

**FARKLI ÖZELLİKTEKİ ZnO
NANOPARTİKÜLLERİNİN FİBROBLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kenan IŞIK
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Ocak 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kenan IŞIK'ın “Farklı Özellikteki ZnO Nanopartiküllerinin Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin *İn Vitro* Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 28.12.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL
Üye : Doç. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ
Üye : Yard. Doç. Dr. Mediha CANBEK

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****FARKLI ÖZELLİKTEKİ ZnO NANOPARTİKÜLLERİNİN FİBROBLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN VİTRO* OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ****Kenan IŞIK****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****İleri Teknolojiler Anabilim Dalı****Biyoteknoloji Bölümü****Danışman: Yard. Doç. Dr A.Tansu KOPARAL****2010, 88 sayfa**

Nanoteknoloji ileri teknoloji ekonomisinin en hızlı büyüyen sektörlerinden biridir. Kişisel, ticari ve medikal olarak kullanılan nanomalzemelerden günümüzde 1000'den fazla ürün elde edilmektedir. 100 nm veya altındaki boyutlarda düzenlenen nanomalzemeler elektronik, sağlık, kozmetik teknolojileri ve mühendislik endüstrisi uygulamalarında yenilikler sağlamaktadır. Kozmetik uygulamalarında yaygın olarak çinko oksit kullanılmaktadır. Nanomalzemeler üstün özelliklerine rağmen toksisite gibi bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Nanomalzemeler üzerinde toksikolojik bilgilerin eksikliği, nanomalzemelere maruz kalındığında ortaya çıkacak risklerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır.

Bu tezde kullandığımız farklı boyut ve şekle sahip ZnO nanotozlarının sitotoksik etkisi *in vitro* olarak hücre kültürü teknikleriyle araştırılmıştır. Bu amaçla Çin hamster akciğer (V79 379 A) hücreleri 100 nm ZnO, 2-8 µm ZnO plakalar ve 7 µm çubuk ZnO nanotozlarının belirli dozlarına maruz bırakıldıktan sonra, hücrelerin sitotoksitesi, MTT (Mitokondriyal aktivite ölçüm testi) ve NR (Lizozomal aktivite ölçüm testi) testleriyle ölçülmüştür. Sonuçlar tüm maddelerin zamana ve doza bağımlı olarak sitotoksik etki yaptığını göstermiştir.

Bu nanopartiküllerin hücre iskeleti üzerine etkisini araştırmak için FITC-Phalloidin boyama yapılmıştır. Bu test maddelerinde doz artışına bağlı olarak F-aktin filametlerinde bozulmalar ve hücre morfolojisinde değişiklikler saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Nanoteknoloji, Nanopartiküller, Çinko oksit, Sitotoksisite, Hücre İskeleti

ABSTRACT**Master of Science Thesis*****IN VITRO* EVALUATION OF EFFECTS OF DIFFERENT PROPERTIES
OF ZnO NANOPARTICLES ON FIBROBLAST CELL****Kenan IŞIK****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Advanced Technologies****Biotechnology Program****Danışman: Assist. Prof. Dr A.Tansu KOPARAL****2010, 88 pages**

Nanotechnology is one of the fastest growing sectors of the high-tech economy. In recent times, there are more than 1000 nanomaterials products that are used in commercial, medical and personal applications. Engineered nanomaterials with dimension of 100 nm or less provide novel applications in electronics, healthcare, cosmetic technologies and engineering industries. ZnO nanoparticles are widely used in cosmetic applications. Although nanomaterials have high properties, problems like toxicity will come with together. Lack of toxicological data on nanomaterials makes it difficult to determine if there is a risk associated with nanomaterials exposure.

The materials that are used in this study are ZnO nanoparticles that have different shapes and dimensions. In this thesis, cytotoxic effects of ZnO metal oxide nanoparticles were investigated with techniques of cell cultures on healthy cells as *in vitro*. Accordingly, at first Chinese hamster lung cells (V79 379 A) were exposed to appropriate dose of 100 nm ZnO, 2-8 µm ZnO and 7 µm rod shape ZnO materials and, then cell cytotoxicity are measured with MTT (mitochondrial activity) test which is accepted as indicator of mitochondrial activity and NRU (lysosomal activity) test which is accepted as indicator of lysosomal activity. The results showed that all materials cause cytotoxicity on healthy cells dependent on times and doses.

In order to evaluate effects of these nanoparticles on the cell cytoskeleton, FITC-Phalloidin staining was used. Increasing of these test doses are caused some changes of cell morphology and F-Actin filaments.

Keywords: Nanotechnology, Nanoparticles, ZnO, Cytotoxicity, Cell Cytoskeleton

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi, deneyim ve yardımıyla, her zaman desteğini esirgemeyen hocam Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL' a,

Tez çalışmalarımda kullandığım maddeleri veren Sayın Doç. Dr. Ender SUVACI ve öğrencilerine,

Ayrıca bu süreç boyunca yardımları, destekleriyle ve sevgileriyle hep yanımda olan anneme, babama ve üzerimde çok emeği olan arkadaşım Beklem BOSTANCIOĞLU'na, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kenan IŞIK

Ocak, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Biyoteknoloji.....	2
1.2. Nanoteknoloji.....	3
1.2.1. Nanomateryaller ve Nanopartiküller	5
1.2.2. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri	8
1.2.3. Nano Tozlar ve Kozmetik	11
1.2.4. Güneş Kremi	11
1.3. Nano-Biyo Etkileşimi ve Nanotoksikoloji	13
1.3.1. <i>In vitro</i> Nanotoksikoloji.....	14
1.3.2. <i>In Vitro</i> Toksikolojiyi etkileyen nanopartikül özellikleri	16
1.3.3. Nanopartikül <i>in vitro</i> test yöntemlerinin iyileştirilmesi.....	18
1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Aktivitesinin Tespit Edilmesi.....	19
1.4.1. Çalışmada kullanılan toksisite yöntemleri	20
1.4.1.1 Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi..	20
1.4.1.2 Lizozomal aktiviteye dayalı Nötral Red testi..	21

1.5. Hücre İskeleti	21
1.5.1. Hücre İskeletinin elemanları	22
1.5.1.1 Mikrotüpçükler..	22
1.5.1.2 Mikroflamentler.....	23
1.5.1.3 Intermediate elementler	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Çalışmada Kullanılan V79 379A (CHL) Hücreleri	28
2.2. Kullanılan ZnO Nanotozları	28
2.2.1. 100 nm boyutlu ZnO nanotozları	28
2.2.2 10-20 nm tanelerin birleşimiyle oluşan 2-8 µm plaka ZnO.....	29
2.2.3 Ortalama 7 µm çubuk ZnO	30
2.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	31
2.5. Kullanılan Aletler	31
2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması.....	31
2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	31
2.8. Yöntem	32
2.8.1. V79 379A Hücrelerinin kültürü	32
2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	32
2.8.3. MTT ölçümü	33
2.8.4. Neutral Red Up-take sitotoksisite ölçümü	33
2.8.5. Floresan boyama ile morfolojik inceleme.....	34

2.8.6. Mikroskopi ve Fotoğrafi	35
2.8.7. İstatiksel değerlendirmeler	35
3. BULGULAR.....	36
3.1 100 nm ZnO Nanotozlarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri	36
3.1.1.100 nm ZnO nanotozlarının MTT testi sonuçları.....	36
3.1.2.100 nm ZnO nanotozlarının NRU testi sonuçları.....	38
3.2. 10-20 nm Tanelerin Birleşmesiyle Oluşan 2-8 µm ZnO Plakalarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri.....	40
3.2.1 2-8 µm ZnO plaka nanotozlarının MTT testi sonuçları.....	40
3.2.2. 2-8 µm ZnO plaka nanotozlarının NRU testi sonuçları.....	42
3.3. 7 µm Çubuk ZnO Nanotozlarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri	44
3.3.1 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının MTT testi sonuçları.....	44
3.3.2 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının NRU testi sonuçları.....	46
3.4 ZnO nanotozlarının Hücre İskeleti Üzerine etkisi	48
3.4.1 100 nm ZnO Nanotozlarının Hücre İskeleti üzerine etkileri.....	49
3.4.2 10-20 nm tanelerin birleşmesiyle oluşan 2-8 µm ZnO nanotozlarının Hücre İskeleti üzerine etkileri	50
3.4.3 7 µm Çubuk ZnO Nanotozlarının Hücre İskeleti Üzerine Etkileri	52
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. 1970-2007 yılları arasında nanomateryal sentezi ile ilgili yayınlanan makalelerin sayısı.....	12
2.1. 100 nm boyutlu ZnO nanotozunun SEM görüntüsü	29
2.2. 10-20 nm tanelerden oluşan 2-8 µm plakaların SEM görüntüsü	29
2.3 Ortalama 7 µm çubuk ZnO'nun SEM görüntüsü.....	30
3.1. 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği.....	37
3.2. 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği.....	37
3.3. 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği.....	39
3.4. 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği.....	39
3.5. 2-8 µm ZnO plakaların CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği	41
3.6. 2-8 µm ZnO plakaların CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği	41
3.7. 2-8 µm ZnO plakalarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği	43
3.8. 2-8 µm ZnO plakalarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği	43
3.9. 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği	45
3.10. 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği	46

3.11. 7 μm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği	47
3.12. 7 μm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği	48
3.13. CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri	49
3.14. 100 nm ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri	50
3.15. 2-8 μm plaka ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri.....	51
3.16. 7 μm ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri.....	52

TABLÖLAR DİZİNİ

1.1. Farklı alanlardaki nanomateryal ürünlerinin uygulama alanlarına genel bir bakış.....	7
1.2. Metal oksit nanopartiküllerinin uygulama alanları	9
1.3. ZnO'nun temel fiziksel özellikleri	10
1.4. Güneş kremi içeriklerinin karşılaştırılması.....	12

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

NRU: Nötral Red Up-take

EDTA: Etilen-diamin tetra asetik asit

FBS/FCS: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum

MTT: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid

NaHCO₃: Sodyum bikarbonat

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

WST: (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2*H*-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)

1. GİRİŞ

Son yıllarda bilim adamlarının ilgisini çok çeken nanoteknoloji, 100 nm'nin altında partikül alanına sahip maddelerin kullanımı ve gelişimiyle ilgilenmektedir. İnsan yaşamının her alanında nano devrimi görülmektedir. Elektronik, optik araçlar, endüstriler, diagnostik, ilaç gelişimi, biyosensörler, görüntüleme ve ayrıca güneş kremleri, tekstil, kozmetik, spor ve aksesuarlar gibi tüketici ürünleri de nanoteknolojinin kullanıldığı alanlardır (Balshaw ve ark.2005; The Royal Society, 2004; Lee ve ark.2008; Thomas ve ark.2006).

Günümüz teknoloji dünyasında nanoteknolojinin bu kadar popüler olmasının temel sebebi, nanomateriyallerin sağladığı geniş yüzey alanı ile optik, elektrik ve mekanik özelliklerindeki artışla kuantum mekaniğindeki nano boyuttaki oran artışına bağlı olarak yüzey alanındaki artıştır. Bununla birlikte, nano boyuttaki materyal tarafından kazanılan bu yeni özellikler, biyolojik sistemlerle bu materyallerin etkileşimi sonucu tahmin edilemeyen sonuçlara neden olabilir. Farklı kimyasal kompozisyona sahip, farklı metodlarla sentezlenen farklı alan, şekil ve yüzey kaplamasına sahip nanopartiküllerin memeli hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkiler meydana getirdikleri yapılan çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Sharma ve ark.2009, Dhawan ve ark. 2006; Isakovic ve ark. 2006; Lewinski ve ark.2008; Papageorgiou ve ark. 2007; Singh ve ark. 2007). Nanopartiküllerin toksisitesi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu alanda son iki yıl içindeki hızlı büyüme, dünya pazarındaki nanoteknolojiye dayanan tüketici ürünlerinin sayısında % 185 oranında artışa neden olmuştur. Bu nanoteknolojiye dayanan tüketici ürünlerinin en geniş kapasiteli alanı kozmetiktir. Halk arasında ve bilim dünyasında bu tüketici ürünlerinin toksisitesi cevaplanmadığından dolayı kaygılar bulunmaktadır.

Güneş kremleri, yaygın olarak tüm dünyada kullanılmaktadır. Deriye uygulanan bu nanopartiküllerin güvenlik ve toksisitesi hakkındaki bilgiler zamanla artmasına rağmen nanopartiküllerin toksisitesi hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır. ZnO (çinko oksit) nanopartikülleri yoğun oranda güneş kremleri içerisinde kullanılmaktadırlar. Fakat ZnO ile yapılan toksisite çalışmaları yeterli değildir.

Hayvan hücre kültürleri, kanser araştırmalarında hücre farklılaşma olaylarının incelenmesi, onkojenik maddelerin ve onkojenlerin etkilerinin analizleri, hücre hareketleri olaylarının incelenmesinde büyük önem taşımaktadır (Kılıç, 2002). Hücre kültürü yönteminde etkiler doğrudan doğruya olduğundan sonuç kısa sürede alınabilir, istatistik olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilir, çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesi önlenir. Hücre kültürü çalışmaları *in vitro* toksisite çalışmalarında yoğun oranda kullanılmaktadır. *In vitro* sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre çoğalması, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad, 2000). Sitotoksosite deneyleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Neutral Red (NR) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri tek tabakalı kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell 2005; Fent, 2001). Hücre iskeleti, birçok maddenin hücrede meydana getirdiği zararların incelenmesinde kullanılır. Hücre iskeletindeki zararları görebilmek amacıyla FITC (floresan izosiyonat)- Phalloidin boyaması yapılarak F-aktin iskeletine bakılmaktadır (Kroll ve ark.2009; Gunaratnam ve Grant 2004, Wulf ve ark. 1979).

Bu tez çalışmasında birçok uygulama alanı olan ve ticari öneme sahip farklı boyut ve şekillerde sentezlenen ZnO nanotozlarının sitotoksik etkileri ve hücre iskeleti üzerine etkileri araştırılmıştır.

1.1. Biyoteknoloji

1970’li yıllardan beri ortaya çıkan yeni teknolojiler arasında bulunan biyoteknoloji o dönemden beri çok dikkat çekmektedir. Ortaya çıktığı dönemden beri biyoteknoloji ekonominin önemli sektörlerini etkilemiştir (Gavrilescu ve ark.2005). Biyoteknoloji biyolojik sistem, organizma veya süreçlerin malzeme ve hizmet endüstrilerinde uygulanmasıdır. Diğer bir tanımla biyoteknoloji, canlıları veya canlılardan gelen bir yapıyı kullanan herhangi bir teknik ile bir ürün oluşturarak veya değiştirerek “özgün kullanım amaçlı” bitki, hayvan veya

mikroorganizmalar geliştirmektir. Biyoteknoloji kavramı, Birleşmiş Milletler’e bağlı 157 ülkenin biyolojik çeşitliliğin korunması amacı ile 1992 yılında imzalanan “Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi”nde; **“herhangi bir teknolojik uygulama, biyolojik sistemleri, organizmaları veya organizma kaynaklı yapıları, bir ürünün yapımında veya değiştirilmesinde veya spesifik bir süreçte kullanıyorsa; biyoteknoloji ”** şeklinde tanımlanmaktadır ([http:1](http://1)).

Biyoteknoloji bilimi aslında yeni olmasına rağmen kökeni MÖ 6000 yıllarına ve eski Mısır’da, MÖ 3000 yıllarına dayanmaktadır. Bu dönemler biyoteknolojik yöntemlerle peynir, şarap, yoğurt ve sirke yapımıyla yüzyıllardır süregelen ilkel fermentasyon tekniklerini içerir. Daha sonra 1900’lü yılların başında enzim teknolojilerinin temellerinin atılması, antibiyotiklerin 1929 yılında keşfedilmesi ve İkinci Dünya Savaşı boyunca geniş ölçekli üretimleri, fermentasyon teknolojisinde büyük ilerlemelere neden olmuştur. Günümüzde modern biyoteknoloji belli bir ürünü ticari miktarlarda elde etmek amacıyla genetik olarak değiştirilmiş canlıları kullanmaktadır. Son yirmi yılda, moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında kaydedilen büyük gelişmeler, biyoteknolojideki hızlı değişim ve ilerleyişin itici gücü olmuş ve bu teknoloji, giderek, çok daha fazla sayıda sanayi ve hizmet sektörünü kapsar ve etkiler hale gelmiştir. İnsan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji üretimine kadar yaşamın pek çok alanı bu teknolojinin kapsamına girmiştir.

Biyoteknoloji anabilim dalı çok farklı bilimlerle etkileşim içindedir. Bunlardan bir tanesi Nanoteknoloji bilim dalıdır. Bu iki bilimin etkileşimiyle ortaya çıkan bölüm Biyo-nanoteknoloji olarak adlandırılmaktadır. **Biyonanoteknoloji;** biyoteknoloji, genetik mühendisliği, sitoloji, moleküler biyoloji ve biyokimya disiplinlerinin ilerlemesiyle sonuçlanan teknoloji ve bilimin bir alanıdır.

1.2. Nanoteknoloji

21. yüzyılda insan yaşamının her alanında nano devrimi görüldüğünden dolayı bu yüzyılı nano yüzyılı olarak adlandırabiliriz. Nanoteknoloji alanı, son

yıllarda insan yaşamının daha iyi olması için farklı sektörlerde çok sayıda uygulamalarda kullanılarak dünya üzerinde hızlı bir şekilde büyümeye devam etmektedir. Nanoteknolojinin önemi, atomlar ve moleküller seviyesinde (1 ila 100 nanometre (nm) ölçüsünde) çalışarak, gelişmiş ve/veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklere sahip yapılar elde edilmesine imkan sağlamasından kaynaklanmaktadır. Teknik açıdan açıklamak gerekirse malzeme özellikleri ve cihazların çalışma prensipleri, genel olarak 100 nm'den büyük boyutları temel alarak yapılan varsayımların sonucunda ortaya çıkarılmış geleneksel modelleme ve teorilere dayanmaktadır. Kritik uzunluklar 100nm'nin altına indiğinde ise geleneksel teori ve modeller ortaya çıkan özellikleri açıklamakta çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Nanoteknoloji işte burada resme girmektedir. Daha sağlam, daha kaliteli, daha uzun ömürlü ve daha ucuz, daha hafif, daha küçük cihazlar geliştirme isteği birçok iş kolunda gözlenen eğilimlerdir. Minyatürizasyon olarak tanımlanabilecek bu eğilim birçok mühendislik çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Minyatürizasyonun sadece kullanılan parçaların daha az yer kaplamasından çok daha önemli getirileri vardır. Minyatürizasyon üretimde daha az malzeme, daha az enerji, daha ucuz ve kolay nakliye, daha çok fonksiyon ve kullanımda kolaylık olarak uygulamada kendini göstermektedir (Reeves ve ark.2008).

Nanoteknolojide örnek olan nano bir Yunanca kelime olan dwarf (cüce) kelimesinden türetilmiştir. 1 nanometre, metrenin milyarda birine, 6 karbon atomunun veya 10 su molekülünün genişliğine eşittir. İnsan saçı 80000 nm, bir kırmızı kan hücresi ise 7000 nm genişliğindedir. Atomlar 1 nm'den küçüktürler halbuki bazı proteinleri içeren çoğu molekül ise 1nm veya daha büyüktür.

Nanoteknoloji, köken olarak ölçü birimi olan “nanometre” den gelmektedir. Nanometre ölçü olarak metrenin milyarda birini ifade etmekte ve bir nanometre, düzlemine 2 – 3 tane atomun dizilebileceği kadar küçüktür. Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzeme tasarlayıp üretmeyi, bu malzemelerde yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aygıtlar ve aletler üretmeyi amaçlamaktadır (Çıracı, 2005). Nanoteknoloji, bir başka anlamı ile de metrenin milyarda biri boyutunda makineler yapmak olarak tanımlanmaktadır (Çıracı, 2005; Goorsell, 2000).

1.2.1. Nanomateryaller ve Nanopartiküller

Nanoboyuttaki materyallerin bilim ve teknolojisi çok eski zamanlara dayanmaktadır (Delatte, 2001; Edwards ve Thomas, 2007; Sanchez ve ark.2003). Ayrı anabilim dalları olarak nanobilimler ve nanoteknoloji son 20 yıldır kullanılmaktadır. Nanomateryaller, kristal büyüklükleri en az bir boyutta 1-100 nm arasında değişen tek fazlı yada çok fazlı partiküllerdir. Klasik malzeme davranışı kanunları yerine, atom fiziği kanunlarını sergileyen nanomalzemeler; metal, seramik, polimer veya kompozit türde olabilir. Dünyada ticarî nanomalzemelerin en yaygın çeşidi olan nanokompozitlere olan talep, yılda binlerce tona ulaşmış ve her geçen gün hızla artmaktadır.

Boyutlarına bağlı olarak nano materyaller dört grupta toplanabilir.

a- Nano partiküller

b-Tabakalı yada lamelli yapılar

c-İpliksi yapılar

d-Yığın yapıları nano materyaller (Suryanarayana ve ark.1999).

Nano materyallerin özellikleri temel olarak dört sebebe bağlıdır;

1- Tane büyüklüğü ve tane dağılımı

2- Kimyasal bileşimi

3- Ara fazların varlığı (Taneler arası boşluklar, serbest yüzeyler)

4- Temel bileşenler arası etkileşimler. (Gonsalves ve ark. 2000).

Kullanıldığı ana malzemenin yüzeyine veya buraya yakın kısımlara dağıtılabilmesi, nanomalzemeyi normal malzemedan farklı kılan özelliklerden biridir. Böylelikle ana malzeme, elektronik, manyetik, optik ve reaktivite bakımından son derece farklı özellikler kazanır. Nanomalzemelerin yapısına az miktarda başka elementler eklenerek, dayanıklılıkta % 100'e varan bir artış elde edilebilir. Malzemelerin yüzeylerine kaplanan ve çoğu defa pürüzsüzlüğü sağlayan nanopartiküller, su ve nem bakımından izolasyonu artırmada, ayrıca kirlenmeyi önlemede kullanılır. Bazı nanomalzemelere silikat parçacıklar eklendiğinde, bu malzemeler normal şartlardakinden 100°C daha yüksek sıcaklıkta kullanılabilir. Güvenlik açısından malzeme seçiminin önemli

olduğu uzay araçlarının ve uçakların yapımında, çok hafif, sert ve dayanıklı malzemeler gerekmektedir. Nanokompozitlere verilen dayanıklı yapı ile sıcaklığa direnç özelliği, bu maddelerin uzay araçları, uçak ve elektronikte yaygın olarak tercih edilmelerini mümkün kılmıştır. Aynı zamanda, polimer tabanlı nanokompozit gibi bazı nanomalzemelerin işlenmesinin kolay olması, bu malzemelerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Örneğin, bu malzemeler, otomotiv endüstrisinde büyük ölçekli üretim uygulamalarına kolaylıkla uyumlu hale getirilerek kullanılmaktadır (Hickman, 2002). Tablo 1’ de farklı endüstriyel alanlarda kullanılan nanomateryallerin kullanım alanları gösterilmektedir (Luther, 2004).

Nanopartiküller, 100 nm’nin altında en az tek boyutlu olarak düzenlenen yapılar olarak adlandırılmaktadır. Geleneksel kimyasallarla karşılaştırıldıklarında multifonksiyonel partiküller olarak imal edilmektedirler. Son zamanlarda, bu nano yapıli partiküllerden oluşan ürünlerin sayısında çok yüksek oranda artış görölmektedir (Chaudhry ve ark. 2008). Nanoteknoloji, son yıllarda insanların yaşam standardını yükseltebilmek amacıyla farklı sektörlerde çok sayıda uygulamalarda kullanılarak dünya üzerinde hızlı bir şekilde büyümeye devam etmektedir. Nanoteknolojiyi bu kadar ilginç kılan unsur, malzemelerin nano boyutta makro boyuttakinden farklı davranmalarıdır. Külçe şeklindeki altın başka maddelerle reaksiyona girmek istemezken, nano boyuttaki altında bu durumun tam tersi gözlemlenmektedir. Kuantum etkileri yüzünden maddeler, nano boyutta farklı özellikler göstermektedir. Bu özellik yüzünden, bilim adamları malzemelerin nano boyuttaki hallerini araştırıp, mevcut toplumsal sorunlara bu nano malzemeleri kullanarak çözüm bulmaya çalışmaktadırlar.

