

**ALTIN NANOPARTİKÜLLERDE POLİMER
KAPLAMANIN OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**THE EFFECTS OF POLYMER COATING OF GOLD
NANOPARTICLES ON OXIDATIVE STRESS AND DNA
DAMAGE**

GAMZE TİLBE ŞEN

PROF. DR. BELMA GÜMÜŞEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

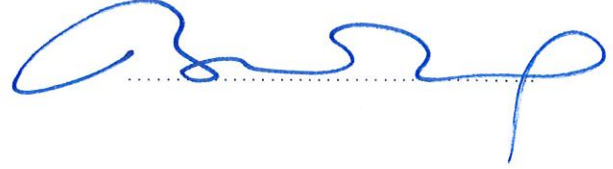
2017

GAMZE TİLBE ŞEN' in hazırladığı "Altın Nanopartiküllerde Polimer Kaplamanın Oksidatif Stres ve Dna Hasarı Üzerine Etkileri" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN
Başkan



Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL
Danışman



Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER
Üye



Prof. Dr. Benay Can EKE
Üye



Doç. Dr. Pınar ERKEKOĞLU
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 06.09.2019. tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

06. / 09. / 2019...


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Gamze Tilbe Şen

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/08/2017



GAMZE TİLBE ŞEN

ÖZET

ALTIN NANOPARTİKÜLLERDE POLİMER KAPLAMANIN OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ

GAMZE TİLBE ŞEN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Belma Gümüsel

Eylül 2017, 93 sayfa

Altın nanopartikülleri (Au NP), yüzeylerinin kolaylıkla işlevsel hale getirilebilmesi ve yakın infrared (NIR) bölgede ışığı absorblamaları gibi özellikleri nedeniyle biyolojik ve medikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilir. Au NP özellikle izleme ve görüntüleme, biyo-algılama, gen, kanser tedavisi, fototermal tedavi ve ilaç taşınımı gibi farklı uygulamalarda kullanılır. Literatürdeki bazı çalışmaların sonuçları Au NP'lerin hücre içi oksidatif stresi artırabildiği ve DNA hasarına neden olabildiğine işaret etmektedir; ancak bu alandaki çalışmaların sonuçlarının çelişkili olduğu görülmektedir. Toksik etkilerinin azaltılabilmesi için Au NP'lerin yüzeysel özelliklerinin değiştirilmesi önerilmektedir. Bu amaçla, polietilenglikol (PEG) ve polietilenimin (PEI) kaplamalar kullanılabilir. PEG, nötr ve yüksek oranda hidrofildir; böylece Au NP'nin retikuloendotelyal sistem tarafından alımı ve spesifik protein adsorpsiyonunu önler; nanopartiküllerin vücutta dolaşım süresini uzatır. Aynı zamanda nanopartiküle kararlılık, biyoyumluluk ve çoklu işlevsellik gibi özellikler kazandırır. Diğer taraftan, PEI'nin de biyoyumlu olması nedeniyle Au NP'lerin kararlılık ve biyoyumluluğunu artırdığı bildirilmiştir. Ancak, literatürde Au NP'lerde yapılan bu değişikliklerin oksidatif stres üzerine olan etkileri detaylı olarak araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı Au

NP'nin sitotoksosite, oksidan/antioksidan statü parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkilerinin insan hepatoma hücreleri (HepG2) üzerinde detaylı olarak incelenmesi ve PEG ile PEI kaplamanın toksisite üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, Au NP'leri (45 nm), PEG veya PEI (molekül ağırlığı 2000 ve 25000) ile kaplanmış; çalışma grupları kontrol, Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 olarak belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinin Au NP'lerinin farklı konsantrasyonlarına 24 saat inkübasyonunu takiben 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile tayin edilen yarım maksimal inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri, Au, Au-PEG ve Au-PEI 2000 için sırasıyla 167 µg/ml, 257 µg/ml ve 198 µg/ml olarak belirlenmiştir. Au-PEI 25000 grubu için IC₅₀ değeri belirlenmemiştir. Çalışma gruplarında, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan enzim aktiviteleri [glutasyon peroksidaz 1 (GPx1), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD)]; total glutasyon (GSH), lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyon düzeyleri ve DNA hasarı incelenmiştir. Au NP, HepG2 hücre hattında IC₃₀ konsantrasyonda 24 saat maruziyeti sonucu hücre içi ROS düzeylerinde artışa neden olurken, incelenen diğer parametrelerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir farklılığa neden olmamıştır. Kaplama yapılan tüm gruplarda da hücre içi ROS düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttığı gözlenmekle birlikte; incelenen diğer parametrelerde (protein oksidasyon düzeyleri hariç) Au-PEG grubunda Au grubuna kıyasla anlamlı bir farkın oluşmadığı belirlenmiştir. Au-PEI 2000 grubunda antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, GPx1) kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artışların gözlemlendiği; Au-PEI 25000 grubunda ise, tüm oksidan/antioksidan statü parametrelerinde anlamlı düzeyde değişikliklerin oluştuğu belirlenmiştir. DNA baz hasarının bir göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHdG) düzeylerinde tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmanın sonuçları, IC₃₀ dozunda Au NP'lerinin HepG2 hücre hattında oksidatif stres ve DNA hasarını önemli düzeyde etkilemediğini; PEG ile kaplamanın toksisite üzerinde bir etkisi olmadığını; ancak Au NP'lerini PEI ile (özellikle de PEI 25000 ile) kaplanmasının oksidatif stresi indükleyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Altın nanopartikülleri, oksidatif stres, antioksidan enzimler, DNA baz hasarı, reaktif oksijen türleri, PEG kaplama, PEI kaplama

ABSTRACT

THE EFFECTS OF POLYMER COATING OF GOLD NANOPARTICLES ON OXIDATIVE STRESS AND DNA DAMAGE

GAMZE TİLBE ŞEN

Master Degree, Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Belma Gümüşel

September 2017, 93 pages

Gold nanoparticles (Au NPs) are preferred in many biological and medical applications due to their easy surface functioning property and their ability to absorb light in near infrared (NIR) region. Au NPs are specifically used in many applications like monitoring and visualization, biosensing, gene and cancer therapy, photothermal therapy and drug delivery. The results of some studies in literature pointed out that Au NPs could increase intracellular oxidative stress and cause DNA damage; however results of studies in this field are contradictory. In order to reduce their toxic effects, it is suggested that the surface properties of Au NPs should be changed. For this reason, polyethyleneglycol (PEG) and polyethyleneimine (PEI) coatings can be used. PEG is neutral and highly hydrophilic; therefore it prevents the uptake of Au NPs by reticuloendothelial system, inhibits specific protein adsorption and increases their circulation period in the body. In addition, it adds several properties to nanoparticles, including stability, biocompatibility and multi-functioning. On the other hand, as PEI is also biocompatible, it was indicated that it can also increase the stability and biocompatibility of Au NPs. However, there is not any comprehensive study in literature that compares the effects of the variations of Au NPs on oxidative stress. The aim of this thesis is to examine the effects of Au NPs on cytotoxicity, oxidant/antioxidant parameters and DNA damage in human hepatoma cells

(HepG2) in detail and to search for the protective roles of PEG and PEI coatings. For this, Au NPs (45 nm) were coated with PEG or PEI (molecular weights of 2000 and 25000) and the study groups were determined as control, Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 and Au-PEI 25000. After incubating HepG2 cells with different concentrations of Au NPs for 24 hours, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values using (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for Au, Au-PEG and Au-PEI 2000 were found to be 167 $\mu\text{g/ml}$, 257 $\mu\text{g/ml}$, and 198 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The IC_{50} value for the Au-PEI 25000 group was not determined. In the study groups, intracellular reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities [glutathione peroxidase 1 (GPx1), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD)]; total glutathione (GSH), lipid peroxidation and protein oxidation levels as well as DNA damage were determined. After HepG2 cells were exposed to IC_{30} concentrations of Au NPs, intracellular ROS levels were increased; however no other changes were determined in any of the measured parameters in the Au group vs. control. In all of the coated Au groups, the intracellular ROS levels were significantly higher vs control; however other than intracellular ROS levels, no significant alterations (except an increase in protein oxidation) were observed in Au-PEG group vs. Au group. In Au-PEI 2000 group, there were significant changes in some of the antioxidant enzyme activities (SOD, GPx1) vs. control; however, in Au-PEI 25000 group, all of the oxidant/antioxidant parameters were markedly altered vs. both control and Au group. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels were measured as a marker of DNA base damage and 8-OHdG levels were not different in any of the study groups when compared to control. The results of this study suggest that at IC_{30} doses, Au NPs does not affect oxidative stress and DNA damage significantly; PEG coating does not have an impact on toxicity; however coating Au NPs with PEI (particularly by PEI 25000) can induce oxidative stress.

Keywords: gold nanoparticles, oxidative stress, antioxidant enzymes, DNA base damage, reactive oxygen species, PEG coating, PEI coating

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca daima destek veren, yakın ilgi ve öneriler ile beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini bu çalışmanın her aşamasında paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL**'e,

Deneylerimin yapılması ve tezimin hazırlanması sırasında sabırla destek olan ve danışmanlığını hiçbir zaman eksik etmeyen hocam **Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU**'na,

Tez çalışmam boyunca katkılarını esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**'a ve **Reza SHAHBAZI**'ye,

Tüm bu yorucu süreçte, bana her daim destek olan, yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgi birikimi ile bana yardımcı olan çalışma arkadaşım, **Kübra Gizem YILDIZTEKİN**'e

Bana güç veren, her zaman yanımda olan ve beni bugünlere getiren sevgili annem **Esen ÖZİŞİK** ve tüm **Ailem**'e,

Koşulsuz şartsız, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, zor günlerimi kolaylaştıran **Erdal İNCE**'ye,

Tüm saygı ve sevgimle teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGE DİZİNİ.....	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
SİMGE ve KISALTMA DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Altın Nanopartikülleri	3
2.1.1. Altın Nanopartiküllerin Genel Özellikleri	3
2.1.2. Altın Nanopartiküllerin Uygulama Alanları	4
2.1.3. Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları.....	9
2.1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Sistemlerle Etkileşimleri	12
2.1.5. Nanopartiküllerin Hücreden Atılması.....	14
2.1.6. Altın Nanopartiküllerin Organizmaya Giriş Yolları ve Hücre İçine Alınması... 15	
2.2. Oksidatif Stres.....	17
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	17
2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Kaynakları	19
2.2.3. Reaktif Azot Türleri	20
2.2.4. Oksidatif stres	21
2.2.5. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Hücresel Fonksiyonlar Üzerindeki Etkileri.....	22
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi	22
2.3.1. Antioksidan Enzimler	23

2.3.2. Glutasyon.....	24
2.4. Lipit Peroksidasyonu.....	26
2.5. Oksidatif DNA hasarı.....	27
2.6. Protein Oksidasyonu	29
2.7. Nanomalzeme Kaynaklı Toksikite	29
2.7.1. Altın Nanopartiküllerin Toksik Etkilerine İlişkin Çalışmalar.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	40
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	41
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması	41
3.4.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	41
3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	42
3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.4. ROS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.5. Glutasyon Peroksidaz 1 Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.6. Süperoksit Dismutaz Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.7. Katalaz Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.8. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkoninik asit (BCA) Deneyi] Kullanılan Çözeltiler 45	
3.4.9. Glutasyon Deneyinde Kullanılan Çözeltiler.....	46
3.4.10. TBARS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler.....	47
3.4.11. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler.....	48
3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.13. DNA Baz Hasarı Tespitinde Kullanılan Çözeltiler.....	49

3.5. Yöntemler.....	50
3.5.1. Hücre Kültürü	50
3.5.2. Altın Nanopartiküllerin Eldesi	50
3.5.3. Çalışma Grupları	50
3.5.4. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi	51
3.5.5. HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....	52
3.5.6. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi.....	53
3.5.7. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması.....	54
3.5.8. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü	55
3.5.9. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	56
3.5.10. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	58
3.5.11. Protein Oksidasyonunun Belirlenmesi.....	60
3.5.12. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	61
3.5.13. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	62
3.5.14. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü	63
3.5.15. DNA İzolasyonu	64
3.5.16. DNA Baz Hasarının Belirlenmesi.....	65
4. BULGULAR.....	68
4.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	68
4.2. MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar.....	69
4.3. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	72
4.4. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	73
4.5. SOD Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	74
4.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar.....	76
4.7. Lipit Peroksidasyonu Ölçümleri	77

4.8. Glutasyon Düzeyi Ölçümleri.....	78
4.9. Protein Oksidasyonu Ölçümleri.....	79
4.10. DNA Baz Lezyonu Ölçümleri	81
4.11. İstatistiksel Değerlendirme	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	104

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

ÇİZELGE 2.1. ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN GÖRÜNTÜLEME UYGULAMALARI ÖZETİ	9
ÇİZELGE 2.2. ALTIN NANOPARTİKÜL HAZIRLANMASINDA KULLANILAN POLİMERİK LİGANDLAR	10
ÇİZELGE 3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI	51
ÇİZELGE 4.1. ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN HİDRODİNAMİK ORTALAMA ÇAPI, POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ (PDL) VE ZETA POTANSİYELİ	68
ÇİZELGE 4.2. ÇALIŞMA GRUPLARINDA HÜCRE CANLILIĞI.....	70
ÇİZELGE 4.3. ÇALIŞMA GRUPLARININ IC ₃₀ VE IC ₅₀ DEĞERLERİ	72
ÇİZELGE 4.4. ÇALIŞMA GRUPLARINDA HÜCRE İÇİ ROS ÜRETİMİ.....	73
ÇİZELGE 4.5. ÇALIŞMA GRUPLARINDA GPX AKTİVİTESİ	74
ÇİZELGE 4.6. ÇALIŞMA GRUPLARINDA SOD AKTİVİTESİ	75
ÇİZELGE 4.7. ÇALIŞMA GRUPLARINDA CAT AKTİVİTESİ	76
ÇİZELGE 4.8. ÇALIŞMA GRUPLARINDA MDA DÜZEYLERİ	77
ÇİZELGE 4.9. ÇALIŞMA GRUPLARINDA TOTAL GLUTATYON DÜZEYLERİ.....	79
ÇİZELGE 4.10. ÇALIŞMA GRUPLARINDA KARBONİL DÜZEYLERİ.....	80
ÇİZELGE 4.11. ÇALIŞMA GRUPLARINDA 8-HİDROKSİ-2'-DEOKSİGUANOZİN DÜZEYLERİ	81

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

ŞEKİL 2.1. FARKLI ŞEKİLLERDEKİ ALTIN NANOPARTİKÜLLERİ	4
ŞEKİL 2.2. ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANIM ALANLARI	5
ŞEKİL 2.3. ALTIN NANOPARTİKÜLLER, İN VİTRO ÖLÇÜMLER İÇİN, ÇEŞİTLİ MOLEKÜLLER İLE MODİFİYE EDİLEBİLMEKTEDİR	6
ŞEKİL 2.4. PEG'İN YAPISAL FORMÜLÜ	11
ŞEKİL 2.5. POLİETİLENİMİN (PEI) YAPISAL FORMÜLÜ	11
ŞEKİL 2.6. NANOPARTİKÜL YÜZEYİ ÜZERİNDE SERT VE YUMUŞAK PROTEİN KORONA OLUŞUMU	14
ŞEKİL 2.7. MOLEKÜLER OKSİJENİN İNDİRGENMESİ.....	18
ŞEKİL 2.8. ÇEŞİTLİ ETMENLERİN NEDEN OLDUĞU ROS ÜRETİMİNİN HÜCRE METABOLİZMASINA ETKİSİ.....	19
ŞEKİL 2.9. GLUTATYONUN KİMYASAL YAPISI	24
ŞEKİL 2.10. MALONDİALDEHİT (MDA) KİMYASAL YAPISI.....	26
ŞEKİL 2.11. 4-HİDROKSİ-2-NONENAL (HNE) KİMYASAL YAPISI.....	26
ŞEKİL 2.12. OH· RADİKALİNİN GUANİN İLE REAKSİYONU SONUCU 7,8-DİHİDRO-8-OKSOGUANİN OLUŞMAKTADIR	28
ŞEKİL 2.13. NANOMALZEME KAYNAKLI TOKSİSİTE.....	30
ŞEKİL 3.1. CANLI HÜCRELER TARAFINDAN MTT'NİN FORMAZAN TUZA DÖNÜŞÜM METABOLİZMASI.....	53
ŞEKİL 3.2. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ÖLÇÜMÜ REAKSİYON ŞEMASI.....	57
ŞEKİL 3.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ STANDART EĞRİSİ.	58
ŞEKİL 3.4. FORMALDEHİT STANDART EĞRİSİ.....	59
ŞEKİL 3.5. PROTEİN MİKROGRAMLARINA KARŞI ABSORBANS EĞRİSİ.	60
ŞEKİL 3.6. GSH DÖNGÜSÜ	61

