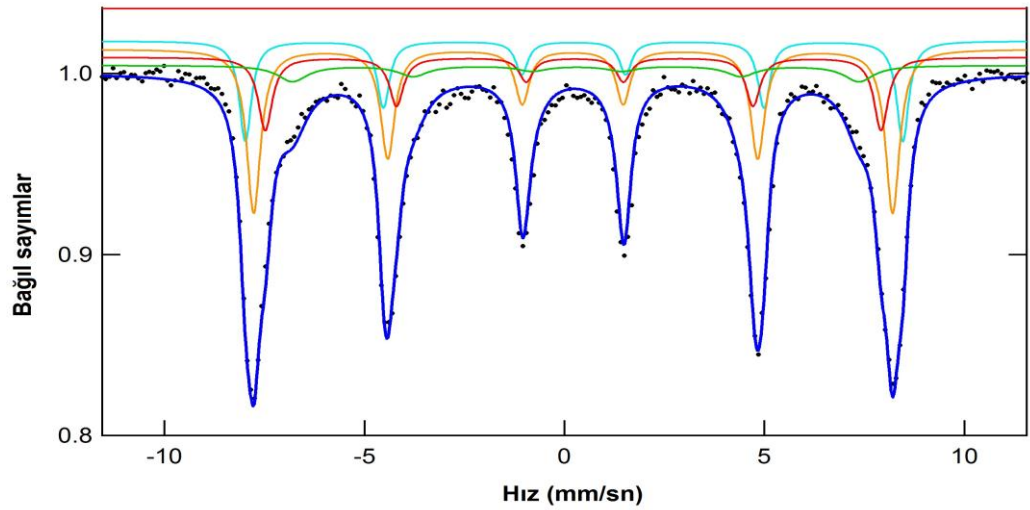
Şekil 4.1 a. C₆₀, b. TDKNT ve c. Fe₃O₄ nanoparçacıklarının XRD desenleri. Her pike ait Miller indisleri parantez içinde verilmiştir.

C₆₀ parçacık boyutu, sırası ile; (111), (220), (311), (222), (331), (420), (422) ve (511) pikleri için hesaplanan boyutların ortalaması alınarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.a). TDKNT parçacık boyutu, sırası ile; (002) ve (101) pikleri için hesaplanan boyutların ortalaması alınarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.b).

TDKNT X-ışını kırınım desenine göre, (002) pikindeki Bragg yansıması $2\theta = 25.5^\circ$ açısına ortalanmıştır ki bu 0,35 nm'lik bir d –mesafesine karşılık gelmektedir. Fe_3O_4 parçacık boyutu ise sırası ile; (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511), (440), (620) ve (622) pikleri için hesaplanan boyutların ortalaması alınarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.c).

4.2 Fe_3O_4 NP'ların Mössbauer Spektroskopisi

Fe_3O_4 NP'ların dört sekstet (altılı pik) ile fit edilmiş (uyumlandırılmış) oda sıcaklığındaki (RT) Mössbauer spektrumu şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Fe_3O_4 nanoparçacıklarının Mössbauer spektrumu

Elde edilen parametreler, manyetitın oktahedral bölgelerinde (Hf: 43.904 T) $\text{Fe}^{2.5+}$, tetrahedral bölgelerinde (Hf: 47.741 T) ise Fe^{3+} varlığına işaret etmektedir. Tetrahedral bölgelerdeki diğer iki Fe^{3+} sekstetinin magemit (Hf: 49,539 T) ve hematite (Hf: 50,969 T) ait olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Fe₃O₄ nanoparçacıklarının Mössbauer spektrumunun oda sıcaklığında fit edilmesiyle (uyumlandırılmasıyla) elde edilen aşırı ince yapı (hyperfine) parametreleri

Bileşen	IS (mms ⁻¹)	QS (mms ⁻¹)	Hf (Tesla)	W (mms ⁻¹)	Alan (%)
Fe ^{2.5+} (Mt)	0.4071	-0.033	43.904	0.9	18.815
Fe ³⁺ (Mt)	0.3445	-0.04	47.741	0.4249	19.049
Fe ³⁺ (Mh)	0.3181	0.0109	49.539	0.4253	42.818
Fe ³⁺ (Hm)	0.3410	0.0096	50.969	0.3643	19.318
(IS: İzomer kayma, QS: Kuadropol kayma, Hf: Manyetik aşırı ince yapı, W: Maksimum yarı genişliği) (Mt: Manyetit, Mh: Magemit, Hm: Hematit)					

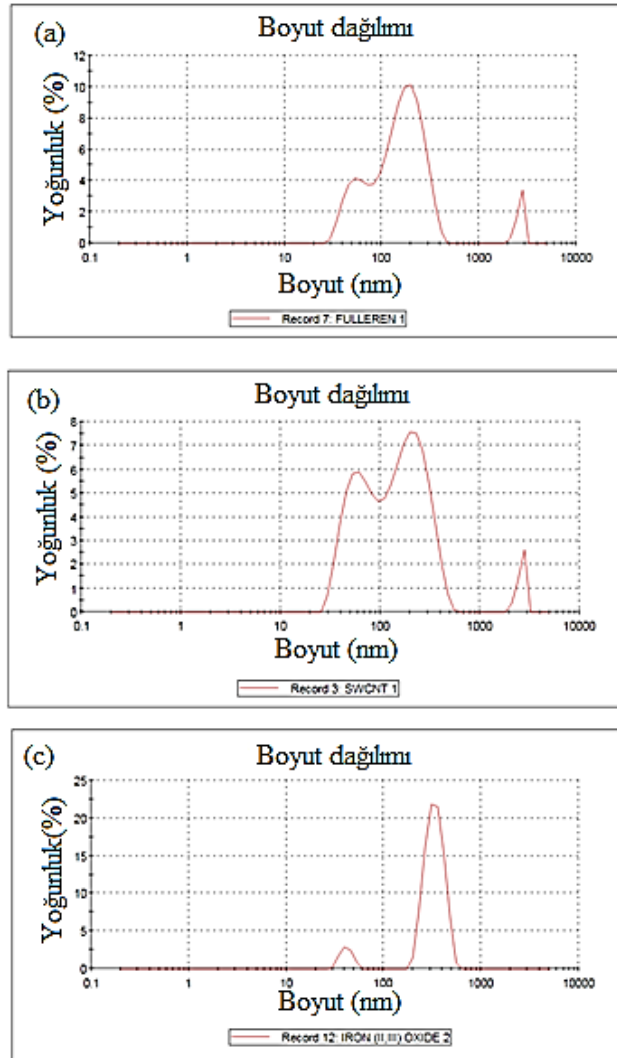
4.3 Parçacık Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Hücre kültür ortamı içinde DLS yöntemi ile ölçülen NP'ların ortalama tanecik boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli (ζ) verileri şekil 4.3, şekil 4.4 ve çizelge 4.2'de gösterilmiştir. TDKNT, C₆₀ ve Fe₃O₄ için ortalama hidrodinamik çap sırasıyla 112.9, 142 ve 316.6 olarak belirlenmiştir. Nano Zetasizer cihazı kullanılarak polidispersite indeksi (PDI) de belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre tüm parçacıkların göreceli olarak geniş bir boyut dağılımına sahip olduğu gözlemlenmiş, bu sebeple hücre kültür ortamı içinde polidispersite (geniş moleküler ağırlık dağılımı) gösterdikleri saptanmıştır

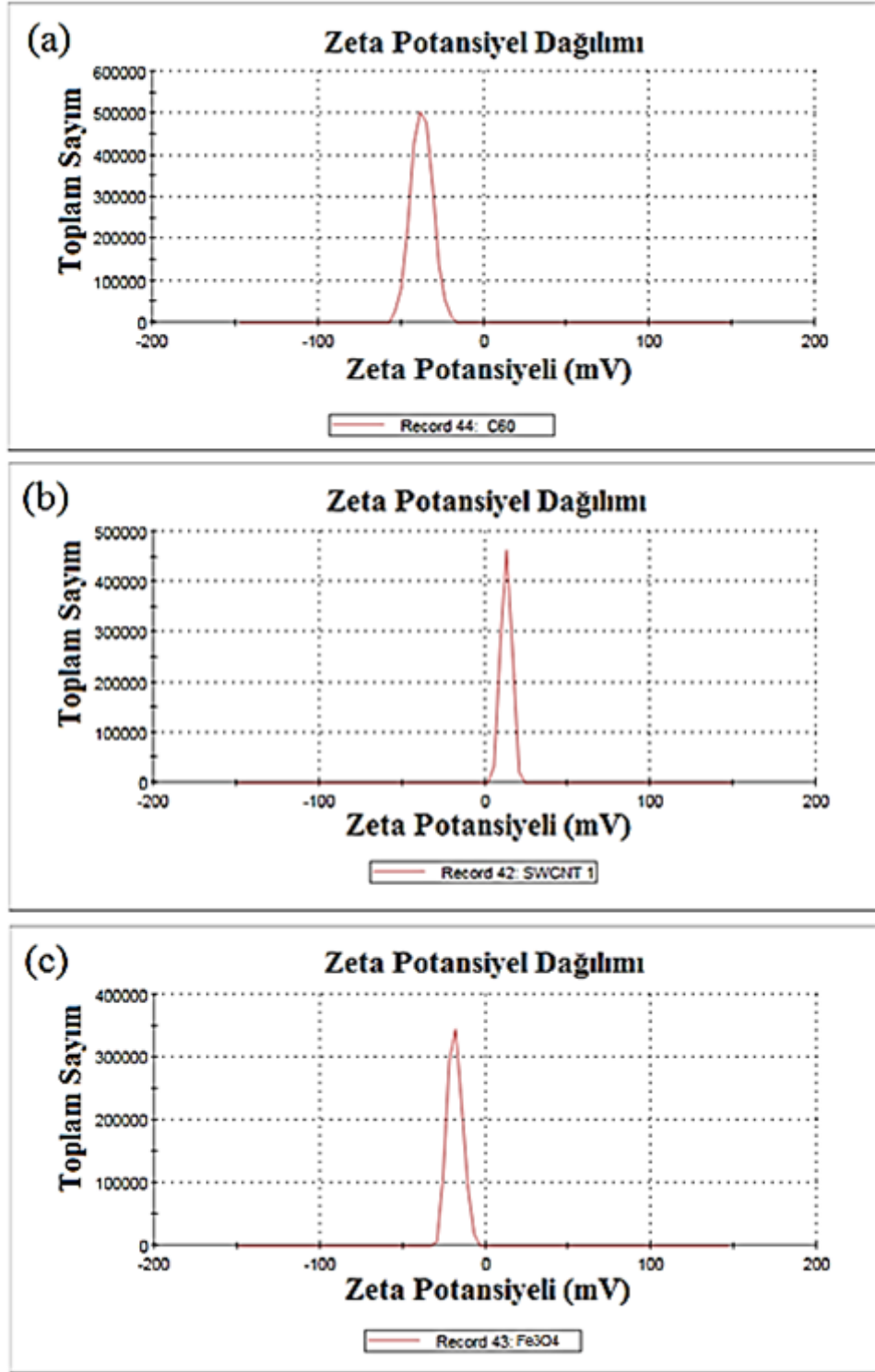
Çizelge 4.2 Nanoparçacık karakterizasyonu

	C ₆₀	TDKNT	Fe ₃ O ₄
BET yüzey alanı (m ² /g)	10.58	808.3	40.89
Ortalama çap DLS (nm)	142.0	112.9	316.6
Zeta potansiyeli (ζ) (mV)	-37,4± 6,45	12,9± 3,19	-18,4± 4,49
Polidispersite indeksi (PDI)	0.548	0.573	0.644
Boyut TEM (nm)	34,64	9,00*	28,33

*TDKNT çapı



Şekil 4.3 a. C₆₀, b. TDKNT ve c. Fe₃O₄ NP'lerinin DLS yöntemi ile hücre ortamı içinde elde edilmiş parçacık boyut dağılımları



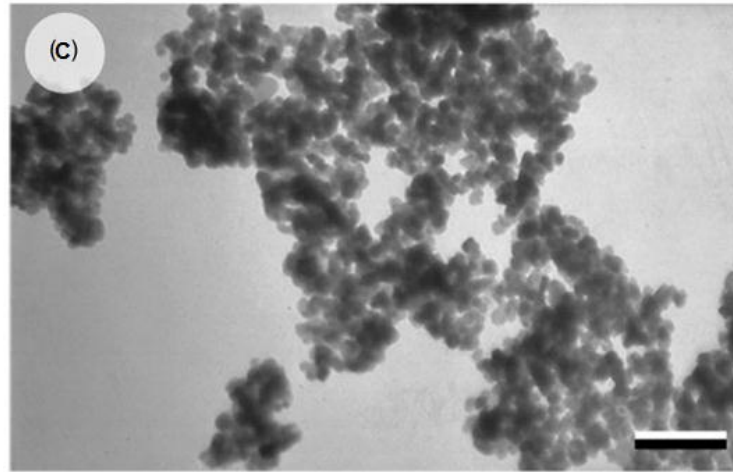
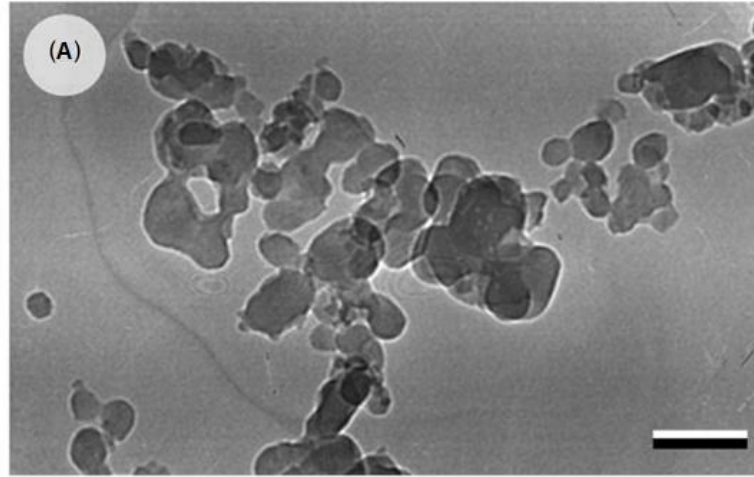
Şekil 4.4 a. C₆₀, b. TDKNT ve c. Fe₃O₄ NP'lerinin Zeta potansiyel dağılımları

4.4 BET Yüzey Alanı Ölçümü

BET analizi ile ölçülen spesifik yüzey alanları çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, TDKNT’lerin C_{60} ve Fe_3O_4 ’e kıyasla daha geniş yüzey alanına sahip olduğu belirlenmiştir.