Malzeme boyutundaki küçölme yapıya farklı ya da ekstra olarak pek çok özellik katmaktadır. Yüzey alanının artması ve malzemenin boyutunun düşmesinden dolayı ön plana çıkan quantum etkilerinden dolayı nano yapıların özellikleri normal boyutlu yapılarınkinden farklılıklar gösterebilir. Bunların başında elektriksel, mekanik, kimyasal ve optik özellikler gelmektedir. Bu özelliklerinden dolayı elektronik, optik, teşhis, ilaç gelişimi, biyosensörler, görüntölleme gibi endüstrilerde ve ayrıca güneş kremleri, tekstil, kozmetik, spor ve

Tablo 1: Farklı alanlardaki nanomateryal ürünlerinin uygulama alanlarına genel bir bakış
(Luther, 2004)

Otomotiv Sanayi • Beyaz ışık konsantrasyonu • Boyama (astar, taban kaplama, boya temizleme) • Katalizörler • Lastik (astar) • Sensör	Kimyasal Sanayi • Boyama sistemleri için astar • Nanokompozitlerinde içinde bulunduğu taban kaplama sistemi • Kağıtlarda ki immegrasyon işlemi	Mühendislik • makine ve araçlar için koruma (antiblokaj kaplamalar, tahriş olmuş plastik kaplamalarda, vb.)
Elektronik Sanayi • hafıza kartları (MRAM, GMR-HD) • ekranlar (OLED, FED) • lazer diyotlar • cam yapılarda • optik yapıştırıcılarda • filtreler de (IR-blok)	Yapı Malzemeleri • yapı materyalleri • termal izolasyon • alev geciktirici • bina yapımında kullanılan ahşap, zemin, beton, döşeme, cephe, çatı döşeme vb. malzemelerde • bina cephe kaplamalarında	Tıp • ilaç ulaşım sistemleri • aktif ajanlar • medyum kontrastında • seri testlerde • protez ve implantlar • antimikrobiyal ajan ve kaplamalar
Tekstil/Kumaş/Dokuma • yüzey uygulamaları • kaliteli elbiselerde	Enerji • yakıt pili • güneş pili • bataryalar • kondansatör	Kozmetik • güneş koruma • ruj • vücut kremi • diş macunu
Gıdalar ve İçecekler • ambalajlama materyelleri • raf ömrü sensörü • katkı maddeleri • akışkan jellerde ki klarifikasyonda	Ev • demirin seramik ile kaplanması da • koku giderici • pencere, zemin, seramik, cam temizlemede	Spor / Açık hava • kayak malzemeleri • cam ve gözlüklerde donuklaşmama • bot ve gemilerde kaplamanın bozulmaması

aksesuarlar gibi tüketici ürünlerinde nanoteknolojinin kullanımı gözlenmektedir (Balshaw ve ark. 2005). Kişisel, ticari ve medikal olarak kullanılan 200'den fazla nanomateriyal ürün bulunmaktadır (Brumfiel, 2003).

ZnO gibi metal oksit nanopartikülleri kozmetikten gıda paketlemesine kadar değişen bir çok alanda ürün eldesinde kullanılmaktadır (Chaudhry ve ark. 2008). Nanopartiküller farmakoloji ve tıp uygulamaları içinde olağanüstü fırsatlar sunmaktadır. Silika gibi bir metalik kaplama tarafından oluşturulan nanokaplamalar, ışık absorblayıcısı olarak iş görürler ve faredede fototermal olarak tümörlü organın kesilip dışarı çıkarılmasında kullanılmaktadırlar (O'Neal ve ark. 2004). Medikal diagnostikte en göze çarpan nanopartiküller Quantum-dot nanopartikülleridir ve bunlar floresan özelliklerle beraber nanokristal semikondüktörlerdir (Gao ve ark. 2004; Voura ve ark. 2004). Kitosan gibi polimer nanopartiküller gen terapisinde (Mansouri ve ark. 2006) ve ilaç geliştirilmesinde (Agnihotri ve ark. 2004) kullanılmaktadırlar.

1.2.2. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri

Biyolojik sistemlerde metaller önemli bir rol oynar. Çünkü metaller oksidatif stres oluşumunun önemli bir kaynağıdır. Metal oksit nanopartikülleri küçük boyutlara ve geniş spesifik yüzey alanına sahiptir. Bu özellikler metal oksit nanopartiküllerine yüksek kimyasal reaksiyona girme isteği kazandırmakta ve bu da intrinsik toksisiteye neden olmaktadır. Bu dönemde, çoğu nanotoksiste çalışmaları nano boyuttaki metal oksitlere odaklanmıştır (Wang ve ark. 2007).

Metalik nanopartiküllerin kimyasal destabilizasyonu ile birleşen toksik mekanizmalar:

- 1- Solüsyonlardaki metallerin doğrudan salınımı,
- 2- Metalik nanopartiküllerin katalitik özellikleri,
- 3- Proteinlerin oksidasyonunu yapan yüzey redoks gelişimi yollarıyla reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturur ve oksidatif stresi indükler (Limbach ve ark. 2005; Nel ve ark. 2006; Brunner ve ark. 2006).

Silika (SiO₂), titanyum(TiO₂), alüminyum (Al₂O₃) ve çinko (ZnO) gibi metal oksit nanopartikülleri inorganik partiküller içinde çok yüksek oranda ticari

olarak kullanılan ürünlerdir. Metal oksit nanopartiküllerinin esas uygulama alanları elektronik, eczacılık, tıp, kozmetik ve kimya gibi alanlardır. Metal oksit nanopartiküllerinin farklı endüstriyel alanlardaki uygulamaları Tablo 2’ de gösterilmektedir (Rittner, 2002).

Tablo 2: Metal oksit nanopartiküllerinin uygulama alanları (Rittner, 2002)

Elektronik, Optoelektronik magnetik uygulamalar	Biyomedikal, farmasötik kozmetik uygulamalar	Enerji, katalitik yapı uygulamaları
• Kimyasal-fiziksel cilalama • Elektrokondüktif kaplama • Optik fiberler • Quantum optik araçları • Multilayer kapasitörleri • fosforlar	• antimikrobiyal • biodedeksiyon ve etiketleme • biyomagnetik ayırmalar • ilaç gelişimi • güneş kremleri • ortopedi • termal sprey kaplamaları	• otomotiv katalizörleri • membranlar • fotokatalizörler • solar hücreleri • yapısal seramikler • çizmeye dayanıklı kaplamalar

Çinko, memeli organizmaları içinde önemli eser elementlerden biridir ve hemoostazi, immun cevap, oksidatif stres, apoptosis ve yaşlanmada önemli rol oynar (Stefanidou ve ark. 2006). Çinko ayrıca memeli androjen reseptörleri, DNA tamir enzimleri ve DNA veya RNA sentezi, stabilitesi, proliferasyonu ve transkripsiyonu için gerekli bileşiklerdendir (Robins, 2005; Urnov ve ark. 2005).

Çinko oksit ZnO formülüne sahip bir kimyasal bileşiktir. Su içinde tam olarak çözünmez fakat asit ve bazlar içinde çözünür. Partikül, çubuk, tel, tüp, kafes, duvar ve yüzük gibi yapılarını içeren ZnO nanoyapılar, bunların yararlı elektronik ve optoelektronik özellikleri ve boyalar, UV detektörleri, transparan kondüktif filmler, gaz sensörü, solar hücreleri güneş kremleri ve diğer kozmetik ürünler gibi yeni uygulamalardan dolayı son zamanlarda büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir (Ramakrishna ve Ghosh, 2003; Bae ve Seo, 2004; Ding ve Wang, 2004; Zhu ve ark. 2005; Huang ve ark. 2006).

Çinko oksit, piezoelektrik, yarı iletken ve optik özellikleri (morötesi absorplama, düşük kırınım indisi gibi) bir arada gösterebilen nadir malzemelerden biridir. Tablo 3' de çinko oksidin temel fiziksel özellikleri listelenmiştir (Steiner, 2004).

Tablo 3. ZnO' nun temel fiziksel özellikleri (Steiner, 2004)

Özellikler	
Latis sabitleri (T = 300 K)	
a_0	0,32469 nm
c_0	0,52069 nm
Yoğunluk	5,606 g/cm ³
Ergime noktası	2248 K
Dielektrik sabiti	8,66
Enerji boşluğu	3,37 eV
Taşıyıcı konsantrasyonu	$< 10^6$ cm ⁻³
Uyarım (aktivasyon) enerjisi	60 meV
Etkin elektron kütlesi	0,24
Elektron hareketliliği (T = 300 K)	200 cm ² /V.s
Etkin boşluk kütlesi	0,59
Boşluk hareketliliği (T = 300 K)	5 - 50 cm ² /V.s

Nano boyutlu çinko oksit üstün optik ve kimyasal özellikleri özellikle günlük hayatta sıklıkla karşımıza çıkan nemlendiriciler, güneş kremleri, bebek pudraları gibi insan derisine doğrudan temas eden yapıların içerisinde yaygın olarak kullanılan malzemelerden birisidir. Çinko oksit yapısından dolayı anti-alerjik, kaşıntı önleyici, kızarıklık önleyici ve güneşin zararlı ışınlarından koruyucu özelliklere sahiptir. Ayrıca çinko oksit, yapısından dolayı dekontaminasyon (zararlı kimyasalları kimyasal tepkime sonucunda etkisiz hale getirme) alanında da kullanılabilen malzeme olduğu için ZnO kirli suları temizlemede, kimyasal savaş ajanlarını ve gübreleme sonrasında toprakta kalan kimyasalları etkisiz hale getirmede, toprağı ve bitkiyi kimyasallardan temizlemekte kullanılabilir. Yapısı itibarıyla yarı iletken özellik gösteren çinko oksit çok geniş kullanım ve araştırma potansiyeline sahiptir. Çinko oksit (ZnO), dermatolojik malzemeler ve güneş kremlerinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

1.2.3. Nano Tozlar ve Kozmetik

Kozmetik kimya dalı, son 10 yıldır nano boyutlu (<100 nm) inorganik morötesi absorplayıcılar veya nano tozları yani nanoteknolojiyi kullanan lider sektörlerden biridir. Bu da kozmetik endüstrisi için nano boyutlu toz üretiminde en son teknolojiyi yakından takip edebilmenin önemini ve bu yolla firmaların büyük avantajlar sağlayabileceğini göstermektedir. Günümüzde, 20'den fazla ülke, nanoteknolojik 600'den fazla ürünü üreterek pazarlamaktadır (Sharma ve ark. 2009). Bu nanoteknolojiye dayanan tüketici ürünlerinin en geniş kapasiteli alanı kozmetiktir (http:2).

ZnO ve TiO₂ inorganik morötesi ışınları absorplayıcılar uzun yıllardır insanları morötesi ışınlarından korumak için kullanılmaktadır. Kozmetikte en çok kullanılan metal oksit nanopartikülleri ZnO ve TiO₂ nanopartikülleri (Innes ve ark. 2002).

1.2.4. Güneş Kremleri

Güneş kremleri, genel ve yaygın olarak kullanılan tüketici ürünlerini temsil eder. ZnO ve TiO₂ inorganik nanopartikülleri güneş kremlerinde kullanıldığında deride beyaz görüntülere neden olurlar. Alan olarak geniş olan bu partiküller görünen ışığın çoğunu dağıtırlar. Partikül alanının küçük olması görünen ışığın saçılımının daha az olması demektir. Bu nedenle, aynı içerikteki nano formda eklendiğinde, daha az ışık yayılmış olur ve güneş kremleri daha şeffaf görünerek nanopartiküllerin şimdilerde güneş kremlerinin gerekli içeriği olduğu anlamına gelir (Sharma ve ark. 2009).

ZnO ve TiO₂ özellikle pigment maddesi olarak endüstriyel ve ticari uygulamalarda çok geniş bir alanda kullanılan iki kimyasal bileşiktir. Fiziksel özelliklerine göre, iki bileşik de UV radyasyonundan korumak için güneş kremlerinde yoğun oranda kullanılmaktadır (Gurr ve ark. 2005). Nano boyuttaki ZnO ve TiO₂ normal boyuttaki güneş kremlerine kıyasla benzer seviyede UV radyasyonundan koruma özelliğine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Popov ve ark.

2005). Fakat, nano boyutta kullanılma nedeni normal boyuttaki partiküllere kıyasla nanopartiküller daha fazla transparan özelliğe sahiptir.

Güneş kremi içerikleri 2 ana başlıkta incelenmektedir. Bunlar, kimyasal ve fizikseldir. Kimyasal güneş kremi içerikleri güneşin yaydığı morötesi ışınlarını absorplama sırasında yapısında güneş ışınlarına maruz kaldıklarında yapılarında meydana gelen kimyasal reaksiyon ile morötesi ışınlarını absorplarlar. Ancak bu durum deri üzerinde bazı problemlere yol açabilmektedir. Absorplama mekanizması kimyasal reaksiyonlar sonucunda olduğu için morötesi ışık altında oluşan bu reaksiyonlar deride kızarıklık, kaşıntı, yara gibi problemler doğurabilmektedir. Fiziksel güneş kremi içeriklerinin en bilinen örnekleri ZnO ve TiO₂' dir. Bu tarz inorganik yapılar kimyasal reaksiyonlar olmadan morötesi ışınlarını absorplayarak ya da saçarak koruma yapmaktadırlar.

Tablo 4'de ZnO'nun dünyada kullanılan güneşten koruyucu kremlerin içerikleriyle karşılaştırılması gösterilmektedir. Bu tablo Amerika Birleşik Devletleri'nde hükümetin bir kuruluşu olan The Food and Drug Administration (FDA) tarafından hazırlanmıştır. Çinko oksit optik özellikleri bakımından güneşin yaydığı UVA ve de UVB ışınlarını absorpladığı için bu alanda kullanılabilecek en iyi seçeneklerden bir tanesidir.

Tablo 4. Güneş kremi içeriklerinin karşılaştırılması

Güneş Kremi İçerikleri	Işıktan Koruma Miktarı		Kimyasal / Fiziksel
	UVA	UVB	
Aminobenzoic acid (PABA)	○	●	K
Avobenzene	●	◐	K
Cinoxate	◐	●	K
Dioxybenzone	◐	●	K
Homosalate	○	●	K
Menthyl anthranilate	◐	●	K
Octocrylene	◐	●	K
Octyl methoxycinnamate	◐	●	K
Octyl salicylate	○	●	K
Oxybenzone	◐	●	K
Padimate O	○	●	K
Phenylbenzimidazole	○	●	K
Sulisobenzene	◐	●	K
Titanyum Dioksit	◐	●	F
Trolamine salicylate	○	●	K
Çinko Oksit	●	●	F

Koruma Seviyesi: ● = mükemmel ◐ = iyi ◑ = sınırlı ○ = minimum

1.3. Nano-Biyo Etkileşimi ve Nanotoksikoloji

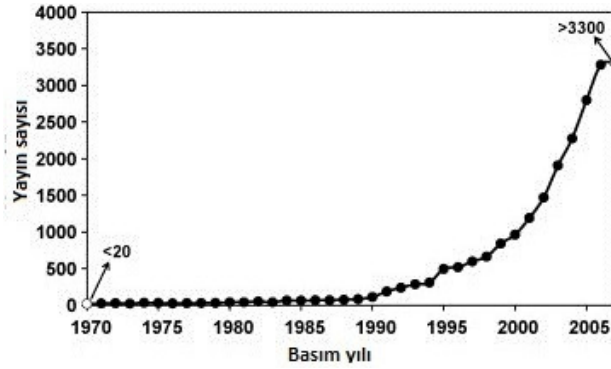
Proteinler ve nükleik asitler nanoteknoloji alanını da içeren çok farklı tipteki çalışmaların odağı haline gelmiştir (Kim ve ark. 2006; Samori ve Zuccheri, 2005; Sarikaya ve ark. 2003; Seeman, 2003; Zhao ve Zhang, 2006). Dünya üzerindeki araştırmacılar, farklı inorganik, organik ve kompozit nanopartiküllerin ilaç gelişimi ve hücresel seviye biyogörüntülenmesini de içeren biyolojik çalışmalarda kullanıldığını göstermişlerdir (Akerman ve ark. 2002; Allen ve Cullis, 2004; Arap ve ark. 1988; Martin ve Kohli, 2003).

Nanotoksikoloji, nanomateriyallerin biyoetkisinin değerlendirilmesidir. Nanotoksikoloji giderek büyüyen bir alan olarak göze çarpmaktadır (Suh ve ark. 2009). Nanopartiküllerin benzersiz özellikleri ve küçük hacme sahip olmalarına rağmen, insan ve çevre sağlığı için bu nanopartiküller risk taşıması sebebiyle büyük oranda ilgi odağı olmuşlardır (Colvin 2003; Adams ve ark. 2006).

Nanomateriyal kullanımı, kozmetik, farmasötik ve diğer endüstriyel uygulamalar gibi alanlarda hızlı ve geniş oranda artarak devam etmektedir. İnsan sağlığı için bu nanomateriyallerin güvenliği ve toksisitesi değerlendirilmesi çok önemlidir. Gelecek çalışmalarda insan sağlığına bu nanomateriyallerin potansiyel riski üzerinde durulmalıdır. Kozmetikten tenis toplarına kadar ticari ürünlerin artışıyla nanoboyuttaki materyallerin toksikolojik değerlendirmesi giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Colvin, 2003; Maynard ve ark. 2006; Nel ve ark. 2006; Oberdorster ve ark. 2005).

Üretilen nanomateriyallerin farklı tipleriyle son zamanlarda yayınlanan makalelerin sayısı, sadece nanoyapılı materyallerin senteziyle ilgili yayınlar eksponansiyonel olarak artmaktadır. Şekil 1.1’de bu durumla ilgili grafik yer almaktadır (Suh ve ark. 2009). Nanoteknoloji ürünlerinin ticarileşmesiyle nanopartiküllere maruz kalan insanların sayısı giderek artmakta ve nanopartiküllerin potansiyel toksisitesinin değerlendirilmesi gereklidir. Üretimi yapılan nanopartiküllerin *in vivo* ve *in vitro* olarak toksik etkiye sahip oldukları gösterilmektedir (Donaldson ve ark. 2006; Lewinski ve ark. 2008; Brumfiel, 2003; Goldston, 2007; Nel ve ark. 2006; Igarashi, 2008; Nielsen ve ark. 2008). Yayınlardaki bu devasa artış sayesinde yüzlerce *in vitro* toksikolojik çalışmalar

rapor edilmiştir (Gurr ve ark. 2005; Oberdorster, 2004; Ramires ve ark. 2002; Soto ve ark. 2005; Suh ve ark. 2006b; Yoshida ve ark. 2003 ve Suh ve ark. 2009).



Şekil-1.1 1970-2007 yılları arasında nanomateryal sentezi ile ilgili yayınlanan makalelerin sayısı
(Suh ve ark. 2009)

1.3.1. *In vitro* Nanotoksikoloji

Nanomateryal toksisitesinin değerlendirilmesinde en kolay çözüm canlılığın artış veya azalışı için çeşitli memeli hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* test yöntemleridir. Hücreye bağımlı deneyler toksisite testleri, biyomateryal ve nanomateryal testlerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Nel ve ark. 2006; Lewinski ve ark. 2008). 5 temel toksisite deney kategorisi bulunmaktadır. Bunlar; ROS üretimi, hücre canlılığı, hücre stresi, hücre morfolojisi ve hücre partikül alım testleridir (Jones ve Grainger, 2009). Hücresel metabolizma çoğu hücre canlılığı testlerinin odağı haline gelmiştir (Veranth ve ark. 2007). Bir örnekteki ölü hücrelere karşı canlı hücrelerin tespiti kullanılan materyale karşı hücresel cevabın tahmini konusunda fayda sağlar. Çoğu hücre canlılığı testleri floresan veya kolorimetrik olarak ölçülebilen testlerdir. Bunların çoğu boyaya bağımlı MTT (Mosmann, 1983; Tian ve ark. 2006; Jones ve Grainger, 2009), WST (Ishiyama ve ark. 1997), Nötral Red (Kroll ve ark. 2009), laktat dehidrogenaz (LDH) (Hussain ve ark. 2005) gibi testlerdir. İnorganik nanopartiküller, (Gurr ve ark. 2005; Ramires ve ark. 2002; Soto ve ark. 2005; Yoshida ve ark. 2003) TiO_2 , SiO_2 , Fe_2O_3 (Oberdorster, 2004), nanotüpler (Cui ve ark. 2005; Donaldson ve ark. 2006; Garibaldi ve ark. 2006; Maynard ve ark. 2004), quantum noktacıkları (Chang ve ark. 2006; Voura ve ark. 2004) gibi metal nanopartiküller farklı

araştırma grupları tarafından hücre kültürü yöntemi kullanılarak *in vitro* testler ile değerlendirilmektedir.

Memeli hücreleri ile yapılan toksisite çalışmaları giderek artmaktadır fakat sadece hayvan çalışmalarıyla nanomateriyallerin insan üzerine etkisinin değerlendirilmesi zor ve bu testlerin insana uygulanması imkansızdır. Ek olarak, nanoyapılı materyaller biyolojik sistemlere girerek onlarla devamlı kontakt halindedir (Suh ve ark. 2009).

Nanomateriyallerin biyolojik etkisinin belirlenmesi çalışmaları nanoyapılı tüketici ürünlerinin kullanılmasıyla giderek artmıştır (Maynard ve ark. 2006). Hücre içinde veya dışında oluşan Reaktif oksijen türleri (ROS) ürünleri nanoyapılı materyallerin toksisitesinin değerlendirilmesinde temel faktörlerden biridir (Nel ve ark. 2006). Süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri sürekli olarak insan vücudunda üretilir. Düşük seviyedeki ROS hücresel sinyalizasyonu ayarlar ve normal hücre çoğalmasında önemli rol oynar. Fakat ROS üretiminin artması yaşlanmanın patojenezine, kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin oluşumuna neden olur. Oksidatif stres, DNA, protein ve lipidler gibi farklı hücresel içeriklere hasar vererek karsinogeneze neden olabilir. Özellikle, oksidatif stres tarafından oluşturulan DNA hasarı karsinogeneze kritik rol oynar. Oksidatif stres, kanser oluşumuna katkıda bulunan genomik kararsızlığa neden olan DNA hasarını indükler. Bu nedenle, ROS'un tümör oluşumunda çok çeşitli rolleri olduğu düşünülmektedir.

Oksidatif stres çok çeşitli mekanizmalar tarafından oluşturulur. Mitokondriyal solunum, enflamasyon ve yabancı bileşiklerin metabolizması gibi mekanizmalar oksidatif stres oluşumunda rol oynarlar. DNA'nın ROS'un oluşturulması için en önemli bir hedef olduğu düşünülür.

Hücreden küçük bir nanopartikül hücre içine girerek ROS'u oluştururarak hücre membran stabilitesini ve hücre canlılığını etkileyerek ROS oluşumu sonucunda partikül dağılması ve hücresel birimlerde mekanik hasar oluşumuna neden olur (Nel ve ark. 2006; Borm ve ark. 2006; Yamamoto ve ark. 2004). Ek olarak, nanoyapılı materyalin yüzey elektronığı ve farklı fonksiyonel grupları, nanopartiküller ile onları çevreleyen yapılar arasında etkileşiminin seviyesini belirler (Karakoti ve ark. 2006; Kostarelos ve ark. 2007). Bundan başka

partikülün tüm boyutları çok önemli role sahiptir. Büyük boyutlu partiküller daimi hasara neden olurken küçük boyutlu partiküller hücre membranından geçerek hücre içinde hasara neden olurlar (Yoshida ve ark. 2003). Küresel olmayan nanopartiküller küresel olanlara göre farklı biyolojik etkiye sahiptirler (Geng ve ark. 2007). Hücre içinde veya dışında nanopartiküllerin dağılma özellikleri çeşitli yollarla hücreyi etkileyebilir (Borm ve ark. 2006).