ŞEKİL 3.7. GSSG STANDART EĞRİSİ (414 NM).....	62
ŞEKİL 3.8. MDA-TBA KOMPLEKSİNİN OLUŞUMU.....	62
ŞEKİL 3.9. MDA STANDART EĞRİSİ (530 NM).....	63
ŞEKİL 3.10. 8-OHdG STANDART EĞRİSİ.....	67
ŞEKİL 4.1. ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN TEM GÖRÜNTÜLERİ.....	69
ŞEKİL 4.2. HEPG2 HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDE AU NP'LERİN 25 – 400 µG/ML KONSANTRASYON ARALIĞINDA ETKİSİ.....	71
ŞEKİL 4.3. HEPG2 HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDE AU-PEG'LERİN 25 – 400 µG/ML KONSANTRASYON ARALIĞINDA ETKİSİ.....	71
ŞEKİL 4.4. HEPG2 HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDE AU-PEI2000'LERİN 25 – 400 µG/ML KONSANTRASYON ARALIĞINDA ETKİSİ.....	71
ŞEKİL 4.5. HEPG2 HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDE AU-PEI25000'LERİN 25 – 400 µG/ML KONSANTRASYON ARALIĞINDA ETKİSİ.....	72
ŞEKİL 4.6. ÇALIŞMA GRUPLARINDA HÜCRE İÇİ ROS ÜRETİMİ.....	73
ŞEKİL 4.7. ÇALIŞMA GRUPLARINDA GPX AKTİVİTESİ.....	74
ŞEKİL 4.8. ÇALIŞMA GRUPLARINDA SOD AKTİVİTESİ.....	75
ŞEKİL 4.9. ÇALIŞMA GRUPLARINDA CAT AKTİVİTESİ.....	77
ŞEKİL 4.10. ÇALIŞMA GRUPLARINDA MDA DÜZEYLERİ.....	78
ŞEKİL 4.11. ÇALIŞMA GRUPLARINDA TOTAL GLUTATYON DÜZEYLERİ.....	79
ŞEKİL 4.12. ÇALIŞMA GRUPLARINDA KARBONİL DÜZEYLERİ.....	80
ŞEKİL 4.13. ÇALIŞMA GRUPLARINDA 8-HİDROKSİ-2'-DEOKSİGUANOZİN DÜZEYLERİ.....	81

SİMGE ve KISALTMA DİZİNİ

Simgeler

μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

3-NT	3-Nitrotirozin
8-oksodG	7,8-Dihidro-8-Oksoguanin
A549	Akciğer Epitel Hücresi
ATP	Adenozintrifosfat
Au	Altın
AuNC	Altın Nanoküpler
Au-NK	Altın Nanoküreler
AuNO	Altın Nano-Oktahedralar
Au NP	Altın Nanopartiküller
BCA	Bişinkoninik Asit
BER	Baz Eksizyon Onarımı
BHK-21	Hamster Böbrek Fibroblast Hücreleri
BSA	Sığır Serum Albumini
BT	Bilgisayarlıtomografi
C	Karbon
C2C12	Sıçan Miyoblastoma Hücresi
CAT	Katalaz
Cit	Sitrat
cm^2	Santimetre Kare
CM-DCF	2',7'-Diklorofloreskein
CM-H ₂ DCFDA	5-Ve-6-Klorometil-2',7'-Dikloro Dihidro Floreskein Diasetat
Coco-2	İnsan Epitelyal Kolorektal Adenokarsinoma Hücreleri
CuZnSOD	Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz

DMEM	Dulbecco' Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
DOX	Doksorubisin
D-PBS	Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
DTNB	5,5'-Diti-Bis-(2-Nitrobenzoik) Asit
DTPA	Dietilen Triamin Pentaasetik Asit
e ⁻	Elektron
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu
ELP	Elastin Benzeri Polipeptid
ER	Endoplazmik Retikulum
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FAD	Flavin Adenin Nükleotit
FBS	Fötal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon (Glutasyon Disülfid)
GST	Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HAuCl ₄ • 3H ₂ O	Hidrojen Tetrakloraurat (III) Trihidrat
HCl	Hidroklorik Asit
HEK293	İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri
HeLa	İnsan Serviks Adenokarsinoma Hücreleri
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücreleri
HNE	4-Hidroksi-2-Nonenal
HO ⁻	Hidroksil Anyonu
IC ₃₀	Hücrelerin %30'unun Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sinin Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
J774A1	Sıçan Monositik/Makrofaj Hücreleri
KOH	Potasyum Hidroksit

Kromojen	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
L(D)-PAV	Poli(Akriloil-L(D)-Valin)
L929	Sıçan Fibroblast Hücreleri
LC/MS/MS	Sıvı Kromatografi/Kütle Spektroskopisi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LP	Lipit Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MES	2-(N-Morfolin) Etansülfonik Asit
MnSOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
MTS	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromür
NAC	N-Asetilsistein
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
NIR	Nükleotid İnsizyon Onarımı
NIR	Yakın – Kıızılötesi Işık
NIST	Ulusal Standartlar Ve Teknoloji Enstitüsü
NO·	Nitrik Oksit
NOX	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Oksidaz
NP	Nanopartikül
O ₂	Moleküler Oksijen, Dioksijen
O ₂ ^{·-}	Süperoksit Anyonu
OGG1	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin DNA Glikozilaz
OH·	Hidroksil Radikali
ONOO-	Peroksi Nitrit Radikali
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
PCL	Poli-Kaprolakton
PDDA	Polidial Dimetil Amonyum
PdI	Polidispersite İndeksi

PDMA	Poli dimetilsiloksan
PEG	Polietilenglikol
PEI	Polietilenimin
pH	Hidrojenin Gücü
PMOEGMA	Poli (Oligo (Etilen Glikol) Metil Metakrilat)
PNIPAM	Poli izopropilkrilamit
pO ₂	Yüksek Oksijen Kısmi Basıncı
PS	Polistren
Purpald, Kromojen	4-Amino-3-Hidrazino-5-Merkapto-1,2,4-Triazol
PVCL	Polivinil Kaprolaktam
RES	Retiküloendotelyal Sistem
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Scda	5'S-8,5'-Siklo-2'-Deoksiadenozin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SERS	Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
SK-Mel-28	İnsan Cilt Melanom Hücreleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikler
TCA	Trikloroasetik Asit
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
Tiyolat PVP	Polivinil Prolidon
TPPMS	Trifenilfosfin Monosülfonat
TPPTS	Tri-Sülfonat Trifenilfosfin
UV	Ultraviyole
WST-1 formazan	(2-(4-İyodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disulfofenil)-2H Tetrazolyum, Monosodyum Tuzu)

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji; malzemelerin, cihazların ve sistemlerin nanometre skalasında (1-100nm) boyut ve şeklini kontrol ederek, tasarımlarını, gelişimlerini, üretimlerini ve uygulamalarını yapmaktadır. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ile ilaç taşınımı, teşhis, tedavi, biyomalzemelerin üretimi gibi yaşam bilimlerinde önemli değişiklikler gerçekleşmektedir. Nano boyutta yeni moleküllerin geliştirilmeye devam edilmesi nanoteknolojinin sağlık hizmetlerindeki kullanım potansiyelini de arttırmıştır. Nano ilaç moleküllerinin hedef bölgeye hedeflenmesi son yıllarda üzerinde durulan bir konudur. Görüntüleme alanı bir diğer önemli kullanım alanıdır. Nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen yeni ilaçların bazıları Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır [1].

Araştırmacılar, nanomalzemelerin tıpta ilaç olarak ve gen taşınımında kullanılmasına, hücrelerin ve patolojik süreçlerin görselleştirilmesinde kullanımına, antiviral ve antimikrobik maddeler, kontrast ve ışığa duyarlı maddeler olarak kullanılmasına yönelmektedir. Nanomalzemeler, gelecekteki tıbbi uygulamalarda umut vaat eden araçlardır. Nanopartiküllerin kullanımının artması ve yaygınlaşması bu özellikteki moleküllerin toksik etkilerinin de değerlendirilmesini beraberinde getirmiş ve nanotoksikoloji alanındaki çalışmalar da son yıllarda büyük bir ivme kazanmıştır [2,3].

Büyük boyuttaki altın, uzun yıllardır terapötik ve tıbbi değerlere sahip, inert, soy metal olarak bilinmektedir. Altın Nanopartiküller (Au NP) düşük toksisiteleri ve biyoyumlu olmaları nedeniyle birçok hastalığın teşhis ve tedavisindeki uygulamalarda araştırılmaya başlanmıştır. Au NP'lerin olağanüstü ışık saçma özellikleri olduğu da bilinmektedir. Farklı özellikleri nedeniyle Au NP'ler kanserin teşhis ve tedavisinde, çeşitli ilaçların dokulara taşınımında, görüntüleme teknikleri için kontrast madde olarak biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Elektron-fonon ve fonon-fonon etkileşimleri yakın – kızılötesi (NIR) ışığa (650-900nm) maruz kalan Au NP'lerde ısı üretimi sağlamaktadır. Bu nedenle tümör görüntüleme ve ablasyonunda kullanılabilecekleri düşünülmektedir [1, 3].

Altın nanopartiküllerin önemli bir diğer özelliği, biyoyumlu polimerlerle yüzeylerinin kolaylıkla kaplanabilir olmasıdır. Fonksiyonelleştirilmemiş Au NP'ler normal fizyolojik koşullar altında kararlı değildir. Polimerik kaplamalar sayesinde uygun yüzey yükü ve kararlılık sağlanırken, nanopartikül boyutu da ayarlanabilir olmaktadır. Aynı zamanda

ilaç molekülünün hedeflenmesi, dolaşım ömrünün uzatılması ve sitotoksitenin azaltılması için polimerik kaplamalar kullanılmaktadır. Mükemmel biyouyumluluk ve hidrofiliklik nedeniyle Au NP'lerin polietilen glikol ile kaplanması (PEGilasyonu), biyolojik çevrede agregasyonu ve spesifik olmayan protein adsorpsiyonunu etkili bir şekilde önleyerek, retiküloendotelyal sistem (RES) alımını azaltır ve dolaşım süresini arttırır [4].

Altın nanopartiküllerin toksisitelerine ilişkin bazı çalışmalar yapılmış olmakla birlikte, olası toksitenin mekanizmaları konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Oluşan toksitenin ortadan kaldırılabilmesi için farklı kaplama yöntemlerinin etkilerinin incelendiği çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Sunulan tez çalışması ile Au NP'lerinin HepG2 hücrelerinde neden olabileceği olası toksik etkilerin sitotoksite ve oksidan/antioksidan statü parametrelerinin (lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, glutasyon düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü ile) ölçümü ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Altın nanopartiküllerinin polietilenglikol (PEG) ve polietilenimin (PEI) ile kaplanmasının incelenecek olan bu parametrelerde neden olacağı değişimlerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi, kaplamanın olası koruyucu rolünün irdelenmesine olanak sağlayacaktır. Elde edilen sonuçların, Au NP'nin olası toksik etkilerinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlaması ve bu etkilerin önlenmesi için uygulanabilecek yaklaşımlar konusunda yararlı bilgiler sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Altın Nanopartikülleri

2.1.1. Altın Nanopartiküllerin Genel Özellikleri

Altının epilepsi, tüberküloz, romatizma gibi farklı hastalıkların tedavisinde terapötik amaçlı kullanıldığı yıllardır bilinmektedir. Altın nanopartiküllerin kullanımı ise, nanobilim ve nanoteknolojide son zamanlardaki gelişmelerden sonra araştırılmaya başlanmıştır. Düşük toksisitesi, inert olması ve biyouyumluluğuna ilişkin veriler altını biyolojik ve biyomedikal uygulamalarda araştırmacılar için ilgi çekici kılmaktadır [1, 4].

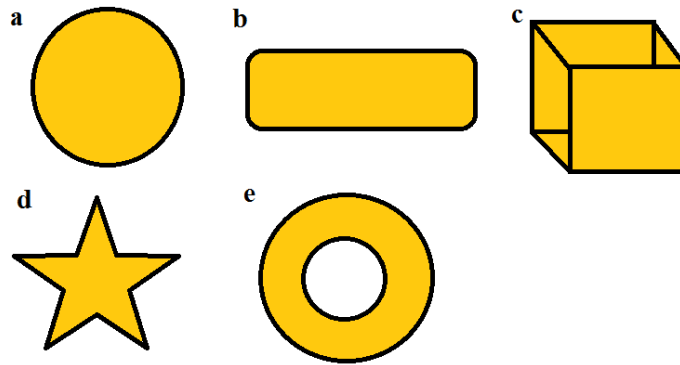
Altın nanopartiküllerin, yüzeyleri kolaylıkla işlevselleştirilebilir, kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle, küçük moleküllerle ya da nükleik asitlerle kolaylıkla modifiye edilebilir. İlaç ya da gen ürünleri iyonik ya da kovalent bağlarla doğrudan Au NP'e bağlanabilmektedir. Boyutlarına bağlı olarak renkleri kırmızıdan maviye değişebilmektedir. Au çekirdeği non-toksik olarak bilinmektedir. Au NP'leri, NIR bölgesinde ışığı absorplamak (görünür ışığı absorbe eder ve saçar) ve saçmak için parçacık büyüklüğü, şekli ve bulunduğu ortamı değiştirilerek ayarlanabilmektedir; optik ve fototermal fonksiyonları, boyut, şekil, yapı ve bileşimleri değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. Görünür ışık saçılımı (Rayleigh) da yapabilmektedir. Partikül boyutu arttıkça, saçılan ışık oranı da artmaktadır. Yüksek molekül ağırlıkları sayesinde transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile görüntüleme yapılmasına olanak sağlamaktadırlar [1].

Au NP'ler 4 farklı yöntem ile hazırlanabilmektedir:

1. Mikrodalga ışınlama, sonokimyasal yöntem, ultraviyole radyasyon, lazer ablasyonu, fotokimyasal işlem gibi fiziksel yöntemlerle,
2. Sitrat ya da sodyum borohidrür gibi indirgeme maddeleri kullanarak sulu ortamda kimyasal reaksiyonlarla,
3. Süper kritik sıvının, kendi kritik noktasındaki sıcaklık ve basıncın üzerinde sıcaklık ve basınca sahip çözücü olarak tanımlandığı yöntem olan "süper kritik akışkan teknolojisi"yle,
4. Mantar ya da bakterileri kaynak olarak kullanarak biyolojik yöntemlerle (Bu yöntem organik çözücülerin kullanımını azaltmak ve böylece çevre dostu Au NP'ler üretmek için kullanılmaktadır) [1].

Birçok çalışmada nanopartikül sentezi, karmaşık saflaştırma sürecine sahip, çok basamaklı bir işlem olarak anlatılmaktadır. Nanopartiküller öncelikle, kapsül maddesi olarak küçük bir molekül yüzey aktif madde (sitrat) kullanılarak sentezlenmektedir. Sonraki aşamada bu kapsül PEG ligandları ile değiştirilebilir [5].

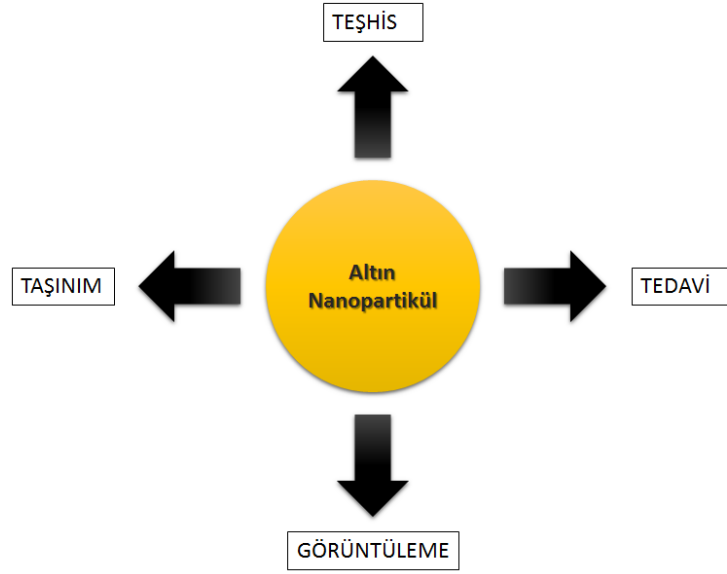
Sentez prosedürü ve deney koşullarına göre farklı şekillerde Au NP'ler elde edilebilmektedir. Bunlar nanoküreler, nanorodlar, nanokabuklar, nanokafesler, nanoyıldızlar, nanokutular, nanoküpler, nanokristaller ve üçgen-bipiramitler olarak çeşitlendirilmektedir (Şekil 2.1). Ancak, nanoküreler, nanorodlar, nanokabuklar ve nanokafesler biyomedikal uygulamalarda daha fazla çalışılmaktadır [6].



Şekil 2.1. Farklı şekillerdeki altın nanopartikülleri [(a) nanoküre, (b) nanorod, (c) nanoküp, (d) nanoyıldız ve (e) nanokabuk. [6]

2.1.2. Altın Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Altın nanopartiküller, kolloidal ya da kümelenmiş olarak, altın bir çekirdek ve bu çekirdeğin etrafında bir yüzey kaplamasından oluşan partiküller olarak bilinmektedir. Kolay sentezlenebilmeleri, kimyasal kararlılıkları, optik özellikleri ve elektronik yapıları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda, bilimsel ve teknolojik araştırmalarda ilgi uyandıran inorganik nanopartiküllerden biridir. Bu özellikleri sayesinde görüntüleme (bilgisayarlı tomografi (BT), fotoakustik görüntüleme), taşıma (ilaç, gen, RNA), tedavi (fototermal tedavi) ve teşhis (biyolojik ve kimyasal algılama) amaçlı olan biyomedikal uygulamalarda kullanım için aday olarak görülmektedir (Şekil 2.2) [7, 8].