4.5 NP’ların TEM ile Karakterizasyonu

NP’ların TEM mikrografları Şekil 4.5’te gösterilmiştir. TEM verilerine göre, C_{60} NP’larının çözelti içinde dairesel şekilli büyük agregatlar oluşturduğu ve agregat çapının ortalama 34,64 nm olmak üzere 26.78 nm ile 44.23 nm arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5. a). TDKNT’lerin ise doğal olarak kümелendikleri ve moleküller arası Van der Waals kuvvetleri sebebiyle tek başına tüpler olarak değil, demetler ve aglomerat/agregat yığınları olarak bulundukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.5. b). Ayrıca nanotüp çapının ortalama 9 nm olduğu belirlenmiştir. Fe_3O_4 NP’larının nispeten homojen bir boyut dağılımına sahip olduğu şekil 4.5. c’de görülmektedir. TEM mikrografı incelendiğinde Fe_3O_4 NP’larının da aglomerat/agregat oluşturduğu söylenebilir ancak C_{60} ve TDKNT’lere göre daha küçük boyutlu yığınlar oluşturdukları gözlemlenmiştir. Fe_3O_4 NP’ları için aglomerat/agregat çapının ortalama 28.33 nm olmak üzere 19.44 ile 36.11 nm arasında değiştiği belirlenmiştir.



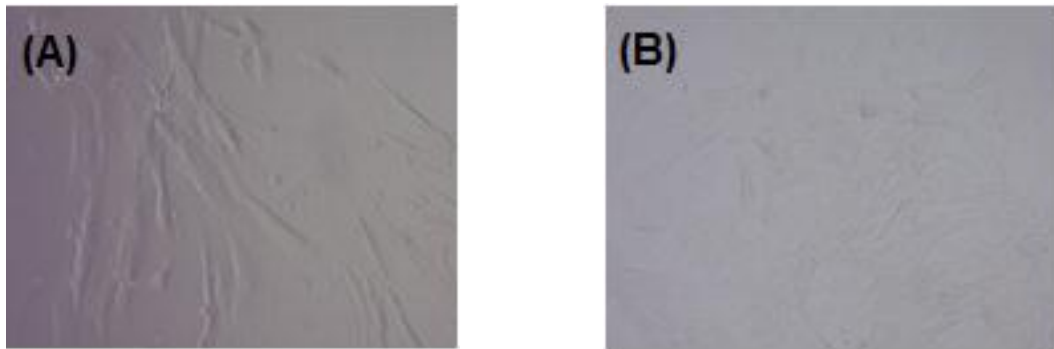
Şekil 4.5 a. C₆₀, b. TDKNT ve c. Fe₃O₄ NP'lerinin TEM mikrografları (Ölçek çubukları: 100 nm)

4.6 Hücre Morfolojisi

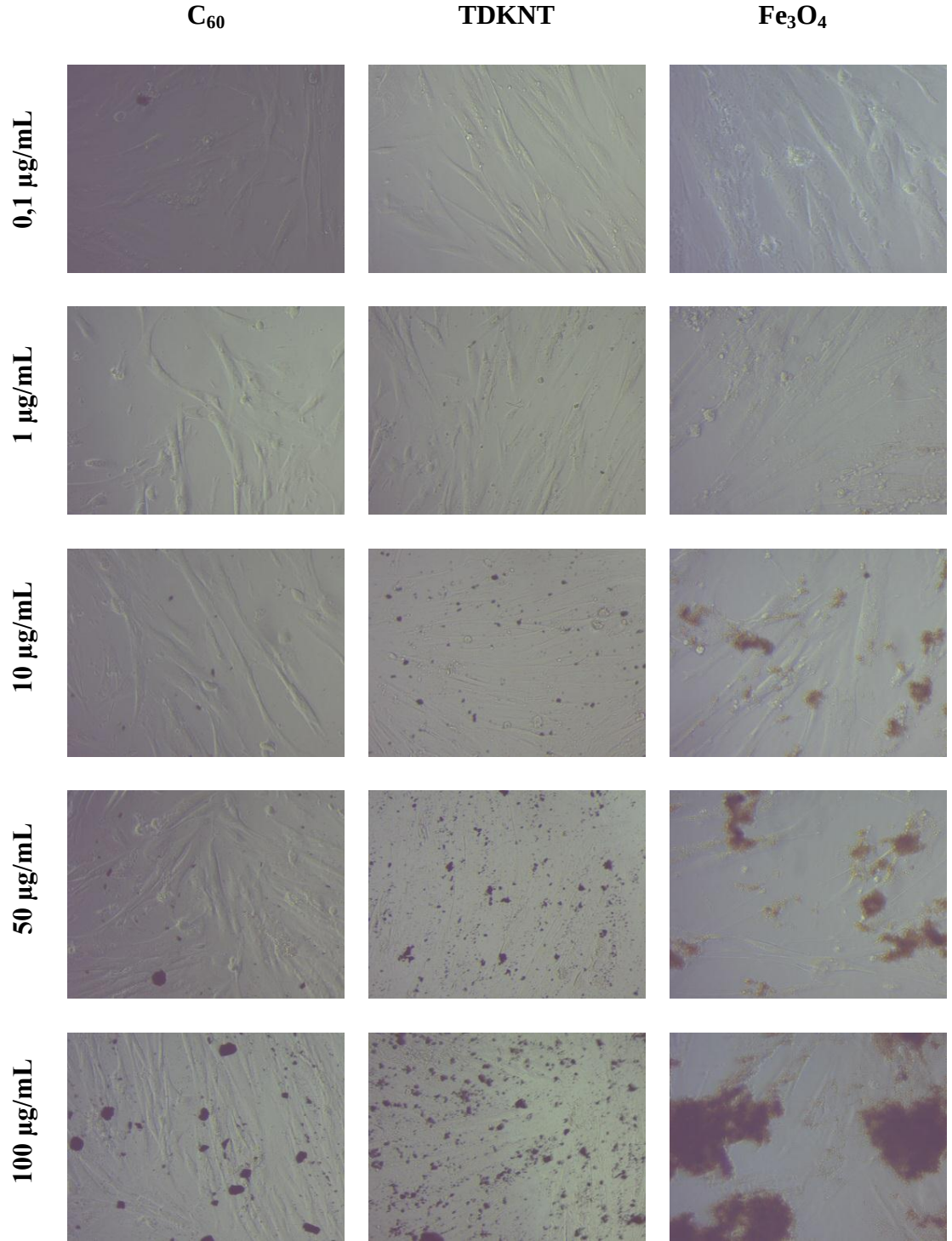
hPDLF ve mDF hücrelerinde sitotoksosite sebebiyle meydana gelen morfolojik değişimlerin görüntülenebilmesi amacıyla, hücreler NP'lara 48 saat boyunca maruz bırakılmadan önce ve sonrasında ters faz-kontrast görüntüleri çekilmiştir. Kontrol grubu hücreleri normal bir morfoloji ve inhibisyonsuz bir proliferasyon sergilemiştir (Şekil 4.6). TDKNT, C_{60} ve Fe_3O_4 ile muamele edilmiş hücrelerin ters faz-kontrast mikrografları şekil 4.7 - 4.8'de verilmiştir. NP'lar ile etkileştirilmiş hPDLF hücreleri orijinal iç şekilli yapılarını kaybetmiş ve sitoplazmik büzülme nedeni ile yuvarlaklaşmıştır. Ayrıca faz-kontrast mikroskobu görüntüleri incelendiğinde hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldığı saptanmıştır. Özellikle yüksek NP konsantrasyonlarında (50 ve 100 $\mu g/mL$) karakteristik morfolojinin korunamadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

mDF hücreleri de yüksek NP konsantrasyonlarında yüzeyden ayrılmış ve yuvarlaklaşmış, hücrelerin bir kısmı karakteristik fusiform şekillerini kaybetmiş ve düzensiz, büzülmüş bir görünüm kazanmıştır (Şekil 4.8).

Hücreler ayrıca videomikroskopi yöntemi ile izlenmiş ve elde edilen veriler NP'ların varlığının özellikle yüksek derişimlerde hücrelerin morfolojilerini ve yüzeye bağlanma davranışlarını olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Özellikle Fe_3O_4 NP'larının hücre ortamındaki aglomerasyon davranışının artan konsantrasyonla arttığı görülmüştür (Şekil 4.7-4.8).

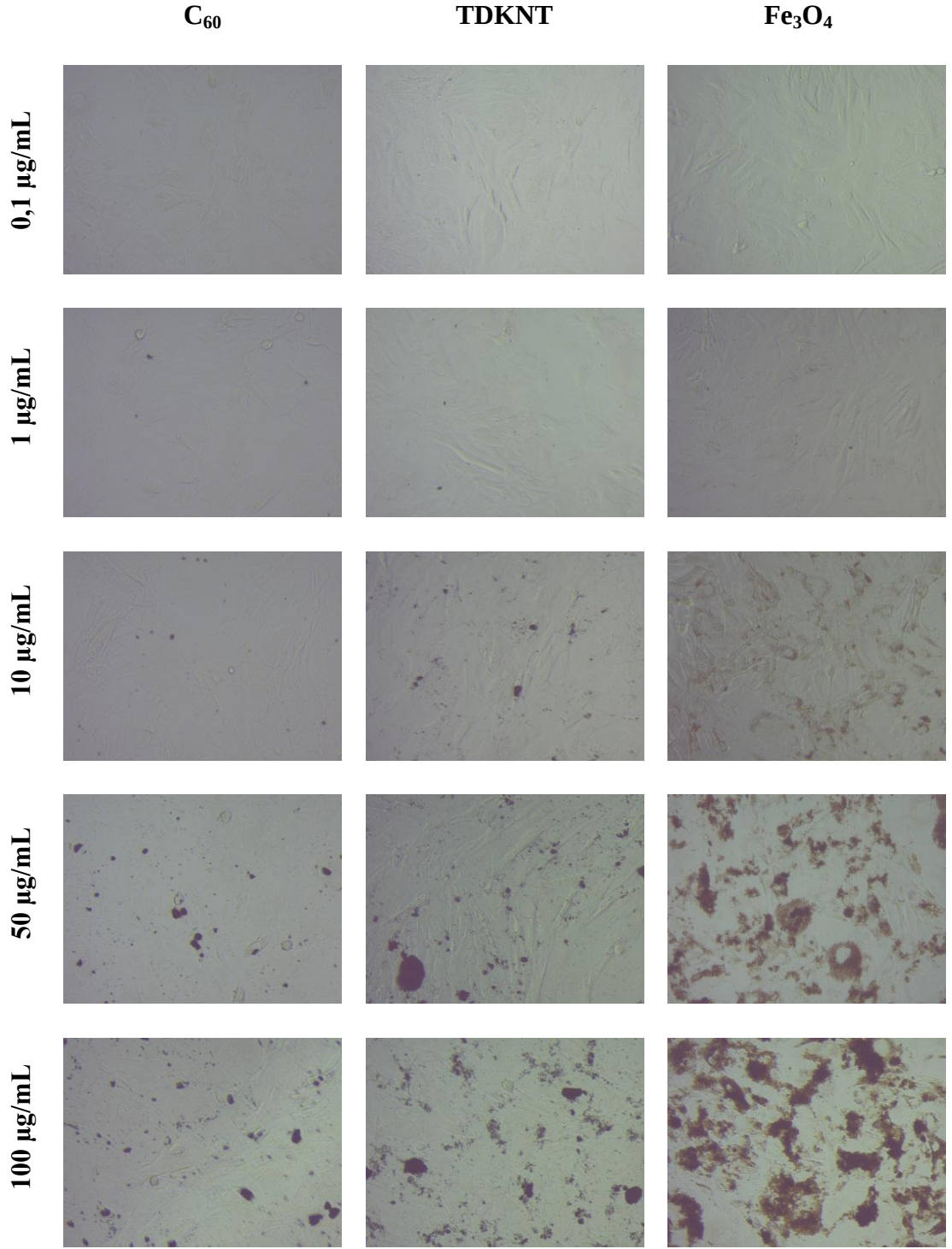


Şekil 4.6 Kontrol grubu hücreleri a. hPDLF, b. mDF
Mikrograflar (200X) optik büyütmede çekilmiştir.