1.3.2. *In Vitro* Toksikolojiyi Etkileyen Nanopartikül Özellikleri

Nanopartiküller, yeni uygulamalar ve yüksek performanslı ürünlerin çeşitliliği için benzersiz fizikokimyasal özellikler göstermektedir. Bu özellikler, sitotoksikite testleri için çok büyük bir engel olabilir ve bu yüzden dikkatli bir şekilde karakterize edilmelidirler. Nanopartikül toksisite çalışmalarının giderek artmasından dolayı daha iyi geliştirilmiş *in vitro* yöntemler kullanılmalıdır. Nanopartiküllerin boyutuna ve dağılımına dayanarak nanopartiküller sıvı içerisine difüze mi olmuş yoksa hücre kültürü hücreleri üzerine sediment mi oluşturmuş bunu iyice anlamak lazımdır (Schulze ve ark. 2008). *In vitro* toksisite testlerini etkileyen özelliklerden aşağıda bahsedilecektir.

Yüksek Emme Kapasitesi: Birim kütle başına düşen yüzeyden dolayı nanopartiküller artan oranda emme kapasitesi ve hacimsel materyallere kıyasla biyolojik reaktivite gösterirler. Bu nedenden dolayı, bir biyolojik sıvı içerisine nanopartikül girecekse bu nanopartikül farklı proteinlerle kaplanmaktadır (Kane ve ark. 2007). Kaplama materyali olarak kullanılacak protein sadece protein belirlenmesi ile değil aynı zamanda partikül boyutu, yüzeyi, kümeleşme durumu ve partikül konsantrasyonu ile de belirlenir (Cedervall ve ark. 2007). Kaplama yöntemi, etkili boyutu ve bunun sonucunda fizyolojik koşullar altında nanopartiküllerin davranışını belirler (Schulze ve ark. 2008; Kim ve ark. 2005). Ek olarak, protein konsantrasyonu veya aktivitesi partikül toksisitesini değerlendirmede kullanıldığında nanopartiküller doğrudan olarak deney sonuçlarını etkileyebilir (Veranth ve ark. 2007). Sonuç olarak, yüksek emme kapasitesine sahip partiküller üretim prosesi esnasında kontamine edici bileşiklere bağlanma kapasitesine sahiptir (Pulskamp ve ark. 2007).

Optik Özellikler: Işık absorpsiyonu veya floresan dedeksiyonu partikül toksisitesini değerlendirmede kullanılır. Çoğu nanopartikül dedeksiyon sistemiyle engelleme potansiyel olarak optik özellikler gösterirler. Nanopartiküllerin ışık absorplama özelliğine bağlı olarak sodyum tianat gibi metalik nanopartiküller doğrudan hücre canlılığı testlerinde sonuçları etkilerler (Davis ve ark. 2007). Dahası, altın nanopartiküllerinin ve floresan boyalarının yakınlığı azalan floresan sinyal yoğunluğu ile sonuçlanır (Dulkeith ve ark. 2005). Sonuç olarak, QD ve nanokaplama gibi medikal görüntülemeye kullanılan nanopartiküller farklı dalga boylarında ışığı absorplar ve emerler ve belki optik okuma ile testlerdeki sinyal yoğunluğunu saptırabilirler.

Katalitik Aktivite: Nanoyapılı malzemelerin yüksek yüzey / kütle ilişkisi herhangi bir katalitik aktiviteyi artıran aşırı yüzey enerjisiyle sonuçlanır. Metal oksit nanopartikülleri, ful erenler ve silika partikülleri gibi farklı nanopartiküller hücre olmayan sistemlerde ROS oluşumuna neden olurlar (Isakovic ve ark. 2006; Kim ve ark. 2004; Fubini ve ark. 2003). 2-4 nm boyutundaki nanopartiküllerin ROS oluşturma hızı 100 nm partiküllerin ROS oluşturma hızından 100-1000 kat daha fazladır (Hoffman ve ark. 1994). Bu bilgi bize artan katalitik aktivitenin boyuta bağımlı olduğunu göstermektedir. TiO_2 ve ZnO gibi fotoaktivite özelliğine sahip nanopartiküller eritrosin gibi anyonik bir boyayı parçalarlar (Hasnat ve ark. 2007). Tek duvarlı karbon nanotüpler ise MTT substratını oksidize ederek MTT ile yapılan hücre canlılığı testini engeller (Belyanskaya ve ark. 2007). Bu nedenle redoks aktif nanopartiküller susbtrat oksidasyonuna bağlı olarak testlerde yanlış sonuçların oluşumuna neden olurlar.

Asidite / Alkalilik: Solüsyonlardaki nanopartiküllerin pH'ı düşünüldüğünde çoğu yaygın *in vitro* testleri pH bağımlı olarak görülmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin asitliği veya bazlılığı test sonuçlarını etkileyecektir (Kroll ve ark. 2009).

Manyetik Özellikler: Fe_2O_3 gibi bazı metal oksit nanopartikülleri süper paramanyetik özelliklere sahiptirler, güçlü ve bölgesel manyetik alan oluşturabilirler. Bu manyetik alan ise serbest radikallerin oluşumu ve daha sonra redoks reaksiyonlarına bağlı olarak sitotoksisite testlerinin engellenmesiyle

önemli bir parametre haline gelmiştir (Schafer ve ark. 2000; Dobson ve ark. 2001).

Dağılma: Nanopartiküller su içeren çözeltilerde çözünmemek üzere (Larson ve ark. 2003) veya ZnO gibi sulu çözeltilerde boyuta bağlı ve intrinsik dağılma gösteren (Meulenkamp ve ark. 1998) materyaller olarak dizayn edilmişlerdir. ZnO bir biyolojik medyum içerisine girdiğinde metal iyonlarını salıverir. Sitotoksosite testleri metal iyonlarına duyarlıdır ve bu nedenden dolayı çözünmeyen nanopartiküllerin bulunması biyolojik sistemlere zarar vermektedir (Kroll ve ark. 2009).

1.3.3. Nanopartikül *In Vitro* Test Yöntemlerinin İyileştirilmesi

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri risk değerlendirmesi için *in vitro* sitotoksosite testlerinin daha iyi kullanılabilirliğini kısıtlar. Nanopartikül toksisitesini belirlemek için yapılan çalışmalar nanospesifik özellikler tarafından etkilenmeyen test sistemlerini kullanmayı gerektirmektedir (Nel ve ark. 2006).

Toksositeyi belirleyecek yeni test sistemleri yeni toksisite biyomarkerlarını içermelidir. Örnek olarak; *in vivo* toksisite parametrelerini yansıtan daha iyi hücre kültürü sistemleri geliştirilmelidir (Lilienblum ve ark. 2008). Genom tarafından kontrol edilen hücresel ürünler üzerine odaklanabilecek toksikogenomik gibi yeni alt disiplinler oluşturulmalıdır (Heijne ve ark. 2005). Bu teknolojiler hücresel cevaplar ve biyokimyasal mekanizmaların daha derin bir şekilde araştırılmasına olanak sağlamalıdır (Kroll ve ark. 2009). Yukarıda yapılması önerilen yeni sistemler de konvensiyonel dedeksiyon sistemlerine bağlıdır ve nanopartikül spesifik özellikler tarafından etkilenecektir. Markera bağımlı olmayan yeni sitotoksosite testlerinin geliştirilmesi bu engelleri ortadan kaldıracaktır. Örnek olarak; hücresel analiz, elektrik rezistans veya refraktif indeks gibi fiziksel hücre özellikleri kullanılabilir. Dijital holografik mikroskopi, görünen ışığın değişim fazıyla sonuçlanan hücre kültürü medyumunu içindeki yaşayan hücrelerin içsel refraktif indeksini belirleyebilir (Marquet ve ark. 2005).

Markera bağımlı olmayan canlı ölçüm sistemleri değerlendirildikten ve onaylandıktan sonra spesifik nanopartikül özelliklerinden etkilenmeyen

nanopartiküllerin *in vitro* toksisite testleri için genel yeni bir standard belirlenebilir (Kroll ve ark. 2009).

1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Aktivitesinin Tespit Edilmesi

Nanopartiküllerin toksik etkisinin değerlendirilmesinde *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin *in vitro* toksisitesilerinin belirlenmesinde hücre kültürü çalışmaları ön plana çıkmaktadır.

Hücre kültürü; canlıdan izole edilen doku parçalarının yapay olarak hazırlanan uygun besiyerlerinde *in vitro* şartlarda çoğaltılması esasına dayanır. Hücre kültürü hücrelerin kontrollü koşullar altında yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Tarihsel olarak hücre kültürü alanındaki gelişmeler doku ve organlardan elde edilen hücrelerin yaşatılması ve çoğaltılması için geliştirilen metodlara dayanmaktadır. Bu teknikler özellikle 1950 ve 1960'lı yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde büyütülmesi üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiş ve son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre konusunun bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla toplumda da popüler bir hal kazanmıştır. Hücre kültürleri; viral aşılar ve viral teşhisli çalışmalar, büyüme faktörlerinin üretimi, enzim, antikor ve böcek aşı üretimi, somatik gen tedavisi, tümör aşıları, hücre-çevre ilişkilerini araştırmada ve son dönemde de nanotoksikoloji çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kroll ve ark).

In vitro toksisite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi veya hücresel metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad, 2000; Kroll ve ark. 2009). *In vitro* sitotoksikite testleri hızlı ve rasyonel metodlardır (Kroll ve ark. 2009). *In vitro* da kullanılan yöntemler test yapılması gereken hayvan sayısını azaltır ve organ toksisitesini hedef alan çalışmalar için çok değerli bir araçtır.

İnsanların farklı yollarla biyolojik sistemlerine giren nanomateriyallere yoğun oranda maruz kalma riski vardır (Oberdorster ve ark. 2005). Bu riskler, nanopartiküllere maruz kalmanın istenmeyen yan etkileriyle ilgili olarak son birkaç yıl içinde yapılan bazı çalışmalar tarafından doğrulanmıştır (Brumfiel,

2003; Goldston, 2007; Nel ve ark. 2006; Igarashi, 2008; Nielsen ve ark. 2008; Sharma ve ark. 2009; Reeves ve ark. 2008; Hayes ve ark. 2007).

1.4.1. Çalışmada Kullanılan Toksisite Yöntemleri

1.4.1.1 Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi

Son yıllarda *in vitro* yöntemler çevresel ve işe bağımlı oluşan sağlık risklerinin toksisitesinin değerlendirilmesinde önemli bir potansiyel göstermektedirler (Lestari ve ark. 2006). Bu yöntemlerden birisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksfenil)-2-(4-sülfonik)-2H- tetrazolyum) testidir. MTT testi sayısal olarak çoğu sitotoksisite çalışmasında uygulanmış ve gelişim göstermiştir.

MTT testi tek tabakalı kültürlerde sitotoksisite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir (Fotakis ve Timbrell 2005; Fent 2001). Bu testin, hızlı ve yüksek duyarlılığına sahip olduğu kanıtlanmıştır (Potera, 2007). Bu yöntemin esası, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümü sonucunda elde edilen formazan tuzunun yoğunluğunun ölçülmesiyle canlı hücrelerin yoğunluğunun belirlenmesidir.

Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Mossman, 1983; Potera, 2007).

1.4.1.2 Lizozomal aktiviteye dayalı Nötral Red Testi

Neutral Red (NR) testi, tek tabakalı kültürlerde *in vitro* sitotoksosite sitotoksosite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerden birisidir (Fotakis ve Timbrell 2005; Fent 2001; Kroll ve ark. 2009). NR deneyi, lizozomlarda biriken, elektrostatik olarak lizozomal matrisindeki anyonik bölgelere bağlanabilen, katyonik supravital bir boya olan nötral kırmızısının (3-amino-7-dimetilamino-2metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alınımına dayanan bir yöntemdir (Bulychev ve ark. 1978; Weyermann ve ark. 2005; Babich ve ark. 1990; Borenfreund ve ark.1988). Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızısının alınımını ve bağlanmasını azaltarak canlı/sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır (Komissarova ve ark. 2004). Nötral kırmızısı boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006). Bu yöntem, uzun yıllardır kozmetik, farmasötik ilaçlar ve endüstriyel kimyasalların toksisitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Nötral kırmızısı alımı sitotoksosite deneyi, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Popiolkiewicz ve ark. 2005).

1.5. Hücre İskeleti

Ökaryotik hücrelerdeki hücre şeklinin korunmasını, şekil değişikliklerini, hücre hareketini, hücre içi vezikül taşınımını, hücre sinyalleşmelerini düzenleyen sitoplazmadaki protein filamentlerden oluşan karmaşık ağ sistemine **hücre iskeleti** denilmektedir (Alberts ve ark. 2002; Turner ve ark. 2004; Lodish ve ark. 1999; Pramod ve ark. 2007). Hücre iskeletinin dinamik organizasyonu hücre adezyonu, çoğalması, farklılaşması ve migrasyonu için çok önemli rol oynar (Weiger ve ark. 2009). Bazı yüksek organizmalar ve ökaryotik hücreler, bir çekirdek (bazı istisnai durumlar hariç) ve hücre iskeleti içermektedirler (Salman ve ark. 2002). Hücre iskeleti zincirler halinde dizilmiş protein moleküllerinden oluşmaktadır. Ökaryotik hücre iskeleti biyopolimer ağlarını içermektedir

(Pramod ve ark, 2007). Ökaryotik hücre iskeleti üç farklı tip filament içermektedir. Bunlar mikrofilamentler, mikrotübüller ve yardımcı filamentlerdir (Promad ve ark. 2007; Berdyeva ve ark. 2005; Gunaratnam ve Grant 2004; Jiang ve ark. 2009). Hücre iskeleti elemanlarının her biri ökaryotik hücrelerin yapısal bütünlüğü, organizasyonu ve şekli üzerinde önemli rollere sahiptir. Aktin filamentleri plazma membranının aşağısında ağ örgüsü şeklini oluşturur. Bu filamentler hücrenin mekanik işleri için gerekli gücünü oluşturma özelliğine sahip motor proteinler gibi çok fazla proteinlerle çapraz bağ kurarlar. Bu filamentler ayrıca çift katlı lipid tabakası içine gömülü proteinler yardımıyla plazma membranına bağlanırlar. Sentrozomdan köken alan mikrotübüller çekirdeğe yakındır ve aktin korteksine giden yollar uzanır. Yardımcı filamentler ise çekirdek etrafında yoğunlaşırlar (Pramod ve ark. 2007).

1.5.1. Hücre İskeletinin elemanları

1.5.1.1 Mikrotüpçükler

Mikrotüpçükler hücrelerin önemli yapısal elementlerindendir. Mikrotübüller, hücrelere fiziksel destek sağlayan, hücre şeklinin sabit kalmasını sağlayan ve çoğu önemli fizyolojik olayları kolaylaştıran ökaryotik hücrelerin hücre iskeletlerinin temel bileşenlerindendir (Watanabe ve ark. 2005; Wang ve ark. 2009; Stamenovic, 2005). Hücre içindeki mikrotübüller yüksek derecede dinamiktirler. Sahip oldukları açık uçları vasıtasıyla kolayca polimerize ve depolimerize olurlar (Hawkins ve ark. 2010). Mikrotübüller hücre içi iskeletsel filamentlerin en sert olanlarıdır. Mikrotübüllerin sertliği bunların biyolojik fonksiyonları için çok önemlidir. Hücre şeklini oluşturmak için mikrotübüllerin sert olması gerekmektedir (Hawkins ve ark, 2010). Mikrotübül filamentler hücre iskeletinin en geniş filamentleridirler. Mikrotübüller 25 nm büyüklüğünde dış çapa, 17 nm büyüklüğünde iç çapa sahip olan sert, içi boş çubuklardır. Mikrotübüller tübülün monomerlerinin kendiliğinden bir araya gelmesi sonucu oluşan polar ve içi boş küçük tüplerdir. Aktin filamentler ile karşılaştırıldığında az sayıda bulunurlar. Mikrotübüller mikrotübül düzenleme merkezi veya hücre

merkezinine yakın olan sentrozomdan köken alırlar. (Pramod ve ark. 2007). Mikrotübüller sitoplazmanın her yerine yayılmışlardır ve spektrine bağımlı membran iskeleti ile etkileşmek için dynaktin ve dynein motor proteinlerini kullanırlar (Lambert ve ark. 1997). Ancak, mikrotübüller plazma membranına kendi başlarına uzanamazlar (Dejana ve ark. 2004; Small ve Kaverina, 2003). Her mikrotübülün duvarında 13 kadar subfilament bulunmaktadır (Prasain ve Stevens, 2009). Tübülün heterodimerleri protofilamentler oluşturmak için uç uca gelecek şekilde küme oluşturmaktadırlar. Bu protofilamentler tüp içine yuvarlanan bir tabaka oluşturmak için yana doğru bağlanırlar(Hawkins ve ark. 2010).

Mikrotüpçükler túbülün adı verilen 110.000 Dalton molekül ağırlığında bir protein kapsamaktadırlar. Túbülün 2 monomerden oluşan bir dimerdir. Kolşisin, vinblastin gibi alkaloid maddeler varlığında ve düşük sıcaklıklarda mikrotüpçükler hızlıca túbülün dimerlerine parçalanırlar. Bu maddeler iğ ipliklerindeki túbüline bağlanarak mitozu engellemektedirler. Bağlanma sırasında dimer monomerlerine ayrılırlar.

Aktin filamentleri gibi, mikrotüpçükler de hücre içinde devamlı yapılanıp ayrışabilen dinamik yapılardır. Hücre şeklinin belirlenmesinde, hücrelerin yer değiştirmesinde, organellerin hücre içindeki taşınmasında ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını içeren çok çeşitli hücre hareketlerinde görevleri vardır.

1.5.1.2 Mikrofilamentler

Kasılgan yapıları oluşturarak sitoplazmik harekete neden olmaktadır (Turner ve ark. 2004). Hücrede iki tip mikrofilament bulunmaktadır. Bunlardan biri aktin, diğeri ise miyozin filamentidir. Aktin filamentleri mikrofilament olarak bilinirler ve bunlar polar protein polimerleridir. Aktin filamentleri, G-aktin olarak bilinen aktin alt ünitelerinden kendiliğinden oluşurlar. Yaklaşık 6-8 nm kalınlığında, birkaç mikron uzunluğundadırlar (Pramod ve ark. 2007). Ana hücre iskeleti proteini aktindir. Bir hücrede bulunan aktin filamentler, mikrotübüllere göre daha fazladırlar ve bir hücrede aktif filamentlerin toplam uzunluğu mikrotübüllerin tümünün uzunluğunun 30 katına eşittir (Koparal, 2001). Aktin,

küresel bir proteindir ve kas hücrelerinin temel proteindir. Bütün ökaryot hücrelerde aktin bulunmaktadır. Ökaryotlarda, aktin filamentleri hücre ve dokulara mekanik destek sağlamaktadırlar (Cardelli ve ark. 2009). Hücre iskeletinin protein polimerleri olan mikrotübüller ve aktin filamentleri, hücrenin bölünme ve gelişmesinde, hareketinde, hücre şeklinin gelişme ve korunmasında rol oynamaktadırlar (Lodish ve ark. 1999). Miyozin filamentleri kas hücrelerinde aktin ile sıkı bir birlik içindedir.

Aktin hücre iskeleti, hücre bölünmesi, hücre hareketi, organelerde hücrelerarası trafiği, hücre polaritesinin devam etmesi ve hücre morfolojisini içeren hücre fonksiyonlarda yer alan dinamik bir yapıya sahiptir (Revenu ve ark. 2004; Kobiak ve ark. 2004; Rafalski ve Theriot, 2004; Pruyne ve ark. 2004). Aktin hücre iskeleti yüksek derecede dinamik ve hücre fonksiyonlarına göre polimerize ve depolimerize olan bir yapıya sahiptir. Bu filamentlerin en önemli ve dikkat çekici özelliklerinden birisi fiziksel ve kimyasal durumlara bağımlı olarak hızlı bir şekilde polimerize ve depolimerize olmalarıdır (Cardelli ve ark. 2009). Düz olmayan kas hücrelerinde özgün globüler B-aktin ve gama aktin alt üniteleri alternatif olarak F-aktin olarak bilinen çift zincirli filamentli bir yapıyı oluşturmak için polimerize olurlar. Genel olarak G ve F-aktinin miktarı birbirleriyle dengelidir (Stossel ve ark. 1985). Aktin bağımlı hücre iskeleti yapısı için temel yapı olan F-aktinin oluşumu için aktin polimerizasyonu gereklidir.

Aktin polimerizasyonu, nükleasyon (çekirdeklenme) ve elongasyon (uzama) adı verilen iki ardışık işlem sonucu oluşur (Stossel, 1993). Üç aktin monomeri bir geometrik konfigürasyonda birbirleriyle bağlandığı zaman çekirdeklenme oluşur ve çekirdeklenme uzama için bir bölge sağlar. Bu bölgeye ATP bağlı G-aktin bağlanır ve F-aktin oluşturmak için büyür. F-aktin, aktin monomerlerinin hızlıca bağlandığı ve filamentin uzamasını sağlayan pozitif uç olarak bilinen çok hızlı büyüyen bir uca sahiptir. F-aktin polar yapısını oluşturmak için aktin monomerlerinin yavaşça eklendiği yavaş büyüyen aktin ucu ise negatif uç olarak bilinir(Steinmetz ve ark. 1997; Prasain ve Stevens, 2009). F-aktin, komşu monomerler arasındaki bağlanma ilgisinin kaybıyla sonuçlanan ATP'nin ADP' ye dönüşmesiyle depolimerize olur (Lambrechts ve ark, 2004; Prasain ve Stevens, 2009). Aktin hücre iskeletinin fonksiyonu ve organizasyonunu

ayarlamaktan sorumlu süreçler için gerekli olan çapraz bağlayıcı, uzatıcı ve aktin nükleasyonunu indükleyen çoğu aktin bağlanma proteinleri tanımlanmıştır.

F-aktin, üç farklı hücre iskeleti yapısını düzenler. Bunlar; membran iskeleti, kortikal aktin çerçeveleri ve stres lifleridir. Membran iskeleti ve stres liflerinin ikisi de kısa F-aktin filamentlerinden meydana gelmektedirler (Heimann ve ark. 1999; Prasain ve Stevens, 2009). Kortikal aktin çerçeveleri ise uzun F-aktin demetlerinden meydana gelmiştir (Heimann ve ark. 1999). Membran iskeleti, membran mimarisini belirler ve membranın gerilebilme kapasitesini sağlar (De Matteis ve Morrow, 2002). Bu destek yapısı plazma membranına bitişiktir. Kortikal aktin çerçevesi spektrin bağımlı membran iskeleti altında stabilize ve organize edilmiştir. Bu yapının kalınlığı aktin bağlanma ve çapraz bağlanma proteinleri tarafından koordine edilmiştir. Membran iskeleti ve kortikal aktin çerçeveleri farklı hücre iskeleti yapılarıdır ancak, bunlar geniş multi-protein komplekslerinin koordinasyonu ile etkileşirler (Prasain ve Stevens, 2009).

Stres lifleri aktomyozin demetleridir ve bunlar hücre kasılmalarını başlatmak için gereklidirler (Hotulainen ve Lappalainen, 2006; Prasain ve Stevens, 2009). Stres lifleri alternatif polariteyle kısa F-aktin proteinlerinden oluşmaktadır (Prasain ve Stevens, 2009), ve bunlar alpha-aktinin ve diğer aktin bağlayıcı proteinler tarafından çapraz bağlanmaktadır (Hotulainen ve Lappalainen, 2006). Membran iskeleti ve kortikal aktin çerçeveleri hücre membranına yakın olmalarına rağmen, stres lifleri hücre sitoplazmasında baştanbaşa uzanmışlardır. Gerçekten, stres lifleri içeriye doğru bir gerilim oluşturur. Bu kortikal aktin çerçeveleri tarafından oluşturulan dışa doğru olan gerilimi etkisiz hale getirir (Prasain ve Stevens, 2009).