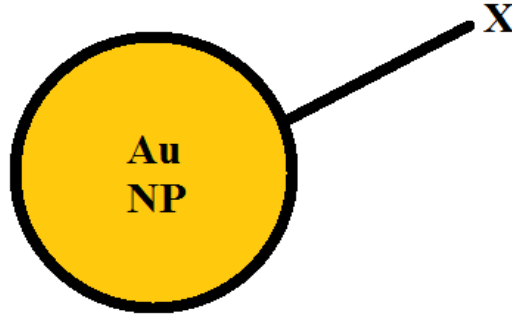
Şekil 2.2. Altın Nanopartiküllerin Biyomedikal Uygulamalarda Kullanım Alanları [7].

Kanser nanoteknolojisi, moleküler görüntüleme, moleküler tanı, hedefli tedavi ve biyoinformatik olmak üzere kanser ile mücadelede geniş potansiyel uygulamalar içeren disiplinler arası bir alan olmuştur. Kanser nanoteknolojisindeki gelişmeler, hastaların moleküler profiline dayalı, kişiselleştirilmiş onkolojik tedavi konusunda umut vermektedir. Au NP'ler kanser nanoteknolojisinde, hem hedefli görüntüleme hem de ilaç taşınımıyla teşhis ve tedavide birlikte kullanılabilir. NIR ile ışınlandıklarında hipertermi (kansere hücrelerinin apoptozu için sıcaklık artışı) oluşturmada, kemoterapötik ilaç taşıyıcıları olarak görev yapabilmektedirler [3, 9].

Kanserli hücreye özel ligandlarla, antikörlerle ya da peptidlerle bağlanan partiküller kanser hücrelerinin hedeflenmesinde etkili olmaktadır. Au NP'ler kanserli dokulara, aktif veya pasif hedefleme stratejileri ile taşınabilmektedir. Aktif hedefleme, hedef bölgedeki reseptörlerle etkileşim için partikül yüzeyine bağlanmış ligandlar ile gerçekleşmektedir. Çeşitli aktif hedefleme ajanları sayesinde, sadece belirli bir hedefe ulaşılmaz, aynı zamanda gerekli dozda ilaç hedefe ulaştırılır ve spesifik olmayan hücre etkileşimleri de en aza indirgenbilir. Pasif hedefleme, nanopartiküllerin doğal boyutu ve tümör mikro ortamının sağladığı özelliklerden yararlanmaktadır. Nano boyuttaki partikül, boyutu nedeniyle herhangi bir değişikliğe ihtiyaç duyulmadan hedeflenebilmektedir [6, 10].

Son yıllarda Au NP'lerin ilaç yüklü nanotaşıyıcılar olarak özellikle kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabileceğine dair yapılan çalışmalar artmıştır [11]. Geleneksel kanser tedavileri (kemoterapi, radyasyon tedavisi) hızlı büyüyen hücreleri yok ederek

çalışmakta, diğer hızlı büyüyen hücreler (kan, saç hücreleri) de kanser hücreleri ile birlikte hasar görmektedir. Au NP'lerin ilaç taşınımında kullanılması ile istenilen ilaç, istenilen miktarda, istenilen bölgeye ulaştırılabilmektedir. Böylece kanser tedavisinde kullanıldığında sağlıklı dokuların zarar görme riski en aza indirgenmiş olmaktadır. Çeşitli ilaçlar, DNA, RNA, proteinler parçacık yüzeyine tutunarak taşınabilmekte, kanser tedavisi için, kemoterapötik ilaç taşıyıcıları olarak düzenlenebilmektedir (**Şekil 2.3**). Au NP'lerin kemoterapötik ilaç taşınımındaki üstünlükleri boyut ve şekil kontrolü ile sentez kolaylığı, yüzey modifikasyonun kolay olması, şekle ve boyuta bağlı optik özelliklerinin sağladığı üstünlükler, biyouyumlu olmaları ve kararlılık olarak sıralanabilir. Kısıtlamaları ise, biyobozunur olmamaları, gözenekli yüzeye sahip olmamaları, yüzey modifikasyonu ile biyodağılım, toksisite ve farmakokinetiğin değişmesi ve toksisiteleri hakkında bilgi eksikliği olarak sıralanabilir. Son çalışmalar, tümör yüzeyinde oluşan hipertermideki başarının Au NP şekil ve büyüklüğüne bağlı olduğunu göstermiştir [9, 10].



Şekil 2.3. Altın nanopartiküller, in vitro ölçümler için, çeşitli moleküller ile modifiye edilebilmektedir (X;gen tedavisi için DNA, peptid, protein; görüntüleme için organik boya olabilmektedir) [2].

Altın, yüksek atom numarası ve elektron yoğunluğu sayesinde, klinikte kullanılan geleneksel iyot temelli maddelerle karşılaştırıldığında X-ışınını etkin bir şekilde zayıflatabilmektedir. Aynı zamanda, Au NP'ler geleneksel maddelere oranla daha uzun dolaşım süresi sağlar, böylelikle uzatılmış görüntüleme, belirli hücre tiplerine ya da ligandlara hedefleme ve hücre takibi sağlayabilmektedir. Bu özellikleri X-ışınlarını zayıflatan diğer elementlerle karşılaştırıldığında, BT gibi X-ışını tabanlı görüntüleme teknikleri için kontrast madde olarak Au NP'lerin araştırılmasına neden olmuştur. Yapılan bir çalışmada, trombüs tespiti için fibrine hedeflenen bizmut ve iterbiyum bazlı Au NP'ler BT ile tespit edilebilmiştir. Bu çalışmaya ek olarak, antikorlar aracılığıyla

fibrine hedeflenen altın nanoyıldızlar, *in vitro* olarak oluşturulan pıhtıların BT ile görüntülenmesi ve tespitinde kullanılmıştır [2, 10, 12].

Büyük boyuttaki altının floresansı 10^{-10} 'luk kuantum verimi ile çok zayıfken, Au NP'lerde 10^{-3} gibi güçlü bir kuantum verimi gözlemlenmiştir. Aynı zamanda Au NP'ler organik boyaların eklenmesiyle floresans verebilir hale getirilebilmektedir [2, 12].

Diğer taraftan, Au NP'lerin yüzeylerindeki soğrulmanın, Raman aktif moleküllerinin titreşim spektrumu yoğunluğunu arttırdığı görülmüştür. Raman spektroskopisi, moleküler titreşimleri, moleküler rotasyonları incelemek için kullanılan bir tekniktir. Raman spektrumu ile bir örneğin kimyasal bileşimi elde edilebilmektedir, Raman saçılması gerçekleştiği molekülün kimyasal yapısına özeldir. Bu nedenle Raman spektroskopisi moleküllerin "parmak izi" olarak da adlandırılmaktadır. Raman spektrumu oldukça özellikli olmasına rağmen, hassasiyeti çok düşüktür. Au NP kullanılması ile elde edilen, Raman aktif moleküllerinin titreşim spektrumu yoğunluğunun artması, "Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi" (SERS) adı verilen yeni bir tekniği ortaya çıkarmıştır. Bu tekniğin, yüzeydeki elektronların ortak salınımla üretilen ve parçacık yüzeyine yakın bir bölgedeki elektromanyetik alana bağlı olduğu düşünülmektedir. En güçlü elektromanyetik alanın, nanoyapıların kenarlarında (Altın nanorod uçları gibi) olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, Au NP'lerin canlı hücrelere girmesi SERS görüntüleme ile araştırılmıştır. Makrofaj hücreleri 50 nm boyutunda Au NP ile inkübe edildikten sonra, Raman mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş, nanopartikül yüzeyine yakın biyomoleküllerde SERS sinyalleri gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucu hücre içindeki nanopartikül hareketinin yüksek uzaysal çözünürlük ile takip edilebildiğini göstermiştir [2].

Foto-akustik görüntüleme, ışınlama yapılan bölgede lokal ısınma ve dokuda küçük bir genişleme meydana gelmekte ve lokal ısınma sonucunda akustik dalga oluşmaktadır. Kısa lazer darbelerinin kullanılması, ultrasonik frekans aralığında (20.000 Hz ve üzeri) ses dalgaları üretmektedir. Foto-akustik görüntülemenin, diğer bazı görüntüleme tekniklerine kıyasla üstünlükleri bulunmaktadır, çünkü kullanılan radyasyon iyonlaştırılmamakta ve ultrason kullanılması nedeniyle sonuçlar yüksek uzaysal çözünürlükte elde edilmektedir. Farklı biyolojik dokuların, farklı ışık absorpsiyon katsayıları olduğundan, bu görüntüleme tekniği ile dokular arasında ayırım yapılabilmektedir. Güçlü ışık absorpsiyonlarından dolayı Au NP'ler foto-akustik görüntüleme için kontrast madde olarak araştırılmıştır. Boyut ya da morfolojileri ile

absorbansları NIR bölgesine ayarlanabilen Au nanoyapılar (nanokafesler, nanoküreler, nanorodlar) bu teknik için araştırılmıştır. PEG kaplı altın nanoküreler (Au-NK), sıçanlarda damar yayılışı için foto-akustik tomografi ile test edilmiştir. Au-NK'lerin absorpsiyonları 800 nm, çapları 50 nm olarak ayarlanmıştır. Bu nanoküreler kullanılarak yapılan foto-akustik görüntüleme ile beyin damar sisteminin çok yüksek uzaysal çözünürlüklü görüntüleri elde edilmiş, kılcal damarların çapı 100 µm kadar küçük olacak şekilde tespit edilebilmiştir [2, 10].

Altın nanopartiküllerin olağanüstü ışık saçma özellikleri olduğu bilinmektedir. Au NP'lerin büyüklüğü ve şeklindeki değişiklikler ışık saçılımını etkilemektedir, bundan faydalanarak maddenin en iyi ışık saçılımına sahip olacak şekilde ayarlanması sağlanabilmektedir. Örneğin, hem yansıma katsayısı hem de optik kesit yüzeyi boyut ile artmaktadır, daha küçük nanopartiküllerden bile daha verimli ışık saçılımı elde edilmektedir. Bunlara ek olarak, optik görüntülemede kullanılan floresans problemleri ile karşılaştırıldığında Au NP'lerde ışıltama bozulması görülmemiştir. Bu özellikler ışık saçılımlı görüntüleme teknikleri için kontrast maddeler olarak Au NP'lerin araştırılmasını sağlamıştır [2].

Çizelge 2.1. Altın Nanopartiküllerin görüntüleme uygulamaları özeti [2]

Görüntüleme Uygulamaları	Gereken Özellikler	Uygun Au NP Tipi
X-Işını Görüntüleme	X-ray absorpsiyonu, büyük NP'ler avantajlı	Hepsi, genellikle küreler
Floresans Görüntüleme	Rodlar ve kabuklar doğal floresanlardır. Diğerleri yapılabilir.	Rodlar, kabuklar, etiketlenmiş küreler
SERS Görüntüleme	Güçlü elektromanyetik alan iyileştirme. Yıldızlar avantajlıdır.	Küreler, yıldızlar
Foto-akustik Görüntüleme	NIR bölgesinde güçlü absorpsiyon gereklidir.	Kafesler, küre kümeleri, rodlar, kabuklar
Optik Görüntüleme	Güçlü ışık saçılımı. Bütün yapılar saçılım yapar. Rodlar ve küreler NIR ışıktadır.	Küreler, rodlar

Altın nanopartiküller ile farklı alanlardaki terapötik amaçlı kullanımları için de çalışmalar sürdürülmektedir. Yapılan klinik çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

1. AuroLase®: PEG ile kaplanmış silika-altın nanokabukların uygulama alanı, solid tümörlerin termal ablasyonu, baş/boyun kanserleri, primer ve/veya metastatik akciğer tümörleridir.
2. Sebecia Mikropartikülleri: Silika çekirdekli altın nanopartiküllerin uygulama alanı, iltihaplı akne vulgaris tedavisidir.
3. Au NP'ler ile işlevselleştirilmiş sensörler: Organik işlevselleştirilmiş altın nanopartiküllerin uygulama alanı, gastrik lezyonların tespitidir [13, 14].

2.1.3. Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları

Biyolojik uygulamalar için gerekli olan en önemli özellik biyoyumlu bir kaplama ile yüzeyin modifikasyonudur [4, 10].

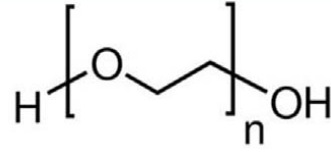
Altın nanopartiküllerin ayırt edici özelliklerinden bazıları, biyoyumlu olmaları ve biyoyumlu polimerlerle kaplanabilir olmalarıdır. Bu polimerler, nanopartiküllere uygun

yüzey yükü ve kararlılık sağlar. Genel olarak, özellikle küresel olmayan Au NP'lerin anizotropik özelliklerinden dolayı agregat oluşturma eğilimi olduğu bilinmektedir. Yüksek eğrilik ve yüzeylerindeki ligand yapısının agregat oluşturmalarından sorumlu olduğu bilinmektedir. Az sayıda ligand ile kaplanmış küçük Au NP'lerde agregat oluşturmaya karşı düşük afinite gözlemlenirken, daha büyük Au NP'ler çözülmeden agregatlar oluşturmaktadır. Agregasyona bağlı kararsızlık Au NP yüzeyinin polimerler ile kaplanmasıyla önlenmektedir. Au NP'lerin yüzey kaplamasında genellikle heparin, hiyalüronik asit, kitosan, dekstran, pullulan, selüloz türevleri, jelatin, PEG, PEI, polivinil kaprolaktam (PVCL), polidial dimetil amonyum (PDDA), elastin benzeri polipeptid (ELP), maltoz gibi polimerler kullanılmaktadır (**Çizelge 2.2**). Bu polimerik ligandlar, Au NP'lerin uzun-dönem kararlılığını iyileştirmekte, biyouyumluluğunu ve dış yüzeyin hidrofilitasını arttırmakta, çözünürlüğü ayarlanabilir kılmaktadır. Ayrıca, Au NP boyutu kullanılan polimer oranı ile ayarlanabilmektedir. Polistren (PS), PEI, ksantan sakızı gibi polimerler hem indirgeyici hem de stabilize edici maddeler olarak işlev görmektedir [4, 11, 15, 16].

Çizelge 2.2. Altın Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Polimerik Ligandlar [4].

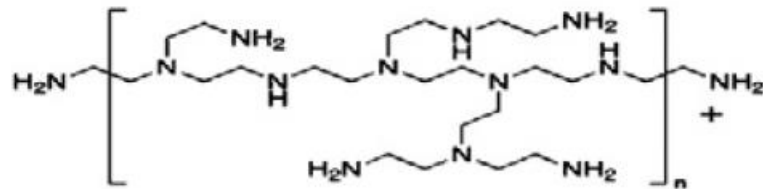
POLİMER	
Heparin	PSS (Polistiren sülfonat)
Hiyalüronik asit	PCL (poli-kaprolakton)
Kitosan	PEG (polietilen glikol)
Dextran	PEI (polietilenimin)
Pullulan	PVCL (Polivinil kaprolaktam)
Selüloz türevleri	PDDA (Polidial dimetil amonyum)
Guar sakızı	Tiyolat PVP (Polivinil pirolidon)
Maltoz	PDMA (Poli dimetilsiloksan)
Ksantan sakızı	PNIPAM (Poli izopropilkrilamit)
Jelatin	ELP (Elastin benzeri polipeptid)
PMOEGMA ((Poli (oligo (etilen glikol) metil metakrilat)	

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) PEG'in, nanopartikül yüzeyini değiştirmek için en yaygın kullanılan madde olduğunu onaylamıştır. PEG modifikasyonunun, kararlılığı iyileştirmeye ve dolaşım süresini uzatmaya yardımcı olduğu görülmüştür. PEG'in hidrofilik yapısı (Şekil 2.4), partiküllerin retiküloendotelial sistem (RES) tarafından atılımını engellemektedir. Au NP'lerin PEGilasyonu, diğer Au NP'lere kıyasla hücreye alımın etkililiğini önemli ölçüde arttırmıştır. Bir çalışmada, PEGlenmiş Au NP'lerin agregasyonu önlediği görülmüştür. PEG zincirleri Au NP ve ilaçları birleştirmede aralayıcı olarak da kullanılabilir [4].



Şekil 2.4. PEG'in yapısal formülü [5].

Yapısında amin grubu bulunan, katyonik bir polimer olan PEI, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda viral olmayan gen taşıyıcısı olarak kullanılmıştır. PEI, pH tampon kapasitesi sayesinde en güçlü viral olmayan polimerik gen vektörlerindedir. PEI'nin tamponlama kapasitesi, zincirinde bulunan amin gruplarının sayısına ve türüne bağlıdır. PEI'nin yapısı ve molekül ağırlığı, PEI bazlı komplekslerin hem biyolojik aktivitesini hem de biyoyumluluk derecesini etkilemektedir (Şekil 2.5). Biyoyumluluğu arttırmak, sitotoksiteyi azaltmak, transfeksiyon verimliliğini arttırmak amacıyla PEI'nin lipidler ve diğer polimerler ile hidrofobik modifikasyonları incelenmektedir. Boyutlarına bağlı sitotoksiteleri olduğu söylenmekle birlikte, toksisitenin moleküler kökeni tam olarak bilinmemektedir [17,18].



Şekil 2.5. Polietilenimin (PEI) yapısal formülü [19].