Şekil 4.7 Farklı derişimlerdeki C_{60} , TDKNT ve Fe_3O_4 NP maruziyeti sonrası hPDLF hücrelerini gösteren faz kontrast mikrografları

Tüm mikrograflar (200X) optik büyütmede çekilmiştir.

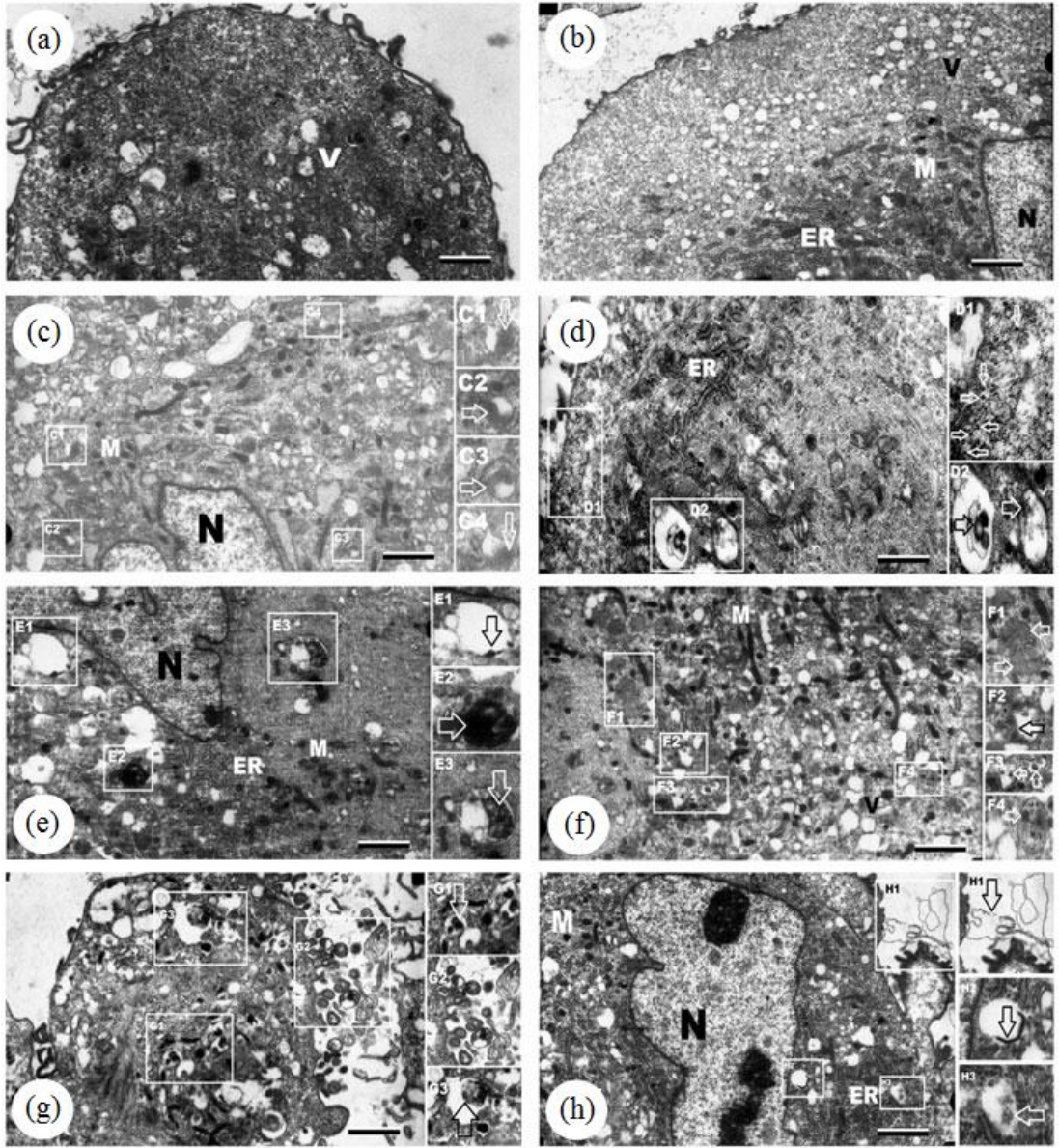


Şekil 4.8 Farklı derişimlerdeki C_{60} , TDKNT ve Fe_3O_4 NP maruziyeti sonrası mDF hücrelerini gösteren faz kontrast mikrografları

Tüm mikrograflar (200X) optik büyütmede çekilmiştir.

4.7 Hücresel Alım, Hücre İçi Birikim ve Morfolojik Değişimler

Seçilen hücrelerde hücresel alım, hücre içi birikim ve morfolojik değişimler maruziyet çalışmalarından elde edilen TEM mikrografları kullanılarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuçlar şekil 4.9'da verilmiştir. NP'lar ile etkileştirilmiş hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla sitoplazmik veziküller bakımından zengin olduğu görülmüştür. Kontrol hücrelerinde ise veziküllerin homojen dağılım gösterdiği ve NP içermediği, hücre morfolojisinin normal olduğu ve herhangi bir hücre hasarı belirtisi bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.a ve b). TDKNT'e maruz bırakılan hPDLF hücrelerinin nükleuslarındaki oluklanma ve kıvrımlanmalar sebebiyle düzensiz sınırlı, girintili çıkıntılı görünen bir nükleus yapısına sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.9. c). TDKNT ile etkileştirilmiş mDF hücrelerinde ise koyu renkteki (elektronca yoğun) mitokondriler dikkat çekmektedir (Şekil 4.9. d). C₆₀'e maruz bırakılmış hPDLF hücrelerinde artan sayıda ve büyüklükteki vakuoller haricinde hücre hasarına ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.9.e). mDF hücrelerinin ise vakuollerinde C₆₀ bulunduğu ve granüllü endoplazmik retikulumun düzensiz bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.f). Hücre membranında belirgin bir bleb (membranda cepçik, tomurcuklanma) oluşumuna rastlanmamıştır. Fe₃O₄ NP agregatları, her iki tip hücrenin de (hPDLF ve mDF) sitoplazma ya da sitoplazmik veziküllerinde görülmektedir. Hücre membranı üzerinde biriken belirgin sayıdaki endositotik-ekzositotik veziküller (kesecikler) dikkat çekicidir. Özellikle Fe₃O₄ NP'lara maruz bırakılan hPDLF hücrelerinde membran üzerinde yoğun bleb oluşumu görülmektedir (Şekil 4.9.g). Fe₃O₄ ile etkileştirilen mDF hücrelerinde de membran üzerinde mikrovillus ağı ile birlikte bleb oluşumuna rastlanmıştır (Şekil 4.9.h).

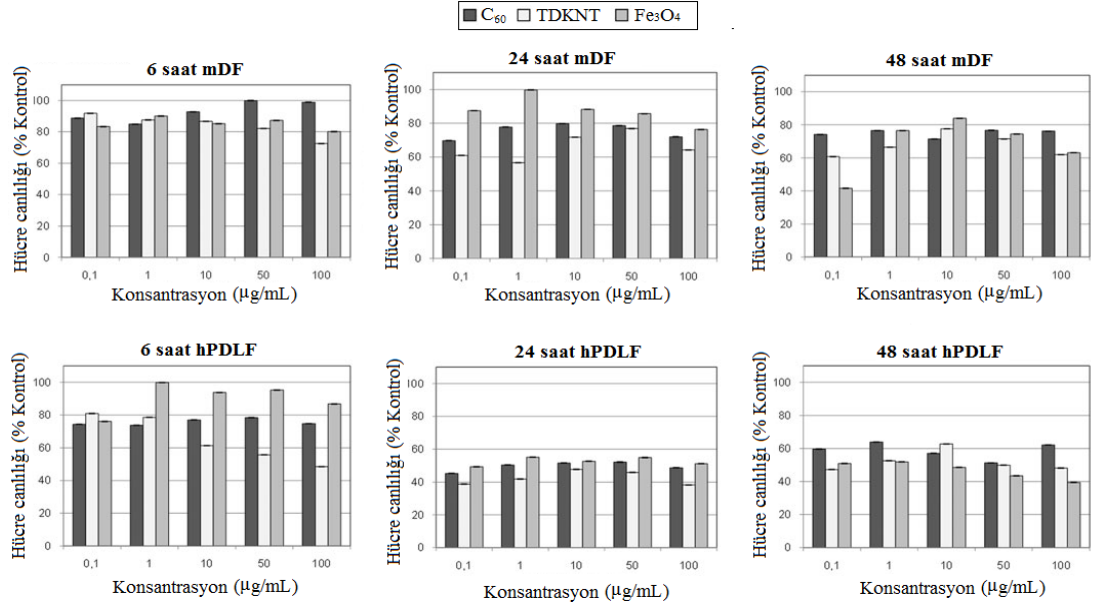


Şekil 4.9 a. hPDLF ve b. mDF kontrol hücreleri; c. C_{60} ile muamele edilmiş hPDLF, d. C_{60} ile muamele edilmiş mDF, e. TDKNT ile muamele edilmiş hPDLF, f. TDKNT ile muamele edilmiş mDF, g. Fe_3O_4 ile muamele edilmiş hPDLF ve h. Fe_3O_4 ile muamele edilmiş mDF hücrelerinin TEM mikrografları.

Mikrograflar üzerinde işaretlenen bölgeler yanda daha yüksek büyütmede verilmiştir. Oklar NP öbeklerini işaret etmektedir. (N: Nukleus, M: Mitokondri, ER: Endoplazmik retikulum, V: Vezikül. Ölçek çubukları: $1\mu m$)

4.8 Mitokondriyal Fonksiyon

Hücre canlılığı, NP maruziyeti sonrasında mitokondriyal dehidrogenazların ölçümü yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, hücre canlılığı hPDLF hücreleri için maruziyetin ilk 6 saatinde yüksek olmasına rağmen sonraki zaman noktalarında önemli ölçüde (~%50) azalmıştır.

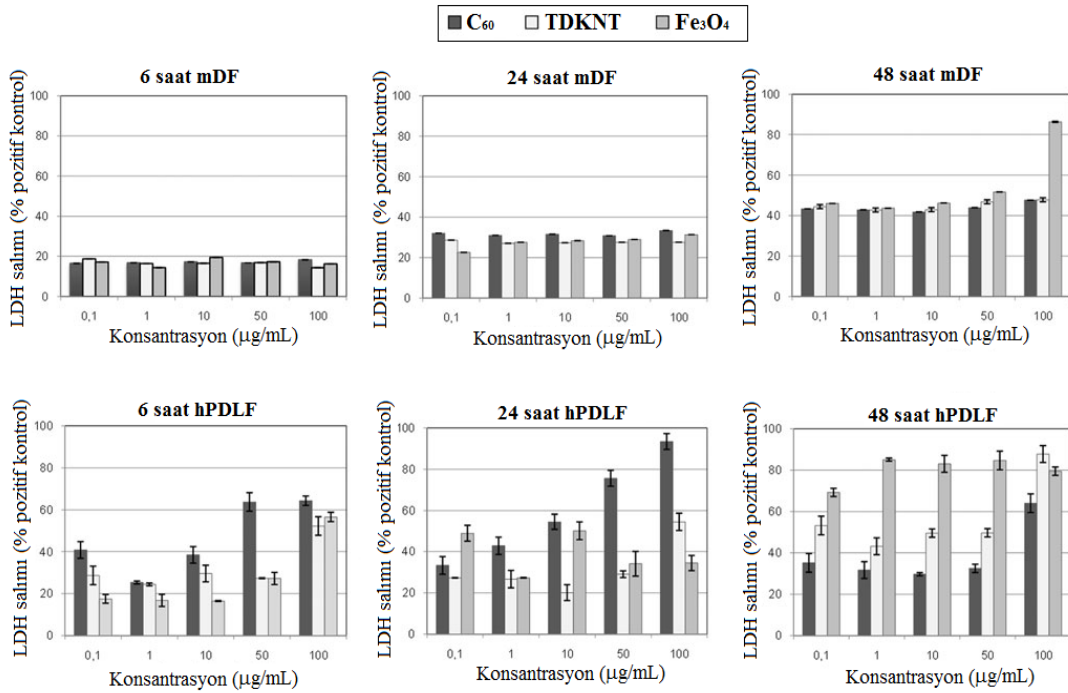


Şekil 4.10 hPDLF ve mDF hücrelerinin 6, 24 ve 48 saatlik NP maruziyeti sonrası elde edilen MTT testi sonuçları

mDF hücre canlılığının 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinde hPDLF hücreleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. TDKNT maruziyetinin ilk 6 saatinde hPDLF hücre canlılığının artan derişimlerde kademeli bir azalma gösterdiği için konsantrasyona bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Ancak C₆₀ ile etkileştirilen hücrelerde canlılığın konsantrasyona bağımlılığı nispeten daha düşüktür çünkü bu hücrelerde tüm derişimlerde birbirine yakın hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir.