F-aktin hücre iskeleti ile mitokondri arasında çeşitli etkileşimler bulunmaktadır. Mitokondri ve aktin hücre iskeleti arasındaki etkileşimler sadece hücre içindeki mitokondri pozisyonu ve transportunda değil mitokondriye bağımlı apoptotik olaylar için de önemlidir. Mitokondri ve aktin hücre iskeleti arasındaki etkileşimler, hücre bölünmesi esnasında mitokondriyal hareket ve mitokondrinin yerleşimi, hücre polaritesinin kurulmasını ve normal hücre fonksiyonlarını anlamamızda temel katkılar sağlar. Aktin hücre iskeleti bu olaylarda iki önemli role sahiptir.

1. Organellerin hücre içi hareketleri için gereklidir.
2. Hücre korteksindeki organellerin immobilizasyonu için gereklidir (Istvan ve ark. 2006).

Mitokondrinin aktine bağımlı immobilizasyonunun mekanizması yeterince anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, bu immobilizasyon olayları mitokondriyal kalıtım ve yüksek ATP elde edilen bölgelerde mitokondrinin yerleşimi için kritik öneme sahiptir. Mitokondri aktin mikrofilyamentlerini lokal transportta yardımcı sistem olarak kullanabilir (Morris ve Hollenbeck, 1995).

1.5.1.3 Intermediate Elementler

Intermediate filamentler yüksek yapılı ökaryotik hücrelerde üç temel filament sisteminden biridir (Coulembe ve Wong, 2004; Ndozanque ve ark. 2008; Marceau ve ark. 2007). Intermediate filamentler 60'dan fazla farklı gen tarafından kodlanır ve 5 sınıfa ayrılır. Tip I ve Tip II asit ve bazik keratinlerdir ve tüm epitel hücrelerde bulunurlar. Tip III intermediate filamentler çoğu hücre tipinde yer almaktadır. Mezenşimal endotel ve lökosit hücrelerde vimentin, kas, glia hücrelerindeki glial fibril asidik proteinlerinde ve periferel sinir fiberlerindeki periferinlerde ise desmin bulunmaktadır. Tip IV intermediate filamentler nöronlarda ve periferel nöroendokrin sistem hücrelerinde bulunan nörofilamentler ve interneksindir. Tip V filamentler ise nükleer membranın iç zarındaki bir filament desteği sağlamak için bulunan 3 nükleer lamin proteinleridir (Ndozanque ve ark. 2008; Marceau ve ark. 2007; Broers ve ark. 2006). Her bir intermediate filament monomeri çubuksu alfa heliks domainine sahiptir ve bu domain N-terminal ile C-terminal globüler domainleri bağlar (Fuchs ve Weber, 1994). Bu çubuksu domain intermediate filamentlerin oluşumu esnasında büyük hareket ettirici bir kuvvet meydana getirir (Herrman ve Aebi, 2003). Intermediate filamentler plakin ailesinin proteinleri (periplakin, plektin ve dezmozoplakin) yardımıyla hücre iskeletinin diğer üyelerine çapraz olarak bağlanırlar ve polimerize olurlar. Bu yapının genel bir fonksiyonel özelliği mekanik strese dirençliliğidir (Coulembe ve ark. 2004). Intermediate filamentlerin benzersiz yapısı, fibril özelliği ve bağlayıcı proteinler ile etkileşimi bunların mekanik

olmayan doku spesifik koruma fonksiyonları olduğunu vurgulamaktadır. Bu fonksiyonlar hücre ölümüne neden olan kimyasal strese dirençliliği içerir (Ndozanque ve ark. 2008; Marceau ve ark. 2007). Intermediate filamentlerin apoptozis esnasında 2 tip görevi vardır. İlki, TNF (Tümör Nekrozis Faktör) ailesi reseptörleri tarafından aktive edilen apoptotik sinyalleri azaltır ve bunların kaspazlar tarafından kesilmesi ile ölen hücrenin parçalara ayrılmış yapısına katılırlar (Ndozanque ve ark. 2008).

Ara filamentler 10 nm çapındadır ve bu boyut hücre iskeletinin diğer iki temel elemanı olan aktin filamentleri ve mikrotüpçüklerin çaplarının arasındadır. Diğer iki hücre iskeleti elemanlarının aksine bunlar hücre hareketlerine doğrudan katılmazlar. Intermediate filamentlerin hücre iskeletinin elementi olarak hücresel bütünlük, şekil ve organel pozisyonlarının korunması, hücresel ve hücre içi hareketlerin düzenlenmesi gibi görevleri olduğu ileri sürülmektedir (Milli ve ark. 2000).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan V79 379A (CHL) Hücreleri

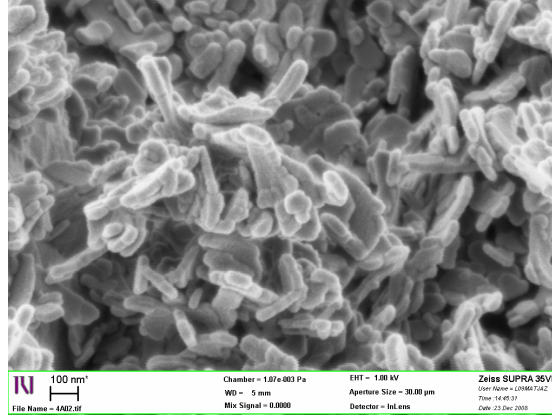
Chinese Hamster Akciğer fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler sitotoksosite, toksisite ve mutajenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melo ve ark.2001; Katzer ve ark.2002). V79 379A hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

2.2. Kullanılan ZnO Nanotozları

Çalışmalarda kullandığımız farklı boyut, şekil ve plakamsı özelliklere sahip ZnO nanotozları ve bu nanotozların elde edilmesiyle ilgili tüm veriler Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimleri Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ender SUVACI tarafından sağlanmıştır.

2.2.1. 100 nm boyutlu ZnO nanotozları

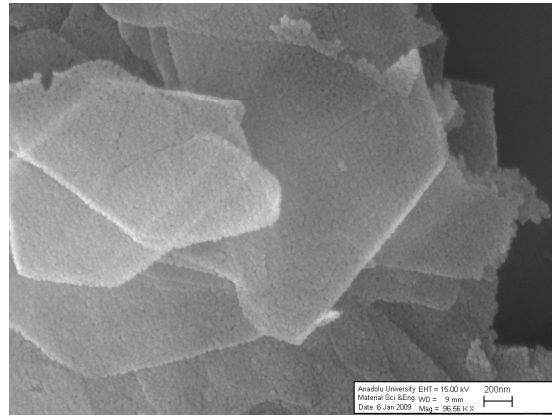
100 nm boyutlu ZnO tozu çözücü olarak suyun kullanıldığı hidrotermal yöntemle sentezlenmiştir. ZnO'nun hidrotermal sentezlerinin öncül maddeleri, 1,0-M konsantrasyonla $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan direkt çöktürme prosesi ile hazırlanmıştır. pH değişimi için çöktürme ajanı olarak distile su içinde çözünen NaOH 10,0,M konsantrasyonda hazırlanmıştır. NaOH solüsyonu, magnetik karıştırıcı altında $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ üzerine damlatma yoluyla ilave edilmiştir ve konsantrasyonun 0.5 M'a kadar dilüe edilmesi sağlanmıştır. NaOH solüsyonunun ilave edilmesi beyaz bir çökeltinin oluşumuyla sonuçlanmıştır. Daha sonra çökelti distile su ile yıkanmış, kurutulmuş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Şekil 2.1'de elde edilmiş olan 100 nm boyutlu ZnO nanotozunun SEM ile çekilmiş görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 2.1 100 nm boyutlu ZnO nanotozunun SEM ile çekilmiş görüntüsü

2.2.2 10-20 nm tanelerin birleşimiyle oluşan 2-8 µm plaka ZnO

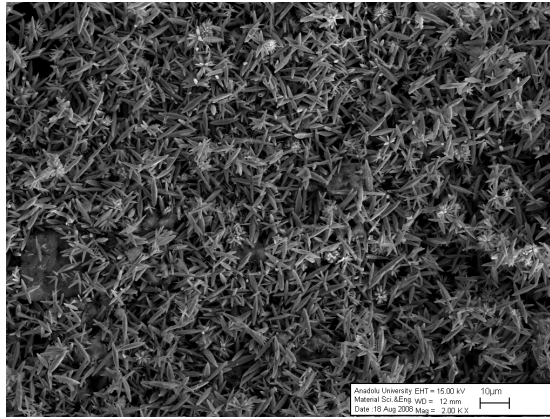
Kontrollü topaklanmış mikron boyutlu plaka sentezi solvotermal yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde çözücü yerine su kullanıldığı için hidrotermal yöntemden farklı bir isim verilmiştir. Sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilen bu sentezde çinko kaynağı çözücü içerisinde belirli bir sıcaklığa getirilene kadar karıştırılarak ısıtıldıktan sonra sırasıyla yıkama, kurutma ve kalsinasyon işlemleri uygulanmıştır. Daha sonra maddenin çeşitli yöntemlerle karakterizasyonu yapılmıştır. Şekil 2.2’de bu nanotoza ait SEM fotoğrafı görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 2.2 10-20 nm tanelerin birleşimiyle oluşan 2-8 µm plaka ZnO’nun SEM görüntüsü

2.2.3 Ortalama 7 µm çubuk ZnO

Daha önceki bir çalışmaya dayanarak hazırlanan prosedürde (Suvaci ve Özer, 2005); 0.5 M $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (Zinc nitrat hegzhidrat, Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır. Seyreltilerek hazırlanan 0.1 M NH_3 çözeltisi çinko nitrat çözeltisi ile karıştırılarak çinko hidroksit türlerinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Elde edilen jel saf su ile yıkanarak azot içeren bileşenlerden temizlenmiştir. Sonrasında hidrotermal otoklava alınan jel 100°C 'de 3 saat tutulmuştur. Hidrotermal sentez sonrasında elde edilen toz saf su ile santrifüj yardımıyla yıkanmıştır. Daha sonra bu toz donmaya dayalı kurutucu ile kurutulmuştur. Şekil 2.3'de tozun SEM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 2.3 Ortalama 7 µm çubuk ZnO'nun SEM görüntüsü

2.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), Penicilin-Streptomycin (Biological Industries), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Trypsin-EDTA solution (Biological Industries), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Merck), Triton X-100 (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), Formaldehit (Merck), CaCl_2 (Merck), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), Phalloidin FITC (Sigma), Neutral Red (Fluka), Asetik Asit Glasiyal (Carlo Erba), Etanol (Riedel de Haen).

2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, küçük cam petriler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

2.5. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), Kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Olympus BX51 floresan mikroskobu, DP-72 analiz sistemi (Olympus), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Test maddeleri olarak kullanılan tüm ZnO nanotozları kullanılan hücrelerin büyümesi ve gelişimi için kullanılan kültür vasatında çözülerek 1000 µg/ml'lık ana stok dozu hazırlanmıştır. Daha sonra bu ana stokdan dilüsyon yolu ile

hazırlanan bu konsantrasyonlar 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarıdır. Bu hazırlanan konsantrasyonlar literatür taraması neticesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada negatif kontrol olarak kültür vasatı, negatif kontrol olarak ise vasatın içeriğinde de bulunan ultra saf su 1 µl /ml olacak şekilde kullanılmıştır. Bu maddeler her deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

2.8. Yöntem

2.8.1. V79 379A Hücrelerinin kültürü

V79 379A (CHL) hücreleri, inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicilin-Streptomycin ve %9,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğunda belirlenen sayıda (6000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 4 ve 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız ZnO nanotozlarının belirlenen konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bunlar için çözücü olarak kültür vasatı kullanılmıştır. Ultra saf su oranı %1'i geçmeyecek şekilde hazırlanmıştır.

2.8.3. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 4 ve 24 saatlik muameleye tabi tutulan hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırılarak, hücreler 5 mg/ml⁻¹ MTT solüsyonu ile 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu testler 3 kez 8 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Mossman, 1993).

2.8.4. Neutral Red Up-take sitotoksiste ölçümü

Test maddeleri ile 4 ve 24 saat muamele edilen hücrelerden besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 50µg/ml Neutral red solüsyonu ile 37°C'de 2-3 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerden boya solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan 0,1 ml ilave edilerek oda sıcaklığında 1-2 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra fiksatif/yıkama solüsyonu dökülüp plakalar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde 1 gün bekletilerek kurutulmuştur. Bu süre sonunda asetik asit-etanol solüsyonu 0,1 ml ilave edilerek 5 dakika oda ısısında bekletilmiş ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Borenfreund ve ark.1988; Babich ve ark. 1990).

2.8.5. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

Aktin filamentlerinin floresan mikroskopunda incelenmesinde Rhodamin Phalloidin (RhPh) genellikle kullanılmaktadır (Balaz ve Mansson 2005, Borovikov ve ark. 1996, Klinth ve ark. 2003).

Phalloidin, aktin filamentlerini sınıksıkı sarmakta ve onların yapısını stabilize etmektedir (Balazs ve ark. 2004). Aktin filamentlerini stabilize eden Phalloidin, daha çok *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca intrasellüler çalışmalardaki Phalloidin 24 floresan türevleri, floresan mikroskopik yöntemlerde aktin iskeletinin mimarisinin tasarlanmasında uygulanmaktadır (Balazs ve ark. 2004).

Hücre iskeletindeki zararları görebilmek amacıyla FITC (floresan izosiyonat)- Phalloidin boyaması yapılarak F-aktin iskeletine bakılmaktadır (Gunaratnam ve Grant 2004).

25 cm²' lik flasklarda büyütülen V79 379A hücreleri Tripsin - EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırıldıktan sonra, içlerinde 2' şer adet steril yuvarlak lamel bulunan her bir kuyucuğa 150.000 hücre gelecek şekilde 6' lı plakalara ekilmişlerdir. %5 CO₂' li gaz ortamında 37°C' deki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerleri 6' lık plakadaki kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Lameller üzerine yapışmış hücreler üzerine belirlenen maddelerin konsantrasyonları medyum içinde ilave edilmiş ve tekrar 12 saat inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda lameller % 3,7'lik formaldehit ile 37° C' de tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄; Ph 7.3) ile 3 kere yıkanmışlardır. Ardından lameller % 0.2'lik Triton X-100 ile 1,5 dakika muamele edilmiştir. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan hücreler, 1mM' lık Phalloidin FITC ile 2 saat kapalı ve karanlık ortamda 22°C 'de bekletilmiştir. Daha sonra 3 kez PBS ile yeniden yıkanan hücreler üzerinde 7 µl PBS bulunan lamalar üzerine kapatılarak, sabitlenmiştir (Fujiwara ve ark.2004).

2.8.6. Mikroskopi ve Fotoğrafi

Hücreler Olympus BX51 floresan ataçmanlı mikroskop ve Olympus DP-72 analiz sistemi ile incelenmişlerdir.

2.8.7. İstatiksel değerdendirmeler

MTT ve NRU deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerdendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Test maddelerinin uygun konsantrasyonları, sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla V79 379A hücreleri üzerine 4 ve 24 saat uygulanmış, gerekli zaman sonrasında hücrelere MTT ve NR verilmiş ve ELISA plate okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.1 100 nm ZnO Nanotozlarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri

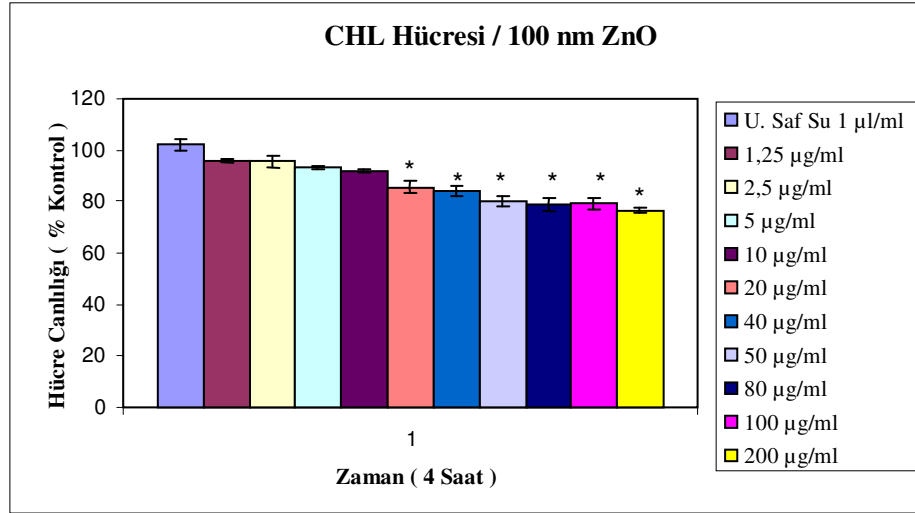
3.1.1. 100 nm ZnO nanotozlarının MTT testi sonuçları

100 nm ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının V79 379A hücreleriyle yapılan 4 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin düşük konsantrasyonlarının (1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml) konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Maddenin konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml’lık maddenin sitotoksik etkilerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. 4 saat sonucundaki hücre canlılığı % 20 oranında azalmıştır. 20 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

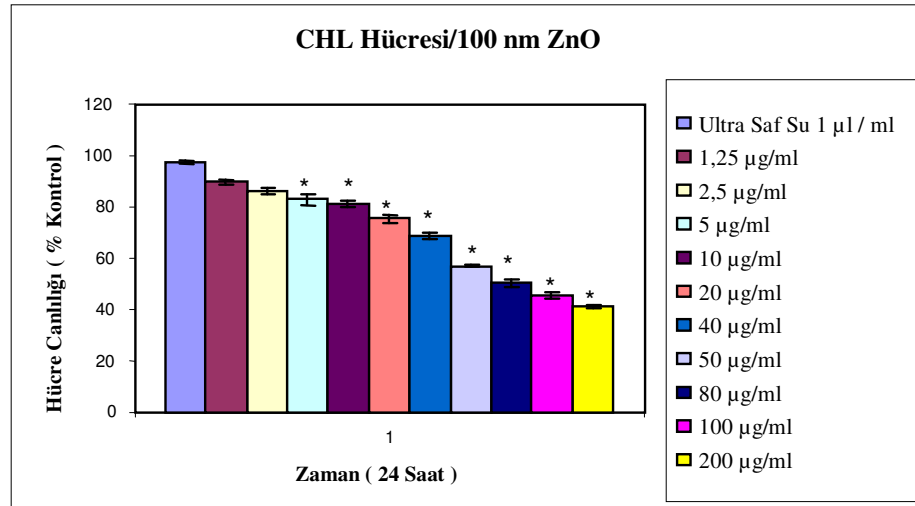
100 nm ZnO nanotozlarının 4 saatlik uygulaması sonucunda bu maddelerin kısa süreli uygulamalarında toksik etkisinin az olduğu görülmektedir Şekil 3.1’ de 4 saatlik MTT sonucu gösterilmektedir.

100 nm ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin düşük konsantrasyonlarının (1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml) CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu konsantrasyonlar toksisiteyi ortalama % 20 oranında azaltmıştır. Maddenin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 20 µg/ml % 25, 40 µg/ml % 32, 50 µg/ml % 43, 80 µg/ml % 50, 100 µg/ml % 55 ve 200 µg/ml’lık konsantrasyon % 59’luk hücrenin azalmasına etki etmişlerdir. Burada 80 µg/ml’lık konsantrasyon

hücre sayısını % 50 oranında azaltmıştır. 5 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.2' de 100 nm ZnO'nun 24 saatlik etkisinin MTT grafiği yer almaktadır.



Şekil 3.1 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

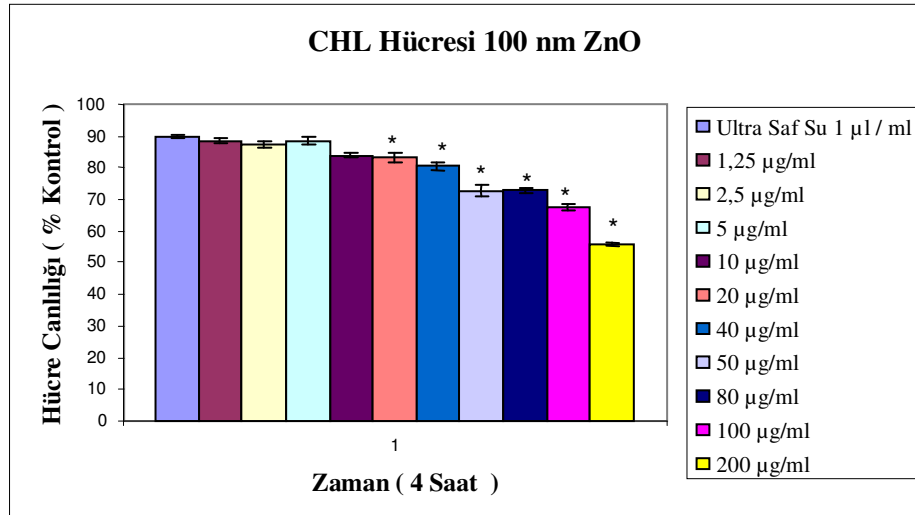


Şekil 3.2 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (*Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

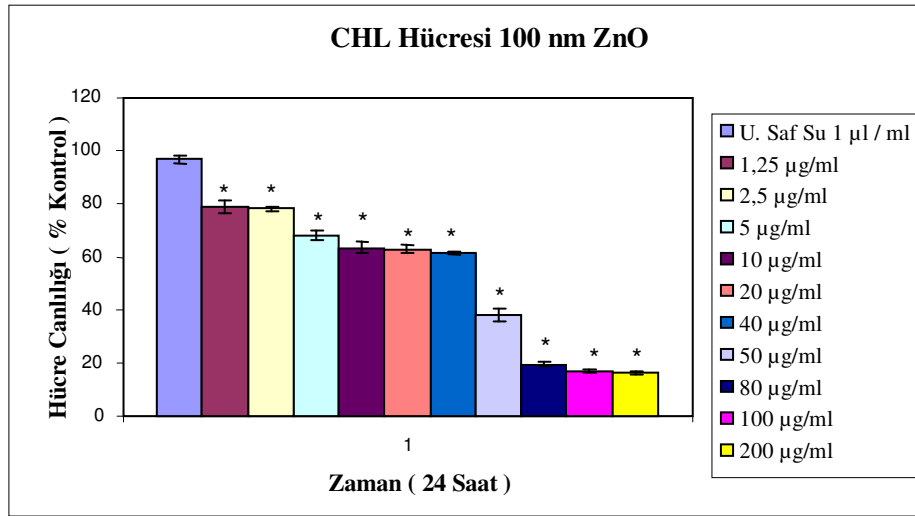
3.1.2. 100 nm ZnO nanotozlarının NRU testi sonuçları

100 nm ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 4 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında % 10 oranında bir düşüşe neden olduğu görülmektedir. 10 µg/ml 20 µg/ml, 40 µg/ml'lık konsantrasyonların etkisi de birbirine çok yakındır ve hücre sayısında % 15 oranında bir azalmaya neden olmuştur. 50 µg/ml, 80 µg/ml ve 100 µg/ml'lık konsantrasyonlarının etkisi de yine aynı şekilde birbirine yakın ve hücre sayısında ortalama % 30 oranında azalmaya neden olduğu görülmektedir. 4 saatlik NRU sonucunda maddenin en yüksek konsantrasyonu olan 200 µg/ml'lık uygulanan konsantrasyonunun hücre canlılığını %45 oranında azalttığı görülmektedir. Maddenin konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 20 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.3'de 100 nm ZnO tozunun 4 saatlik NRU sonucu yer almaktadır.