Altın nanopartiküllerin iyonik, kovalent bağlanma ya da fiziksel adsorpsiyon yoluyla yüzey modifikasyonu ile, ilaç taşınımı için tedavi edici maddelerin partikül yüzeyine

yerleştirilmesi sağlanmaktadır. Antikanser ilaçlar çeşitli yöntemler kullanılarak Au NP'lere yüklenebilmektedir. Kullanılacak ilaç, yüzey kaplama maddesine bağlanabilmekte ya da Au NP içine yüklenebilmektedir. Altın nanokafesler ve altın nanokabuklar boşluklarının varlığı nedeniyle daha yüksek ilaç yükleme verimliliğine sahiptir. Doksorubisin (DOX), dosetaksiel, tamoksifen, oksaliplatin gibi birçok ilaç başarılı bir şekilde Au NP'lere yüklenmiş ve kanser tedavisinde kullanılmıştır. Bir çalışmada, polimer ile kaplanmış, DOX yüklenmiş Au NP'lerin, zamanı, dozajı ve bölgeyi kontrol ederek antikanser ilaçların taşınmasını sağladığı belirtilmiştir [6, 20, 21].

2.1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Sistemlerle Etkileşimleri

Nanopartiküller ve diğer nanomalzemeler görüntüleme, ilaç taşıma ve hipertermi gibi tedaviler için biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere çalışılmaktadır. Bu nedenle nanomalzemelerin biyolojik sistemlerle olan etkileşimlerini anlamak, güvenli ve verimli uygulamalar için gereklidir [22].

Plazma membranı seçici geçirgen, hücre içinde homeostatik ortam sağlamakla görevli bariyerdir. Hücre membranı hücreye madde alımını ve atık ürünlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştıran farklı lipit ve proteinlerden oluşmaktadır [23].

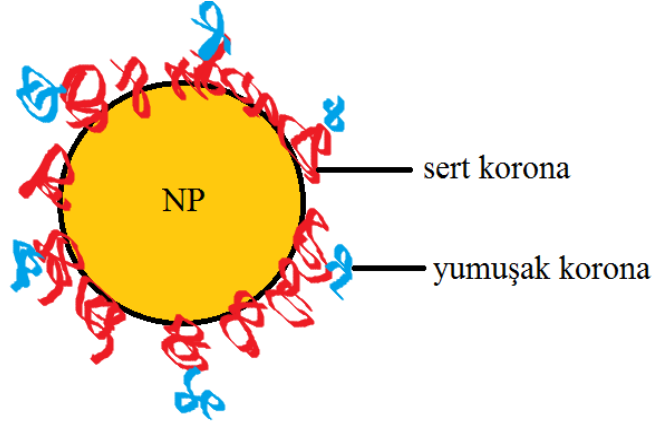
Endositoz ve ekzositoz, aktif süreçleri enerji gerektiren, hücre membranından maddelerin geçişi için kullanılan mekanizmalardır. Endositoz mekanizmaları; fagositoz, pinositoz, reseptör aracılı endositoz olarak sınıflandırılabilir. Her durumda endositoz, hücre içi vezikül oluşumuyla sonuçlanmaktadır. NP'lerin hücreye girmek için kullandıkları bu mekanizmalara bağlı olarak ulaşacakları yer ve biyolojik yazgıları değişecektir. Fagositoz (çoğunlukla büyük partiküller için), makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri tarafından yürütülür. Makrofajlar yabancı maddenin yüzeyini çevreler ve vezikül (vezikül boyutları $>0,75\mu\text{m}$) oluşumuyla madde hücre içine alınarak sindirim için lizozoma taşınır. Pinositoz (küçük partiküller, özellikle sıvılar ve çözeltiler için) mekanizması öncelikle sıvılar ve tuzlar, glikoz, amino asitler gibi hücreler için gerekli temel maddelerin alınmasında kullanılmaktadır. Bu mekanizma, hücre membranının maddeleri alması, sıkıştırması, ve en son vezikül (veziküller $0,5 - 5\mu\text{m}$ boyutlarında) oluşumuyla gerçekleşmektedir. Ayrıca pinositoz en az dört farklı mekanizma ile her hücrede oluşur: makropinositoz, kltrin aracılı endositoz, kaveoleler aracılı endositoz ve kltrin – kaveolelerden bağımsız endositoz [23, 24, 26].

Nanopartiküller hücre membranına yaklaştıklarında, membrandaki glikolipitlerden ve glikoproteinlerden oluşan negatif yüklü bir oligosakkarit tabakası ile karşılaşmaktadır.

Oligosakkarit tabakası makro molekül geçirmez katman olarak görev yaparak, NP'lerin hücre içine alınmasını zorlaştırabilir [23, 26].

Nanopartikül – hücre etkileşimleri büyük oranda NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir. Büyüklük, şekil, yüzeyin kimyası, yüzey yükü gibi özellikler NP'nin hücre membranına bağlanması ve hücreye alınmasında büyük etkiye sahip olmaktadır. NP yüzeyi, hücre alım için itici kuvvetleri (elektrostatik, hidrofobik, hidrofilik) sağlamakta ve alım yolunu belirlemektedir. Pozitif yüklü NP'ler, nötr veya negatif yüklü NP'lerden daha fazla hücre membranı ile etkileşim halindedir. Bu durum, hücre membranlarının negatif yüklü olması ve olumlu elektrostatik etkileşimler nedeniyle oluşmaktadır. Buna ek hücre membranına negatif yüklü NP'lerin bağlanmasını sağlayan katyonik bölgeler de bulunmaktadır [26, 27].

Bunlara ek olarak, biyolojik bir ortamda NP'ler hızla yüzeylerine adsorbe olan proteinler tarafından kaplanmaktadır. NP'nin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek yeni bir arayüz oluşturan bu duruma “protein korona” denilmektedir. Aynı zamanda, NP ve hücre membranları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin “protein korona” etkisi ile gerçekleştiği söylenmektedir. NP, protein makromolekülleri ile sarmalanır ve hücre membranları ile spesifik olmayan etkileşimlere neden olabilir. Bu durum, retikuloendotelial sistemin (RES) makrofajları tarafından NP temizlenmesini artırır. Fagositik hücrelerden oluşan bağışıklık sisteminin bir kolu olan RES, NP birikimini önleyebilir. Protein koronanın yapısı ve bileşimi, NP fizikokimyasal özelliklerine (boyut, şekil, yapı, yüzeydeki fonksiyonel gruplar, yüzey yükü), fizyolojik ortamın özelliklerine (kan, interstisyel sıvı, hücre sitoplazması) ve maruz kalma süresine bağlıdır. Protein korona, yüksek afinite ile adsorbe olmuş, sıkı bağlanmış proteinlerden oluşan “sert” korona ve düşük afinite ile adsorbe olmuş, yüzeyden kolayca ayrılabilen “yumuşak” koronadan oluşmaktadır (**Şekil 2.6**). NP yüzeyine adsorbe olan korona yüzeyi tamamen maskeleyememekle birlikte, agregasyonu, hücre alımı, dolaşım ömrünü, birikimi ve toksisite gibi fizyolojik yanıtı değiştirebilmektedir [22, 26, 27].



Şekil 2.6. Nanopartikül yüzeyi üzerinde sert ve yumuşak protein korona oluşumu [22].

In vitro ve *in vivo* deneyler, küçük boyutlu NP'lerin, büyük boyutlu NP'lere oranla daha fazla hücreye alındığını göstermiştir. NP üzerindeki ligand dağılımının membran penetrasyon oranını etkilediği, hidrofilik NP'lerin membran yüzeyinde kaldığı, hidrofobik NP'lerin ise lipit bölgesinde kaldığı bulunmuştur [23].

2.1.5. Nanopartiküllerin Hücreden Atılması

Hücre sel alım mekanizmaları yoğun olarak çalışılmış olmakla birlikte, NP'lerin hücrelerden nasıl uzaklaştırıldığı daha az bilinmektedir.

Lizozomal ekzositoz hücre içi parçacık konsantrasyonu azaltma ve atılım mekanizmaları arasında en önemlisi olarak görülmektedir. Küçük parçacık boyutu, hücre içinde yüksek hücre dışında düşük parçacık seviyeleri ekzositozu kolaylaştırmaktadır. Genel olarak hücre içi NP konsantrasyonları çeşitli mekanizmalar yoluyla azaltılmaktadır:

- (i) Hücre ölümü,
- (ii) Hücre proliferasyonu,
- (iii) NP difüzyonu,
- (iv) NP bozunması / lizozomlarda çözünmesi,
- (v) Ekzositoz,
- (vi) Partiküllerin endositoz ile hücreye girerek, hücre içinde işlenmeden doğrudan dışarı bırakılması (Transsitoz).

Nanopartiküller nekroz veya apoptoz ile hücre ölümünü indüklediğinde, hücre içeriği serbest halde veya apoptotik cisimler olarak hücre dışı boşluğa salınmaktadır. Fagositler, hücre kalıntılarıyla birlikte NP'leri de alır, fakat hücrelerden atılan NP'lerin kaderleri büyük oranda belirsizdir. NP'lerin hücre içi konsantrasyonu hücre bölünmesi ile de

azaltılabilmektedir. NP'ler genellikle hücre ölümüne neden olabilecek konsantrasyonlarda hücreye ulaşamadıklarından, bu mekanizmaların NP'nin hücrel atılımı için ana mekanizmalar olmadığı söylenmektedir [22, 28].

Lizozomlar, NP'lerin hücreden atılımında çözünme, bozunma ya da ekzositoz ile önemli bir göreve sahiptir. Lizozomlar, sadece biyobozunur polimerleri değil aynı zamanda metal oksit NP'leri de parçalayabilir. Bozunma NP'nin polimerik kabuğunu etkileyebilir veya lizozomlar parçacıkların özünü çözebilir. Altın, gümüş, demir oksit gibi NP'lerin hücre içi bozunması sitotoksiste için ana neden olarak bilinmektedir. Endositoz için hücrel veziküller, hücrel dışa atılım sistemleriyle bağlantılıdır. Proteinler memeli hücrelerinden sekresyon ya da lizozomal ekzositoz yolu ile atılmaktadır. Salgı hücrelerinde salgı ürünlerinin sentezi endoplazmik retikulum (ER) ve golgi aygıtında gerçekleşmektedir. Lizozomal ekzositoz membran onarımı için gereklidir, hem salgı hücrelerinde hem de diğer hücrelerde gerçekleşebilir. Endozomlar, hücre dışından alınan makromolekülleri içeren, çok kesecikli veziküllerdir. Alınan moleküllerin sindirimini gerçekleştirdiği lizozomlar için olgunlaşmaktadır. Eksozomlar, 50 – 100 nm boyutlu veziküllerdir ve endozomların salınımıyla oluşmaktadır. Otofagozomlar, bozulan sitozolik proteinlerin ve organellerin membran ile çevrilmesiyle sitoplazmada oluşan yapıdır. Endozom, eksozom ve otofagozom veziküllerinin hepsi NP içerebilir [22].

Yapılan çalışmalar, NP'lerin lizozomal ekzositoz yolu ile atılabildiğini göstermiştir. Lizozomal çözünme ve bozunma yokluğunda lizozomlarda NP birikimi ve lizozomal işlev bozukluğu olumsuz etkilere neden olabilir. Hücrel partikül atılımının tam olarak bilinmesi, bu çalışmalar için kullanılan yöntemlerin kısıtlıkları nedeniyle karmaşıktır. NP'lerin hücrede tutulması olumsuz etkilere neden olabileceğinden, NP'lerin ekzositozunu anlamak için bu konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılması gereklidir [22, 28].

2.1.6. Altın Nanopartiküllerin Organizmaya Giriş Yolları ve Hücre İçine Alınması

Nanopartiküller, dermal, oküler, solunum ve oral yoldan vücuda girebilir. NP'lerin deriden geçebilmeleri, NP'lerin şekil, boyut, yüzey kimyası ve derinin yapısına bağlıdır. Oküler sistem, yabancı maddeleri izotonik bir solüsyon olan gözyaşları ile yıkayarak uzaklaştırmaktadır. NP'ler solunum sırasında vücuda girebilir. Makrofajların ve goblet hücrelerinin savunma mekanizmaları, NP'lere karşı tam koruma sağlayamayabilir. NP'ler akciğerlere doğru ilerledikçe uzaklaştırılmaları daha zor olabilmektedir.

Nanomalzemeler gıda ve su kaynakları da dahil olmak üzere farklı kaynaklardan oral yol ile de vücuda girebilir [23].

Altın nanopartiküllerin hücre içine alınmasında, hücre tipi, partikül boyutu, şekli, yüzey yükü ve kaplama çeşidi etkili olmaktadır. Hücre içine endositoz ya da ekzositoz yolu ile alımı takiben, Au NP'leri kapsayan membrana bağlı veziküller olgunlaşır ve lizozomlarla birleşir. Dolayısıyla hücre içindeki Au NP'ler hücre membranına bağlı veziküllerinde sıkışır. Bu veziküllerden kurtulmaları ancak partikül yüzeyinin modifikasyonu ile başarılabilir. Veziküllerde sıkışan Au NP'ler, hücrelerden “ortak hücrel taşıma mekanizmaları” (hücre içi filament ağı boyunca miyozin, kinesin, dinein gibi moleküler motorlar) yoluyla taşınmaktadır. Au NP'lerin hücre içine hücre membranını tahrip etmeden giremediği, veziküllerde sıkıştığı ancak hücre çekirdeğine giremediği gözlenmiştir. Çalışmalar ortalama hızların, bu mekanizmalar tarafından taşınan partikül büyüklüğüne bağlı olduğunu, özetle büyük boyutun daha yavaş hareket demek olduğunu göstermiştir [24, 25, 29].

Bir çalışmada, küre şeklindeki nanopartiküllerin hücre içine alınımının çubuk şekilli nanopartiküllerden fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca 50 nm boyutlu küresel Au NP'lerin, çalışılan diğer nanopartiküllere göre en iyi hücre içine alıma sahip olduğu gözlenmiştir [12].

Makrofaj hücrelerinde Au NP'lerin hücre içine alım dinamiğinin incelendiği bir çalışmada, hücreler tarafından alınan Au NP'lerin uzun süre hücre dışına atılmadığı görülmüştür. Aynı zamanda Au NP'ler oldukça biyouyumlu bulunmuş, yüksek dozlarda antioksidan özellikler göstermişlerdir [30].

Protein korona oluşumunun incelendiği bir çalışmada, Au NP'lerde protein absorpsiyonu 5 – 30 dk inkübasyondan sonra ölçülmüş ve kan serumu proteinlerinin inorganik yüzeye adsorpsiyonunun zamana bağlı olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada, farklı boyutlarda Au NP'in (4 – 40 nm), elektrostatik olarak kararlı hale getirildikten sonra %10 fetal bovin serum (FBS) içeren hücre kültür ortamında protein korona oluşumu araştırılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri, UV spektroskopisi, TEM analizleri kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde yüzey yükünde azalma ve hidrodinamik çapta artış Au NP yüzeyinin protein kaplandığını göstermiştir [22].

Farklı dozlarda Au NP'lerin sıçan miyoblastoma (C2C12) hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığı bir çalışmada, küçük çap ve geniş yüzey alanına sahip Au NP'lerin kolaylıkla

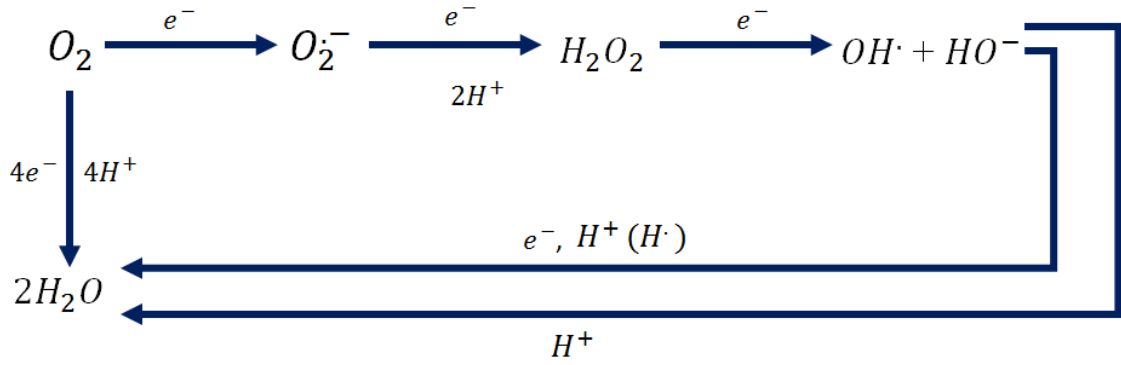
hücrelere girebildiği gözlenmiştir. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) deneyi hücre sitotoksitesini belirlemek için kullanılmıştır ve sonucunda Au NP'lerin kanser hücrelerinin büyümesinde yavaşlatıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiş ve artan Au NP konsantrasyonu hücre canlılığında azalmaya yol açtığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda yeni nesil nanoyapıların antikanser ajan olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir [31].

2.2. Oksidatif Stres

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran moleküller olarak tanımlanmaktadır. Eşlenmemiş elektron serbest radikale oldukça fazla reaktivite vermektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) moleküler oksijenin (dioksijen) indirgenmesiyle oluşan, eşlenmemiş elektron içeren kısa ömürlü moleküllerdir [32, 33].