4.9 LDH Ölçümleri

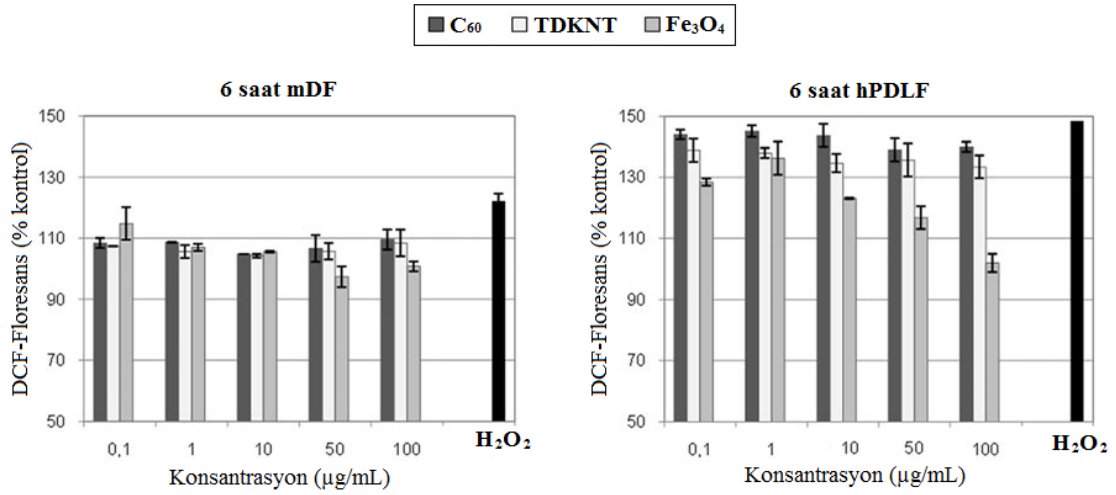
Nanoparçacıkların hPDLF ve mDF hücre membranlarına verdiği zararı ortaya koymak amacıyla membran bütünlüğünün bozulması sonucu hücre dışı sıvıya sızabilen LDH enziminin miktarı maruziyet sonrasında incelenmiştir. Deney sonuçlarına göre, her üç nano parçacığın zaman içinde artan bir şekilde hücrelerin membran bütünlüğünü bozduğu belirlenmiştir. mDF hücreleri ile karşılaştırıldığında, hPDLF hücreleri için ölçülen LDH seviyelerinin tüm zaman noktalarında belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Yalnızca 48 saat boyunca Fe_3O_4 ile muamele edilen mDF hücreleri için ölçülen LDH değerlerinin aynı koşullarda test edilen hPDLF hücrelerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. mDF hücrelerinden salınan LDH miktarının tüm nanoparçacıklar için zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Özellikle 48 saatlik maruziyet sonunda 100 $\mu\text{g/mL}$ Fe_3O_4 ile muamele edilen hücrelerde anlamlı derecede yüksek miktarda (~% 84) LDH salımı olduğu tespit edilmiştir. hPDLF hücrelerinde meydana gelen LDH miktarındaki artış, mDF hücrelerine göre daha konsantrasyona bağımlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 hPDLF ve mDF hücreleri için 6, 24 ve 48 saatlik NP maruziyeti için LDH ölçüm sonuçları

4.10 Hücre İçi ROT Ölçümleri

Nanoparçacıklar tarafından hücre içinde tetiklenen oksidatif strese bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerini belirlemek üzere indikatör olarak karboksi- H_2DCFDA içeren bir floresan test kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.12), maruziyetin ilk 6 saatinde her üç nanoparçacığın ROT oluşumunu tetiklediğini göstermiştir ancak, daha ileri zaman noktalarında (24. ve 48. saatler) ROT miktarları daha düşük seviyelere gerilemiştir. İlk 6 saat içinde hPDLF hücrelerinde oluşan ROT miktarının mDF hücrelerine göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

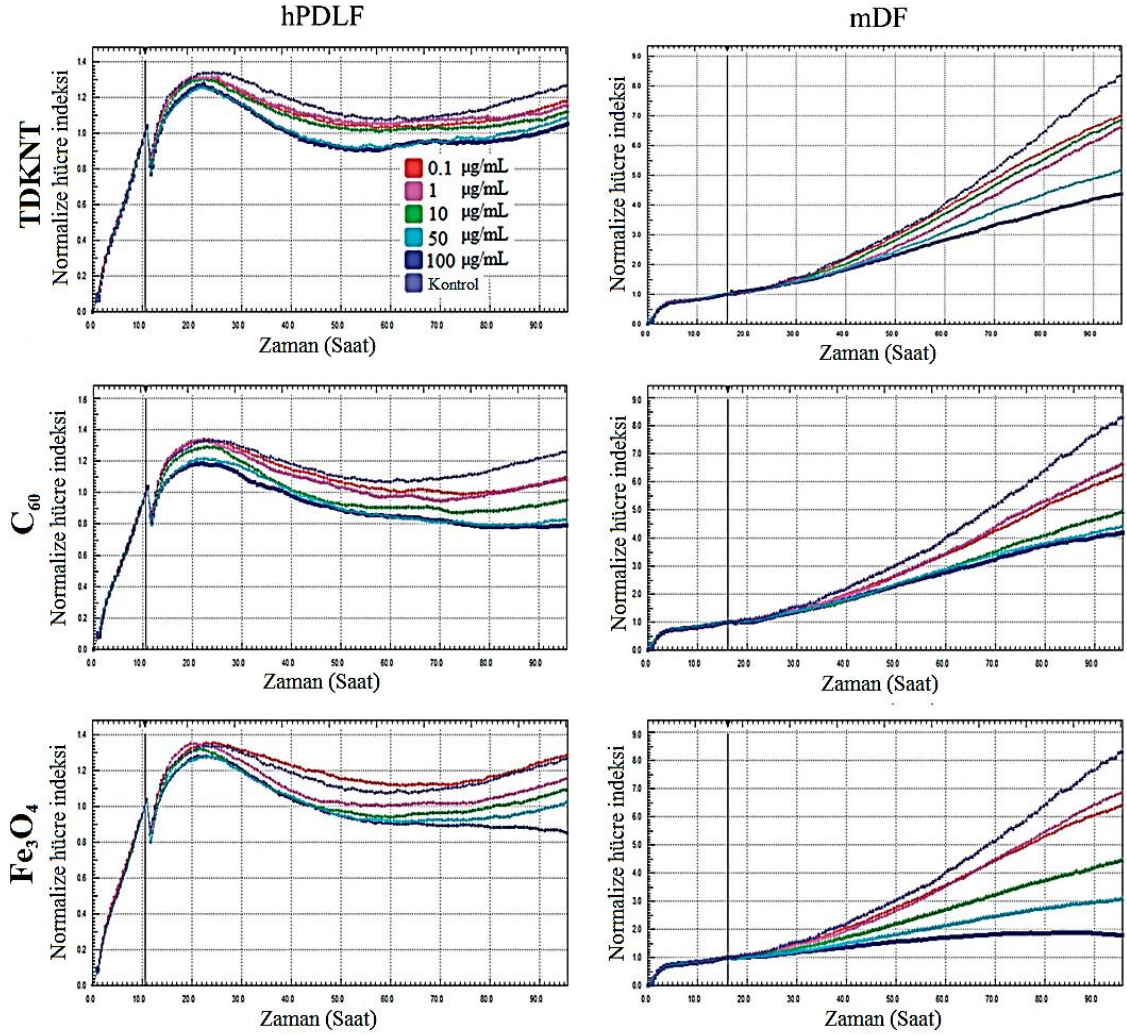


Şekil 4.12 hPDLF ve mDF hücrelerinin 6 saatlik NP maruziyeti sonrası ROT ölçüm sonuçları

4.11 Hücresel Empedans (Direnç) Ölçümleri

Hücrelerin maruziyet koşulları altındaki adhezyon ve proliferasyon dinamikleri xCELLigence sisteminin yardımı ile hücresel empedans olarak ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı örnekler için ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Hücre indeksinde (CI) nanoparçacıklara bağlı olarak meydana gelen değişiklikler şekil 4.13’de verilmiştir. CI değerleri nanoparçacıkların eklendiği zaman noktasına göre normalize edilmiştir. Normalize hücre indeksi (NCI) değerleri, kontrol hücrelerinde her iki hücre tipi için hücre proliferasyonu sebebiyle sabit bir hızla artmıştır.

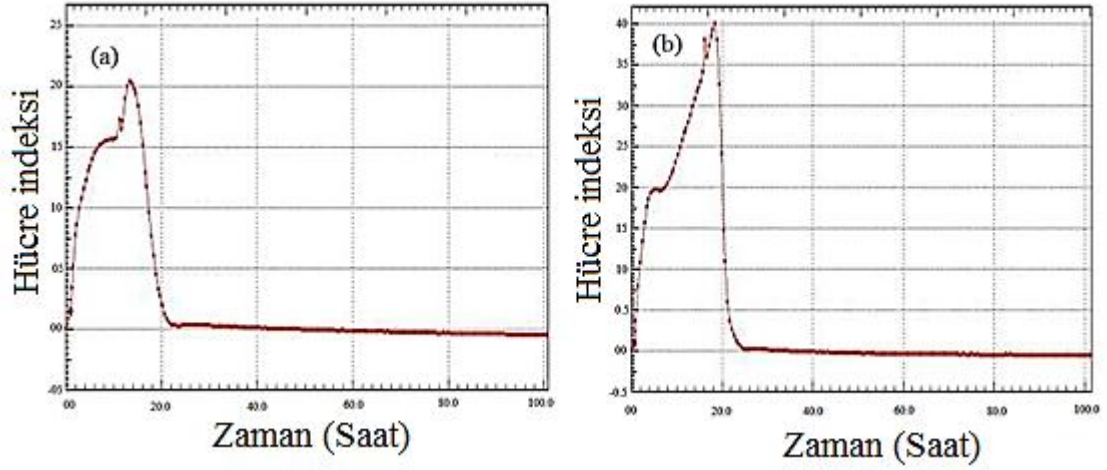
xCELLigence deneyleri, konsantrasyonun hücresel toksik cevap üzerindeki etkisini gözlemlmek üzere nanoparçacıkların 5 farklı derişimi için (0,1; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.13 hPDLF ve mDF hücrelerinin TDKNT, C_{60} ve Fe_3O_4 maruziyeti sonrası empedans ölçümüne dayalı hücre canlılığı verileri

Sonuçlar, hPDLF hücrelerinin tüm NP'lar için kontrol hücrelerine benzer NCI değerleri oluşturduğunu, kontrol hücrelerinin değerleri ile gözlemlenebilir anlamlı bir fark bulunmadığını ortaya çıkarmıştır. mDF hücreleri için ise NP maruziyeti konsantrasyona bağlı olarak, her üç NP için NCI artışında, özellikle yüksek konsantrasyona maruz bırakılan hücrelerde, belirgin bir yavaşlamaya sebep olmuştur (Şekil 4.13).

Pozitif kontrol deneyi sonuçları her iki hücre tipi için de CI değerlerinin belirgin şekilde düştüğünü (sıfır düzeyine yaklaştığını) göstermiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 a. hPDLF, b. mDF, hücreleri için ZnO NP ile yapılan pozitif kontrol deneyi sonuçları

NP'lerin hiçbirisi NCI değerlerinin sıfır seviyesine gerilemesine sebep olmamıştır. Test edilen NP'ler için IC50 değerleri ($\mu\text{g} / \text{mL}$) XCELLigence RTCA yazılımı ile her iki hücre tipi için hesaplanmıştır. hPDLF ve mDF hücreleri için hesaplanan IC50 değerleri, çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Periodontal ligament fibroblast ve dermal fibroblast hücreleri için hesaplanan IC 50 değerleri

NP	hPDLF	mDF
C ₆₀	50.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	48.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
TDKNT	168.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	136.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fe ₃ O ₄	143.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	88.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

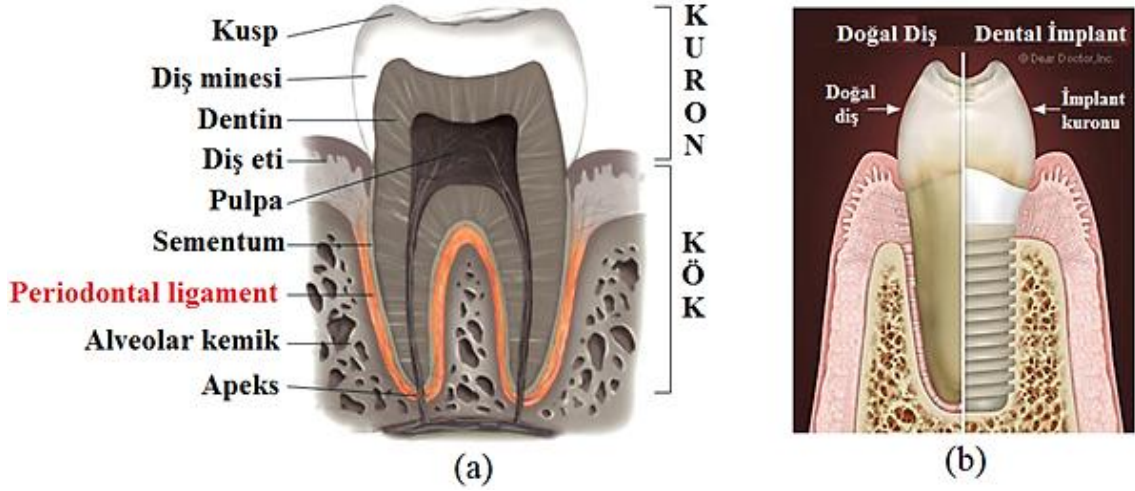
C₆₀, TDKNT ve Fe₃O₄ nano-boyutları ve atomik yapılarıyla eşsiz ve olağanüstü özelliklere sahip nano parçacıklardır. Bu nedenle, birçok alandaki uygulama potansiyelleri yoğun bir şekilde araştırılmakta ve kullanım alanları genişledikçe üretimleri de dolaylı olarak artmaktadır. Ne var ki, hücreler ve dokular ile temas halinde olan nano malzemeler küçük boyutları sayesinde hücrenin bariyerlerini aşabilirler ve bu sebeple toksikolojik açıdan endişe uyandırmaktadırlar. Biyomedikal alanı da içine alan birçok alandaki uygulamanın potansiyel yapı taşı olan nano malzemelerin yukarıda bahsedilen endişe uyandırıcı özellikleri nedeni ile sitotoksikite açısından tam olarak aydınlatılmaları gerekmektedir.