100 nm ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 µg/ml ve 2,5 µg/ml'lık konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında % 20 oranında azalmaya neden olduğu görülmektedir. Sitotoksite 5 µg/ml'lık konsantrasyonda % 35 lere kadar çıkmıştır. 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml'lık konsantrasyonların etkisi de birbirine çok yakın ve hücre sayısındaki azalma ortalama % 40 civarındadır. 50 µg/ml'lık konsantrasyonun etkisi % 60, 80 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml'lık konsantrasyonların etkisi de yine aynı şekilde birbirine yakın ve ortalama % 80 civarındadır. 24 saatlik NRU sonucu bize bu maddenin lizozomal hasarı kuvvetli bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. 24 saatlik NRU sonucu muhtemelen hücre sayısını yarı yarıya azaltan konsantrasyonun 40 µg/ml ile 50 µg/ml arasında olduğunu bize göstermektedir. Şekil 3.4'de 24 saatlik NRU testi sonuçları görülmektedir.



Şekil.3.3 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (*Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).



Şekil.3.4 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (*Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

4 ve 24 saatlik NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; 4 saatteki etkinin 24 saate göre daha az olduğu görülmektedir. 24 saatlik etkide yüksek konsantrasyonlarda sitotoksitenin çok fazla olduğu, 4 saatlik sonuçlarda ise en yüksek konsantrasyonda hücre sayısının % 50 oranında azaldığı görülmektedir.

100 nm ZnO'nun 4 ve 24 saatlik MTT ve NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; MTT sonucundaki toksisitenin daha az olduğu, NRU' da ise daha fazla toksisite olduğu görülmektedir. 24 saatlik NRU sonucunda sitotoksosite çok artmıştır. Buradan sonuçla, lizozomun mitokondriye göre 100 nm ZnO nanotozundan daha fazla etkilendiği görülmektedir.

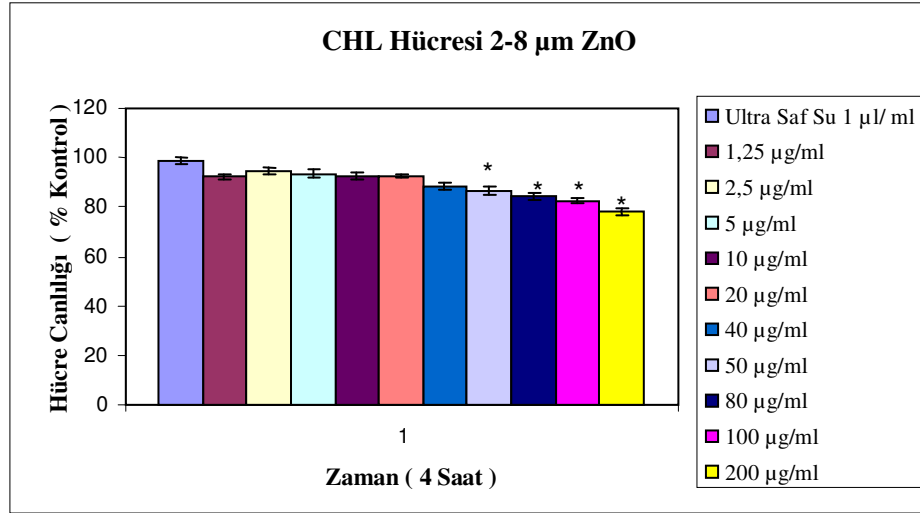
3.2. 10-20 nm Tanelerin Birleşmesiyle Oluşan 2-8 µm ZnO Plakalarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri

3.2.1 2-8 µm ZnO plaka nanotozlarının MTT testi sonuçları

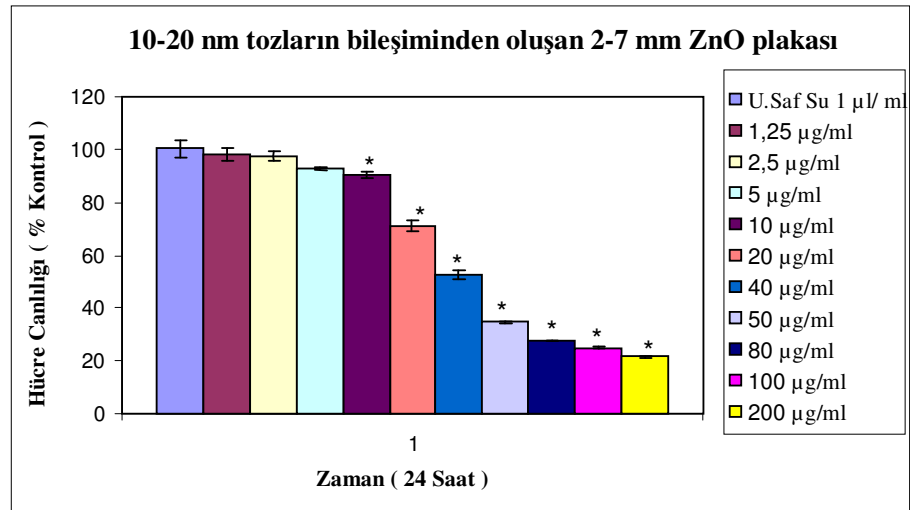
2-8 µm ZnO plaka nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 4 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lık konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında % 10 oranında düşüşe neden olduğu görülmektedir. Maddenin konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 40 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml'lık konsantrasyonlarında toksik etkisinin birbirine yakın ve ortalama % 25 arasında olduğu görülmektedir. 200 µg/ml'lık konsantrasyonun sitotoksik etkisi de % 22 civarındadır. İlk maddede olduğu gibi 4 saat sonucundaki sitotoksosite de % 20 olarak görülmektedir. 50 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.5'de 2-8 µm ZnO plakaların 4 saatlik MTT sonucu gösterilmektedir.

2-8 µm ZnO plaka nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin düşük konsantrasyonlarının 1,25 µg/ml ve 2,5 µg/ml'lık konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin kontrole yakın olduğu görülmektedir. Yani bu konsantrasyonların etkisi yok denecek kadar azdır. 5 µg/ml ve 10 µg/ml'lık konsantrasyonların etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında ortalama % 10 oranından düşüşe neden olduğu görülmektedir. 10 µg/ml' dan sonraki konsantrasyonlarda ise sitotoksosite hızlı bir şekilde artmaktadır. 20 µg/ml'daki

sitotoksite % 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ ' da % 52, 50 $\mu\text{g/ml}$ 'da % 65, 80 $\mu\text{g/ml}$ 'da % 73, 100 $\mu\text{g/ml}$ 'da % 75 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'da % 80 civarındadır. 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyon hücre sayısında % 50'lik azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.6' de 2-8 μm ZnO plakaların 24 saatlik etkisinin MTT grafiği yer almaktadır.



Şekil 3.5 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).



Şekil 3.6 100 nm ZnO'nun CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

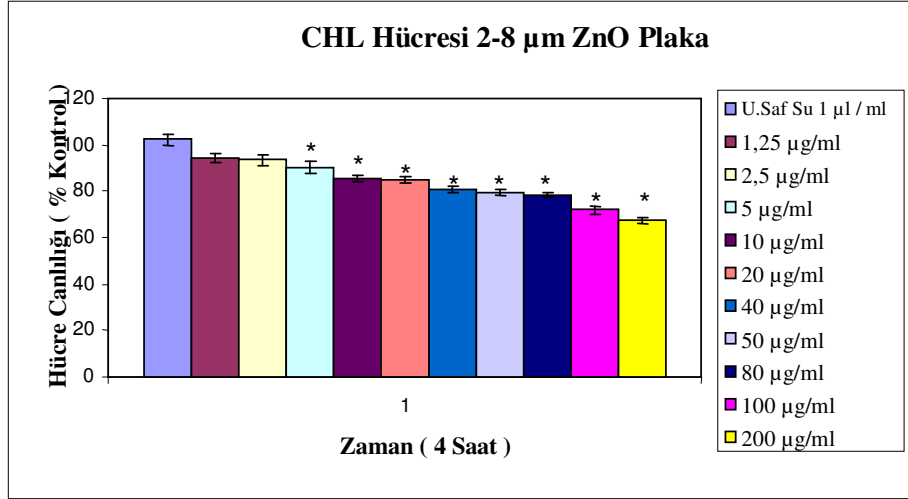
2-8 μm ZnO plakaların 4 ve 24 saatlik MTT sonuçlarını karşılaştıracak olursak 4 saatteki sitotoksik etkinin %20 olmasına rağmen 24 saatteki sitotoksik etkisi % 80 civarındadır. 4 saatlik uygulamadaki en yüksek konsantrasyonların etkisi ile 24 saatlik uygulamadaki 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonun etkisi birbirine yakın olarak görülmektedir. Sonuç olarak; bu maddenin toksik etkisi zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak artış göstermektedir.

3.2.2. 2-8 μm ZnO plaka nanotozlarının NRU testi sonuçları

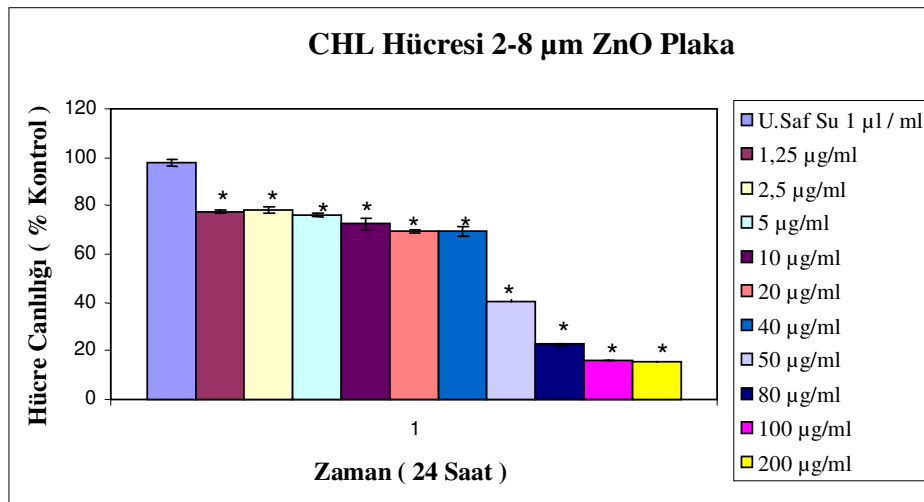
2-8 μm ZnO plaka nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 4 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında % 10 oranında azalmaya neden olduğu görülmektedir. 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonların etkisi de birbirine çok yakın ve hücre sayısında % 15 oranında düşüşe neden olmuştur. 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ ve 80 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonların etkisi de yine aynı şekilde birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında ortalama % 20 azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyondaki toksik etki ise % 30 civarındadır. 4 saatlik NRU sonucunda maddenin en yüksek konsantrasyonu olan 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulanan konsantrasyonunun hücre canlılığını % 35 oranında azalttığını görülmektedir. Maddenin konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığını gözlenmektedir. 5 $\mu\text{g/ml}$ ve üzeri konsantrasyonların sonuçları, kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.7'de 2-8 μm ZnO plaka tozunun 4 saatlik NRU sonucu yer almaktadır.

2-8 μm ZnO plaka konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin birbirine yakın olduğu ve hücre sayısında % 20 oranında azalmaya neden olduğu görülmektedir. 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonların etkisi de birbirine çok yakın ve hücre sayısını % 30 oranında azalttığını görülmektedir. 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonun etkisi % 60, 80 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonun etkisi % 78, 100 $\mu\text{g/ml}$ ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonların etkisi birbirine yakın ve ortalama % 85 civarındadır.

24 saatlik NRU sonucu bize bu maddenin lizozomal hasarı kuvvetli bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. Yine bu maddede de ilk maddede olduğu gibi 24 saatlik NRU sonucu muhtemelen hücre sayısını % 50 azaltan konsantrasyonun 40 µg/ml ile 50 µg/ml arasında olduğu görülmektedir. Şekil 3.8’de 24 saatlik NRU testi sonuçları görülmektedir.



Şekil.3.7 2-8 µm ZnO plakalarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).



Şekil.3.8. 2-8 µm ZnO plakalarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

4 ve 24 saatlik NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; 4 saatteki etkinin 24 saate göre daha az olduğu görülmektedir. 24 saatlik etkide yüksek konsantrasyonlarda sitotoksitenin çok fazla olduğu, 4 saatlik sonuçlarda ise en yüksek konsantrasyonda sitotoksitenin % 35 olduğu görülmektedir.

2-8 μm ZnO plakaların 4 ve 24 saatlik MTT ve NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; MTT sonucundaki toksitenin daha az olduğu, NRU' da ise daha fazla toksite olduğu görülmektedir. 24 saatlik MTT' deki yarılanan konsantrasyon 40 $\mu\text{g/ml}$ iken NRU'nun 24 saatlik uygulamasında hücre sayısını yarı yarıya azaltan konsantrasyon 40-50 $\mu\text{g/ml}$ arasında bir konsantrasyondur. Her iki uygulamada da 4 saatlik sonuçlar arasında yakın sonuçlar görülmektedir. Her iki uygulama sonucunda elde edilen toksik etki bilgileri birbirlerine yakındır.

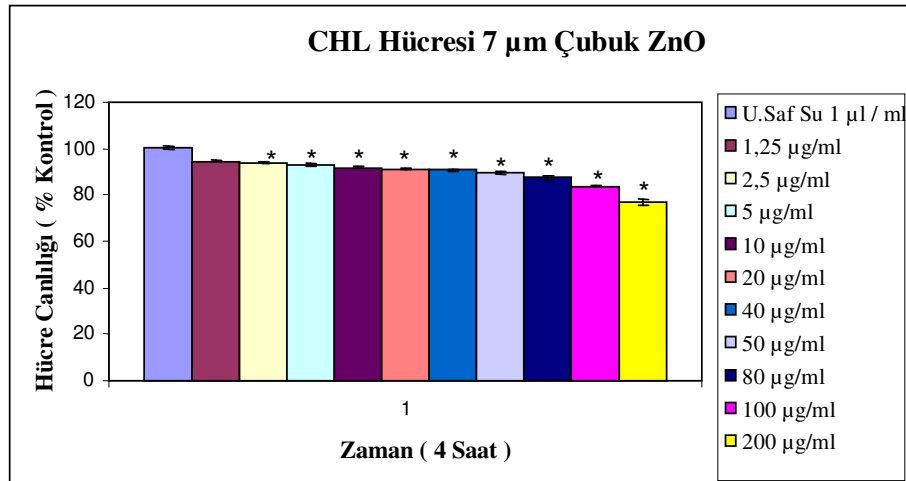
3.3. 7 μm Çubuk ZnO Nanotozlarının V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri

3.3.1 7 μm Çubuk ZnO Nanotozlarının MTT testi sonuçları

7 μm Çubuk ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 4 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 $\mu\text{g/ml}$ ve 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonlarının etkisi ortalama % 5 oranındadır. 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki % 8, 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonların etkisi % 9, 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki % 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki % 11, 80 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki % 13, 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki %17 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etki % 24 civarındadır. Maddenin konsantrasyonların artmasına bağlı olarak toksitenin giderek arttığı gözlenmektedir. İlk iki maddede olduğu gibi 4 saat sonucundaki sitotoksiste de % 20 olarak görülmektedir. Tüm konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.9'da 7 μm Çubuk ZnO nanotozlarının 4 saatlik MTT sonucu gösterilmektedir.

7 μm Çubuk ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin sitotoksik etkisi 1,25 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda % 10, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda % 15, 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda %30, 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda %43, 40

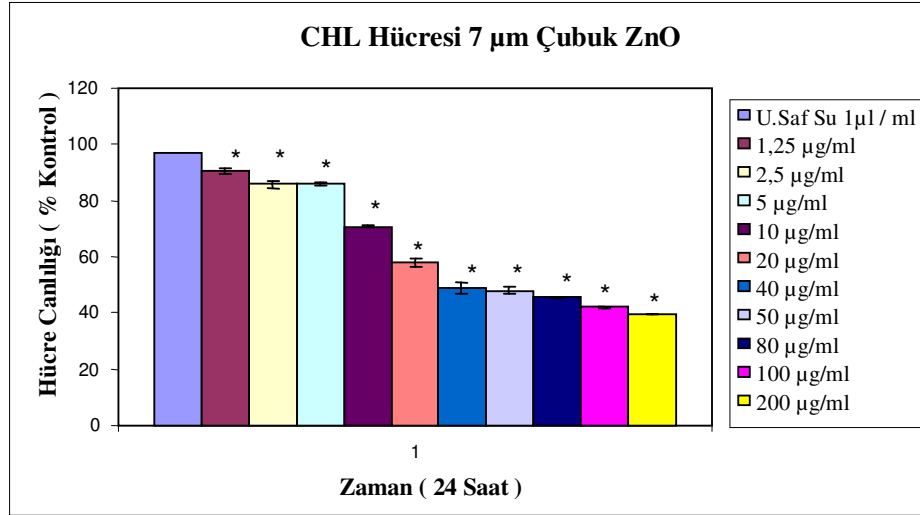
$\mu\text{g/ml}$ ve $50 \mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonlarda ise etkinin % 50 civarında olduğu görülmektedir. İki konsantrasyonun da etkisinin aynı olduğu görülmektedir. Hücre sayısını % 50 azaltan konsantrasyon 40 ve $50 \mu\text{g/ml}$ 'dir. $80 \mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyondaki etki % 55, $100 \mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda etki % 58 ve $200 \mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonda ise toksik etki % 60 civarındadır. Her ne kadar hücre sayısını % 50 azaltan konsantrasyon $40 \mu\text{g/ml}$ olsada $40 \mu\text{g/ml}$ ve sonraki konsantrasyonlarda toksik etki ortalama olarak birbirine yakındır. $5 \mu\text{g/ml}$ 'dan sonra hızlı bir şekilde toksik etki artmıştır. $40 \mu\text{g/ml}$ 'dan sonra ise toksik etki giderek azalmış ve sonuçlar birbirine yakın olarak çıkmıştır. Tüm konsantrasyonların sonuçları kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.10' da $7 \mu\text{m}$ Çubuk ZnO nanotozlarının 24 saatlik etkisinin MTT grafiği yer almaktadır.



Şekil.3.9. $7 \mu\text{m}$ Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

$2-8 \mu\text{m}$ ZnO plakaların 4 ve 24 saatlik MTT sonuçlarını karşılaştıracak olursak 4 saatteki sitotoksik etkinin ortalama %20 olmasına rağmen 24 saatteki sitotoksik etkisi % 60 civarındadır. 4 saatlik uygulamadaki en yüksek konsantrasyonların etkisi ile 24 saatlik uygulamadaki $2,5$ ve $5 \mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonun etkisi birbirine yakın olarak görülmektedir. Sonuç olarak; bu

maddenin toksik etkisi zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak artış göstermektedir.

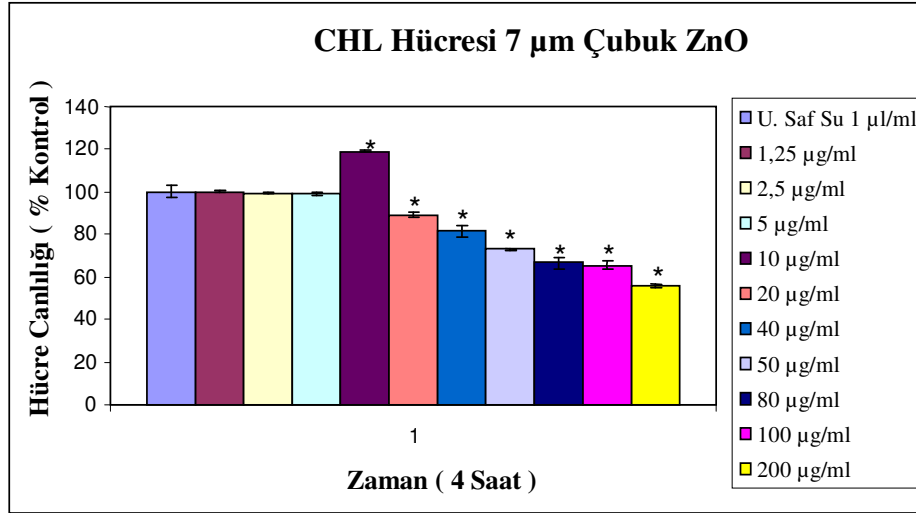


Şekil.3.10 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

3.3.2 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının NRU testi sonuçları

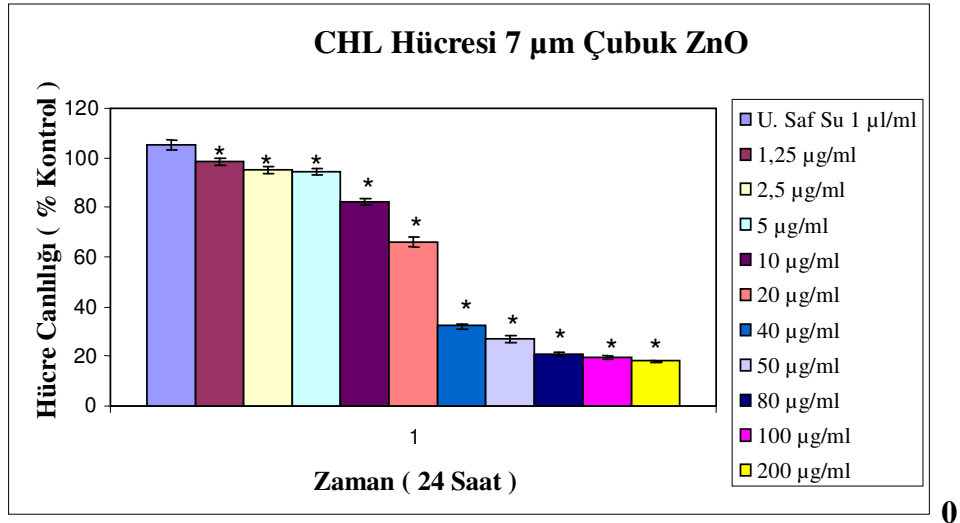
7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 4 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarının CHL hücreleri üzerindeki etkisinin hemen olmadığı görülmektedir. 10 µg/ml’lık konsantrasyonda ise yapılan NRU tekrarları sonucunun hepsinde ortalama % 20 oranında hücre artışına neden olduğu görülmektedir. Ve bu sonuç istatistiki olarak anlamlı görülmektedir. 20 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda ise toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 20 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi, %11, 40 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi %19, 50 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi % 28, 80 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi % 36, 100 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi % 35 ve son olarak 200 µg/ml’lık konsantrasyonun etkisi % 45 dir. Hücre sayısını % 50 azaltan konsantrasyon 200 µg/ml’in hemen üzerinde bir konsantrasyondur. Maddenin konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak toksisitenin giderek arttığı gözlenmektedir. 10 µg/ml ve

üzeri konsantrasyonların sonuçları, kontrole göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Şekil 3.11’de 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının 4 saatlik NRU sonucu yer almaktadır.



Şekil.3.11 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 4 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının konsantrasyonlarının CHL hücreleriyle yapılan 24 saatlik NRU testi sonucunda, uygulanan maddenin 1,25 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 2, 2,5 µg/ml ve 5 µg/ml’lik konsantrasyonların etkisi ortalama % 5, 10 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 18, 20 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 34 dür. 20 µg/ml’lik konsantrasyondan sonra toksisite yoğun oranda artmıştır. 40 µg/ml’lik konsantrasyondaki etki % 68, 50 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 74, 80 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 79, 100 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 81 ve 200 µg/ml’lik konsantrasyonun etkisi % 83 civarındadır. Son konsantrasyonların etkisi birbirine yakın olarak görülmektedir. 24 saatlik NRU sonucu bize bu maddenin lizozomal hasarı kuvvetli bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. Bu maddede NRU 24 saatlik uygulama sonucunda hücre sayısını yarı yarıya azaltan konsantrasyonun 20 µg/ml ile 40 µg/ml arasında olduğu görülmektedir. Şekil 3.12’de 24 saatlik NRU testi sonuçları görülmektedir.



Şekil.3.12 7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının CHL hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin NRU grafiği. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. (* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir).

4 ve 24 saatlik NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; 4 saatteki etkinin 24 saate göre daha az olduğu görülmektedir. 24 saatlik etkiye yüksek konsantrasyonlarda sitotoksitenin çok fazla olduğu, 4 saatlik sonuçlarda ise en yüksek konsantrasyonda sitotoksitenin % 45 olduğu görülmektedir.