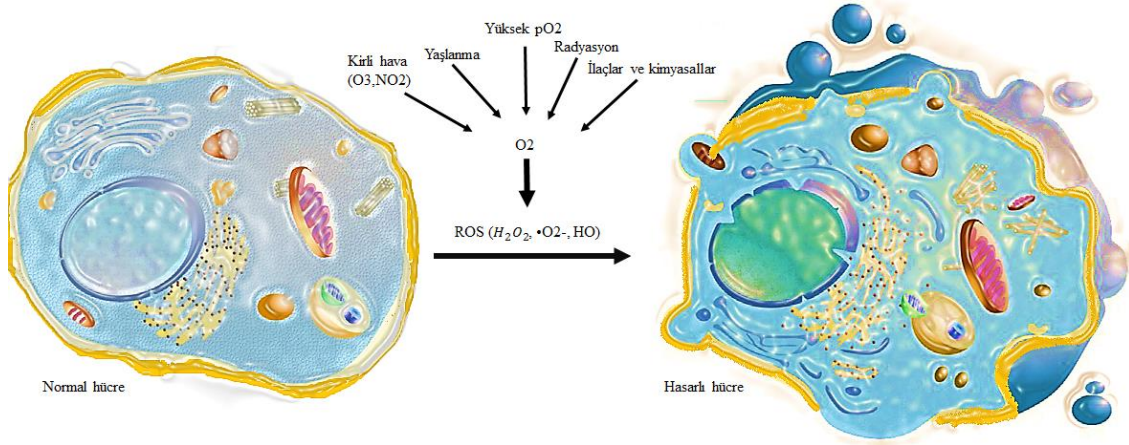
Aerobik koşullarda yaşayan organizmalarda tüketilen oksijenin %90'dan fazlası, elektron taşıma zincirinde (ETC), ROS salımı olmadan doğrudan suya indirgenmektedir. Ökaryotlarda ETC sistemi mitokondriyal membranda bulunurken, prokaryotlarda ETC sistemi plazma membranında bulunmaktadır. ETC, oksidatif fosforilasyon ile birlikte çalışarak Adenozintrifosfat (ATP) formunda enerji üretmektedir. Tüketilen oksijenin %10'dan daha az miktarı tek-elektronlu ardışık yollarla indirgenmektedir. Şekil 2.7'de görüldüğü üzere, moleküler oksijenin süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) çevrilmesinin ardından hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu için iki proton alınmakta, bir elektron indirgenmektedir. H_2O_2 serbest radikal değildir; ancak moleküler oksijenden kimyasal olarak daha aktiftir. Bir elektron daha alan H_2O_2 molekülü, hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve hidroksil anyonuna (HO^-) ayrılmaktadır. Son olarak OH^{\cdot} bir elektron ve proton ile etkileşime girerek su molekülünü oluşturmaktadır (Şekil 2.7) [33, 34].



Şekil 2.7. Moleküler Oksijenin İndirgenmesi [35].

$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve OH^{\cdot} reaktif oksijen türleri olarak belirtilmektedir. Ancak sadece $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} serbest radikaldir, serbest H_2O_2 radikal değildir [35].

Adenozintrifosfat, hücrelerin mitokondrilerinde proton ve elektron reaksiyonları sonucu oksijenin indirgenmesiyle sentezlenmektedir. Bu işlem sırasında oksijenin küçük bir yüzdesi tamamen indirgenmemekte, $O_2^{\cdot-}$ radikalleri oluşmaktadır. ROS çoğu mitokondride oluşan hücrel oksidatif metabolizmanın yan ürünleridir. Aşırı ROS üretimi oksidatif stresi başlatabilir, bu da hücrelerin normal fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmekte başarısız olmalarına neden olur. ROS üretimi genellikle düzensizdir ve hücre içi hedefleri rasgele olabilmektedir. Hücre içi lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın ROS'a bağlı oksidasyonu biyomoleküllerin hasar görmesine yol açmakta ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz gibi çeşitli patolojileri ortaya çıkarmaktadır. İlaçlar, pestisidler, kirli havada bulunan bazı metaller ve metal oksitler gibi çeşitli kimyasal maddeler; gama veya UV radyasyonu, yüksek oksijen kısmi basıncı (pO_2) ve sıcaklık gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra fizyolojik stresler (yaralanma, yaşlanma) ROS üretiminde artışa neden olmaktadır. ROS, elektron taşıma reaksiyonları sırasında nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar tarafından da endojen olarak oluşturulmaktadır. **Şekil 2.8**'de gösterildiği gibi, pek çok farklı etmene bağlı olarak oluşabilen ROS, proteinlere, lipitlere, nükleik asitlere oksidatif hasar vermekte ve organların, hücrelerin işlevlerini bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır [35, 36].



Şekil 2.8. Çeşitli etmenlerin neden olduğu ROS üretiminin hücre metabolizmasına etkisi [36].

Hücrelerin ROS üretimlerinin dengelenmesinden üç tip süperoksit dismutaz (SOD1, SOD2, SOD3), glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler sorumludur. E vitamini, karotenoidler ve C vitamini (askorbat) gibi küçük antioksidan moleküller, oksidan-antioksidan dengesinin korunması için antioksidan enzimleri desteklemektedir. O₂⁻, SOD ile H₂O₂ gibi diğer reaktif türlere dönüştürülebilmekte, süperoksit radikalleri oluşturmak üzere yeniden kullanılabilir veya katalaz ve/veya glutasyon (GSH) ile suya dönüştürülebilmektedir. Geçiş metallerinin varlığında (Fe⁺² gibi) H₂O₂, oldukça reaktif olan ve lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilecek OH• dönüştürülmektedir [36].

ROS'un aşırı olmayan artışı hücre çoğalması ve hücre yaşamını olumlu yönde etkilemektedir. Ancak, ROS artışı belirli bir seviyeye ulaştığında, hücrenin antioksidan kapasitesini aşmakta ve hücre ölümünü tetiklemektedir. Normal hücreler, bir miktar ekzojen ROS'u tolere edebilirken, anormal metabolik aktiviteye bağlı olarak kanser hücreleri, ROS seviyesini toksik eşiğin altında tutmak için redoks dinamiklerini değiştirmektedir. Kanser hücreleri, ekzojen ROS'a karşı daha hassastır, bu nedenle hayatta kalmaları antioksidan aktiviteye daha çok bağlıdır [32, 36].

2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Kaynakları

2.2.2.1. Mitokondri

Mitokondri, endojen ROS havuzuna en fazla katkıda bulunan organeldir. Mitokondri tarafından tüketilen O₂'nin yaklaşık %1'inin O₂⁻ üretmek için kullanıldığı tahmin edilmektedir. Mitokondri, amino asitler, glikoz ve lipitlerin oksidasyonu yoluyla ATP

üretmektedir. Mitokondrinin O_2^- üretebilen on bölümü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, ETC'nin I ve III numaralı komplekslerinde üretilen ROS'un hücre sinyallerinde görevi olduğu bulunmuştur. Kompleks III'ün hem zarlar arası, hem de mitokondriyal matrise O_2^- ve H_2O_2 saldığı gösterilmiş, bu ROS'ların hücre farklılaşması, uyarlanabilir bağışıklık sistemi gibi biyolojik süreçler için gerekli olduğu belirtilmiştir. Kompleks I ve III tarafından üretilen O_2^- ; zarlar arası boşluğa (%80) ve mitokondriyal matrise (%20) salınmaktadır. Oksidatif fosforilasyon sırasında, elektronlar ETC boyunca akmakta ve böylece IV kompleksinde O_2 'nin suya indirgenmesi gerçekleşmektedir. Mitokondride üretilen O_2^- 'nin çoğu, mitokondriyal matriste bulunan manganez süperoksit dismutaz (Mn SOD) ile H_2O_2 'e dismutasyona uğratılmaktadır. H_2O_2 oldukça diffüzdür ve mitokondriyal membranı geçebilmektedir. Mitokondriyal ROS hücre sinyal özelliklerinin yanı sıra, zararlı rollere de sahiptir. Mitokondriyal ROS'un serbest olması, çeşitli kanser vakalarının başlangıcına ve ilerlemesine neden olabilmektedir [35, 37, 38].

2.2.2.2. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik Retikulum (ER)'da ROS üretimi sitokrom P_{450} familyası enzimlerinin yer aldığı hidroksilasyon sisteminin çalışması ile ilgilidir. Substratların oksidasyonu sırasında, elektronların bir kısmı ETC'den kaçmakta ve mitokondriye benzer şekilde O_2 'e katılarak O_2^- 'ne dönüşmektedir. Hidroksilasyon reaksiyonları sırasında oluşan ürünler de oksidasyon döngülerine girebildikleri için ROS üreticisi haline gelebilmektedir [35].

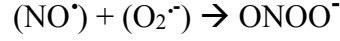
2.2.2.3. NADPH Oksidaz

NADPH oksidazlar (NOX), yan ürün olarak değil, birincil işlev olarak ROS üreten enzim ailesi olarak düşünülmektedir. NOX ailesi yapı ve enzim fonksiyonu açısından benzerliklere sahip 7 farklı NOX izoformu, NOX 1-5 ve çift oksidaz (DUOX) 1-2'den oluşmaktadır. NOX'lar, hızla H_2O_2 'e dönüştürülen O_2^- 'u üretebilmek için elektronları biyolojik membrana aktarmaktadır [34].

2.2.3. Reaktif Azot Türleri

Reaktif azot türleri (RNS) yapısında oksijen ve azot bulunduran ve nitrik oksit kaynaklı serbest radikaller veya peroksitlerdir. Bunlar da yüksek reaktiviteye sahiptir ve oksidatif reaksiyonlarda yer alabilir. RNS'nin aşırı üretimi, nitrozatif stres olarak adlandırılmaktadır. Nitrozatif stres bir sistemdeki RNS üretimi, sistemin nötralize etme yeteneğini aştığı zaman meydana gelmektedir. Nitrozatif stres, proteinlerin yapısını değiştirebilen ve normal işlevlerini engelleyebilen nitrozilasyon reaksiyonlarına neden

olmaktadır. İnflamatuvar süreçler sırasında tetiklenen oksidatif patlama ile bağışıklık sisteminin hücreleri hem süperoksit anyonu hem de nitrik oksit üretmektedir. Bu koşullarda nitrik oksit (NO^{*}) ve süperoksit anyonu (O₂⁻), DNA hasarı ve lipid oksidasyonuna neden olabilecek güçlü bir oksitleyici olan peroksinitrit anyonu (ONOO⁻) oluşturmak üzere reaksiyona girebilmektedir [32, 33].



2.2.4. Oksidatif stres

Oksijen canlı bütün organizmaların yaşaması için gereklidir. Ancak, oksijenin de dahil olduğu katalitik reaksiyonlar serbest radikallerin oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. O₂⁻ ve OH^{*} radikallerinin oluşumu biyokimyasal süreçlerde meydana gelmektedir ve hücrel mekanizmalar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Ancak bazı toksik maddeler bu denge hainini bozarak serbest radikallerin oluşumunda artışa ya da hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının engellenmesine neden olmaktadır. Oksidatif stresin sürekliliği geri dönülemez hücre ölümüne sebep olmaktadır [39, 40].

Oksidatif stres, ROS oluşumu ile nötralizasyonu arasındaki bir dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres, hücrel hasara ve lipitler, proteinler, biyolojik makromoleküllere aşırı hasar vererek dengesiz bir hücrel çevre yaratan zincir reaksiyonu yan ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Oksidatif stres, aynı zamanda doku hasarı, ilerleyen yaşa bağlı fonksiyon bozuklukları ile ilişkilendirilmekte, diyabet, kronik yorgunluk sendromu, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde yer almaktadır [41].

Serbest radikaller veya oksidanlar, çeşitli hücrel bileşenler, proteinler, DNA, RNA, lipitler, yağ asitleri ve glikasyon son ürünlerini içeren biyolojik makromoleküller ile reaksiyona giren veya bu molekülleri oksitleyen, en dıştaki elektron yörüngesinde eşlenmemiş bir elektrona sahip, oldukça reaktif, kararsız moleküllerdir. Hücrel bileşenler ve serbest radikaller arasındaki reaksiyonlar, DNA'da tek ve çift sarmallı kopmalar, DNA parçalanması, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, mitokondriyal bozukluk, hücre membran hasarı, laktat dehidrogenaz (LDH) sızıntısı ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ile programlanmamış hücre ölümüne (nekroz) neden olmaktadır [33, 42].

Serbest radikal oluşumunun artması vücudun bağışıklık sisteminde inflamasyona, apoptoza, nekroza ve gen hasarına yol açmaktadır. Ortaya çıkan oksidatif stresin büyüklüğü hücrel indirgeme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlerin boyutuna bağlı olmaktadır. Eğer hücre ortaya çıkan değişimlerin düzelmesini sağlayabilir ve normal haline geri döndürülebilirse hücrede hasar görülmez ya da küçük bir hasar ortaya çıkar. Ancak hücre onarımı sağlanamaz ise, hücre ölümü gerçekleşebilir. Hasar orta düzeyde ise, hücre apoptoza gitmekte; hasar büyükse nekroz gerçekleşmektedir [33, 41].

2.2.5. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Hücresel Fonksiyonlar Üzerindeki Etkileri

Reaktif oksijen türleri çeşitli hücrel organelleri ve enzim sistemini etkileyebilir. Antioksidan enzim sistemlerinin; diğer çeşitli sitozolik enzimler ve kofaktörlerinin inhibisyonuna ve antioksidanların depleksiyonuna neden olabilir. Hücre membranındaki kanalların inhibisyonuna ve hücrel iyonik dengenin ve hücrel kalsiyum dengesinin bozulmasına, mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna ve enerji depleksiyonuna yol açabilirler. Ayrıca lipit peroksidasyonu ve nitrasyonun artmasına, buna bağlı yağ asitlerinin oksidasyonu ve nitrasyonuna, membran destabilizasyonuna ve proteinlerde tiyol modifikasyonlarına yol açarlar. En önemlisi de DNA hasarına neden olarak sonuçta genotoksik hasara ve hücre ölümüne yol açabilirler. Çok sayıda veri kanserin ilerlemesine neden olan bileşiklerin etkilerini ROS üreten kaynakları aktive ederek ya da doğrudan ROS oluşumuna neden olarak gösterdiklerini doğrulamaktadır [43].

ROS'nin kanser dışında da birçok hastalıkta etkili oldukları bilinmektedir. Bunların başında nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı) gelmektedir. Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve aterosklerozda da ROS üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizliğin etkili olduğu gösterilmiştir [44].

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Serbest radikallere çeşitli kaynaklardan maruz kalma, organizmanın bir dizi savunma mekanizması geliştirmesine yol açmıştır. Antioksidan savunma sistemi, organizmanın kullandığı enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlere sahip en önemli savunma sistemlerinden biridir. Enzimatik antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimlerini içermektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; askorbik asit (Vitamin C), tokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidan moleküllerdir [45, 46].

Çalışmalar, antioksidanların ROS'un etkilerini azalttığını, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların görülme sıklığını düşürdüğünü göstermiştir. Buna rağmen, sürekli serbest

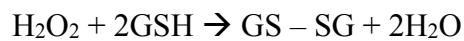
radikal aktivitesi ile savunma sisteminin ROS'a karşı kapasitesi yetersiz kalabilir ve bunun sonucunda hastalık oluşumu gözlenebilir [46].

2.3.1. Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutaz, $O_2^{\cdot-}$ radikalinin hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen metal içerikli proteinlerdir. Sitozolik Cu-Zn SOD (SOD1), mitokondriyal Mn SOD (SOD2) ve hücre dışı SOD (SOD3) olmak üzere üç izoform tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda sitozolik ve mitokondriyal SOD'lar tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanmıştır. Mn SOD aşırı ekspresyonu insan meme kanseri hücrelerinin, glioma hücrelerinin ve melanom hücrelerinin malignansını baskılamış, bunun aksine Mn SOD tükenmesi, *in vitro* hücre proliferasyonunun artmasına ve *in vivo* agresif seyirli tümör büyümesine neden olmuştur. Aynı şekilde farklı kanser tiplerinde Cu-Zn SOD aşırı ekspresyonu tümör büyümesini yavaşlatmıştır [45, 47].

Katalaz, H_2O_2 'nin suya indirgenmesinde görevli enzim olarak bilinmektedir. Hücrelerin, dokuların, organların çoğunda ve karaciğer ile eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır [46].

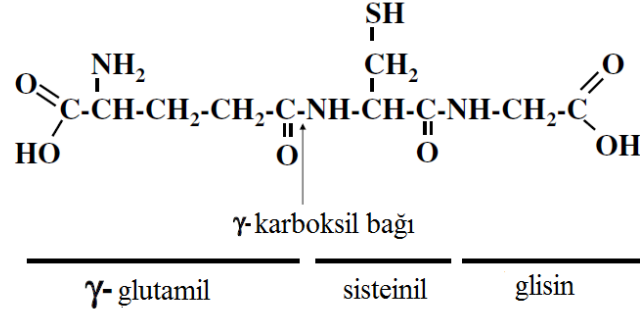
Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 ve organik peroksitlerin inaktivasyonundan sorumludur. Memelilerde 5 izozimi bulunmaktadır. Selenyum içerikli bir enzim olan GPx hem H_2O_2 'nin hem de organik hidroperoksitlerin suya ya da karşılık gelen alkollere indirgenmesini kataliz etmektedir. İndirgenmiş glutasyon, serbest tiyol grupları disülfid bağlarına oksitlendiğinden etkili elektron vericisi olarak işlev görmektedir [46, 47, 48].