Bu çalışmada, iki farklı hücre tipi; hPDLF ve mDF seçilen üç nanoparçacığın sitotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır.

hPDLF hücreleri (Şekil 5.1 a) alveolar kemik ve dişin sement tabakası arasında bulunan diş kökü hücreleridir. Hastalara uygulanan uzun süreli tedavilerden biri olan dental implantlar periodontal bağ dokusu içinden geçtiği için hPDLF hücreleri ile doğrudan temas halinde bulunmaktadır. Periodontal doku mühendisliği ve dental implantların (Şekil 5.1 b) geliştirilmesi gibi diş uygulamaları için tasarlanmış malzemeler üzerine yayımlanmış veya devam eden birçok araştırmada, olağanüstü yapısal özelliklerinden faydalanmak için nanoparçacıklar kullanılmaktadır (Kong vd. 2006, Wang vd. 2007, Jurczyk 2012). Ne var ki dental implant malzemelerinin *in vivo* ortamda bozunması ve/veya aşınması son derece mümkündür ve periprostetik dokular ve/veya diğer organlarda nano boyutlu kalıntılar olarak bu malzemelere rastlandığı bildirilmiştir (Yang ve Webster 2012).

mDF, yara iyileşmesinin önemli faktörlerinden olan dermis tabakası içindeki cildin kollajen üreten hücreleridir (Thangapazham vd. 2014). Son yıllarda, nanoparçacıklar, yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalara antimikrobiyal maddeler olarak dahil edilmiştir (Simmons vd. 2009, Zhou vd. 2010, Anghel vd. 2012, Grumezescu vd. 2014).

Ayrıca, cilt kremleri ve diş macunları gibi kozmetik ürünlere de NP'ların ilave edilmesi araştırılmakta ve NP'ların endüstrideki kullanım alanları genişlemektedir (Takada vd. 2006, Lens 2011, Inui vd. 2011, Benn vd. 2011, Inui vd. 2014).



Şekil 5.1 a. Periodontal ligament fibroblast hücreleri, (Archana vd. 2014'ten değiştirilerek alınmıştır) b. Dental implant (<http://www.lichoudds.com/dental-implants.html> 2016 adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

Nanoparçacıkların dermal hücrelere ulaşmasının tek yolu kozmetik ürünler aracılığıyla dermal maruziyet değildir, bu nanoparçacıkların ticari üretimi mesleki maruziyet riskini de ortaya çıkarmaktadır. TDKNT üzerine yapılan bir çalışmada (Maynard vd. 2004), el başına 0.2-6 mg mesleki dermal maruziyet saptandığı bildirilmiştir. Belirtilen gerekçelerle, bu çalışmada iki tip fibroblast hücresi; hPDLF ve mDF prototip olarak seçilmiştir.

Bildiğimiz kadarıyla, hPDLF ve mDF hücreleri üzerine C_{60} , TDKNT ve Fe_3O_4 NP'larının sitotoksik etkileri ilk olarak bu çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca, hPDLF ve mDF hücrelerinin seçilen nanoparçacıklara verdikleri proliferatif sitotoksik yanıtlar xCELLigence sistemi ile ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir. Geleneksel *in vitro* sitotoksikite testlerinin (MTT, LDH ve ROT) nispeten yeni empedans ölçümüne dayalı xCELLigence sistemi ile karşılaştırılması da çalışmanın amaçlarındandır.

Seçilen NP'ların XRD desenleri toksisiteye etki edebilecek olan boyut ve yapısal özellikler hakkında bilgi vermektedir. C₆₀ rg yapısı için elde edilen XRD kırınım deseni (Şekil 4.1.a) daha önce literatürde yayınlanan desenlerle uyum sağlamaktadır (Pu vd. 2014), (JCPDS file No.44-0558). Bragg eşıtliği kullanılarak yapılan hesaplamadan elde edilen sonuçlar, TDKNT'nin grafitteki düzlemler arası ayrılmaya benzer bir ayrılmaya (mesafelenmeye) sahip olduğunu gstermişıtir. TDKNT kırınım deseniindeki nispeten genişı (002) piki, TDKNT'nin tipik amorf yapısını ve kusurlu uzun aralıklı düzenli yapısını yansıtmaktadır (Şekil 4.1.b) ve bu bulgular daha önce yayınlanmış bir çalışmanın bulguları ile de örtüşmektedir (Ng vd. 2005). Fe₃O₄ NP'larının tüm kırınım pikleri (Şekil 4.1.c) standart JCPDS deseni ile (JCPDS Kart No. 79-0417) ve daha önce yayınlanmış başka bir çalışmada elde edilen desenle (El Ghandoor vd. 2012) uyumludur. Elde edilen kırınım deseni incelendiğinde kübik spinel bir yapıyı işaret etmektedir. Piklerin genişlikleri Fe₃O₄ NP'larının kristal yapıda olduklarını göstermektedir. XRD kırınım desenlerinde herhangi bir safsızlık fazına rastlanmamıştır.

Fe₃O₄ veya diğer adıyla manyetitın oksijen varlığında termodinamik açıdan kararsız olduğu bilinmektedir. Oda sıcaklığında kendiliğinden yavaşça önce magemite (γ -Fe₂O₃) ve daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında ise hematite (Fe₂O₃) oksitlenir (Tang vd. 2003). Ayrıca, nano boyutlu Fe₃O₄, nano olmayan formuna (bulk) göre daha az kararlıdır ve büyük yüzey alanı sebebiyle magemite daha kolay oksitlenebilir (Schwertmann ve Cornell 2006). Bu sebeple, Fe₃O₄ NP'ları içinde her hangi bir oksidasyon ürününün oluşup oluşmadığının tespit edilmesi önemlidir, zira bu durum NP'ların aktivitesine etki edebilir ve dolayısıyla hücresel toksik cevabın değişmesine yol açabilir.

Manyetit ve magemitin XRD piklerinin (Şekil 4.1.c) her ikisi de kübik yapıda ve hemen hemen aynı açıda kristallenirler. Bu nedenle, bu iki demir oksit türünü XRD yöntemi ile birbirinden ayırt etmek oldukça zordur. Bu durumda manyetik Fe₃O₄ NP'larının ayrıntılı yapı ve oksidasyon durumunu belirlemekte yetersiz kalan XRD tekniğine ek olarak demir içeren bileşiklerin incelenmesinde hassaslığı ve spesifikliği ile iyi bilinen bir lokal ölçüm tekniği olan Mössbauer spektroskopisi tekniği kullanılmıştır.

Gözlemlenen Mössbauer spektrumu ve ölçülen parametreler Andrade ve arkadaşları tarafından yayımlanan spektruma benzerlik göstermektedir (Andrade vd. 2009). Fe_3O_4 NP'lerinin Mössbauer spektrumu, ölçümlenen numuneler içinde magnetit, magemit ve hematit kristal fazlarının her üçünün de bulunduğunu düşündürmektedir. Bu durum, nanoparçacıkların sentezlenme ve/veya daha büyük ihtimalle depolama sırasında havada kısmi oksidasyona uğramalarının bir sonucu olabilir. Parçacıkların nano boyutta olmaları yüksek yüzey alanına bağlı olarak oksidasyon işlemini kolaylaştırmakta ve Fe_3O_4 nanoparçacıkların yüzeyi kısmen oksitlenmiş bir manyetit çekirdeğe dönüşmesine sebep olmaktadır. Hafifçe genişlemiş rezonans çizgileri partikül boyutunun küçük olmasının bir sonucu olabilir ki bu aynı zamanda Hf değerinin nano boyutta olmayan (bulk) malzemeye göre azalmasına sebep olur (Schwertmann ve Cornell 2006).

Nanoparçacıkların özgül yüzey alanı BET analizi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, TDKNT'nin C_{60} ve Fe_3O_4 'e kıyasla daha büyük bir yüzey alanına sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2). Bu durumda TDKNT 'nin daha yüksek bir reaktifliğe sahip olduğu söylenebilir. Reaktifliğin yüksek olması da toksik etkiyi arttıran bir faktör olarak değerlendirilebilir.

NP'ların hücre kültürü ortamındaki kümelenme davranışı hakkında bilgi edinmek için, hidrodinamik boyutlar besiyeri ortamında ölçülerek belirlenmiştir. Ölçülen hidrodinamik çapların değerlerinin, her üç NP için TEM ya da XRD ile ölçülen çaplardan (Çizelge 4.2) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun başlıca iki olası sebebi olabilir; ilk olarak nanoparçacıklar hücre kültürü ortamı içinde disperse edildiğinde, bir elektrik dipol tabakası yüzeye tutunarak NP etrafında bir katman oluşturur ve DLS ile ölçülen partikül çapına bu katmanın kalınlığı da eklenir. İkinci neden ise, parçacıkların hücre kültürü ortamına girdiklerinde kümeler veya yığınlar oluşturma eğiliminde olmalarıdır (Carvalho vd. 2016).

Nanoparçacıkların karakterizasyonu için TEM kullanılmıştır. Elde edilen TEM mikrograflarının (Şekil 4.5) literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. C_{60} yığınlarının ortalama çapı 34.64 nm olarak belirlenmiştir. C_{60} yığınlarının saydam görünüşlerinin sebebi elektronca yoğun olmayan yapıları ile ilgilidir (Şekil 4.5.a).

Yığınların paralel olarak üst üste binmiş görünümü, C₆₀ NP'lerinin kristal yapısının bir sonucu olabilir. Fe₃O₄ NP'lerinin parçacık boyutu TEM verilerine göre yaklaşık olarak 19.44 ile 36.11 nm arasında değişmektedir ve ortalama olarak 28.33 nm'dir. Bu veriler XRD ölçümlerinden elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir.

NP'ların hücre içine alımı ve lokalizasyonun belirlenmesi ile NP maruziyetinin hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılması için de TEM yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerin NP maruziyeti öncesi ve sonrası elde edilen mikrograflarının incelenmesi sonucunda, kontrol hücreleri ile NP'lara maruz bırakılmış hücreler arasında bazı farklılıklar olduğu görülmüştür. Hem hPDLF hem de mDF hücrelerinin kontrol grubunun normal bir morfolojiye ve sağlam bir hücre membranı ile endoplazmik retikulumu sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.9.a ve 4.9.b).

C₆₀ ile muamele edilen hPDLF hücrelerinde sayıca artmış ve büyümüş vakuoller haricinde belirgin bir hücre hasarına rastlanmamıştır (Şekil 4.9.c). mDF hücrelerinin düzensiz bir granüllü endoplazmik retikulum yapısına sahip oldukları ve vakuollerinde de C₆₀ NP'lerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9.d). Belirgin bir membran cepçığı (bleb) oluşumuna rastlanmamıştır.

TDKNT ile muamele edilen hPDLF hücrelerinin nükleer oluklanma ve kıvrımlanmaların bir sonucu olarak düzensiz, girinti çıkıntılı bir nükleus sınırına ve şekline sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.e). Bu aynı zamanda malign hücre çekirdeğinde de görülen karakteristik bir morfolojik anormalliktir (Dey 2010). TDKNT ile muamele edilmiş mDF hücrelerinde ise karanlık görünen (elektronca yoğun) bölgeler dikkat çekmektedir (Şekil 4.9.f).