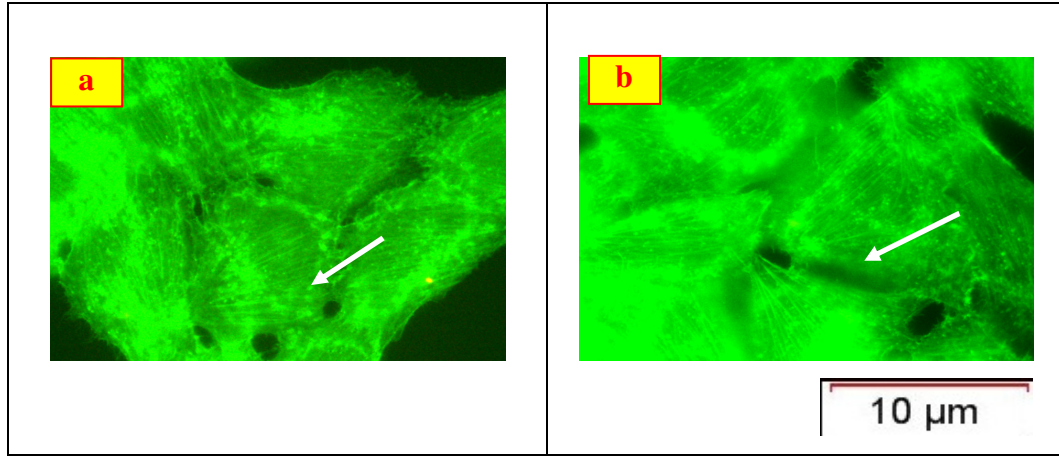
7 µm Çubuk ZnO nanotozlarının 4 ve 24 saatlik MTT ve NRU sonuçlarını karşılaştıracak olursak; MTT sonucundaki toksitenin daha az olduğu, NRU' da ise daha fazla toksite olduğu görülmektedir. 24 saatlik MTT' deki hücre sayısını yarı yarıya azaltan konsantrasyon 40 µg/ml iken NRU'nun 24 saatlik uygulamasında yarılanan konsantrasyon 20-40µg/ml arasında bir konsantrasyondur. Her iki uygulamada da 4 saatlik sonuçlarda NRU'daki toksik etkinin MTT' ye göre daha fazla olduğu görülmektedir. 4 saatlik MTT sonucundaki en yüksek konsantrasyondaki sitotoksiste % 20 iken bu sonuç 4 saatlik NRU sonucunda ise %45 olarak görülmektedir.

3.4 ZnO nanotozlarının Hücre İskeleti Üzerine etkisi

Uygulanan test maddelerinin MTT deneylerinden elde edilen sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyonlarının hücre iskeleti üzerine etkisi olup olmadığını

göstermek amacıyla V79 379A hücreleri üzerine bu maddelerin uygun konsantrasyonları denenmiş ve FITC-Phalloidin boyaması yapılmıştır. FITC-Phalloidin boyamada maddelerin 5,10, 20,40, 80 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonları kullanılmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar Olympus BX51 floresan mikroskobu ile incelenmiş ve Olympus DP-72 sistemi kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

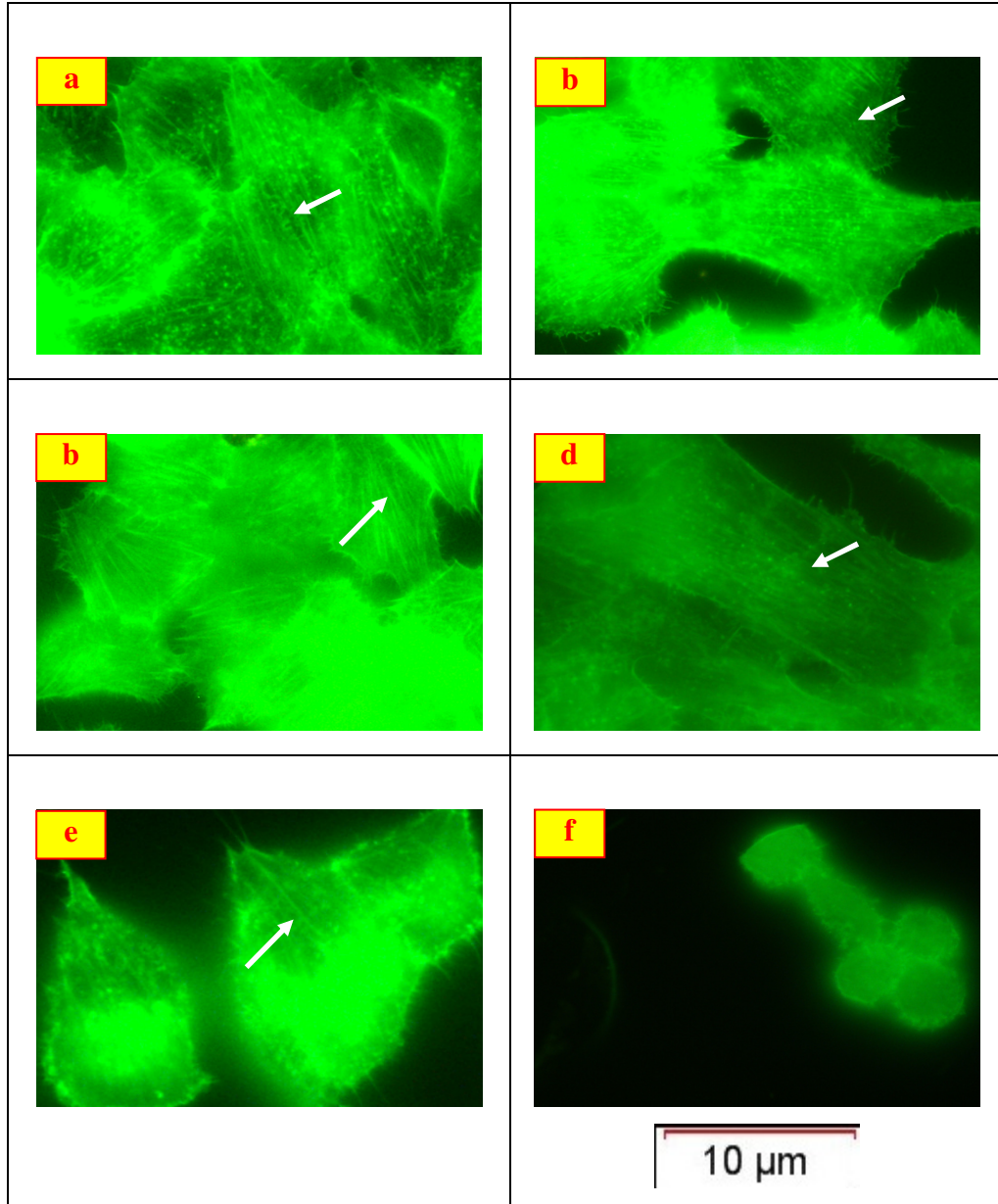
Şekil 3.13'de kontrol ve ultra saf suyun aktin iskeleti üzerine etkisi gösterilmiştir. Her 3 maddenin de konsantrasyon arttıkça hücre iskeleti üzerindeki etkisi giderek artmaktadır.



Şekil 3.13. CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri a) Negatif kontrol grubu. b) Negatif kontrol grubu. Oklar F-aktin filamentlerini göstermektedir. Ölçü birimi 10 μm

3.4.1 100 nm ZnO Nanotozlarının Hücre İskeleti Üzerine Etkileri

Negatif kontrol gruplarında F-aktin hücre iskeletinde herhangi bir bozulma görülmemiş, besiyerlerine 100 nm ZnO nanotozları eklenmiş hücrelerin konsantrasyon bağımlı olarak azaldığı ve 80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 'lık konsantrasyondan başlayarak aktin filamentlerinin konsantrasyona bağımlı olarak depolimerizasyonu sonucu kaybolduğu gözlenmiştir. Şekil 3.14'de 100 nm ZnO nanotozlarının aktin iskeleti üzerine etkisi gösterilmiştir.

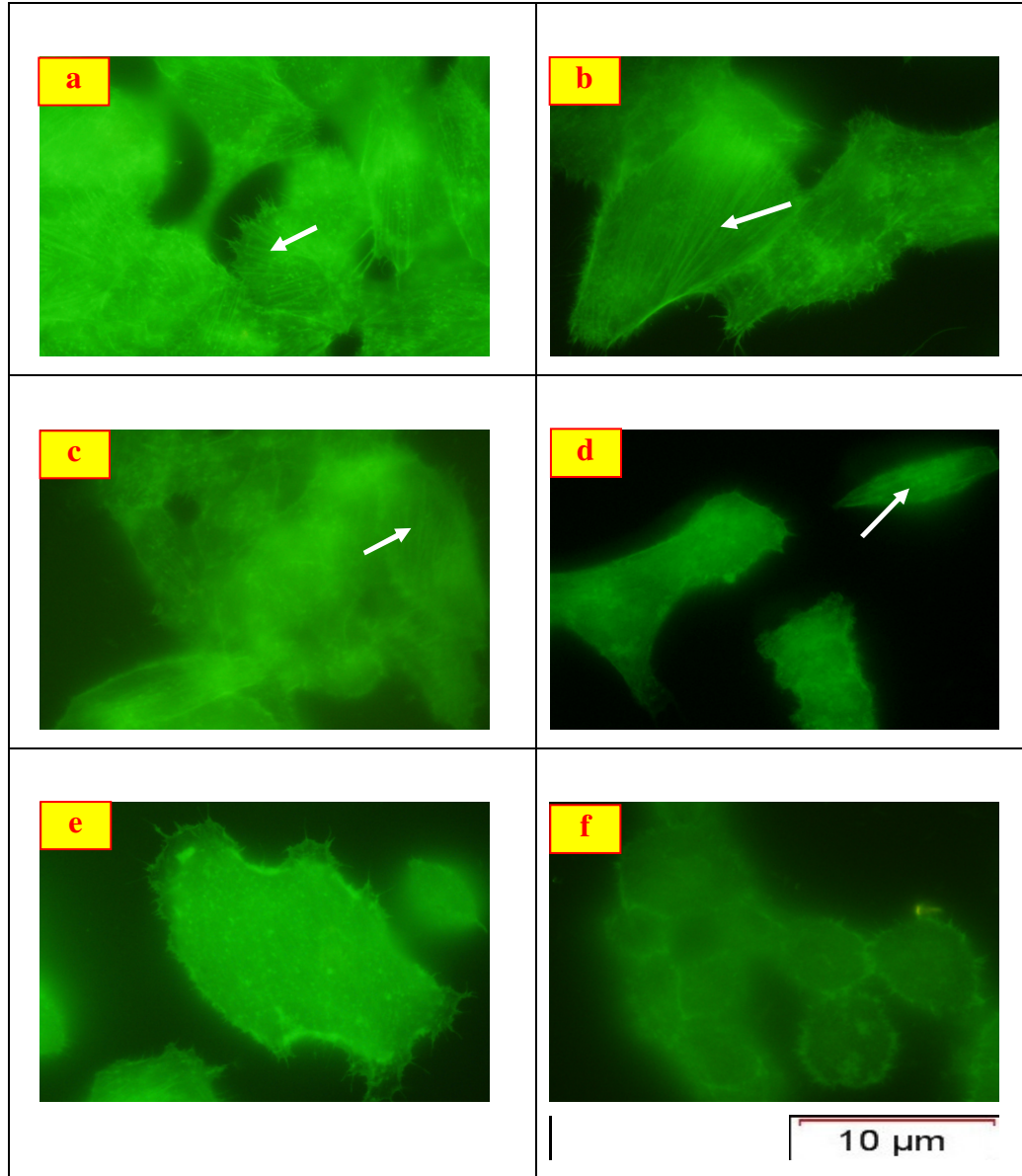


Şekil 3.14. 100 nm ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri. a) 5 µg / ml b) 10 µg / ml c) 20 µg / ml d) 40 µg / ml e) 80 µg / ml f) 100µg / ml. Oklar F-aktin filamentlerini göstermektedir. Ölçü birimi 10 µm

3.4.2 10-20 nm tanelerin birleşmesiyle oluşan 2-8 µm ZnO nanotozlarının Hücre İskeleti üzerine etkileri

Negatif kontrol gruplarında F-aktin hücre iskeletinde herhangi bir bozulma görülmemiş, besiyerlerine 2-8 µm ZnO nanotozları eklenmiş hücrelerin

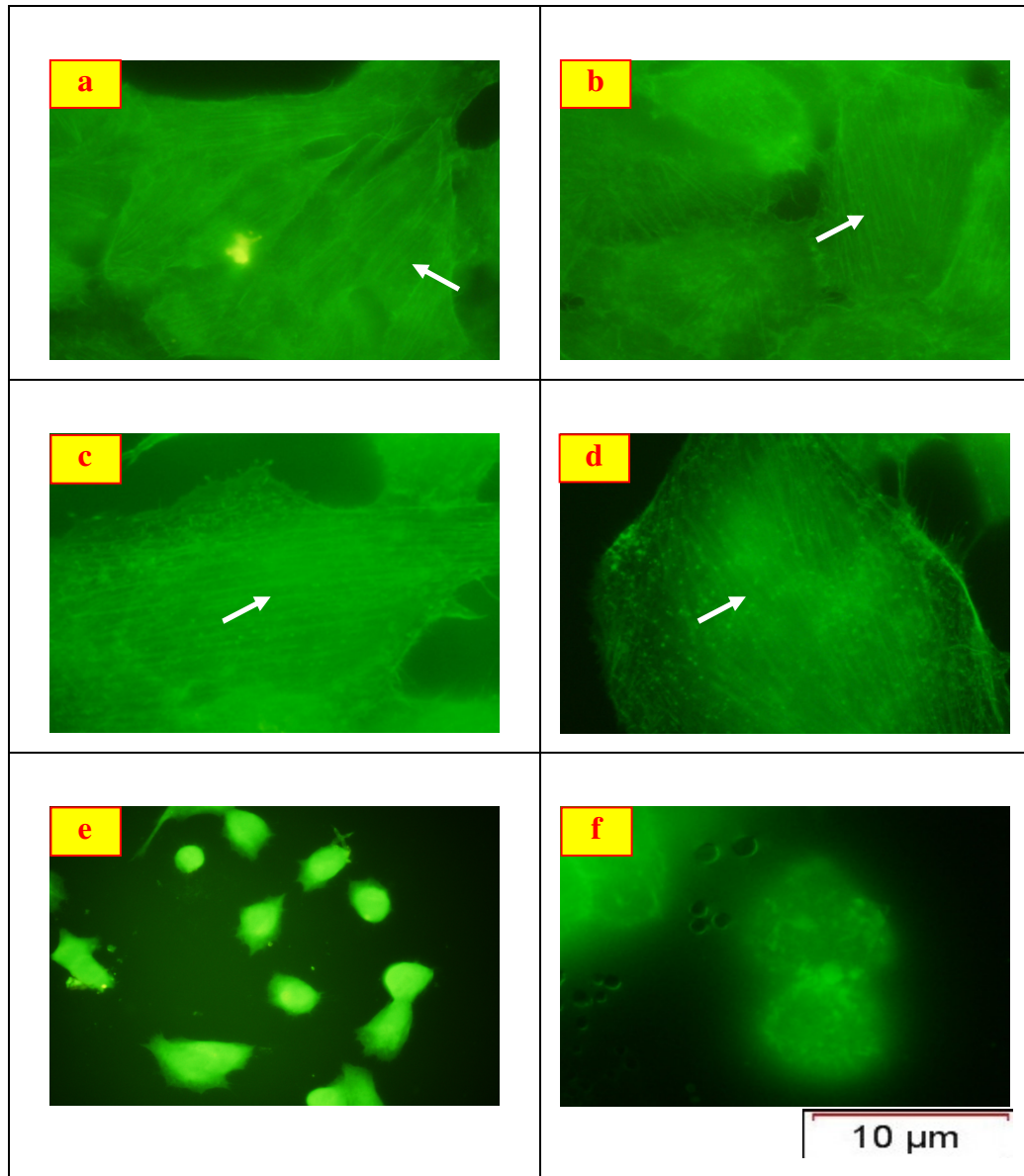
konsantrasyon bağımlı olarak azaldığı ve düşük konsantrasyonlarda hücre iskeleti üzerinde etkili olmadığı 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyondan başlayarak aktin filamentlerinin konsantrasyona bağımlı depolimerizasyonu sonucu kaybolduğu gözlenmiştir. Şekil 3.15'de 2-8 μm ZnO plaka nanotozlarının aktin iskeleti üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 3.15. 2-8 μm plakaların ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri. a) 5 $\mu\text{g/ml}$ b) 10 $\mu\text{g/ml}$ c) 20 $\mu\text{g/ml}$ d) 40 $\mu\text{g/ml}$ e) 80 $\mu\text{g/ml}$ f) 100 $\mu\text{g/ml}$. . Oklar F-aktin filamentlerini göstermektedir. Ölçü birimi 10 μm

3.4.3 7 μm Çubuk ZnO Nanotozlarının Hücre İskeleti Üzerine Etkileri

Negatif kontrol gruplarında F-aktin hücre iskeletinde herhangi bir bozulma görülmemiş, besiyerlerine 7 μm Çubuk ZnO nanotozları eklenmiş hücrelerin konsantrasyon bağımlı olarak azaldığı ve 80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 'lık konsantrasyondan başlayarak aktin filamentlerinin konsantrasyona bağımlı depolimerizasyonu sonucu kaybolduğu gözlenmiştir. Şekil 3.16'de 7 μm çubuk ZnO nanotozlarının aktin iskeleti üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 3.16. 7 μm ZnO nanotozlarının CHL cell line hücrelerinin phalloidin (FITC) boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri. a) 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ b) 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ c) 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ d) 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ e) 80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ f) 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. . Oklar F-aktin filamentlerini göstermektedir. Ölçü birimi 10 μm

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Nanoteknoloji, yeni özelliklere sahip ürünlerin oluşturulması için nanoboyutta materyallerin elde edilerek üretilmesini içeren bir teknolojidir. Son zamanlarda, nanotüpler, nanoteller, fuleren türevleri ve quantum noktacıkları gibi nanomateriyaller biyoteknoloji ve yaşam bilimleri için analitik araçların yeni tiplerinin oluşturulmasında çok dikkat çekici etkiye sahip olmuşlardır (Taton ve ark.2000; Cui ve ark.2001). 1-100 nm boyutta olan nanomateriyaller, yeni fiziksel ve kimyasal fonksiyonel özelliklere sahip nanoboyutta benzersiz araçların üretilmesinde kullanılmaktadır (Colvin, 2003; Oberdörster, 2004). Nanoteknoloji, kozmetik, elektronik ve plastik gibi tüketici ürünlerinde kullanılan endüstrinin hızla büyüyen bir alanıdır (Vippola ve ark.2009; Monteiro-Riviere ve ark. 2009; Auffan ve ark.2009). Yapılan bir araştırmada nanoteknolojiye dayalı ürünlerin 2015 yılına kadar 4 trilyon dolara ulaşacağı ve giderek büyümeye devam edeceği rapor edilmiştir (Monteiro-Riviere ve ark. 2009).

Gelişen nanoteknoloji endüstrisi ve yapılan bilimsel çalışmalar detaylı olarak incelendiğinde nanoboyutlu tozların en fazla kullanıldığı ve ilerleyen dönemlerde de kullanılması planlanan sektörlerden birisinin kozmetik sektörü olduğu görülmektedir. Bu sektörde en yaygın olarak kullanılan nanoboyutlu malzemeler ise çinko oksit (ZnO) ve titanyum oksit (TiO₂) metal oksit nanopartikülleridir. TiO₂ ve ZnO 'in eşsiz band aralık değerleri sayesinde UV ışığını absorplama özellikleri bulunmaktadır. ZnO ve TiO₂ malzemelerinin dermatolojik açıdan insan vücudu ile uyumlu olması, hatta koruyucu/iyileştirici, anti-kaşıntı (kaşınma giderici) ve kızamık giderici özelliklerinin yanında birde UV ışığı absorblama özelliği nedeniyle kozmetik sektöründe özellikle güneş kremi solüsyonlarında kullanılmaktadır (Innes ve ark. 2002).

Günümüzde, nanoboyutlu çinko oksit (ZnO) elektronik ve optoelektronik özelliklerinden dolayı fotokatalist(Wang ve ark. 2007), optik araçlar, güneş kremleri ve diğer kozmetik ürünler gibi birçok alanda yoğun oranda kullanılmaktadır (Huang ve ark. 2010; Johnston ve ark. 2010).

Nano boyutlu tozların kullanımında büyük bir artış gözlenmektedir. Buna karşılık, insanların farklı yollarla biyolojik sistemlerine giren nanomalzemelere

yoğun oranda maruz kalma riski vardır (Donaldson ve ark. 2006; Lewinski ve ark. 2008; Kroll ve ark. 2009; Johnston ve ark. 2010; Oberdorster ve ark.2005). Bu riskler, nanopartiküllere maruz kalmanın istenmeyen yan etkileriyle ilgili olarak son birkaç yıl içinde yapılan bazı çalışmalar tarafından doğrulanmıştır (Brumfiel, 2003; Goldston, 2007; Nel ve ark.2006; Igarashi, 2008; Nielsen ve ark.2008; Sharma ve ark.2009; Reeves ve ark.2008). Nanopartiküllerin toksisitesi ve güvenliği hakkındaki bilgiler zamanla giderek artmış olmasına rağmen, hala elde edilen bilgiler yeterli değildir ve çok sınırlıdır bu nedenle bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Sharma ve ark.2009; Kroll ve ark. 2009; Johnston ve ark. 2010; Monteiro-Riviere ve ark. 2009; Auffan ve ark.2009). Nanotoksikoloji üzerinde mevcut çalışmalar genelde farklı nanopartiküllerin toksisitesinin değerlendirilmesi empirik yöntemler üzerine yoğunlaşmış ancak nanopartikül özellikleri (kimyasal kompozisyon, şekil, boyut, dağılım, kümelenme) ve toksisite üzerindeki çalışmalar daha azdır (Hu ve ark. 2009). Küçük boyut ve geniş yüzey alanından dolayı metal oksit nanopartikülleri yüksek kimyasal reaktivite ve intrinsik toksisiteye sahiptirler. Son zamanlarda çoğu nanotoksikoloji çalışması nanoboyutlu metal oksit nanopartikülleri üzerine yoğunlaşmıştır (Hu ve ark. 2009).

Yapılan bu çalışmalar hücre kültürü çalışmalarına dayanmaktadır. Hücre kültürü yöntemleri hayvan modellerinin kullanıldığı testlere göre etkileri doğrudan doğruya olduğundan kısa sürede sonuç vermesi, istatistiki olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilmesi ve çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesinin önlenmesi avantajlarını taşıdığı için dünyada yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu sebepten dolayı hücre kültürü; kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimya, moleküler biyoloji çalışmalarında, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku ve deri mühendisliği, kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde ve kozmetikte sık sık kullanılmaktadır (Gad, 2000; Putnam, 2002).

Hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve hücrel metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesi *in vitro* sitotoksite testlerine dayanır (Gad, 2000). Sitotoksite testleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Kültüre edilen hücreler kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmaları

materyallerin toksisitesinin belirlenmesinde önemli rol oynar (Monteiro-Riviere ve ark, 2009). *In vitro* hücre kültürüne dayalı sitotoksosite belirleme testleri, toksisiteyi belirlemekte kullanılan hayvan sayısını azaltır ve modern toksikoloji test stratejilerinin ana dayanağı haline gelmiştir. Yüksek veri sağlayan hücre bağımlı testler biyolojik görüntüleme yaklaşımlarının başlangıç basamağıdır (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Kültüre edilen hücrelerde sitotoksosite ve/veya hücre canlılığının belirlenmesinde birkaç sınıf *in vitro* toksisite testleri kullanılmaktadır. Bunlar membran içeriğini değerlendirerek hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan kolorimetrik veya floresans özellikteki NR, MTT vb. testlerdir (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Tek tabakalı kültürlerde sitotoksosite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde en sık Nötral Red ve MTT sitotoksosite testleri kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2005; Kroll ve ark. 2009).