Süperoksit radikallerine karşı birincil antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx birlikte hareket etmektedir. Bu enzimlerden birinin aktivitesinde diğer enzimlerin karşılayamayacağı değişiklik olduğunda, lipid peroksidasyonu oluşabilir. $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} radikalleri nedeniyle oluşan lipid peroksidasyonu önlemek için, $O_2^{\cdot-}$ öncelikle SOD ile H_2O_2 haline dönüştürülmekte, daha sonra CAT ile su ve oksijene ayrıştırılmaktadır. GPx, indirgenmiş glutasyonun (GSH) oksidasyonu ile glutasyon disülfidin (GSSG) oksitlenmesi peroksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemektedir. GSSG daha sonra glutasyon redüktaz (GR) ile GSH'a dönüştürülmektedir [49].

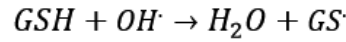
2.3.2. Glutasyon

Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki ardışık mekanizma ile (α -glutamil sistein sentezi ve GSH sentezi) elde edilmektedir (Şekil 2.9). İnsanlarda GSH, oldukça yüksek konsantrasyonlarda (1-10 mM) bulunmaktadır, doğrudan veya dolaylı olarak ROS'ların temizlenmesine yardımcı olmaktadır [33, 50].

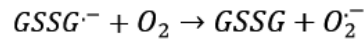
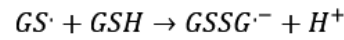


Şekil 2.9. Glutasyonun kimyasal yapısı [51].

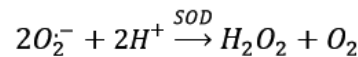
Glutasyonun biyolojik fonksiyonlarla reaksiyonları sonucu disülfid, tiyoeter ve tiyoesterler oluşmaktadır. GSH'ın redoks reaksiyonları katalizör olarak GPx ve GSSG redüktazları içermektedir ve tiyoeter oluşumunda rol oynayan enzim sınıfı GSH transferazlardır. GSH'ın $\text{OH}\cdot$ gibi radikallerle reaksiyonu sonucu bir tiyol radikali oluşmaktadır:



Glutasyon disülfid radikalini oluşturan tiyol radikali ile GSH'ın reaksiyonu sonrasında, GSSG radikali moleküler oksijen ile tepkimeye girerek $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşturmaktadır:



Süperoksit dismutazların bulunduğu hücre bölümlerinde (mitokondri, sitozol) ise aşağıdaki reaksiyon gerçekleşmektedir:



Tüm reaksiyonların amacı, reaktif radikal türlerini indirgemek ve hücre tarafından kolaylıkla metabolize edilebilen ürünler oluşturmaktır.

Hücrede GSH homeostazı yalnızca sentez ile değil, aynı zamanda kullanım, hücresel taşınım ve geri dönüşüm ile sağlanmaktadır. Bu redoks döngüsü “GSH döngüsü” olarak bilinmektedir. Aerobik solunum, GPx tarafından metabolize edilen 2GSH molekülünün oksitlenmiş hale (GSSG) dönüşmesi sonucu H₂O₂ artışına neden olabilir. GSH, protein artıkları ile reaksiyona girebilir, disüflitler oluşturabilir. Bu durum, glutatyon S-transferaz (GST) ile geri dönüştürülebilmektedir ve düzensiz bir süreç olarak bilinmektedir. GST aktivitesi GSH varlığına bağlıdır. GST’lerin başlıca görevi, reaktif elektrofilik bileşiklerin (çevresel toksinler ve oksidatif stres ürünleri) GSH varlığında detoksifikasyonudur. Belirli taşıyıcılar ile birlikte, GSH konjugatları hücreden uzaklaştırılmakta, böylelikle hücresel protein ve nükleik asitlerin reaktif bileşiklerden etkilenmesi önlenmektedir. GR, GSSG’yi GSH’a indirgemek için NADPH ve flavin adenin nükleotidi (FAD) kullanmaktadır. Aynı zamanda GSH, NADPH ve GR’nin varlığında disüflit indirgenmesini katalizleyen çoklu glutaredoksinler (Grx) için bir kofaktör ve substrattır [33, 52].

N-asetilsistein (NAC), GSH’ın hücre içi seviyelerini yenileyen sistein öncüsüdür. NAC, sistein düzeylerini, GSH konsantrasyonlarını ve GST aktivitesini artırarak çevresel ve kimyasal ajanlara maruziyet sonucu oluşan toksisitenin önlenmesinde veya azaltılmasında yararlı olmaktadır [50, 53].

Glutatyonun oksidatif strese karşı koruyucu rolleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- (i) GSH, oksidatif strese karşı çeşitli detoksifiye edici enzimlerin bir kofaktörüdür [örn; GPx].
- (ii) GSH, plazma membranından amino asit taşınmasında görev almaktadır.
- (iii) GSH, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizler, hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri GPx’in katalitik etkisi ile detoksifiye edebilmektedir.
- (iv) GSH en önemli antioksidanları, C ve E vitaminlerini aktif formlarına geri döndürebilmektedir; vitamin E’nin tokoferol radikalini doğrudan veya dolaylı olarak semidhidro-askorbata askorbata indirgeyebilmektedir [45].

Çekirdekdeki glutatyon, DNA’nın onarımı ve ekspresyonu için protein süflitlerin redoks durumunu korumaktadır. Okside GSH, hücrelerde birikebilir ve GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir ölçüsüdür [55].

Normal koşullar altında, prooksidan oluşumu ile antioksidan sistemler arasında denge vardır ve bu dengenin organizmanın yaşamsal fonksiyonlarını gerçekleştirmesi için

korunması gerekmektedir. Çeşitli patolojik süreçler serbest radikal oluşumunu artırarak bu dengeyi bozabilir [33, 45, 52, 54, 55].

2.4. Lipit Peroksidasyonu

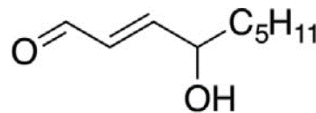
Tüm biyolojik sistemler yaşam için uygun koşulları sağlamak amacıyla oksitlenme ve indirgenme reaksiyonlarını dengeleyerek redoks eşitliğini sağlamaktadır. Redoks homeostazındaki bozulmalar, aşırı üretim ya da hücrel indirgenme yeteneğinin kaybedilmesi sonucu oksitleyici moleküllerin birikmesi ile ortaya çıkmaktadır. Her iki durumda da biriken oksitleyici maddeler DNA, proteinler ve lipitleri oksitleyebilmekte, böylece yapılarını, aktivitelerini ve fiziksel özelliklerini değiştirebilmektedir. Oksidatif hasarın olası şiddeti göz önüne alındığında, redoks dengesinin bozulması, biyolojik homeostazın bozulmasına, sonucunda hastalık veya ölüme yol açmaktadır [33, 56].

Lipit peroksidasyonu (LP), kısaca membran lipitlerinin oksidatif hasarla bozulması olayı olarak tanımlanabilir. LP'nin biyolojik membranlardaki sonuçları membran bütünlüğünün bozulması, membran akışkanlığının değişmesi, membranların birçok iyon geçirgenliğinin artması ve membranın parçalanarak hücre içinde yer alan moleküllerin/enzimlerin dışarıya salınması olarak sıralanabilir [57].

Glutasyon peroksidaz enzimleri, özellikle GPx4, lipit peroksidleri alkollere indirmek için yardımcı substrat olarak GSH kullanmaktadır. Bu enzimin inaktivasyonu LP birikimine ve genellikle hücre ölümüne neden olmaktadır [56, 57].



Şekil 2.10. Malondialdehit (MDA) kimyasal yapısı [56].



Şekil 2.11. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) kimyasal yapısı [56].

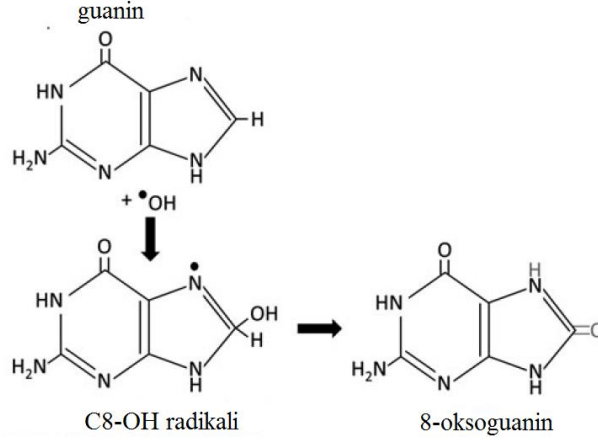
Peroksil radikalleri, siklizasyon reaksiyonları aracılığıyla endoperoksidlere (MDA öncüleri) dönüşebilir, peroksidasyon sürecinin son ürünü malondialdehit (MDA)

oluşabilir (**Şekil 2.10**). MDA proteinler veya DNA üzerindeki aminler ile reaksiyona girerek çapraz bağlar oluşturabilir. LP sonucu oluşan MDA başta olmak üzere birçok aldehit yapısındaki molekül de toksik etkilere sahiptir. LP'nin en önemli bir diğer aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)'dir (**Şekil 2.11**). MDA bakteri ve memeli hücrelerinde mutajen, sıçanlarda kanserojendir. HNE, zayıf bir mutajendir ancak LP'nin en önemli toksik ürünüdür. Bu moleküller LP'nin belirlenmesi amacıyla ölçülebilmektedir [**33, 56, 57**].

Yapılan birçok çalışma lipit peroksidasyonunun; inflamasyon, kanser, nörodejeneratif hastalık, böbrek dejenerasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca LP, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısını, fonksiyonunu değiştirmekten ve bu moleküllerin sitotoksitesinden sorumludur [**33, 56, 57**].

2.5. Oksidatif DNA hasarı

Yüksek konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri, hücre yapıları, nükleik asitler ve proteinlerin hasar görmesinde önemli araçlar olarak bilinmektedir. DNA hasarının büyük bir kısmı, tek ve çift sarmallı DNA zincir kırılmalarını, DNA – protein çapraz bağlarının oluşumunu içeren ve özellikle kanser oluşumunu tetikleyen ROS nedeniyle oluşmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 DNA hasarıyla doğrudan ilgili olmasalar da, OH^{\cdot} radikali birikiminden sorumludurlar. OH^{\cdot} radikalinin DNA molekülünün tüm bileşenleri ile reaksiyona girdiği bilinmektedir. OH^{\cdot} radikali hem pürin hem de pirimidin bazlarına ve ayrıca deoksiriboz omurgasına zarar vermektedir. Serbest radikaller DNA bazlarının çift bağlarına ek olarak hem 2'-deoksiriboz hem de timinden hidrojen çıkarılması gibi mekanizmalar ile DNA hasarına neden olabilir [**33**].



Şekil 2.12. OH[•] Radikalinin guanin ile reaksiyonu sonucu 7,8-dihidro-8-oksoguanin oluşmaktadır [58].

Oksidatif DNA hasarı çok sayıda baz lezyonuna neden olabilir; örneğin guanin düşük redoks potansiyeli nedeniyle oksitlenebilir. En çok karşılaşılan DNA lezyonunun, 7,8-dihidro-8-oksoguanin (8-oksoguanin, 8-oksodG) olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.12). 8-oksodG hücrelerin UVA ve metilen mavisine maruziyeti sonucu singlet oksijen tarafından üretilmektedir. 8-oksodG lezyonu guanin – timin değişimine neden olabilir. Adenin replikasyon sırasında 8-oksodG ile eşleşme oranı yüksektir. Ayrıca sitozin ile eşleştirilmiş 8-oksodG anormal eşleşme olarak kabul edilmektedir. Memelilerde 8-oksodG'yi genomdan uzaklaştırmak için birincil enzim 8-oksodG DNA glikozilaz (OGG1) olduğu bildirilmiştir. OGG1 oksitlenmiş bazların N-glikozilik bağlarını parçalayarak 8-oksodG'yi genomdan uzaklaştırmaktadır [58, 59, 60].

8-oksoguanin en sık karşılaşılan lezyon olsa da, OH[•] radikali adenin, timin ve sitozin ile de etkileşime girebilir. Oksidatif DNA hasarından kaynaklanan başlıca lezyonlar; 5-hidroksi-6-hidrotimin, timin glikol, sitozin glikol, 5-hidroksisitozin, urasil glikol, 5-hidroksiurasil, 8-hidroksiadenin, 2-hidroksiadenin olarak bilinmektedir [58, 59].

Reaktif oksijen türleri tarafından hasar gören DNA, genetik kararlılık için doğrudan risk oluşturmaktadır. DNA oksidatif hasara eğilimli olduğu için, tehlikeli lezyonlardan hücreleri korumak üzere onarım sistemleri geliştirilmiştir. Oksidatif DNA hasarı; baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve nükleotid insizyon onarımını (NIR) içeren bir dizi DNA onarım mekanizması ile giderilebilir. Oksidatif DNA hasarı yeterince hızlı bir şekilde durdurulmazsa, hastalıkların, özellikle kanserin gelişimine katkıda bulunan, kendi kendini devam ettirebilen mutasyonlar haline gelebilir

ve oksidatif hasar kaynaklı genetik materyalin kalıcı olarak değişimi mutajenez ve karsinogenez başlangıcına neden olabilir [33, 58, 59, 60].

2.6. Protein Oksidasyonu

Reaktif oksijen türlerinin proteinler ile reaksiyonu oksidatif hasara yol açmaktadır. Protein oksidasyonu, polipeptit zincirinin kırılması, aminoasit yan zincirlerinin modifikasyonu ve proteinlerin farklı türevlere dönüşmesine neden olur. Oksidatif protein modifikasyonlarının çoğu onarılamamaktadır. Hücreler oksitlenmiş proteinlerin birikimi ve birikimin sonuçlarından korunmak için bazı sistemlere sahiptir [61].

Radikal kaynaklı reaksiyonlar genellikle protein omurga hasarına neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda hidrojen atomunun α -karbondan ayrılması ile karbon (C) merkezli radikal oluşmaktadır. C-merkezli radikal O_2 ile reaksiyona girebilir, peroksil radikali oluşumuna ve peroksil radikalleri de hidroperoksit üretimine neden olabilir. Her iki durum protein omurgasının parçalanması ile sonuçlanmaktadır [61, 62].

Aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonu protein omurga oksidasyonundan daha karmaşık bir mekanizma olup, alkoksil radikalleri, hidroperoksitler, alkoller, karboniller gibi birkaç oksidasyon ürününün oluşumuna neden olmaktadır. Protein karbonilleri prolin, arginin, lizin, treonin ve diğer aminoasit artıklarının oksidasyonu ve protein omurgasının oksidasyonu sonucu üretilmektedir. Protein karbonilleri aminoasitler (sistein, histidin ve lizin) ile reaktif karbonil bileşikleri (ketonlar ve aldehitler) arasındaki reaksiyonlar sonucu oluşabilir, LP veya glikasyon/glikoksidasyon reaksiyonlarına neden olabilirler [62, 63].

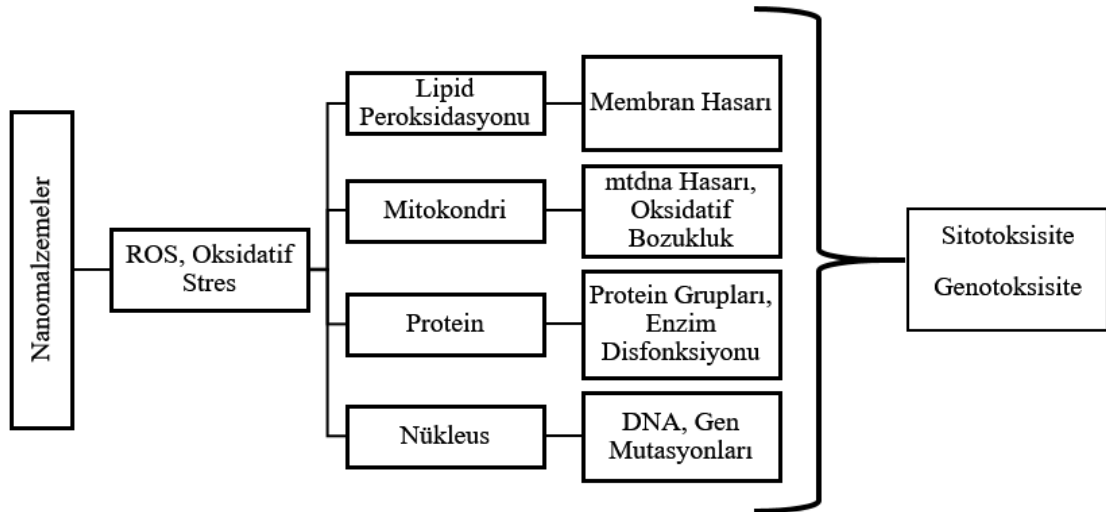
Aromatik amino asit artıklarının oksidasyonuna örnek olarak tirozin verilebilir. Tirozinin oksidatif hasarı sonucunda tirozil radikalleri oluşmaktadır. Tirozin oksidasyonunun diğer önemli ürünleri 3-klorotirozin, 3,4-dihidroksifenilalanin ve 3-nitrotirozin (3-NT) dir. Oksidatif protein modifikasyonlarından en yaygın olarak ölçülenler, protein oksidasyonunun hücresel durumunu değerlendirmek için kullanılan protein karbonilleri ve 3-NT'dir [61, 63].