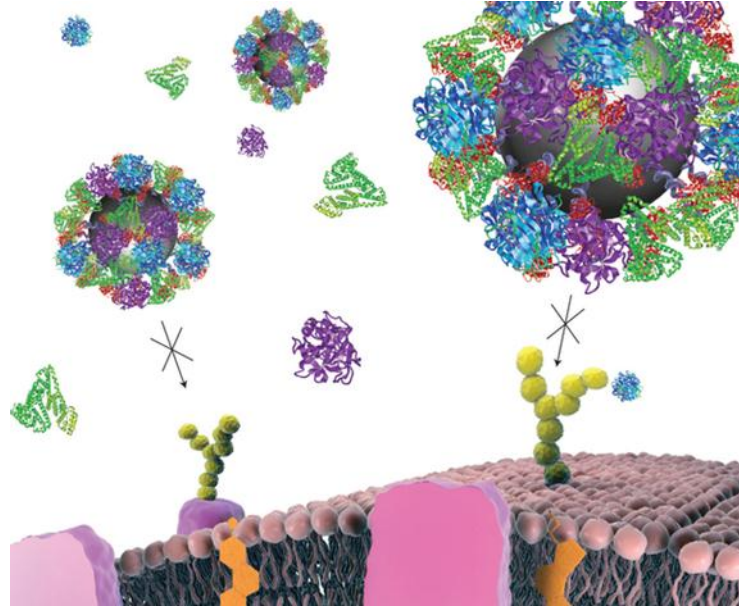
İncelenen NP'lar arasında Fe₃O₄ NP'larına maruz bırakılan hücrelerle kontrol hücreleri arasındaki bazı farklılıklar dikkat çekmiştir. hPDLF ve mDF hücrelerinin her ikisinde de sitoplazmada ya da sitoplazmik veziküllerde Fe₃O₄ öbeklerine rastlanmıştır. Belirgin sayıda endositotik-eksositotik veziküllerin hücre membranı üzerinde biriktiği görülmüştür. Özellikle Fe₃O₄ ile muamele edilmiş hPDLF hücrelerinde yoğun bir membran cepçığı oluşumu dikkat çekicidir (Şekil 4.9.g).

Fe₃O₄ ile muamele edilmiş mDF hücrelerinde de bir mikrovillus ağıyla beraber membranda cepçik oluşumu görülmektedir (Şekil 4.9.h).

Hücrelerin, membranları üzerinde küçük çıkıntılar-cepçikler şeklinde gözlemlenen anormal morfolojiyi NP'lar tarafından tetiklenen toksisitenin bir sonucu olarak ortaya çıkan hücre hasarı ve nekrozun bir belirtisi olarak sergiledikleri düşünülmektedir. Bu bulguya paralel olarak, daha önce literatürde Fe₃O₄ NP'na maruz bırakılan farklı türde hücreler üzerine yapılan çalışmalarda da (Yurchenko vd. 2010, Sadhukha vd. 2014) membranda cepçik oluşumu gözlenmiştir. Membranda cepçiklerin oluşumu ayrıca hücre ölümünün bir işareti olarak apoptozis ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda hücre-hücre temasının da kaybedildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular Fe₃O₄ NP'larının ROT oluşumuna bağlı olarak apoptozisi tetiklemiş olabileceğini akla getirmektedir ki bu durum, daha önce Ramesh vd. ve Shi vd. tarafından yapılan çalışmalarda (Ramesh vd. 2012, Shi vd. 2012) rapor edilen bulgularla da örtüşmektedir.

NP'ların hücre içine giriş yolu ve hücre içine giren NP miktarı sadece NP'ların fizikokimyasal özelliklerine ve boyutlarına değil, aynı zamanda hücre türüne de oldukça bağlıdır. NP'ların ekstraselüler matriks, hücre membranı ve sitoplazma ile etkileşimi NP'ların öbeklenme (aglomerasyon) davranışı ile de ilgilidir ki öbeklenme davranışı NP'ların etkin boyutunu, şeklini ve dolayısıyla temas yüzey alanını, hareket ve hücre içine giriş kabiliyetini de belirleyici bir rol oynar. Öbeklenme eğilimi düşük olan NP'lar hücre içine daha kolay girebilirler ve bu durum öbeklenmeye eğilimi olan NP'lara göre maruziyet dozunun daha yüksek olmasına sebep olur. Öbeklenme davranışı NP'lar için yaygın bir durumdur çünkü çoğunun hücre ortamında proteinler gibi moleküllerle etkileşerek protein korona (Şekil 5.2) oluşturabilecek yüzey yükleri vardır. Ayrıca NP'ların doğrudan membrandan geçiş için yeterince küçük olmaları öbeklenme durumunda mümkün olmayacağı için endositotik alım haricinde hücre içine girişi engelleyebilir (Nazarenus vd. 2014).

C₆₀ ve TDKNT'ler karbon atomlarının birbirine kuvvetli kovalent bağlarla bağlı olduğu sentetik bir karbon allotropları ailesidir. C₆₀ ve TDKNT'lerin sahip olduğu hidrofobik yüzey, $\pi\pi$ - $\pi\pi$ ve/veya van der Waals etkileşimleri aracılığı ile geniş bir madde sınıfını adsorbe edebilir. Fe₃O₄, C₆₀ ve TDKNT nanopartikülleri hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile hücre kültür ortamında bulunan serum proteinlerini yüzeylerinde adsorbe edebilirler ki bu durum yüzey yüklerinde ve öbekenme davranışlarında değişikliğe sebep olur (Murdock vd. 2008). Ayrıca, Fe₃O₄ NP'ları süperparamanyetik davranış sergiler. Manyetik çekim kuvvetleri ile birlikte yüksek yüzey enerjileri sıvı içinde yoğun öbekleşmelere sebep olur. DLS ölçümlerinin sonuçları Fe₃O₄ NP öbeklerinin C₆₀ ve TDKNT öbeklerine göre daha büyük olduğunu göstermiştir.



Şekil 5.2 Hücre zarı ve NP'ların oluşturduğu protein koronanın şematik gösterimi (http://www.nature.com/nnano/journal/v8/n2/images_article/nnano.2013.11-f1.jpg a 2016)

NP'ların hücre içine girişi antioksidan mekanizmaların doğasını bozarak oksidatif stresi tetikleyebilir. Bu sebeple, seçilen hücrelerde NP maruziyet çalışması sonrasında oluşan oksidatif stres düzeyi araştırılmıştır. İncelenen her üç NP için ölçülen reaktif oksijen türü (ROT) seviyesinin kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hPDLF ve mDF hücrelerinin her ikisi için de maruziyetin 6. saati sonunda yükseldiği, ancak bu noktadan sonra zamana bağımlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde, daha önce yapılan çeşitli çalışmalar da ROT seviyelerinin başlangıçta yükselmesine rağmen ilerleyen zaman noktalarında azaldığını bildirmiştir (Hussain vd. 2005, Kuo vd. 2009). Bu durum, hücrelerin hücre içi adaptasyon sürecinde antioksidan mekanizmalarının tetiklenmesi ve indirgenmiş glutatyon (GsH) ve tiyoredoksin (TrX) gibi, reaktif oksijen türlerini nötralize edebilecek moleküllerin salgılanması ile ROT seviyelerinin ilerleyen zaman noktalarında düşmesine sebep olması şeklinde açıklanabilir. Bir diğer muhtemel açıklama ise; maruziyetin ilk saatlerinde oluşan serbest radikallerin NP'larla etkileşimi sonucu antioksidan benzeri bir mekanizma ile ROT seviyelerinin düşmesine sebep olması olabilir. Bu açıklama, özellikle antioksidan özellikleri ile bilimsel çalışmalara konu olmuş C₆₀ ve TDKNT için literatürle uyum sağlamaktadır (Wang vd. 1999, Gharbi vd. 2005, Galano 2010, Johnston vd. 2010). ROT seviyelerinin yukarıda belirtildiği gibi zamana bağlı olarak azalması sebebiyle, tüm NP'lar ve hücre tipleri için sadece ilk 6 saatte oluşan ROT değerleri dikkate alınmıştır.

Seçilen NP'ların hPDLF ve mDF hücreleri üzerindeki potansiyel toksik etkisi impedans temelli xCELLigence sistemi ile izlenmiştir. Her iki hücrenin de gerekli NCI değeri olan 1'e (Meindl vd. 2013) 24 saatten daha az bir sürede ulaştığı ve dolayısıyla xCELLigence sistemine uygun olduğu tespit edilmiştir. NP ile muamele edilmiş hücreler için toksisitenin derecesi, NP'lara maruz bırakılmamış kontrol hücrelerinin NCI değerine göre NCI değerindeki azalma olarak ifade edilmiştir. Elde edilen NCI değerlerinin, kullanılan NP türüne ve hücre tipine bağlı olarak belirgin şekilde birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. hPDLF hücrelerinde en düşük toksisite seviyesini TDKNT oluştururken, mDF hücrelerinin TDKNT maruziyetine daha duyarlı olduğu görülmüştür. mDF hücreleri için en belirgin toksik etkiyi ise Fe₃O₄ NP oluşturmuştur. Bu bulgular, sitotoksik cevabın hedef hücre türüne bağlı olduğunu doğrulamaktadır. TDKNT ile daha önce yapılan bir toksisite çalışmasının sonuçları da (Hu vd. 2010) bu bulgu ile oldukça uyumludur. Söz konusu çalışmada test edilen üç hücre dizisinin her biri NP maruziyetine farklı bir toksik cevap oluşturmuştur. Ayrıca, farklı gruplar tarafından yürütülen çalışmalarda da (Treichel vd. 2004, Falcão vd. 2006, Patra vd. 2007, Sohaebuddin vd. 2010, Suresh vd. 2012) benzer sonuçlar vurgulanmaktadır.

Bu çalışmada gerçekleştirilen empedans ölçümlerinin sonuçları da seçilen NP'ların farklı hücreler üzerinde farklı sitotoksik etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Hücrelerin NP'lara karşı farklı sitotoksik cevaplar vermelerinin olası sebebi, farklı hücrelerin farklı hücre membranı kompozisyonuna sahip olmaları olabilir; çünkü hücre membranlarındaki bu fark, NP'ların hücre içine alım mekanizmasını ve dolayısıyla hücre içine giren NP miktarını değiştirebilir. Ayrıca, hücrelerin vücuttaki konum ve fonksiyonlarına bağlı olarak farklı hücresel savunma mekanizmalarına sahip olmaları verdikleri sitotoksik cevabın farklılık göstermesinin sebeplerinden biri olabilir. Farklı hücrelerin farklı ortamları tolere edebilmek için farklı adaptasyon becerilerine sahip olmaları da (Williams vd. 2002) diğer bir muhtemel sebep olarak sayılabilir.

Özetle, hPDLF ve mDF hücrelerinin TDKNT, C₆₀ ve Fe₃O₄ NP'ları ile maruziyet çalışmaları; mDF hücrelerinin, hPDLF hücreleri ile karşılaştırıldığında, NP maruziyetine daha duyarlı olduğunu ortaya koymuştur. hPDLF hücreleri için en düşük toksik etkinin TDKNT tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. mDF hücreleri için en belirgin toksik etki Fe₃O₄ NP tarafından oluşturulmuştur. Sonuç olarak, her biri biyomedikal malzemelerin potansiyel yapıtaşı olan, incelenen üç NP'nın da maruz kalınan konsantrasyonlarının toksik cevap oluşturmayacak seviyede tutulması koşulu ile biyoyumumluluk açısından uygun adaylar oldukları söylenebilir.

Daha önce yapılan toksisite çalışmalarının sonuçlarına göre TDKNT için NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) tarafından tavsiye edilen iş yeri maruziyet limiti (Recommended Exposure Limit -REL) değeri günlük sekiz saatlik bir çalışma süresi için 1 µg/ m³ olarak belirlenmiştir (2013). Fulleren için belirlenen bir limit olmamakla birlikte, NIOSH tarafından elementel karbon için tavsiye edilen REL değeri de TDKNT için önerilen değerle aynıdır. Manyetit için ise OSHA (Occupational Safety and Health Administration) tarafından izin verilen maruziyet limiti (Permissible Exposure Limit -PEL) 10 mg/m³ olarak açıklanmıştır (2009)

Bu verilerle birlikte bu çalışmanın bulguları göz önüne alındığında, seçilen iki hücre tipinin verdiği farklı toksik cevaplar, biyomalzemenin muhtemel uygulama bölgesi ve kullanım amacı hakkında fikir verebilir. Örneğin TDKNT NP'larına hPDLF hücrelerinin gösterdiği düşük sitotoksosite sebebiyle uygun derişim aralığında diş hekimliğı uygulamaları için biyouyumlu bir nano malzeme olarak nitelendirilebilir. mDF hücreleri ile yapılacak çalışmalarda ise denemelerde kullanılan en düşük derişim miktarlarının maksimum maruziyet derişimi olarak kullanılması koşulu ile her üç NP'ın biyomedikal alanda kullanıma uygun olduğu söylenebilir.