Bu tez çalışmasında ZnO metal oksit nanopartiküllerinin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT ve NR sitotoksosite testlerini kullanılmıştır.

MTT deneyi, 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid, oksidatif enzimlerden birinin aktivitesini ölçerek hücre enerji metabolizmasını belirlemede kullanılmaktadır. Bu boya, mitokondride suksinik dehidrogenazla çözünmeyen mor renkli bir formazan ürününe indirgenir (Fotakis ve Timbrell 2005; Kroll ve ark.2009; Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Tetrazolyum tuzunun mavi bir formazan ürünü olan bromide dönüşümüne dayalı olan bu deneyler hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçmekte yaygın olarak kullanılmaktadır.

MTT deneyinin sonuçları; araştırmamızda kullandığımız her 3 maddenin de zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Nano boyutlu tozlarla 4 saat muamele sonucunda elde edilen MTT sonuçlarından her 3 maddede de toksik etkinin yüksek konsantrasyonlarda birbirine yakın olduğu ve hücre canlılığını % 20 oranında azalttığı görülmektedir. 24 saatlik uygulama sonucunda ise 100 nm ZnO ile 7 µm çubuk ZnO toksik etkisinin birbirine yakın olduğu ve 2-7 µm plaka ZnO'ların toksik etkisinin diğer 2 maddeye göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Nano boyutlu ZnO ile mikron boyutlu ZnO'ları karşılaştırdığımızda 10-20 nm tanelerinden oluşan mikron boyutlu plakaların nano boyutlu plakaya ve

mikron boyutlu çubuksu plakaya göre daha toksik olduğu görülmektedir. Literatürde, aynı kimyasal içerikteki mikron boyutlu partiküllerin nanomateriyallere göre daha az toksik olduğu belirtilirken (Karlsson ve ark, 2009), bazı çalışmalarda ise mikron boyutlu partiküllerin daha toksik olduğu rapor edilmiştir (Warheit ve ark. 2006). Aynı kimyasal içerikteki nanopartiküller mikron boyutlu partiküllere göre daha toksiktir diye genelleme yapılmayacağı Karlsson ve ark. (2009) tarafından belirtilmiştir.

Kullandığımız nanotozların toksik etkisinin değerlendirilmesinde yüzey alanının da toksik etkiye neden olabileceği düşünülmüştür. 2-8 μm nanoplakaların yüzey alanı 23 m^2/gr , 100 nm ZnO'nun yüzey alanı 15.84 m^2/gr ve 7 μm çubuk ZnO'nun yüzey alanı 6.5 m^2/gr dir. 2-8 μm nanoplakaların toksik etkisinin daha fazla olmasının materyalin diğerlerine nazaran daha fazla yüzey alanına sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Nötral Red (Nötral kırmızısı) testi hücre canlılığını ölçmek için kullanılan diğer bir yöntemdir. Primer hepatositlerin ve diğer hücrelerin kültüründe sitotoksitenin bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (Kroll ve ark. 2009; Fotakis ve Timbrell 2005). Nötral kırmızısı zayıf bir katyonik boyadır. Hücre membranından doğrudan geçerek difüze olur ve lizozomda birikir. Hücre canlılığının kaybolması lizozomal mebranın bütünlüğünü etkiler ve boyanın lizozom içine alınmasıyla hücre canlılığı ölçülür (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Canlı hücreler, hücrelerin lizozom içindeki konsantrasyonunu belirleyen nötral red boyasını içlerine alırlar. Sonuç olarak NR ölçümü lizozomal aktiviteye dayanan bir hücre canlılığı belirleme yöntemidir (Monteiro-Riviere ve ark. 2009; Kroll, 2009).

NRU deneyinin sonuçları; kullanılan her 3 maddenin de zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki yaptığını göstermektedir. Nanoboyutlu partiküllerle 4 saat muamele sonucunda elde edilen NRU sonuçlarından 100 nm ZnO ile 7 μm çubuk ZnO toksik etkisinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. 2-7 μm plaka ZnO'ların en yüksek konsantrasyondaki toksik etkisi hücre sayısını % 50 oranında azaltmaktadır. 24 saatlik uygulama sonucunda ise 100 nm ZnO ile 7 μm çubuk ZnO toksik etkisinin

birbirine yakın olduğu ve 2-7 µm plaka ZnO'ların toksik etkisinin diğer 2 maddeye göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Yapmış olduğumuz toksisite deneylerinin sonuçlarında farklılıklar görülmektedir. 4 saatlik uygulamalarda sonuçlar birbirine yakın kabul edilebilir. Fakat 24 saatlik uygulamada elde edilen sonuçlar lizozomun mitokondriye göre bu maddelere daha dayanıksız olduğu gösterilmektedir. Buradan da anlayacağımız üzere farklı sitotoksosite testlerinden elde edilen bilgiler farklı olabilmektedir (Clemedson ve Ekwall, 1999; Scheers ve ark.2001). Farklı sitotoksosite belirleme testlerinin, kullanılan test ajanına ve sitotoksosite testine bağımlı olarak farklı sonuçlara neden olduğu daha önce rapor edilmiştir (Weyermann ve ark.2005). Sharma ve arkadaşları 2009 yılında ZnO nanopartiküllerinin toksik etkisini belirlemek için MTT ve NR testlerini yapmışlar ve elde ettikleri MTT ve NR sonuçlarının farklı olduğunu bildirmişlerdir.

In vivo çalışmaların sonuçlarına göre normal boyuttaki partiküller ile kıyaslandığında TiO₂ ve ZnO nanopartikülleri de muhtemelen zararlı etkilere neden olabilir (Oberdörster, 2005). Dunford ve arkadaşlarının Komet (Tek hücre jel elektroforezi) deneyini kullanarak yapmış oldukları araştırmada TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin kültüre edilen insan fibroblast hücreleri üzerinde oksidatif hasarı katalizlediği rapor etmişlerdir (Dunford ve ark.1997).

Sharma ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada ZnO nanopartiküllerinin insan deri epitel hücreleri üzerinde artan konsantrasyona ve maruz bırakılma süresine göre sitotoksik ve genotoksik etki yaptığı gösterilmiştir. Burada hücrelere uygulanan ZnO boyutu 50-70 nm arasındadır. Bu çalışmada 3, 6, 24, 48 saat olarak 4 farklı muamele süresi uygulanmıştır. Biz çalışmamızda kullandığımız 4 ve 24 saatlik muamele ettiğimiz 100 nm boyutlu ZnO ile elde edilen sonuçlarla kıyaslayacak olursak, bizim uyguladığımız en yüksek konsantrasyon 200 µg/ml iken çalışmada uygulanan en yüksek konsantrasyon 20 µg/ml'dir. Ve 24 saatlik muamele sürecinde oluşan hücre canlılığındaki azalma % 90 larda iken bizim çalışmamızdaki hücre canlılığındaki azalma aynı konsantrasyonda % 40 oranındadır ve toksik etkisi bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre daha fazladır. Bu çalışmada yapılan NR sonuçları ile bizim NR sonuçlarımız farklılıklar göstermektedir. Çalışmada

yapılan NR sonucuna göre toksik etkinin bizim sonuçlarımızdan daha az olduğu görülmektedir. Sonuçların farklı çıkması kullanılan farklı hücre tipinden kaynaklanabilmektedir.

Diğer bir çalışmada, ZnO ve TiO₂ nanopartiküllerinin 4 ve 24 saat uygulandığı insan deri fibroblast hücrelerine MTT sitotoksik testi uygulanmış ve ZnO nanopartiküllerinin sitotoksik etkisinin TiO₂'den daha fazla olduğu gösterilmiştir (Dechsakulthorn ve ark.2007). Burada uygulanan ZnO nanopartikül boyutu 50-70 nm arasındadır. Bizim uyguladığımız 100 nm ZnO'dan elde ettiğimiz sonuçlarda toksik etki bu yapılan çalışmaya göre daha az olarak görülmektedir. Nanopartiküllerin toksik etki mekanizması hakkında daha kesin olan bir bilgi yoktur. Literatürde yapılan çalışmalarda genel olarak boyutun hücre üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Sharma ve ark. 2009; Dechsakulthorn ve ark. 2007). Bu çalışmada farklı boyut ve şekle sahip ZnO nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar boyut ve şeklin toksisite üzerinde farklı etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Bazı çalışmalarda ZnO ve TiO₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyon ve zamana ek olarak UV varlığında ve yokluğunda sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmış, UV varlığında genotoksik ve sitotoksik etkinin daha da arttığı sonucu rapor edilmiştir (Uchino ve ark.2002)

Yapılan bir başka çalışmada 20, 30 ve 40 nm boyutlarındaki ZnO nanopartikülleri hücre canlılığı üzerinde konsantrasyon artışına bağımlı olarak azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Yuan ve ark. 2010).

Nano (70 nm) ve mikron (420nm) boyutlu ZnO partiküllerle maruz bırakılan A549 kanserli hücreler üzerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak sitotoksitenin arttığı gözlenmiştir (Lin ve ark.2009). Bizim çalışmamızda kullandığımız nanoboyutlu materyallerle karşılaştırdığımız zaman Lin ve arkadaşlarının kullandıkları nanoboyutlu partiküllerin toksik etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir.

Hücre iskeleti, dinamik ve duyarlı bir sistemdir. Madde ile indüklendikten sonra hücrede meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde değerli bir morfolojik parametre olarak gösterilmektedir (Kohler ve ark. 1994).

Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi esnasında ve hücrenin tamamında bazı kabarcıklar meydana gelmektedir. Hücre dışındaki bu kabarcıklanmaya mikrotübüllerin dağılışı ve aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesi eşlik etmektedir (Uzdensky ve ark. 2004).

Aktin hücre iskeleti yüksek derecede dinamik ve hücresel isteğe göre polimerize ve depolimerize olan bir yapıya sahiptir. Düz olmayan kas hücrelerinde özgün globüler B-aktin ve gama aktin alt üniteleri alternatif olarak F-aktin olarak bilinen çift zincirli filamentli bir yapıyı oluşturmak için polimerize olurlar. Aktin bağımlı hücre iskeleti yapısı için temel yapı olan F-aktinin oluşumu için aktin polimerizasyonu gereklidir (Prasain ve Stevens, 2009).

Aktin, kalın ve esnek lifli olan aktin filamentlerini oluşturmak için polimerize olur. ATP'nin hidrolizi ile G-aktin F-aktini oluşturabilmek için uygun şartlar altında hızlıca polimerize olmaktadır (Jiang ve ark. 2009). Aktin polimerizasyonu hücre siklusunun G1 ve G2/M fazlarında olmaktadır (Lu ve ark. 2004). Aktin polimerizasyonunda F/G aktin oranları (F-aktindeki artış veya G-aktindeki azalış) hücresel farklılaşmaya işarettir (Lu ve ark. 2004). Aktin 42-kDa ağırlığında bir proteindir, polimerize olarak aktin filamentlerini meydana getirmektedir. Aktin hücre iskeleti, hücresel bütünlüğü ve hücre şeklinin sağlanmasında çok önemlidir (Banan ve ark. 2000).

Aktin dinamiklerinin çalışılması için farklı floresan teknikler geliştirilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda aktin iskeletinde meydana gelen değişikliklerin canlı izlenmesi için floresan spektrofotometresi ve mikroskopisi kullanılmaktadır. Bu işlem, aktin moleküllerine kovalent olarak bağlanan prenil ve rhodamine gibi floresan gruplar ile ya da yeşil floresan proteini ile aktin filamentinin birleşmesi ile yapılmaktadır. Bu peptidler filament aktine bağlanırlar, G-aktine bağlanmazlar. Bu türevler, F-aktinin teşhisinde kullanılmaktadırlar.

Phalloidin, Amonita phalloides isimli zehirli bir mantar türünden elde edilen önemli bir komponenttir (Lengsfeld ve ark. 1974). Hücre iskeletindeki zararları görebilmek amacıyla FITC (floresan izosiyonat)- Phalloidin boyaması

yapılarak F-aktin iskeletine bakılmaktadır (Gunaratnam ve Grant 2004, Wulf ve ark. 1979).

Yaptığımız deneylerde V79 379A hücreleri kullanılmış ve bu hücrelere 100 nm ZnO, 7 µm çubuk ZnO ve 2-7 µm plaka ZnO nanopartiküllerin değişik konsantrasyonları uygulanmıştır. Bütün eklenen test maddelerinin uygulandığı hücreler phalloidin (FITC) ile boyanarak, hücrelerin aktin iskeleti incelenmiş ve konsantrasyonlar arttıkça aktin filamentlerinde bozulmalar olduğu görülmüştür.

Yaptığımız deneyler sonucunda MTT hücre canlılığı testinin sonuçları ile hücre iskeleti boyama sonuçları arasında bir benzerlik olduğu görülmüştür. MTT'deki konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre sayısı azalışının aynı şekilde hücre iskeleti preparatlarında da F-aktin fibrillerinin azalması şeklinde görülmüştür. Mitokondri ile F-aktin hücre iskeleti arasındaki etkileşimlerin hücre ölümünü tetiklediği Istvan ve ark (2006) tarafından rapor edilmiştir.

Mitokondri, aerobik enerji mobilizasyonu, önemli metabolitlerin biyosentezi, kalsiyum düzenleyicisi, yaşlanma ve apoptosis gibi olayları içeren önemli olaylara katkıda bulunan bir organeldir. Mitokondri hücrede fagositize olan partiküllerin en önemli hedefi olup ROS üretiminin en önemli kaynağıdır. Mitokondrinin hasar görmesi ROS üretiminin artmasına, mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına ve sonuç olarak da apoptozise neden olur (Karlsson ve ark. 2009). Mitokondri ve aktin hücre iskeleti arasındaki etkileşimler sadece hücre içindeki mitokondri pozisyonu ve transportunda değil mitokondriye bağımlı apoptotik olaylar için de önemlidir. Mitokondri aktin mikrofilamentlerini lokal transportta yardımcı sistem olarak kullanabilir. Mitokondri ve aktin hücre iskeleti arasındaki etkileşimler, hücre bölünmesi esnasında mitokondriyal hareket ve mitokondrinin yerleşimi, hücre polaritesinin kurulmasını ve normal hücre fonksiyonlarını anlamamızda temel katkılar sağlar. Aktin hücre iskeleti bu olaylarda iki önemli role sahiptir.

- Organellerin hücre içi hareketleri için gereklidir.
- Hücre korteksindeki organellerin immobilizasyonu için gereklidir.

(Istvan ve ark. 2006).

Mitokondrinin oksidatif stresin önemli kaynağı olmasından dolayı oluşacak toksik etkiden dolayı apoptozise neden olması aktin iskeleti ile mitokondri arasındaki etkileşimlerin birbirine yoğun olarak bağımlı olduğunu göstermektedir.

Nanomateriyaller üzerindeki toksikolojik bilginin yeterli olmaması, nanomateriyallere maruz kalındığında oluşabilecek riskin değerlendirilmesini zor hale getirmektedir (Hu ve ark. 2009). Nanomateriyallerin toksik etki oluşturma mekanizmaları daha tam olarak belirlenememiştir. Elde ettiğimiz deney sonuçları ve literatür bilgilerine dayanarak olası toksik etki mekanizmaları düşünüldüğünde, en önemli toksik etki mekanizmalarından birisi oksidatif stres oluşumudur (Karlsson ve ark. 2009). Nanopartiküllerin hücre içine alınmasının difüzyon, endositoz ve reseptör bağımlı endositoz gibi çeşitli yollarla olabileceği belirtilmektedir (Chitrani ve ark. 2009). Reseptör bağımlı endositoz ile alınan materyaller endozom içinde yerleşirler ve daha sonra lizozomla birleşerek lizozom içinde depolanırlar (Chitrani ve ark. 2009). İşte burada, alınan materyallerin düşük konsantrasyonlarının etkili olmaması sebebiyle ekzositoz yoluyla materyallerin dışarı verilmesi veya yüksek konsantrasyonlardaki toksisiteden dolayı lizozomal membran potansiyelinin zayıflaması ve bunun sonucunda da lizozom içindeki litik enzimlerin hücre içine dağılarak hücreyi ölüme sürükleyebileceği düşünülebilir.

Diğer bir mekanizma olarak nanopartiküllerin çeşitli yollarla içeri alınması ve sonucunda ROS'un (Reaktif oksijen türleri) oluşması ve buna bağlı olarak oksidatif stres oluşumu ayrıca OH serbest radikallerinin oluşumu görülmektedir. Oksidatif stres oluşumu DNA hasarına ve mitokondriye bağımlı olarak apoptozis oluşumuna neden olabilmektedir. OH serbest radikalleri de membran hasarına neden olmaktadır. DNA hasarı, apoptozis ve membran hasarı da hücre ölümüne neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, nanopartiküllerin çok yoğun olarak kullanılmaya başlaması ve insan yaşamına zarar verme olasılığı olmasından dolayı toksikolojisinin araştırılması giderek önem kazanmaktadır. Nanomateriyallerin sağlığa etkisinin değerlendirilmesinde çok kısa sürede hızlı, yeterli ve etkili test stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Fakat yapılan çalışmalar hala

nanomateryallerin insan sağlığı üzerindeki etkisini belirlemede yetersiz kalmaktadır ve gelişime açıktır.

KAYNAKLAR

- Adams, L.K., Lyon, D.Y. ve Alvarez, P.J.J. (2006), *Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions*, Water Res. **40**, 3527–3532.
- Agnihotri S.A., Mallikarjuna, N.N. ve Aminabhavi, T.M. (2004), *Recent advance on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*, J. Control. Release **100**, 5-28
- Akerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N. ve Ruoslahti, E. (2002), *Nanocrystal targeting in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**, 12617–12621.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raf, M., Robert, K., ve Watson, J.D., (1994), *Molecular Biology Of The Cell*, 3 Rd Ed. New York.
- Allen, T.M. ve Cullis, P.R. (2004), *Drug delivery systems: Entering the mainstream*, Science **303**, 1818–1822.
- Arap, W., Pasqualini, R. ve Ruoslahti, E. (1998), *Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model*, Science **279**, 377–380.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R. ve Bottero J. (2009), *Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro*, Environmental Pollution **157**, 1127–1133
- Bae, S. ve Seo H. (2004), *Vertically aligned sulfur-doped ZnO nanowires synthesized via chemical vapor deposition*, J.Phys. Chem. B **108(17)**, 5206–5210
- Balaz, M. ve Mansson, A, (2005), *Detection of small differences in actinomycin function using action labeled with different phalloidin conjugates*, Analytical Biochemistry, **463**, 103-118
- Balazs, V., Denes, L., Gabor, H., Bela, S. ve Miklos, N. (2004), *The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments*, Febs Letters, **565**, 163-166.
- Balshaw, D.M., Philbert, M. ve Suk, W.A. (2005), *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Nanoscale technologies for assessing risk and improving public health*, Toxicol. Sci. **88**, 298–306.

- Banan, A., Smith, G.S., Kokoska, E.R. ve Miller, T.A.(2000), *Role of actin cytoskeleton in prostaglandin-induced protection in an intestinal epithelial cell line*, Journal of Surgical Research **88**, 104–113.
- Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A. ve Wick, P. (2007), *The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction*, Carbon **45**, 2643–2648.
- Berdyeva, T., Woodworth, C.D. ve Sokolov, I. (2005), *Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope*, Ultramicroscopy **102**, 189-198.
- Babich, H., Goldstein, S.H. ve Borenfreund E. (1990), *In vitro cyto- and genotoxicity of organomercurials to cells in culture*, Toxicology Letters, **50**, Pages 143-149
- Borenfreund, E., Babich. H. ve Martin-Alguacil N. (1988), *Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests*, Toxicology in Vitro, **Volume 2**, Issue 1, Pages 1-6.
- Borm, P., Klaessig, F.C., Landry, T.D., Moudgil, B., Pauluhn, J., Thomas, K., Trottier, R. ve Wood, S. (2006), *Research Strategies For Safety Evaluation Of Nanomaterials. Part V. Role Of Dissolution In Biological Fate And Effects Of Nanoscale Particles*. Toxicol. Sci. **90**, 23–32.
- Borovikov, Y.S., Horiuchi, K.Y., Avrova, S.V. ve Chacko, S. (1996), *Modulation of actin conformation and inhibition of actin filament velocity by calponin*, Biochemistry, **35**, 13849-13857
- Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Bonne, G., Yaou, R.B. ve Hutchison, C.J. (2006), *Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing*, Physiol. Rev. 86967–1008.
- Brumfiel, G. (2003), *Nanotechnology: A little knowledge*. Nature, **424 (6946)**, 246–248.
- Brunner, T.I., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. ve Stark, W.J. (2006), *In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility*, Environ. Sci. Technol., **40**, 4374–4381.
- Bulychev, A. Trouet, A. Ve Tulkens, P.(1978), *Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts*, Cell Res. **115**, 343–355.
- Cardelli, L., Caron, E., Gardner, P., Kahramanoğulları, O. ve Phillips A. (2009), *A process model of actin polymerisation*, Electronic Notes in Theoretical Computer Science, **229**, 127–144

- Cedervall T., Lynch I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A. ve Linse S. (2007), *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*, Proc. Natl. Acad. Sci. Usa **104**, 2050–2055.
- Chang, E., Thekkek, N., Yu, W.W., Colvin, V.L. ve Drezek, R. (2006), *Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake*, Small **2**, 1412–1417.
- Chaudhry Q., Blackburn, M., Ross, J. B., Boxall, A., Castle, L., Aitken R. ve Watkins R. (2008), *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector*, Food Addit. Contam. **25**, 241–258.
- Chithrani, B.D., Stewart, J., Allen, Ch ve Jaffray, D.A. (2009), *Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine **5**, 118–127
- Cıracı, S. (Ağustos 2005), *Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Arastırma Merkezi, Bilim Ve Teknik Eki Yeni Ufuklar*, , Vol.453, C.38, Sf.1-10.
- Clemenson C. ve Ekwall, B. (1999), *Overview of the final meic results. The in vitro evaluation*, Toxicol. In Vitro, **13**, 657–663.
- Coulombe, P.A. ve Wong, P. (2004), *Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose Scaffolds*, Nat. Cell Biol. **6**, 699–706.
- Colvin, V.L. (2003), *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. Nat. Biotechnol. **21**, 1166–1170.
- Cui, D.X., Tian, F.R., Ozkan, C.S., Wang, M. ve Gao, H.J. (2005), *Effect of single wall carbon nanotubes on human Hek293 cells*. Toxicol. Lett. **155**, 73–85.
- Cui, Y., Wei, Q., Park, H. ve Lieber, C. (2001), *Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species*, Science **293**, 1289–1292.
- Davis, R.R., Lockwood P.E., Hobbs D.T., Messer R.L., Price R.J., Lewis J.B. ve Wataha J.C. (2007), *In vitro biological effects of sodium titanate materials*, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. **83**, 505–511.
- De Matteis, M.A. ve Morrow, J.S. (2000), *Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway*, J. Cell. Sci., **113**, 2331–2343.