2.7. Nanomalzeme Kaynaklı Toksikite

Nanoteknolojinin hızlı gelişimi ve biyomedikal alandaki geniş kullanımı ile nanomalzemelerin toksik etkileri dikkat çekmeye başlamıştır. Nanomalzemeler ve biyolojik sistemler arasındaki etkileşimleri araştıran, fizikokimyasal parametreler

(örneğin, nanoparçacıkların boyutu, şekli, yüzey modifikasyonu) ile toksik etkilerin ortaya çıkışı arasındaki ilişkiyi tanımlayan “nanotoksikoloji” alanı ortaya çıkmıştır [7].

Nanomalzemelerin neden olduğu ROS seviyesi, malzemenin kimyasal doğasına bağlıdır. Küçük boyut ve yüksek yüzey – hacim oranı nanomalzemelerin neden olduğu toksisiteyi belirleyen fiziksel ve kimyasal özelliklerdendir. Üretilen nanomalzemeler büyük yapıdaki benzerleriyle karşılaştırıldıklarında, küçük boyutlara, spesifik yüzey alanına, reaktif yüzeye sahiptir ve yüksek ROS seviyesi, sitotoksisite ve genotoksisiteye neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda çeşitli nanomalzemelerin eritrositler ve fibroblastlar gibi biyolojik sistemlerde ROS aracılı toksisiteye neden olduğu görülmüştür. **Şekil 2.13**'te görüldüğü gibi nanomalzeme kaynaklı ROS; oksidatif strese, mitokondriyal hasara, LP'ye, protein modifikasyonuna, DNA hasarına, sitotoksisiteye, genotoksisiteye ve kansere neden olabilmektedir [64].



Şekil 2.13. Nanomalzeme kaynaklı toksisite [64].

Nanoteknolojinin pek çok uygulaması, tıbbi veya biyolojik uygulamalar için tasarlanmamış olmasına rağmen, nanomalzemelerin üretimi ve kullanımı ile ilgili riskler, atıklarının yol açtığı çevresel sorunlar da araştırılmalıdır [7].

Nanopartiküller, virüs ya da bakteri boyutuna kıyasla hücresel membrana nüfuz edebilecek kadar küçüktür ve hücre içinde birikebilir. Hücresel sistemlerde nanomalzemelerin toksisitesini değerlendirmek için sayısız ölçüm bulunmaktadır. Hücre membran bütünlüğüne dayanan, hücre canlılığını değerlendiren testler; tripan mavisi ve LDH gibi sitozolik testleri içermektedir. LDH, hücre membran bütünlüğünün işareti

olarak, hasar görmüş hücrelerden kültür ortamına salınır. Hücresel toksisiteyi belirlemek için basit, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Fonksiyonel testlerden tetrazolyum tabanlı 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sıklıkla kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları, metabolik olarak aktif hücreleri seçici olarak tespit edebilmektedir çünkü sadece bu hücreler bir tetrazolyum halkasını parçalamak için gerekli olan mitokondriyal faaliyete sahiptir. Hücreler tetrazolyum halkasını parçalayarak formazan oluşumuna neden olmaktadır. Formazan oluşumu, canlı hücrelerin miktarını kolorimetrik olarak algılamayı sağlayan ve yalnızca canlı hücrelerde görülen mor renk oluşumu ile sonuçlanmaktadır [64, 65].

Nanomalzemelerin toksisitesini değerlendirmek için doğru testin seçilmesinde önemli olan uygun hücre hattının belirlenmesidir. NP'lere maruziyetin genellikle solunum, oral ve dermal yol ile olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, NP toksisite testleri deri hücreleri, solunum sistemi ya da gastrointestinal sistem hücreleri üzerinde gerçekleştirilmektedir. NP'lerin biyolojik görüntüleme ve ilaç taşıma uygulamalarında terapötik potansiyelini değerlendirmek için ise kanser hücre hatları üzerinde çalışılmaktadır [30, 65].

Nanopartiküllerin toksisitelerini değerlendirmek üzere kullanılan *In vivo* toksisite testlerinin zaman alıcı ve pahalı olduğu; *In vitro* toksisite testlerinin ise daha hızlı, kolay ve daha ucuz testler olduğu belirtilmektedir. Bu üstünlüklerinden dolayı nanomalzemelerin toksisite değerlendirmesi için ilk tercih genellikle *in vitro* testler olmuştur [65].

2.7.1. Altın Nanopartiküllerin Toksik Etkilerine İlişkin Çalışmalar

Farklı şekil ve boyutlarda Au NP toksisitesini ölçmek için kullanılan testler genel olarak nanomalzemelerde kullanılan testler ile tutarlıdır. Au NP'ler için LDH ve tripan mavisi başta olmak üzere bir dizi teknik kullanılmıştır, ancak sitotoksosite için en çok kullanılan yöntem MTT olmuştur [30].

Büyük boyuttaki altının, mikron boyuttaki ya da daha büyük parçacıkların katalitik olmadığı, kararlı, inert ve biyolojik olarak uyumlu olduğu düşünülürken Au NP alımı ve toksisitesi karmaşıktır. Genellikle Au NP'ler "az toksik" olarak nitelendirilmektedir. Sitotoksiteleri yalnızca şekil, yüzey kimyası ya da boyuta değil, aynı zamanda çalışılan hücre hattına da bağlı olmaktadır [30, 66].

Boyutları 0,8 – 15 nm arasında değişen Au NP'lerin insan serviks kanseri hücreleri (HeLa), melanoma hücreleri (SK-Mel-28), sıçan fibroblast hücreleri (L929) ve sıçan monositik/makrofaj (J774A1) hücrelerinde boyuta bağlı sitotoksiteleri incelenmiştir. NP'leri koruyan çeşitli ligandların etkilerini ortadan kaldırmak için trifenilfosfin monosülfonat (TPPMS) ve karşılaştırma için tri-sülfonat trifenilfosfin (TPPTS) kullanılmıştır. Sırasıyla mono ve tri ligandları için MS ve TS kısaltmaları kullanılmıştır. Farklı hücre hatlarının kullanılması hem büyüme fazındaki aktif hücrelerde hem de durağan fazdaki hücrelerde sitotoksitenin test edilmesini sağlamıştır. 96 kuyucuklu hücre kültür plağında her kuyucuğa ekilen hücre sayısı ile ilgili olarak büyüme eğrileri belirlenmiştir. Au1,4MS'lere 1 saatlik maruziyet sonrası HeLa hücreleri şişmiş ve substrat bağlantısını kaybetmeye başlamıştır. TEM görüntülerinde, plazma membranında kabarcık ve vezikül oluşumu görülmüştür. 12 saatlik maruziyet sonrasında, HeLa hücreleri son derece şişmiş, parçalanmış çekirdekli görülmüştür ve birçok hücrede hem hücre – hücre hem de hücre – substrat arasındaki bağlantı kaybedilmiştir. Kültür plağına bağlı kalmış birkaç hücrede sitoplazmik düzensizlik, nükleer parçalanma, membran kabarcıkları nedeniyle apoptoz ve ikincil nekroz görülmüştür. HeLa hücrelerinde olduğu gibi Au1,4MS'e maruz bırakılan J774A1 hücreleri membranlarında kabarcıklar gözlenmiştir. Au15MS partiküllerine maruz kalan J774A1 hücrelerinde ise, hücre içine partikül alımı gerçekleşmemiştir. Au NP toksisitesi MTT testinde IC₅₀ değerleri belirlenerek incelenmiştir. Aktif olarak büyümekte ve bölünmekte olan hücrelerin toksik saldırılara karşı durağan fazdaki hücrelerden 15 – 33 kat daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Au1,4MS ve Au1,4TS, 46 ve 30 µM IC₅₀ değerleri ile en toksik olarak bulunmuştur. Fakat aynı TPPMS ligandı ile stabilize edilmiş farklı boyuttaki Au NP kümeleri; Au0,8MS (IC₅₀ = 250 µM), Au1,2MS (IC₅₀ = 140 µM), Au1,8MS (IC₅₀ = 230 µM), dört ila altı kat daha az toksik bulunmuştur. Hücrelerin belirgin endositozuna rağmen, Au15MS'de 6300 µM'a kadar toksisite gözlenmemiştir. Sonuç olarak ligand toksisitesi genel Au NP toksisitesine katkıda bulunmamıştır. Hem Au1,4MS hem de Au1,4TS hemen hemen aynı IC₅₀ değerlerine sahip bulunmuş ve Au NP toksisite belirleyicisinin ligand kimyası değil, 1,4 nm'lik büyüklük olduğu gösterilmiştir [67].

Yapılan bir diğer çalışmada, ticari olarak var olan üç farklı Au NP, HL-60 ve insan hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücre hatlarına etkileri açısından karşılaştırılmıştır. TEM görüntüleri Au NP'lerin 30, 50 ve 90 nm çapında olduğunu göstermiştir. Au NP sitotoksitesini, hücre metabolik aktivite (MTT) ve membran bütünlüğü (LDH)

ölçülerek incelenmiştir. 30 nm çapındaki, 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarındaki Au NP'lere 72 saatlik inkübasyondan sonra HL-60 hücre canlılığı sırasıyla %79, %73 ve %60 olarak bulunmuştur. 30 nm çapındaki 15 µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetten sonra HL-60 hücre canlılığı sırasıyla %53,3, %42,4 ve %33,2 olarak belirlenmiş, inkübasyon süresi ile orantılı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma olduğu görülmüştür. 50 ve 90 nm, 15 µg/mL Au NP'lere 72 saatlik maruziyet sonucu HL-60 hücre canlılığı sırasıyla %47,8 ve %56,1 bulunmuştur. Hücresel metabolik aktivite en yüksek Au NP konsantrasyonunda (25 µg/mL) 24-72 saatlik maruziyetten sonra %7'den az olarak gözlenmiştir. HL-60 hücreleri için LDH seviyeleri, 15 µg/mL Au NP'lere 24 saatlik maruziyet sonrası 30 nm için %51,6 iken 50 nm ve 90 nm için %50'ye ulaşmamıştır. 25 µg/ml 24 – 72 saatlik maruziyet sonrası ise LDH seviyeleri neredeyse %100 olmuştur. Bu bulgular ile, HL-60 hücrelerinde Au NP'lerinin hücre canlılığı ile Au NP çapı arasında doğrusal bir ilişki bulunurken, konsantrasyon ve maruziyet ile ters bir ilişki olduğu görülmüştür. Benzer durum HepG2 hücrelerinde de saptanmıştır. HepG2 hücrelerinin 30 nm 15µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 72 saatlik maruziyetinden sonra ise %58 hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, HepG2 hücrelerinin 50 ya da 90 nm 15 µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 72 saatlik maruziyeti sonucu hücre canlılığı %80'den fazla olmuştur. 25 µg/mL konsantrasyonda 72 saatlik maruziyet sonucu HepG2 hücre canlılığının 30, 50 ve 90 nm Au NP'lerde sırasıyla %6,3, %12,4, %30 olduğu saptanmıştır. HepG2 hücreleri için LDH seviyesi, 15 µg/mL 30 nm boyutlu Au NP'lere 72 saatlik maruziyet sonrası %76,6 olmuştur. 25 µg/ml konsantrasyonda 72 saatlik maruziyet sonrası LDH sızıntısı 30, 50 ve 90 nm için sırasıyla %90, %85 ve %68 olarak ölçülmüştür. Sonuçlar test edilen Au NP'lerin ve her iki hücre hattındaki sitotoksitesinin zaman ve konsantrasyon bağımlı olduğunu göstermiştir. MTT sonucunda elde edilen IC₅₀ konsantrasyonları 30, 50 ve 90 nm için sırasıyla HepG2 hücrelerinde 19,3 µg/ml, 20,2 µg/ml, 22,4 µg/ml, HL-60 hücrelerinde ise 15,4 µg/ml, 16,8 µg/ml ve 18,2 µg/ml olarak bulunmuştur. Her iki hücre hattı için 30 nm boyutlu Au NP'lerin 50 ve 90 nm boyutlulara kıyasla metabolik aktivite ve membran bütünlüğü açısından daha sitotoksik olduğu görülmüştür. HL-60 hücrelerinde total GSH seviyeleri, IC₅₀ konsantrasyonunda 24 saatlik maruziyet sonrası 30, 50 ve 90 nm için sırası ile %16, %53 ve %66 iken HepG2 hücrelerinde %46, %56 ve %74 olmuştur. HL-60 hücrelerinin SOD aktivesinde önemli değişiklik gözlenmemiştir. Ancak HepG2 hücrelerinin 30 ve 50 nm Au NP'lere 24 saatlik IC₅₀ konsantrasyonlarında maruziyeti sonrası SOD aktivite seviyeleri %74 ve %82 olarak bulunmuştur. HL-60 hücrelerinde ROS seviyeleri 24

saatlik inkübasyondan sonra maksimum seviyelerine ulaşmıştır, ancak 48 saat sonunda bazal seviyelere inmiştir. HepG2 hücreleri için ise maksimum ROS seviyeleri 1 saatlik inkübasyondan sonra gözlenmiş, 24 saat sonunda bazal seviyeye inmiştir. Sonuçlar, hücresel metabolik aktivitenin Au NP maruziyeti sonucu zarar gördüğünü ve membran stabilitesinin bozulduğunu, Au NP'lerin tetiklediği sitotoksitesinin doz ve zamana bağlı olduğunu, ayrıca HL-60 hücrelerinin Au NP'lere HepG2 hücrelerinden daha duyarlı olduğunu göstermiştir [66].

Altın nanopartiküllerin (33 nm) üç farklı hücre hattında toksisitesinin test edildiği bir diğer çalışmada, sonuçlar Au NP'lerin BHK21 ve HepG2 hücrelerinde aynı doz aralıklarında toksik olmamasına rağmen, A549 hücrelerinde toksik olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu hücre seçici etkinin belirli kanser türleri için bir tedavi olasılığı olarak düşünülebileceği rapor edilmiştir [30].

Altın nanopartiküllerin toksisitesininin tek başına farklı hücre hatlarında değerlendirildiği çalışmaların yanı sıra, farklı kaplama yöntemlerinin etkilerinin de incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Polietilenimin ile fonksiyonelleştirilmiş Au NP'lerin sitotoksitesinin incelendiği bir çalışmada dört farklı hücre hattı, insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), HeLa, insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri (Coco-2) ve HepG2 kullanılmıştır. Au NP'lerin PEI ile kaplandıklarında zeta potansiyeli ve boyutlarında artış gözlenmiştir. PEI konsantrasyonu arttıkça yüzey yükü artmıştır. MTT deneyi için 48 kuyucuklu plaklara her kuyucukta $2,4 - 2,9 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmış, hücreler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Au NP-PEI'ler ile hücrelerin 48 saatlik inkübasyonundan sonra MTT prosedürü uygulanmıştır. Au NP-PEI maruz bırakılmayan kontrol hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Maksimum hücre canlılıkları HEK293 hücreleri için %95,4, HeLa için %94,9, HepG2 için %98,2 ve Caco-2 için %76,7 olarak belirlenmiştir. HeLa ve HepG2 hücreleri %90'dan fazla hücre canlılığı göstermiştir [17].