NP'lar kullanılarak toksik açıdan güvenli biyomalzemeler üretilebilmesi için daha fazla farklı türde hücre ile çalışmalar yürütülerek bu hücrelerin NP'lara verecekleri kendilerine has cevaplar, güvenli maruziyet dozları ve adaptasyon kabiliyetleri belirlenmelidir. Bu çalışmaların ışığında daha fazla sayıda ve türde NP'ın FDA (Food and Drug Administration), WHO (World Health Organisation) ve EMA (European Medicines Agency) gibi kuruluşlarca onaylanarak kontrollü ilaç salınımı, yara iyileşmesi, dental uygulamalar gibi biyomedikal alanlarda rutin olarak kullanılması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akasaka, T., Nakata, K., Uo, M., and Watari, F. 2009. Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes. *Bio-medical materials and engineering*, 19(2-3); 179-185.
- Albandar, J.M. 2005. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 49(3); 517-532.
- Andrade, Â.L., Souza, D.M., Pereira, M.C., Fabris, J.D., and Domingues, R.Z. 2009. Magnetic properties of nanoparticles obtained by different chemical routes. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 9(3); 2081-2087.
- Andreoli, E., Suzuki, R., Orbaek, A.W., Bhutani, M.S., Hauge, R.H., Adams, W., Fleming, J.B. and Barron, A.R. 2014. Preparation and evaluation of polyethyleneimine-single walled carbon nanotube conjugates as vectors for pancreatic cancer treatment. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(29); 4740-4747.
- Anghel, I., Grumezescu, A.M., Andronescu, E., Anghel, A.G., Ficai, A., Saviuc, C., Grumezescu, V., Vasile B.S. and Chifiriuc, M.C. 2012. Magnetite nanoparticles for functionalized textile dressing to prevent fungal biofilms development. *Nanoscale research letters*, 7(1); 1.
- Anghel, I., Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Andronescu, E., Ficai, A., Anghel, A.G., Maganu, M., Lazăr, V. and Chifiriuc, M.C. 2012. Modified wound dressing with phyto-nanostructured coating to prevent staphylococcal and pseudomonal biofilm development. *Nanoscale research letters*, 7(1); 1-8.
- Ankamwar, B., Lai, T.C., Huang, J.H., Liu, R.S., Hsiao, M., Chen, C.H. and Hwu, Y.K. 2010. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology*, 21(7); 075102.
- Anonymous. 2008. Instruments, Malvern. Zetasizer nano user manual. Man 317 (2008): 6-2. England.
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://archive.cnx.org/contents/f5c058e0-41f2-4ef6-878b-2fdc07760129@1/bet-surface-area-analysis-of-nanoparticles>, Erişim Tarihi: 28.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://frimat.unifr.ch/frimat/en/page/485>, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://laser.spbu.ru/en/research-eng/dzeta-eng.html>, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques>, Erişim Tarihi: 23.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: http://www.aceabio.com.cn/images/cartoon_pic.jpg, Erişim Tarihi: 24.10.2016

- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigence-Tech-Overview-Fig-1.jpg>, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/139288-An-Overview-of-the-Zeta-Potential-Part-3-Uses-and-Applications/>, An Overview of the Zeta Potential - Part 1: The Concept, American pharmaceuticals review (2013), Erişim Tarihi: 25.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.fritsch-international.com/particle-sizing/fritsch-knowledge/hydrodynamic-diameter>, Erişim Tarihi: 26.10.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.istcgroup.com/pdf/NOVA%20Series.pdf>, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.lichoudds.com/dental-implants.html> Erişim Tarihi: 28.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: http://www.nature.com/nnano/journal/v8/n2/images_article/nnano.2013.11-f1.jpg, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.wichlab.com/wp-content/uploads/2013/04/Size-comparison-Bio-nanoparticles.jpg>, Erişim Tarihi: 24.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://www.wichlab.com/wp-content/uploads/2013/04/Size-comparison-Bio-nanoparticles.jpg>, Erişim Tarihi: 27.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <https://discovery.kaust.edu.sa/cms/figure/index/5687c00e140ba025318b4568>, Erişim Tarihi: 25.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: https://nhmu.utah.edu/sites/default/files/styles/content-node-img/public/collection_object/a2805_Magnetite_0.jpg?itok=Ut_cn-gC//, Erişim Tarihi: 25.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <https://orgspectroscopyint.blogspot.com.tr/p/mossbauer-spectroscopy-spectroscopic.html>, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: https://www.researchgate.net/publication/275834023_Zeta_potential, Erişim Tarihi: 26.11.2016
- Archana, A., Srikanth, V., & Kurien, B. (2014). Fibroblast Heterogeneity in Periodontium—a Review. International Journal of Dental Sciences and Research, 2(3); 50-54

- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P. and Wiesner, M.R. 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10); 634-641.
- Baktur, R., Patel, H. and Kwon, S. 2011. Effect of exposure conditions on SWCNT-induced inflammatory response in human alveolar epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 25(5); 1153-1160.
- Benn, T.M., Westerhoff, P. and Herckes, P. 2011. Detection of fullerenes (C 60 and C 70) in commercial cosmetics. *Environmental pollution*, 159(5); 1334-1342.
- Bhardwaj, A., Bhardwaj, A., Misuriya, A., Maroli, S., Manjula, S. and Singh, A.K. 2014. Nanotechnology in dentistry: present and future. *Journal of international oral health: JIOH*, 6(1); 121.
- Britz, D. A. and Khlobystov, A. N. 2006. Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews*, 35(7); 637-659.
- Brunauer, S., Emmett, P. H. and Teller, E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, pp. 309-319
- Buyukhatipoglu, K. and Clyne, A. M. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96(1); 186-195.
- Callister, W. D. and Rethwisch, D. G. 2007. *Materials science and engineering: an introduction* (Vol. 7, pp. 665-715). New York: Wiley
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L. and Schlager, J.J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43); 13608-13619.
- Carvalho, K.P., Martins, N.B., Ribeiro, A.R.L.P., Lopes, T.S., de Sena, R.C., Sommer, P. and Granjeiro, J.M. 2016. Optimized method of dispersion of titanium dioxide nanoparticles for evaluation of safety aspects in cosmetics. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(8); 244.
- Chifiriuc, M.C., Grumezescu, A.M., Andronesu, E., Fikai, A., Cotar, A.I., Grumezescu, V., Bezirtzoglou, E., Lazar, V. and Radulescu, R. 2013. Water dispersible magnetite nanoparticles influence the efficacy of antibiotics against planktonic and biofilm embedded *Enterococcus faecalis* cells. *Anaerobe*, 22, 14-19.
- Cicchetti, R., Divizia, M., Valentini, F. and Argentin, G. 2011. Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: geno-cytotoxic risk. *Toxicology in Vitro*, 25(8); 1811-1819.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U. 2001. *The Iron Oxides. Structure, Properties*. Wiley Online Library

- Cullity, B.D., Stock, S.R. and Stock, S. 2001. Elements of X-ray Diffraction, 3rd edition Prentice Hall. New Jersey.
- Dąbrowski, A. 2001. Adsorption—from theory to practice. *Advances in colloid and interface science*, 93(1); 135-224.
- Dey, P. 2010. Cancer nucleus: morphology and beyond. *Diagnostic cytopathology*, 38(5); 382-390
- Di Turi, G., Riggio, C., Vittorio, O., Marconcini, S., Briguglio, F., Funel, N., Campani, D., Barone, A., Raffa, V. and Covani, U. 2012. Sub-Micrometric Liposomes as Drug Delivery Systems in the Treatment and Periodontitis. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 25(3); 657-670
- Diaz, B., Sánchez-Espinel, C., Arruebo, M., Faro, J., de Miguel, E., Magadán, S., Yagüe, C., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaría, J. and González-Fernández, A. 2008. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small*, 4(11); 2025-2034.
- Dissanayake, N.M., Current, K.M. and Obare, S.O. 2015. Mutagenic effects of Iron oxide nanoparticles on biological cells. *International journal of molecular sciences*, 16(10); 23482-23516.)
- El Ghandoor, H., Zidan, H.M., Khalil, M.M. and Ismail, M.I.M. 2012. Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(6); 5734-5745.
- Elcin, Y.M., Elcin, A.E. and Pappas, G.D. 2003. Functional and morphological characteristics of bovine adrenal chromaffin cells on macroporous poly (D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds. *Tissue engineering*, 9(5); 1047-1056.
- Emin, N., Koç, A., Durkut, S., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2008. Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: Effects of TGF- β 1 and microgravity bioreactor culture. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36(2); 123-137.
- Falcão, A.S., Fernandes, A., Brito, M.A., Silva, R.F. and Brites, D. 2006. Bilirubin-induced immunostimulant effects and toxicity vary with neural cell type and maturation state. *Acta neuropathologica*, 112(1); 95-105.
- Fouriki, A. and Dobson, J. 2013. Nanomagnetic gene transfection for non-viral gene delivery in NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Materials*, 6(1); 255-264.
- Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.M., Ray, P.C. and Yu, H. 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *Journal of food and drug analysis*, 22(1); 64-75
- Galano, A. 2010. Carbon nanotubes: promising agents against free radicals. *Nanoscale*, 2(3); 373-380.

- Ganesh, E.N. 2013. Single walled and multi walled carbon nanotube structure, synthesis and applications. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)* ISSN, 2278-3075.
- Gharbi, N., Pressac, M., Hadchouel, M., Szwarc, H., Wilson, S.R. and Moussa, F. 2005. [60] fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters*, 5(12); 2578-2585.
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A. 2012. *Chemistry of the Elements*. Elsevier.
- Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Andronescu, E., Mogoşanu, G.D., Vasile, B.S., Chifiriuc, M.C., Lazar, V., Andrei, E., Constantinescu, A. and Maniu, H. 2014. Anionic polymers and 10nm Fe₃O₄@ UA wound dressings support human foetal stem cells normal development and exhibit great antimicrobial properties. *International journal of pharmaceutics*, 463(2); 146-154
- Gupta, A., Main, B.J., Taylor, B.L., Gupta, M., Whitworth, C.A., Cady, C., Freeman, J.W. and El-Amin, S.F. 2014. In vitro evaluation of three-dimensional single-walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(11); 4118-4126.
- Hernández-Ferrer, J., Pérez-Bruzón, R.N., Azanza, M.J., Gonzalez, M., Moral, R., Ansón-Casaos, A., Fuente, J.M., Marijuan, P.C. and Martínez, M.T. 2014. Study of neuron survival on polypyrrole-embedded single-walled carbon nanotube substrates for long-term growth conditions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12); 4443-4454.
- Hoo, C.M., Starostin, N., West, P. and Mecartney, M.L. 2008. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1); 89-96.
- Hu, X., Cook, S., Wang, P., Hwang, H.M., Liu, X. and Williams, Q.L. 2010. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. *Science of the Total Environment*, 408(8); 1812-1817.
- Hunter, R.J. 2013. *Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2)*. Academic press.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. and Schlager, J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7); 975-983.
- Inanç, B., Eser Elçin, A., Koç, A., Baloş, K., Parlar, A. and Murat Elcin, Y. 2007. Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan–hydroxyapatite microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82(4); 917-926.
- Inui, S., Aoshima, H., Nishiyama, A. and Itami, S. 2011. Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: unique impact on skin care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(2); 238-241.

- Inui, S., Mori, A., Ito, M., Hyodo, S. and Itami, S. 2014. Reduction of conspicuous facial pores by topical fullerene: possible role in the suppression of PGE 2 production in the skin. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1); 1.
- Ito, A., Hayashida, M., Honda, H., Hata, K.I., Kagami, H., Ueda, M. and Kobayashi, T. 2004. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue engineering*, 10(5-6); 873-880.
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Aschberger, K. and Stone, V. 2010. The Biological Mechanisms and Physicochemical Characteristics Responsible for Driving Fullerene Toxicity. *Toxicological Sciences*, 114(2); 162-182.
- Jun, Y.W., Huh, Y.M., Choi, J.S., Lee, J.H., Song, H.T., Kim, S., Yoon, S., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S. and Cheon J. 2005. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16); 5732-5733.
- Jurczyk, M. (Ed.). 2012. *Bionanomaterials for Dental Applications*. CRC Press.
- Kanaparthi, R. and Kanaparthi, A. 2011. The changing face of dentistry: nanotechnology. *Int J Nanomedicine*, 6, 2799-804.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P. and Möller, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters*, 188(2); 112-118
- Kim, J.S. and Yu, I.J. 2014. Single-wall carbon nanotubes (SWCNT) induce cytotoxicity and genotoxicity produced by reactive oxygen species (ROS) generation in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated male human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(19); 1141-1153.
- Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M. and Lee, S.B. 2011. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*, 6(5); 929-941.
- Kong, L.X., Peng, Z., Li, S.D. and Bartold, P.M. 2006. Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 40(1); 184-196.
- Könczöl, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski, R., Gieré, R., Grobéty, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. and Mersch-Sundermann, V. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology*, 24(9); 1460-1475.
- Kreupl, F., Graham, A.P., Duesberg, G.S., Steinhögl, W., Liebau, M., Unger, E. and Hönlein, W. 2002. Carbon nanotubes in interconnect applications. *Microelectronic Engineering*, 64(1); 399-408.

- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. and Schnekenburger, J. 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology*, 86(7); 1123-1136.
- Kukreja, B.J., Dodwad, V. and Singh, T. 2012. Robotic Dentistry-The Future is at the horizon. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*; 16(16).
- Kuo, T.C., Yang, J.S., Lin, M.W., Hsu, S.C., Lin, J.J., Lin, H.J., Hsia, T.C., Liao, C.L., Yang, M.D., Fan, M.J., Wood, W.G. and Chung, J.G. 2009. Emodin has cytotoxic and protective effects in rat C6 glioma cells: roles of Mdr1a and nuclear factor κ B in cell survival. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(3); 736-744.
- Kyzyma, E.A., Tomchuk, A.A., Bulavin, L.A., Petrenko, V.I., Almasy, L., Korobov, M.V., Volkov, D.S., Mikheev, I.V., Koshlan I.V., Koshlan N.A., Avdeev, M.V., Aksenov, V.L. and Blaha, P. 2015. Structure and toxicity of aqueous fullerene C60 solutions. *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 9(1); 1-5.
- Lens, M. 2009. Use of fullerenes in cosmetics. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(2); 118-123.
- Lens, M. 2011. Recent progresses in application of fullerenes in cosmetics. *Recent patents on biotechnology*, 5(2); 67-73.
- Levi, N., Hantgan, R.R., Lively, M.O., Carroll, D.L. and Prasad, G.L. 2006. C60-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *Journal of Nanobiotechnology*, 4(1); 14.
- Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, 4(1); 26-49
- Lichti, U., Anders, J. and Yuspa, S.H. 2008. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nature protocols*, 3(5); 799-810.
- Madani, S.Y., Naderi, N., Dissanayake, O., Tan, A. and Seifalian, A.M. 2011. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomedicine*, 6, 2963-2979.
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M.A. and Hosseinkhani, M. 2011. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS nano*, 5(9); 7263-7276.
- Manke, A., Wang, L. and Rojanasakul, Y. 2013. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, 2013.
- Markovic, Z. and Trajkovic, V. 2008. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C 60). *Biomaterials*, 29(26); 3561-3573.

- Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R. and Castranova, V. 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67(1); 87-107.
- Meindl, C., Absenger, M., Roblegg, E. and Fröhlich, E. 2013. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. *BioMed research international*, 2013.
- Meng, L., Zhang, X., Lu, Q., Fei, Z. and Dyson, P.J. 2012. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: targeting doxorubicin to tumors. *Biomaterials*, 33(6); 1689-1698.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J. and Hussain, S.M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, 101(2); 239-253.
- Nan, A., Bai, X., Son, S.J., Lee, S.B. and Ghandehari, H. 2008. Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano letters*, 8(8); 2150-2154.
- Nasterlack, M., Zober, A. and Oberlinner, C. 2008. Considerations on occupational medical surveillance in employees handling nanoparticles. *International archives of occupational and environmental health*, 81(6); 721-726.
- Nazareus, M., Zhang, Q., Soliman, M.G., del Pino, P., Pelaz, B., Carregal-Romero, S., Rejman, J., Rothen-Rutishauser, B., Clift, M.J., Zellner, R., Delehanty, J.B., Medintz, I.L., Parak, W.J. and Nienhaus, G.U. 2014. In vitro interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far?. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1); 1477-1490.
- Ng, S.H., Wang, J., Guo, Z.P., Chen, J., Wang, G.X. and Liu, H.K. 2005. Single wall carbon nanotube paper as anode for lithium-ion battery. *Electrochimica Acta*, 51(1); 23-28.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 823-839.
- Ostiguy, C., Roberge, B., Ménard, L. and Endo, C.A. 2009. Best practices guide to synthetic nanoparticle risk management. IRSST, report R-599, Montréal Québec
- Ozturk, F., Toy, E., Hatunoglu, E., Bozkurt, B.S. and Hakki, S.S. 2014. Real-time cell analysis of cytotoxicity of orthodontic cements on gingival fibroblasts. *Journal of Orthodontic Research*, 2(1); 32.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. and Jahnen-Dechent, W. 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11); 1941-1949
- Patil, U.S., Adireddy, S., Jaiswal, A., Mandava, S., Lee, B.R. and Chrisey, D.B. 2015. In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide

nanoparticles. International journal of molecular sciences, 16(10); 24417-24450.

- Patra, H.K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P. and Dasgupta, A.K. 2007. Cell selective response to gold nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(2); 111-119.
- Petersen, E.J. and Nelson, B.C. 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Analytical and bioanalytical chemistry, 398(2); 613-650.
- Pu, J., Mo, Y., Wan, S. and Wang, L. 2014. Fabrication of novel graphene–fullerene hybrid lubricating films based on self-assembly for MEMS applications. Chemical Communications, 50(4); 469-471.
- Pulicharla, R., Zolfaghari, M., Brar, S.K., Cledon, M., Drogui, P. and Surampalli, R.Y. 2014. Cosmetic Nanomaterials in Wastewater: Titanium Dioxide and Fullerenes. Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste, 20(1); B4014005
- Ramesh, V., Ravichandran, P., Copeland, C.L., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Goornavar, V., Ramesh, G.T. and Hall, J.C. 2012. Magnetite induces oxidative stress and apoptosis in lung epithelial cells. Molecular and cellular biochemistry, 363(1-2); 225-234.
- Ren, Y., Zhang, H., Chen, B., Cheng, J., Cai, X., Liu, R., Xia, G., Wu, W., Wang, S., Ding, J., Wang, J., Bao, W., Wang, L., Tian, L., Song, H., Wang, X. and Gao, C. 2012. Multifunctional magnetic Fe₃O₄ nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. International journal of nanomedicine, 7, 2261.
- Rodríguez-Yáñez, Y., Bahena-Urbe, D., Chávez-Munguía, B., López-Marure, R., González-Monroy, S., Cisneros, B. and Albores, A. 2015. Commercial single-walled carbon nanotubes effects in fibrinolysis of human umbilical vein endothelial cells. Toxicology in Vitro, 29(5); 1201-1214
- Sadhukha, T., Wiedmann, T.S. and Panyam, J. 2014. Enhancing therapeutic efficacy through designed aggregation of nanoparticles. Biomaterials, 35(27); 7860-7869.
- Sadighian, S., Rostamizadeh, K., Hosseini-Monfared, H. and Hamidi, M. 2014. Doxorubicin-conjugated core–shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 117, 406-413.
- Sayes, C.M., Fortner, J.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M., Ausman, K.D., Tao, Y.J., Sitharaman, B., Wilson, L.J., Hughes, J.B., Colvin, V.L. and West, J.L. 2004. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. Nano letters, 4(10); 1881-1887.
- Schulte, P., Geraci, C., Zumwalde, R., Hoover, M. and Kuempel, E. 2008. Occupational risk management of engineered nanoparticles. Journal of occupational and environmental hygiene, 5(4); 239-249.

- Scwertmann, U., and Cornell, R.M. 2006. The Iron Oxides, Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, Germany
- Shi, S.F., Jia, J.F., Guo, X.K., Zhao, Y.P., Liu, B.Y., Chen, D.S., Yongyuan, G. and Zhang, X.L. 2012. Toxicity of iron oxide nanoparticles against osteoblasts. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9); 1-11.
- Shimizu, K., Ito, A. and Honda, H. 2007. Mag-seeding of rat bone marrow stromal cells into porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(3); 171-177.
- Shipelin, V.A., Smirnova, T.A., Gmoshinskii, I.V. and Tutelyan, V.A. 2015. Analysis of Toxicity Biomarkers of Fullerene C60 Nanoparticles by Confocal Fluorescent Microscopy. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 158(4); 443-449.
- Simmons, T.J., Lee, S.H., Park, T.J., Hashim, D.P., Ajayan, P.M. and Linhardt, R.J. 2009. Antiseptic single wall carbon nanotube bandages. *Carbon*, 47(6); 1561-1564.
- Singh, N., Jenkins, G.J., Asadi, R., and Doak, S.H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews and Experiments*, 1
- Sitharaman, B., Shi, X., Tran, L.A., Spicer, P.P., Rusakova, I., Wilson, L.J. and Mikos, A.G. 2007. Injectable in situ cross-linkable nanocomposites of biodegradable polymers and carbon nanostructures for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(6); 655-671.
- Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D., Eaton, J.W. and Tang, L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and fibre toxicology*, 7(1); 1.
- Stephen, Z.R., Kievit, F.M. and Zhang, M. 2011. Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. *Materials Today*, 14(7); 330-338.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Morrell-Falvey, J.L., Gu, B. and Doktycz, M.J. 2012. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*, 28(5); 2727-2735.
- Şeker, Ş., Elçin, A.E., Yumak, T., Sınağ, A. and Elçin, Y.M. 2014. In vitro cytotoxicity of hydrothermally synthesized ZnO nanoparticles on human periodontal ligament fibroblast and mouse dermal fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, 28(8); 1349-1358.
- Taczak, M. 2007. Controlling the Structure and Properties of Carbon Nanotubes. Report No. MP070015, The MITRE Corporation, McLean, VA.
- Takada, H., Mimura, H., Xiao, L., Islam, R.M., Matsubayashi, K., Ito, S. and Miwa, N. 2006. Innovative Anti-Oxidant: Fullerene (INCI#: 7587) is as “Radical Sponge” on the Skin. Its High Level of Safety, Stability and Potential as

Premier Anti-Aging and Whitening Cosmetic Ingredient. Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures, 14(2-3); 335-341.

- Talbot, C. 1999. Fullerene and nanotube chemistry: an update. School science review, 81, 37-48
- Tang, J., Myers, M., Bosnick, K.A. and Brus, L.E. 2003. Magnetite Fe₃O₄ nanocrystals: spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics. The Journal of Physical Chemistry B, 107(30); 7501-7506.
- Thangapazham, R.L., Darling, T.N. and Meyerle, J. 2014. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. International journal of molecular sciences, 15(5); 8407-8427.
- Thompson, D.T. 2007. Using gold nanoparticles for catalysis. Nano Today, 2(4); 40-43..
- Tiefenauer, L. X., Tschirky, A., Kühne, G. and Andres, R.Y. 1996. In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. Magnetic resonance imaging, 14(4); 391-402.
- Treichel, J.L., Henry, M.M., Skumatz, C.M., Eells, J.T. and Burke, J.M. 2004. Antioxidants and ocular cell type differences in cytoprotection from formic acid toxicity in vitro. Toxicological sciences, 82(1); 183-192.
- Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y.N. and Miyata, N. 1996. Novel harmful effects of [60] fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. FEBS letters, 393(1); 139-145.
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. and Reichl, F.X. 2010. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. Dental materials, 26(1); 51-58
- Vetten, M.A., Tlotleng, N., Rascher, D.T., Skepu, A., Keter, F.K., Boodhia, K., Koekemoer, L.A., Andraos, C., Tshikhudo, R. and Gulumian, M. 2013. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. Particle and Fibre Toxicology, 10(1); 1-15.
- Wang, I.C., Tai, L.A., Lee, D.D., Kanakamma, P.P., Shen, C.K.F., Luh, T.Y., Cheng, C.H. and Hwang, K.C. 1999. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. Journal of medicinal chemistry, 42(22); 4614-4620.
- Wang, W., Watari, F., Omori, M., Liao, S., Zhu, Y., Yokoyama, A., Uo, M., Kimura, H. and Ohkubo, A. 2007. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 82(1); 223-230.
- Williams, G.M., and Iatropoulos, M.J. 2002. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. Toxicologic Pathology, 30(1); 41-53.

- Wydra, R.J., Oliver, C.E., Anderson, K.W., Dziubla, T.D. and Hilt, J.Z. 2015. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC advances*, 5(24); 18888-18893.
- Xiao, C., and Luong, J.H. 2005. Assessment of cytotoxicity by emerging impedance spectroscopy. *Toxicology and applied pharmacology*, 206(2); 102-112.
- Xie, Y., Liu, D., Cai, C., Chen, X., Zhou, Y., Wu, L., Sun, Y., Dai, H., Kong, X. and Liu, P. 2016. Size-dependent cytotoxicity of Fe₃O₄ nanoparticles induced by biphasic regulation of oxidative stress in different human hepatoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3557.
- Xing, J.Z., Zhu, L., Gabos, S. and Xie, L. 2006. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology in vitro*, 20(6); 995-1004.
- Yagmur, E., Ozmak, M. and Aktas, Z. 2008. A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. *Fuel*, 87(15); 3278-3285.
- Yang, L., and Webster, T.J. 2012. Biological responses to and toxicity of nanoscale implant materials. In *Degradation of Implant Materials* (pp. 481-508). Springer New York.
- Yoshida, Y., and Langouche, G. 2013. *Mössbauer Spectroscopy. Mössbauer Spectroscopy: Tutorial Book*, ISBN 978-3-642-32219-8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, 1.
- Yurchenko, O.V., Todor, I.N., Khayetsky, I.K., Tregubova, N.A., Yu Lukianova, N., Chekhun, V.F. 2010. Ultrastructural and some functional changes in tumor cells treated with stabilized iron oxide nanoparticles. *Exp. Oncol.* 32:237–242.
- Zelada-Guillén, G.A., Tweed-Kent, A., Niemann, M., Göringer, H.U., Riu, J. and Rius, F.X. 2013. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 366-371.
- Zhang, F., Xia, Y., Xu, L. and Gu, N. 2008. Surface modification and microstructure of single-walled carbon nanotubes for dental resin-based composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 86(1); 90-97.
- Zhang, Y., Ali, S.F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D. and Biris, A.S. 2010. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *Acs Nano*, 4(6); 3181-3186.
- Zhou, Z., Joslin, S., Dellinger, A., Ehrich, M., Brooks, B., Ren, Q., Rodeck, U., Lenk, R. and Kepley, C.L. 2010. A novel class of compounds with cutaneous wound healing properties. *Journal of biomedical nanotechnology*, 6(5); 605-611.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ

Doğum Yeri : Burdur

Doğum Tarihi : 22.05.1980

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: TED Ankara Koleji (1998)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2003)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2006)

Doktora: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2007-Aralık 2016)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2008-Halen)

SCI KAPSAMINDAKİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA MAKALELERİ

Dönmez Güngüneş, Ç., Şeker, Ş., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2016. A comparative study on the in vitro cytotoxic responses of two mammalian cell types to fullerenes, carbon nanotubes and iron oxide nanoparticles. Drug and Chemical Toxicology, 1-13.