- Dechsakulthorn F., Hayes, A., Bakand, S., Joeng, L. ve Winder C. (2007), *In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts*, 6th World Congress On Alternatives & Animal Use in The Life Sciences August 21-25, Tokyo, Japan. Aatex **14**, Special Issue, 397-400
- Dejana, E. (2004), *Endothelial cell-cell junctions: happy together*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**, 261–270.
- Delatte, N.J. (2001), *Lessons from roman cement and concrete*, J. Prof. Issues Eng. Educ. Pract. **127**, 109–115.
- Dhawan, A., Taurozzi, J.S., Pandey, A.K., Shan, W., Miller, S.M., Hashsham, S.A. ve Tarabara, V.V. (2006), *Stable colloidal dispersion of C-60 fullerene in water: evidence for genotoxicity*, Environ. Sci. Technol. **40**, 7394–7401.
- Ding, Y. ve Wang, Z. (2004), *Structure analysis of nanowires and nanobelts by transmission electron microscopy*, J Phys Chem B. **108(33)**, 12280–12291
- Dobson, J. (2001), *Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease*, FEBS Letters, **496**, 1-5
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. ve Alexander, A. (2006), *Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety*, Toxicol. Sci. **92**, 5–22.
- Dulkeith, E., Ringler, M., Klar, T.A., Feldmann, J., Munoz J.A. ve Parak, W.J. (2005), *Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression*, Nano Lett. **5**, 585–589.
- Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H. ve Knowland, J. (1997), *Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients*, Febs Letters, **418**, 87-90.
- Edwards, P.P. ve Thomas, J.M. (2007), *Gold in a metallic divided state—from faraday to present-day nanoscience*, Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 5480–5486.
- Fent, K. (2001), *Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P450 induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples*, Toxicology In Vitro, **15**, 477-488.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J.A. (2006), *Cytotoxicity assays: comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*, Toxicol. Lett. **160**, 171-177

- Fubini, B. ve Hubbard, A. (2003), *Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis*, Free Radic. Biol. Med. **34**, 1507–1516.
- Fuchs E, ve Weber K. (1994), *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*, Annu Rev Biochem., **63**, 345–82.
- Fujiwara, H., Saito, S.Y., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., Ohizumi, Y. ve Ra, V. (2004), *A cyclic depsipeptide, changes the conformational structure of Actin to cause G2 arrest by the inhibition of cytokinesis*, Cancer Letters, **209**, 223–229.
- Gad, S.C. (2000), *Toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung L.W. ve Nie S. (2004), *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*, Nat. Biotechnol. **22**, 969–976.
- Garibaldi, S., Brunelli, C., Bavastrello, V., Ghigliotti, G. ve Nicolini, C. (2006), *carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells*, Nanotechnology **17**, 391–397
- Gavrilescu, M. ve Chisti, Y. (2005), *Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry*, Biotechnology Advances **23**, 471–499
- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T. ve Discher, D.E. (2007), *Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery*, Nat. Nanotechnol. **2**, 249–255
- Goldston, D. (2007), *Small advances*, Nature **450**, 1141.
- Gonsalves, K.E., Rangarajan, S.P. ve Wang, J. (2000), *Handbook of nanostructured materials and nanotechnology*, **Volume 1**, Syntthesis And Processing, ,Academic Pres
- Goorsell D. S. (Mayıs-Haziran 2000), Biomol. And Nanotech. American Scientist, **Vol.88**, No.3, Sf.230
- Gunaratnam, M. ve Grant, M.H. (2004), *Damage to F-actin and cell death induced by chromium VI And nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes*, Toxicology In Vitro, **18**, 245–253
- Gurr, J.R., Wang, A.S.S., Chen, C.H. ve Jan, K.Y. (2005), *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*, Toxicology, **213**, 66–73.

- Hasnat, A., Uddin, M.M., Samed, A.J., Alam, S.S. ve Hossain S. (2007), *Adsorption and photocatalytic decolorization of a synthetic dye erythrosine on anatase TiO₂ and ZnO surfaces*, J. Hazard Mater. **147**, 471–477.
- Hawkins A.T., Matthewmirigian B, M., Selcukyasar B, Jennifer. ve Ross B. (2010), *Mechanics of microtubules*, Journal of biomechanics, **43**, 23-30.
- Hayes, A., Bakand, S. ve Winder, C. (2007), *Novel In vitro exposure techniques for toxicity testing and biomonitoring of airborne contaminants, in drug testing in vitro: breakthroughs and treands in cell culture technology*, Eds. By U. Marx And V. Sandig, Pp.103-124, Wiley-Vch, Berlin.
- Heijne, W.H., Kienhuis,A.S., Van Ommen B., Stierum R.H., ve Groten, J.P. (2005), *Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, troteomics and metabolomics*, In Toxicology, Expert Rev. Proteomics **2**, 767–780.
- Heimann, K. ve ark. (1999), *Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of golgi-derived vesicles*, J. Biol. Chem. **274**, 10743–10750.
- Herrmann, H. ve Aebi, U. (2000), *Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics*, Curr. Opin. Cell Biol. **12**, 79–90.
- Hickman, K., (2002), *Nanomaterials it's a small, small world*, Cambridge Scientific Abstracts.
- Hoffman, A.J., Carraway, E.R. ve Hoffmann, M.R. (1994), *Photocatalytic production of H₂O₂ and organic peroxides on quantum-sized semiconductor colloids*, Environ. Sci. Technol. **28**, 776–785.
- Hotulainen, P. ve Lappalainen, P. (2006), *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*, J. Cell Biol., **173**, 383–394.
- http: 1. www.biodiv.org , Convention on Biological Diversity, 2. Bölüm, 3. Paragraf.
- http: 2. www.nanotechproject.org/consumerproducts
- Hu, X. , Cook, S. , Wang, P. ve Hwang H. (2009), *In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles*, Science of the Total Environment, **407**, 3070–3072.

- Huang, G.G., Wang, C.T., Tang, H.T. , Huang, Y.S. ve Yang, J. (2006), *ZnO nanoparticle-modified infrared internal reflection elements for selective detection of volatile organic compounds*, *Anal Chem* **78**(7), 2397–2404
- Huang, C., Aronstam, R.S., Chen, D. ve Huang, Y.W. (2010), *Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles*, *Toxicology in Vitro*, **24**, 45-55.
- Hussain, S.M. Hess, K.L. J.M. Geiss, K.T, Gearhart, Schlager, J.J. (2005), *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*, *Toxicology In Vitro* **19**, 975–983
- Igarashi, E. (2008), *Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229** (1), 121–134.
- Innes B. ve ark., (2002), *Nanotechnology And The Cosmetic Chemist*.
- Isakovic, A., Markovic, Z., Todorovic-Markovic, B., Nikolic, N., Vranjes-Djuric, S., Mirkovic, M., Dramicanin, M., Harhaji, L., Raicevic, N., Nikolic, Z. ve Trajkovic, V. (2006), *Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene*, *Toxicol. Sci.* **91**, 173–183.
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y. ve Ueno, K. (1997), *A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability*, *Talanta*, **44**, 1299-1305
- Istvan, R.B. ve Liza A.P. (2006), *Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton*, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1763**, 450–462
- Jiang, P., Enomoto, A. ve Takahashi, M. (2009), *Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton*, *Cancer Letters*, **284**, 122–130
- Johnston H.J., Semmler-Behnke, M. , Brown, D.M. , Kreyling, W. , Tran, L. ve Stone, V. (2010), *Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines*, *In Vitro Toxicology and Applied Pharmacology*, **242**, 66–78
- Jones, C.F. ve Grainger D.W. (2009), *In vitro assessments of nanomaterial toxicity*, *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 438–456
- Kane, R.S. ve Stroock, A.D. (2007), *Nanobiotechnology: Protein–nanomaterial interactions*, *Biotechnol. Prog.* **23**, 316–319.

- Karakoti, A.S., Hench, L.L. ve Seal, S. (2006), *the potential toxicity of nanomaterials—the role of surfaces*, J. Min. Met. Mater. Soc. **58**, 77–82.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J. , Cronholm, P. ve Möller, L. (2009), *Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size*, Toxicology Letters, **188**, 112–118.
- Katzer, A., Marquardt, H., Westendorf, J., Wening, J.V. ve Von, F.G. (2002), *Polyetheretherketone—cytotoxicity and mutagenicity in vitro*, Biomaterials, **23**, 1749–1759.
- Kılıç, V. (2002), *Kanserogenesis’de ras ve P53 proteinlerinin rolü üzerine bir çalışma*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D. ve Morey, T. (2005), *Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents*, Colloids Surf. B, Biointerfaces, **40**, 83–91.
- Kim, J., Grate, J.W. ve Wang, P. (2006), *Nanostructures for enzyme stabilization*, Chem. Eng. Sci. **61**, 1017–1026.
- Kim, S.Y., Nishioka, M. ve Taya.M. (2004), *Promoted proliferation of an SOD-deficient mutant of Escherichia coli under oxidative stress induced by photoexcited TiO₂*, FEMS Microbiol. Lett. **236**, 109–114.
- Klinth, J., Arner, A. ve Mansson, A. (2003), *Cardiotonic bipyridine amirone slows myosin-induced actin filament sliding at Saturating (MgATP)*, J. Muscle Res. Cell Motil. **24**, 15-32.
- Kobielak, A. ve Fuchs E. (2004), *Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**, 614–625.
- Kohler, M., Aufderheide, M. ve Ramm, D. (1994), *Method for the description of differences in the filamentous structure of the cytoskeleton*, Toxicology Letters, **72**, 33-42.
- Komissarova, E., Saha, S.K. ve Rossman, T.G. (2005), *Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example*, Toxicology And Applied Pharmacology, **202**, 99–107.
- Koparal, A.T., (2001), *Hücrelerdeki transformasyon gelişiminin moleküler yöntemlerle belirlenmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M. ve Bianco, A. (2007), *Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type*, Nat. Nanotechnol. **2**, 108–113.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. ve Schnekenburger J. (2009), *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **72**, 370–377
- Lambert, S. et al. (1997), *Morphogenesis of the node of ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates*, J. Neurosci. **17**, 7025–7036.
- Lambrechts, A. et Al. (2004), *The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility*, Int. J. Biochem. Cell Biol. **36**, 1890–1909.
- Larson, D.R., Zipfel, W.R., Williams, R.M., Clark, S.W., Bruchez, M.P., Wise, F.W. ve Webb, W.W. (2003), *Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo*, Science, **300**, 1434–1436
- Lee, Y., Ruby, D.S., Peters, D.W., McKenzie, B.B. ve Hsu, J.P. (2008), *ZnO nanostructures as efficient antireflection layers in solar cells*, Nano Lett. **8**, 1501–1505.
- Lengsfeld, A.M., Low, I., Wieland, T., Dancker, P. ve Hasselbach, W. (1974), *Interaction of phalloidin with actin*, Proc. Nat. Acad. Sci. Usa, **71**, 2803–2807
- Lestari, F., Green, A.R., Chattopadhyay, G. ve Hayes, A.J. (2006), *An alternative method for fire smoke toxicity assessment using human lung cells*, Fire Safety Journal, **41**, 605–615.
- Lewinski, N., Colvin, V. ve Drezek, R. (2008), *Cytotoxicity of nanoparticles*, Small, **4**, 26–49.
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H. ve Wollin, K.M. (2008), *Alternative methods to safety study in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH)*, Arch. Toxicol. **82**, 211– 236.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. ve Stark, W.J. (2005), *Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations*, Environ. Sci. Technol. **39**, 9370–9376.

- Lin, W., Xu, Y., Ma, Y. ve Shannon, K. (2009), *Toxicity of nano-and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells*, J.Nanopart Research, **11**, 25-39
- Lodish, H. Berk, A. Zipursky, S.L. Matsudaira, P. Baltimore, D. Ve Darnel, J.E. (1999), *Molecular Cell Biology*, 4 Th Ed. Freeman and Co. New York.
- Lu, Q.Y., Jin, Y.S., Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D., Liang, V., Li, F.P. ve Rao, J.Y. (2004), *Ganoderma lucidum extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro*, Cancer Letters, **216**, 18-20
- Luther, W. (2004), *Industrial applicaiton of nanomaterials-chances and risks. Technology Analysis*.
- Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour M., Beaumont, E. ve Fernandes, J.C. (2006), *Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy*, Biomaterials, **27**, 2060–2065.
- Marceau, N., Schutteb, B., Gilberta, S. ve Lorangera, A. (2007), *Dual roles of intermediate filaments in apoptosis*, Experimentel Cell Research, **313**, 2265-2281
- Marquet, P., Rappaz, B., Magistretti P.J., Cuche, E., Emery, Y, Colomb, T. ve Depeursinge, C. (2005), *Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy*, Opt. Lett. **30**, 468–470.
- Martin, C.R. ve Kohli, P. (2003), *The emerging field of nanotube biotechnology*, Nat. Rev. Drug Discov. **2**, 29–37.
- Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdoerster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., Tinkle, S.S., Tran, L., Walker, N.J. ve Warheit, D.B. (2006), *Safe handling of nanotechnology*, Nature, **444**, 267–269.
- Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R. ve Castranova, V. (2004), *Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material*, J. Toxicol. Environ. Health, **67**, 87–107.
- Melo, P.S, Duran, N. ve Haun, M. (2001), *Cytotoxicity of derivatives from dehidrocrotonin on V79 cells and Escherichia coli*, Toxicology Letters, **159** (3), 135-141.
- Meulenkamp, E.A. (1998), *Size dependence of the dissolution of ZnO nanoparticles*, J. Phys. Chem., **102**, 7764–7769.

- Milli, U., H. Hazıroğlu., R., Aydın, Y. ve Gülbahar, M. Y. (2000), *Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, Vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikrofilamentlerin immunohistokimyasal lokalizasyonu*, Türk J. Vet. Anim. Sci., **24**, 81-92.
- Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. ve Zhang L.W. (2009), *Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line*, Toxicology and Applied Pharmacology, **234**, 222–235.
- Morris, R.L. ve Hollenbeck, P.J. (1995), *Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons*, J. Cell. Biol. **131**, 1315–1326.
- Mossman, T. (1983), *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, Journal of Immunological Methods, **65**, 55–63p.
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J. ve Bre´ard, J. (2008), *Cytoskeleton and apoptosis*, Biochemical Pharmacology. **76**, 11– 18
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., ve Li, N. (2006), *Toxic potential of materials at the nanolevel*, Science, **311**, 622–627.
- Nielsen, G.D., Roursgaard, M., Jensen, K.A., Poulsen, S.S., ve Larsen, S.T. (2008), *In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives*, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. **103** (3), 197–208.
- O’Neal, D.P., Hirsch, L.R., Halas, N.J., Payne, J.D. ve West, J.L. (2004), *Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles*, Cancer Lett. **209**, 171–176.
- Oberdorster, E. (2004), *Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass*, Environ. Health Perspect. **112**, 1058–1062
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., ve Oberdorster, J. (2005), *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*, Environ. Health Perspect. **113**, 823–839.
- Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E. ve Case, C.P. (2007), *The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro*, Biomaterials, **28**, 2946–2958.

- Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S. ve Mazurek, A. (2005), In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides, *Cancer Letters*, **229**, 67-75.
- Popov, A. P., Priezzhev, A. V., Lademann, J., ve Myllylä, R. (2005), *TiO₂ nanoparticles as an effective uv-B radiation skin-protective compound in sunscreens*, *Journal of Physics D, Applied Physics*, **38**, 2564-2570.
- Potera, C. (2007), *More human, more humane: a new approach for testing airborne pollutants*, *Environmental Health Perspectives*, **115**, 148-151.
- Pramod A., Pullarkat, Pablo A., Fernández ve Albrecht Ott. (2007), *Rheological properties of the eukaryotic cell cytoskeleton*, *Physics Report*, **449**, 29 –53.
- Prasain, N. ve Stevens, T. (2009), *The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes*, *Microvascular Research*, **77**, 53–63.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. ve Bretscher, A. (2004), *Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 559–591.
- Pulskamp, K., Diabate, S. ve Krug H.F. (2007), *Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants*, *Toxicol. Lett.* **168**, 58–74.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W. ve Doolittle, D.J. (2002), *Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate*, *Toxicology In Vitro*, **16**, 599-607.
- Rafelski, S.M. ve Theriot, J.A. (2004), *Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics*, *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 209–239.
- Ramakrishna G. ve Ghosh Hn. (2003), *Effect of particle size on the reactivity of quantum size ZnO nanoparticles and charge-transfer dynamics with adsorbed catechols*, *Langmuir*, **19(7)**, 3006–3012
- Ramires, P.A., Cosentino, F., Milella, E., Torricelli, P., Giavaresi, G., ve Giardino, R. (2002), *In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like Cells*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**, 797–801.
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F. ve Jha, A.J. (2008), *Hydroxyl radicals (•OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells*, *Mutat. Res.* **640**, 113–122.

- Revenu C., Athman R., Robine S. ve Louvard D. (2004), *The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals*, Nat. Rev., Mol. Cell Biol. **5**, 635–646.
- Rittner., M. (2002), *Market analysis of nanostructured materials*. Ceramic Bulletin (www.Ceramicbulletin.Org).
- Robins, D.M. (2005), *Androgen receptors and molecular mechanism of male-specific gene expression*, Novartis Found. Symp. **268**, 42–52.
- Salman, H., Gül, Y. ve Granek, R. (2002), *Microtubules, motor proteins and anomalous mean squared displacements*, Chemical Physics, **284**, 389–397
- Samori, B. ve Zuccheri, G. (2005), *DNA codes for nanoscience*. Angew, Chem. Int. Ed. **44**, 1166–1181.
- Sanchez, C., Lebeau, B., Chaput, F. ve Boilot, J.P. (2003), *Optical properties of functional hybrid organic-inorganic nanocomposites*, Adv. Mater. **15**, 1969–1994.
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A.K.Y., Schulten, K. ve Baneyx, F. (2003), *Molecular biomimetics: Nanotechnology Through Biology*. Nat. Mater. **2**, 577–585.
- Schafer, F.Q., Qian, S.Y. ve Buettner, G.R. (2000), *Iron and free radical oxidations in cell membranes*, Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand), **46**, 657–662.
- Scheers M.E., Ekwall B. ve Dierickx J.P. (2001), *In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 melc chemicals on Hepg2 cells and comparison with acute human toxicity data*, Toxicol. In Vitro, **15**, 153–161.
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.M., Schäfer, U.F., K, Becker., Schnekenburger, J., Schulze. C., Landsiedel R.ve Wohleben, W. (2008), *Not ready to use – overcoming pitfalls When dispersing nanoparticles in physiological Media*, Nanotoxicology, **2**, 51–61.
- Seeman, N.C. (2003), *DNA in a material world*, Nature, **421**, 427–431.
- Sharma, V., Ritesh K., Shukla, S.N. , Parmar, D., Das, M. ve Dhawan A. (2009), *DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells*, Toxicology Letters, **185**, 211–218.

- Singh, S., Tingming, S., Duffin, R., Albrecht, C., Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P.J.A. ve Schins, R.P.F. (2007), *Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles*, Toxicology and Applied Pharmacology, **222**, 141–151.
- Small, J.V. ve Kaverina, I. (2003), *Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity*, Curr. Opin. Cell Biol. **15**, 40–47.
- Soto, K.F., Carrasco, A., Powell, T.G., Garza, K.M. ve Murr, L.E. (2005), *Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy*, J. Nanopart. Res. **7**, 145–169
- Stamenovic, D. (2005), *Microtubules may harden or soften cells, depending of the extent of cell distension*, Journal of biomechanics, **38**, 1728–1732.
- Stefanidou M., Maravelias C., Dona, A. ve Spiliopolou. (2006), *Zinc: C. A multipurpose trace element*, Arch. Toxicol. **80**, 1–9.
- Steiner T. (2004), *Nanostructures for optoelectronic applications*, Artech House Inc., London.
- Steinmetz, M.O. ve et al. (1997), *Actin: from cell biology to atomic detail*, J. Struct. Biol. **119**, 295–320.
- Stossel, T.P. (1993), *On the crawling of animal cells*, Science, **260**, 1086–1094.
- Stossel, T.P. ve et al. (1985), *Nonmuscle actin-binding proteins*, Rev. Cell Biol. **1**, 353–402.
- Suh, W.H., Suh, Y.H., Stucky, G.D. ve Suslick, K.S. (2009), *Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience*, Progress in neurobiology, **87**, 133–170
- Suh, W.H., Jang, A.R., Suh, Y.H. ve Suslick, K.S. (2006). *Porous, hollow, and ball-in-ball metal oxide microspheres: preparation, endocytosis, and cytotoxicity*, Adv. Mater. **18**, 1832–1837.
- Suryanarayana, C. ve Koch, C.C. (1999), *Non-equilibrium processing of materials*, Pergamon Material Series.
- Suvaci E. ve Özer, I.Ö. (Haziran 2005), *Processing of textured zinc oxide varistors via templated grain growth*, Journal of the European Ceramic Society, **Vol. 25**, , Pp. 1663-1673.

- Taton, T., Mirkin, C. ve Letsinger, R. (2000), *Scanometric dna array detection with nanoparticle probes*, Science, **289**, 1757–1760.
- The Royal Society And Royal Academy Of Engineering, Uk, (2004), *Nanoscience and nanotechnology: opportunities and uncertainties*, available at <http://www.Nanotech.Org.Uk/Finalreport.Htm>.
- Thomas, T., Thomas, K., Sadrieh, N., Savage, N., Adair, P. ve Bronaugh, R. (2006), *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. part vii: evaluating consumer exposure to nanoscale materials*, Toxicol. Sci. **91**, 14–19.
- Tian, Et Al. (2006), *Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts*, Toxicol In Vitro. **20(7)**, 1202–1212.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D. ve White, M.R.H. (2004). Çeviren Konuk, M., *Moleküler biyoloji: önemli notlar*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Uchino T, Tokunaga H, Ando M, Utsumi H. (2002). *Quantitative determination of oh radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂ UVA treatment*, Toxicol In Vitro, **16(5)**, 629-35.
- Urnov, F.D., Miller, J.C. Lee, Y.L. Beausejour, C.M. Rock, J.M. Augustus, S. Jamieson A.C., Porteus, M.H. Gregory, P.D. ve Holmes, M.C. (2005), *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*, Nature, **435**, 646–651.
- Uzdensky, A., Kolpakova, E., Juzeniene, A., Juzenas, P. ve Moan, J. (2004), *The effect of sub-lethal ala-pdt on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells*, Biochimica Et Biophysica Acta, **73**, 119-121
- Veranth, J.M., Kaser, E.G. Veranth, M.M. Koch, M. Yost, G.S. (2007), *Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts*, Particle and Fibre Toxicology, **4**:2.
- Vippola, M, Falck, Gcm, Lindberg, Hk. ve Suhonen, S. (2009), *Preparation of nanoparticles dispersions for in-vitro toxicity testing*, Human & Experimantal Toxicology, **28**, 377-385
- Voura, E.B, Jaiswal, J.K, Mattoussi, H. ve Simon, S.M. (2004), *Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emissionscanning microscopy*, Nat. Med. **10**, 993–998.

- Warheit, D.B., Webb, T.R., Sayes, C.M., Colvin, V.L. ve Reed, K.L. (2006). *Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area*, Toxicol. Sci. **91**, 227–236.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., Li, Y., Jiao, F., Zhao, Y. ve Chai, Z. (2007), *Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration*, Toxicology Letters, **168**, 176–185.
- Wang, C.Y. ve Adhikari S. Li. (2009), *C.F dynamic behaviors of microtubules in cytosol*, Journal of Biomechanics, **42**, 1270–1274.
- Watanabe, T., Noritake, J. ve Kaibuchi, K., (2005), *Regulation of microtubules in cell migration*, Trends In Cell Biology, **15**, 76–83.
- Weiger, M.C., Wang, C.C., Krajcovic, M., Melvin A.T., Rhoden, J.J. ve Haugh J.M. (2009), *Spontaneous phosphoinositide 3-kinase signaling dynamics drive spreading and random migration of fibroblasts*, J. Cell Sci., **122**, 313–323.
- Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, Int. J. Pharmaceut. **288**, 369–376.
- Wulf, F.A., Deboen, F.A., Bautz, H. ve Wieland, T.H. (1979), *Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin*, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 4498–4502.
- Yuan, J.H., Chen, Yu., Zha, H.X., Songa, L.J., Li C.Y. , Li , J.Q. ve Xia X.H. (2010), *Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **76**, 145–150
- Yamamoto, A., Honma, R., Sumita, M. ve Hanawa, T. (2004), *Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes*, J. Biomed. Mater. Res. Part A, **68A**, 244–256.
- Yoshida, K., Morita, M. ve Mishina, H. (2003), *Cytotoxicity of metal and ceramic particles in different sizes*, JSME Int. J. C: Mech. Syst. **46**, 1284–1289.
- Zhao, X.J. ve Zhang, S.G. (2006), *Molecular designer self-assembling peptides*, Chem.Soc. Rev. **35**, 1105–1110.
- Zhu B.L., Xie, B., Zeng, C., Song, D. ve Wang W.A. (2005), *Investigation of gas sensitivity of Sb-doped ZnO nanoparticles*, Materials Chem Phys **89**(1), 148–153