Bir diğer araştırmacı grubu, hücresel alım, ekzositoz için sitrat ile stabilize edilmiş Au NP (Cit-Au NP) ve karboksil (COOH) terminaline sahip PEG ile modifiye Au NP'lerin (COOH-PEG Au NP) hücresel alım ve ekzositoz ile sitotoksitesilerini HepG2 ve HEK293 hücre hatlarında değerlendirmiştir. Sitotoksite ölçümleri için *in vitro* olarak hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını izlemek, farklı test maddelerinin doza bağlı tepkisini belirlemek için gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) kullanılmıştır. Cit-Au NP boyutu 15 ± 2 nm, COOH-PEG Au NP boyutu 15 ± 3 nm olarak ölçülmüştür. Au NP'lerin hücre

kültür ortamındaki yüzey yükü (zeta potansiyeli) partiküllerin kararlılık derecesini belirlemek üzere ölçülmüş, Cit-Au NP'ler için -38,5 mV, COOH-PEG Au NP'ler için -46,2 mV değerleri ile son derece negatif yüklü NP'lerin kararlı oldukları görülmüştür. Cit-Au NP'lere 5, 2, 1 ve 0,5 nM konsantrasyonlarda 8 saat maruziyet ile HEK293 hücre canlılığında düşüşlerin başladığı gözlenmiş, 22 saat sonunda ise önemli düzeyde azalmalar saptanmıştır. Cit-Au NP yüzeylerinde sitrat iyonlarının varlığı gözlenen toksisite ile ilişkilendirilmiş, test edilen bütün konsantrasyonlarda HEK293 hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. COOH-PEG Au NP'lere (5, 2, 1 ve 0,5 nM) maruz kalan HEK293 hücrelerinde ise 56 saatlik inkübasyon sonunda konsantrasyona bağlı toksik yanıt oluştuğu saptanmıştır. HepG2 hücrelerinin proliferasyon eğrileri 98 saatlik maruziyet sonrası Cit-Au NP'lerin hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve test edilen bütün konsantrasyonlarda (5, 2, 1 ve 0,5 nM) sitotoksik olduğunu göstermiştir. COOH-PEG Au NP'lerde aynı koşullarda konsantrasyona bağlı sitotoksik yanıt oluşmuştur. En yüksek konsantrasyonlarda (5 nM ve 2 nM) Au NP'lerin eklenmesinden sonra HepG2 hücre canlılığı sıfıra inmiştir. Ancak, COOH-PEG Au NP'ler düşük konsantrasyonlarda (0,5 nM ve 1 nM) herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Sitotoksisite sonuçları ile her iki hücre tipinin yüzey kimyası dikkate alınmaksızın Au NP'lere duyarlı olduğu, ancak COOH-PEG Au NP'lerin daha toksik olduğu saptanmıştır ve ayrıca HepG2 hücrelerinde HEK293 hücrelerine göre daha yüksek sitotoksisite seviyeleri gözlenmiştir. Au NP'lerin yoğun ışık saçma yetenekleri kullanılarak elde edilen karanlık alan görüntülerinde, Cit-Au NP ile inkübe edilen HEK293 ve HepG2 hücrelerinin partikülleri hücre içine aldığı, ancak COOH-PEG Au NP'lerin aglomeratlar halinde hücre membranında biriktiği görülmüştür. TEM görüntüleri ise Au NP'lerin hücre içine alımını ve farklı hücre bölümlerinde dağılımlarını gözlemek için kullanılmıştır. Cit-Au NP'ler HEK293 hücre sitoplazmasında dağınık halde gözlenirken, HepG2 hücrelerinde aglomeratlar halinde veziküllerde tutulduğu gözlenmiştir. COOH-PEG Au NP'ler HEK293 hücrelerinin sitoplazmasında ve veziküllerinde tekli ve farklı boyutlarda birikmiş halde, HepG2 hücrelerinde ise sitoplazmada bireysel ve aglomeratlar halinde saptanmıştır. Au NP'lerin hücre alımını takiben hücre içindeki durumları gözlenmiş, Cit-Au NP ve COOH-PEG Au NP'lere maruz bırakılan HEK293 ve HepG2 hücrelerinde (48 saat, 1-2-3 ve 4 hafta) COOH-PEG Au NP'ler ile karşılaştırıldığında Cit-Au NP'lerin hücre içine alımının daha yüksek olduğu görülmüştür. 48 saat ile 3 haftalık inkübasyon sürelerinde Cit-Au NP ve COOH-PEG Au NP'lerin HEK293 hücre veziküllerinde, bir kısmının hücre sitoplazmasında bulunduğu, 4 hafta sonunda ise hücre

içinde partikül bulunmadığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar HepG2 hücrelerinde görülmüş, 4 hafta sonunda HepG2 hücrelerinin veziküllerinde Cit-Au NP'lere rastlanmamıştır. Kısaca, Au NP'lerin büyük çoğunluğu veziküllerde aglomeratlar halinde gözlenmiştir ve sonuç olarak partiküllerin hücre içindeki yerleşimi yüzey kimyasına bağlı olmamaktadır. COOH-PEG Au NP ile inkübe edilen (48 saat, 1 hafta, 2 hafta) HepG2 hücre veziküllerinde partiküller gözlenmiş, ancak 3 hafta sonrasında vezikül salgısı ile 4 hafta sonrasında ise vezikül salgısı olmadan ekzositoz gözlenmiştir. Au NP'lerin hücre dışına ekzositozunu kanıtlayabilmek için Au NP'lerin 48 saat, 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkübasyonu ile elde edilen hücre süpernatanı incelenmiştir. HEK293 ve HepG2 hücreleri için benzer sonuçlar bulunmuş, partiküllerin farklı boyutlarda aglomeratlar halinde hücreden uzaklaştırıldığı görülmüştür. Sonuç olarak Au NP'lerin yüzey kimyası hücre alımı, hücre bölümlerindeki dağılımı ve ekzositoz yolu açısından önemlidir [68].

Altın nanopartiküllerin şeklinin sitotoksositeye olan etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada altın nanoküpler (AuNC) ve altın nano-oktahedralar (AuNO) kullanılmıştır. NP'lerin yüzeyi poli(akrilol-L(D)-valin (L(D)-PAV) ile kaplanmıştır. SEM ve TEM sonuçları, L-PAV-AuNC ve D-PAV-AuNC'lerin boyut (~165 nm) ve yüzey molekül yoğunluğu açısından (2,0 molekül/ nm^2) benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde, L-PAV-AuNO ve D-PAV-AuNO'nun da boyut (~110 nm) ve yüzey molekül yoğunluğu açısından (~1,9 molekül/ nm^2) benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. NP'lerin hücre alım miktarı ve hücre içi dağılımını incelemek üzere A549 hücreleri 4 pM konsantrasyonunda PAV-AuNC ve PAV-AuNO'lara maruz bırakılmış, sonuçlar sitoplazmada çekirdek çevresinde toplandıklarını ve L-PAV kaplı NP'lerin, D-PAV kaplı olanlardan daha fazla hücre içine alındığını göstermiştir. AuNC'lerin hacminin AuNO'lardan daha büyük olması nedeniyle, aynı konsantrasyonlarında (4 pM) AuNC'lerin altın (Au) konsantrasyonu, AuNO'larından daha fazladır. Bu nedenle A549 hücreleri aynı kaplamaya sahip AuNC'ler yerine AuNO'ları hücre içine almayı tercih etmişlerdir. Bu durum parçacık şeklinin hücre içine alımda önemli olduğunu göstermiştir. MTT sonuçları L- ve D-PAV-AuNC'ler ya da L- ve D-PAV-AuNO'ların konsantrasyona bağlı (0,5 – 8 pM) sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. 8 pM konsantrasyonda L-PAV kaplı Au NP'ler ile, D-PAV kaplı Au NP'lerden daha fazla sitotoksosite gözlenmiş, hücre canlılıkları sırasıyla partikül içermeyen kontrole (%100) göre %76 ve %87 olarak bulunmuştur. ROS tespiti için H_2O_2 'ye maruz bırakılan/bırakılmayan A549 hücreleri

pozitif/negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında H_2O_2 'ye ve PAV-AuNC ya da PAV-AuNO'lara (4 pM) 24 saat boyunca maruz bırakılmış A549 hücrelerinde önemli miktarda ROS üretimi gözlenmiştir. AuNO'lar, AuNC'lerden ve ek olarak L-PAV kaplı partiküller D-PAV kaplı olanlardan daha fazla ROS üretimine neden olmuştur. COMET testinde, PAV-AuNO'lara maruz kalan A549 hücrelerinde, PAV-AuNC'lere göre daha fazla DNA hasarı olduğu gözlenmiştir. L-PAV kaplı Au NP'ler, D-PAV kaplı Au NP'lerden daha fazla DNA hasarına neden olmuştur. Özetle, A549 hücrelerinde DNA hasarı PAV-AuNC'lerin ve PAV-AuNO'ların hücre içine alınması ile tetiklenen ROS üretiminden kaynaklanmıştır [69].

Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından sıfır değerlikli 10, 30 ve 60 nm boyutlarında steril Au NP'ler geliştirilmiştir. Bu partiküllerin nanotoksikoloji çalışmalarında pozitif veya negatif kontrol olarak kullanılabilmesi için toksikolojik etkilerinin karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada Au NP'ler HepG2 hücrelerinde DNA'daki oksidatif hasar potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Yeterince yüksek konsantrasyonlarda toksik yanıt elde etmek her zaman mümkün olsa da, HepG2 hücreleri <0,2 µg/ml dozlara maruz bırakılmıştır. Çalışmada ilk olarak Au NP'lerin HepG2 hücrelerine girme yeteneği TEM kullanılarak incelenmiştir. Ardından sitotoksitesiteleri MTT deneyi ile değerlendirilmiş, akış sitometrisi ise partiküllerin hücre döngüsünü etkileyip etkilemediğini görmek için kullanılmıştır. Son olarak oksidatif DNA hasarı incelenmiştir. HepG2 hücreleri 0,0002 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml veya 0,2 µg/ml konsantrasyonlarda Au NP'lere 3 saat maruz bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak HepG2 hücreleri 100 µmol/l hidrojen peroksite 1 saat maruz bırakılmıştır. MTT sonuçları HepG2 hücre proliferasyonunda önemli değişiklik olmadığını göstermiştir. Canlı hücre sayısının Au NP doz ve boyutundan bağımsız olarak %95'den %75'e düştüğü belirlenmiştir. Akış sitometrisi G0, G1, G2, S ya da M fazlarında test edilen bütün Au NP dozları için 0 – 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca istatistiksel olarak önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Au NP'lerin DNA lezyonlarının oluşumu üzerindeki etkisi sıvı kromatografi/kütle spektroskopisi/tandem kütle spektroskopisi (LC/MS/MS) kullanılarak değerlendirilmiştir. Au NP (30 nm) 0,0002 µg/ml konsantrasyonda (5'S)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (Scda) düzeyinde önemli bir artışa neden olmuştur, ancak bu artış doza bağlı değildir. Tersine 60 nm Au NP, 0,0002 µg/ml konsantrasyonda iken Scda düzeyinde düşüş gözlenmiştir, aynı şekilde bu düşüş doza bağlı gerçekleşmemiştir. Ek olarak 24 saat boyunca 10, 30 veya 60 nm Au

NP'lere 0,0002 µg/ml veya 0,2 µg/ml dozlarında maruz bırakılan hücrelerin DNA baz lezyonu seviyelerinde (kontrolle karşılaştırıldığında) önemli fark gözlenmemiştir. Sonuçta, Au NP'lerin 0,2 µg/ml veya 2 µg/ml'den düşük dozlarda HepG2 hücrelerinde ve DNA'da doza bağlı oksidatif hasar oluşturmadığı, hücre ölümüne ve serbest radikal üretimine neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar NIST Au NP'lerin *in vitro* / *in vivo* genotoksisite çalışmaları için kontrol malzemeleri olarak kullanılabilceğini göstermiştir [70].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma - Aldrich
8-OHdG Tayin kiti (BIOXYTECH® 8 – OHdG – EIA™)	Oxis International, Inc.
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma - Aldrich
DNA İzolasyon kiti (Quick-DNA™ Miniprep Kit)	Zymo Research
Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM Low Glucose)	Biowest
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (D-PBS)	Multicell, Wisent Bioproducts
Florometrik Hücre içi ROS kiti	Sigma - Aldrich
Fötal Sığır Serum (FBS)	Sigma - Aldrich
Glutasyon kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz kiti	Cayman Chemical
Hidrojen Tetrakloroaurat (III) Trihidrat	Sigma - Aldrich
Hidrokinon	Sigma-Aldrich
Hücre Liziz Reaktif (CellLytic MT)	Sigma – Aldrich
Katalaz kiti	Cayman Chemical
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries
Polietilen Glikol (6000 MW)	Sigma-Aldrich
Polietilenimin (2000 MW)	Sigma-Aldrich
Polietilenimin (25000 MW)	Sigma-Aldrich
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma – Aldrich
Protein Karbonil kiti	Cayman Chemical
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Süperoksit Dismutaz kiti	Cayman Chemical
TBARS Deney kiti	Cayman Chemical

Tripsin-EDTA	Sigma - Aldrich
Trisodyum Sitrat Dehidrat Çözeltilisi	Sigma – Aldrich

3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Greiner bio-one, Cellstar
Biyogüvenlik kabini	Holten, Lamin Air Model 1,2
Buz kırma makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES mp Minipure, mes08/Thermo Scientific, Branstead Samrt 2Pure
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), pipet (1-25 ml), falcon tüpü (15, 50 ml), eppendorf tüp	Corning, Labosel Directive 98/79/CE
Işık Mikroskobu	Leica, DFC280
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Mikropipet (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, FinnpiPETTE, Labsystems
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Pipet ucu (0,5 – 10, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl'lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Terazi	Mettler Toledo, XS105 Dual Range

Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments

3.3.Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada insan hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücre hattı (ATCC®HB-8065™) kullanılmıştır. Bu hücre hattı 15 yaşında erkek bir adölesanın hepatosellüler karsinoma dokusundan elde edilen adherent epitel hücrelerden oluşmaktadır.

3.4.Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.4.1.1. Çekirdek Büyütme Tekniği ile Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması

Altın nanopartiküllerin hazırlanması için Turkeviç metodu [71] modifiye edilerek önce çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır [72,73]. Bu amaçla 0,25 mM, 100 mL hidrojen tetrakloroaurat (III) trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi geri soğutucu altında 300°C ' ye getirilmiştir ve 30 dk boyunca beklenmiştir. Daha sonra trisodyum sitrat dihidratın stok çözeltiden (% 3 w/v) 1 mL alınarak 300°C 'de 0,25 mM, 100 mL hidrojen tetrakloroaurat (III) trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisine eklenmiş ve 10 dakika boyunca karıştırılmıştır ve çözelti oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Altın nanopartiküller (Au NP) çekirdek büyütme tekniği ile hazırlanmıştır [74]. Bu amaçla 0,25 mM 100 mL $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi hazırlanmış ve 2,5 mL altın nanopartikül çekirdekleşme çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra 15 mM, 1 mL trisodyum sitrat dihidrat stok çözeltisi $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'nun karışımına eklenmiştir. Son aşamada ise 25 mM, 1 mL hidrokinon stok çözeltisi final çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika karıştırılmıştır.

3.4.1.2. PEI ile Yüzey Modifikasyonu

Bu amaçla, molekül ağırlıkları 2000 ve 25000 olan poli(etilenimin)'in % 2'lik stok çözeltisi hazırlanmış ve 50 µL PEI çözeltisi alınarak karışmakta olan 20 mL altın nanopartikül çözeltisine eklenmiş ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Son aşamada, PEI fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller 7000 g'de santrifüj ile 30 dakika saflaştırıldıktan sonra deionize su içinde dağıtılmıştır [72, 73].

3.4.1.3.PEG ile Yüzey Modifikasyonu

Polietilen glikol (Molekül ağırlığı = 6000) %0.02 konsantrasyonunda nanopartikül çözeltilisine eklenip ve 7000 g'de santrifüj ile 30 dakika saflaştırıldıktan sonra deionize su içinde dağıtılmıştır.

3.4.1.4.Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Elde edilen altın nanopartiküllerin boyutları ve zeta potansiyelleri Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern® Instrument Ltd., England) ile ölçülmüş ve TEM (Transmission Electron Microscope, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM Microscope, USA) ile görüntülenmiştir.

3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Kullanılan hücre hatlarının çoğaltılabilmesi için kullanılacak besiyeri, 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM) içerisine %10 (50 ml) fetal sığır serumu (FBS), %1 (5 ml) penisilin streptomisin eklenerek hazırlanmış, +4°C'de saklanmıştır.

3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit:

Dimetil sülfoksit (C₂H₆OS) yoğunluğu 1,1 g/ml'dir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi:

15 mg MTT 3 ml D-PBS içerisinde çözüldükten sonra 27 ml DMEM eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyondaki çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunmalıdır ve 24 saat dayanıklıdır.

3.4.4. ROS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi:

Kit 1 ml ROS tayin reaktifi içermektedir. -20 ° C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit:

Kit 0,1 ml DMSO içermektedir. Tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu:

Kit 20 ml deney tamponu içermektedir. -20 ° C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı:

20 µl 500X ROS tayin reaktifi ve 10 µl deney tamponu içeren karışımdır. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

3.4.5. Glutasyon Peroksidaz 1 Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

Kit 3 ml deney tamponu içermektedir ve 27 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

2 ml örnek tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Çözelti, GPx kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır. 1X çözelti, 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

Glutasyon Peroksidaz (Kontrol):

Kit 50 µl sığır eritrosit GPx'i içermektedir. Kullanmadan önce, enzimin 10 µl'si başka bir vialle aktararak 490 µl 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Seyreltilmiş enzim 4 saat içerisinde kullanılmalıdır. -20°C'de saklanmalıdır.

Ko – Substrat Karışımı:

Kit liyofilize toz halinde NADPH, GSH ve glutasyon redüktaz (GR) içermektedir. Her bir vial ihtiyacı karşılayacak şekilde 6 ml distile suda çözülür. Deney yapılırken oluşturulan reaktif 25°C'de bekletilir. 4°C'de 2 gün dayanıklıdır.

Kümen Hidroperoksit:

Kit 2,5 ml kümen hidroperoksit içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. -20°C'de saklanmalıdır.

3.4.6. Süperoksit Dismutaz Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

3 ml deney tamponu 27 ml distile su ile seyreltilir. Elde edilen 1X deney tamponu radikal detektörü seyreltmek için kullanılır. 1X çözelti, 0,1 mM dietilen triamin pentaasetik asit (DTPA) ve 0,1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. 2 ml örnek tamponu 18 ml distile su ile seyreltilir. Elde edilen 1X örnek tamponu SOD standartlarını hazırlamak, ksantin oksidazı ve SOD örneklerini seyreltmek için kullanılır. 4°C’de 6 ay dayanıklıdır.

Radikal Detektör:

Kit, 250 µl tetrazolyum tuzu çözeltisi içermektedir. Kullanmadan önce, eldeki çözeltinin 50 µl’si başka bir vial e aktarılır ve 19,95 ml 1X deney tamponu ile seyreltilir. Işıktan korunarak 2 saat içerisinde kullanılmalıdır.

SOD Stok ve Standart Çözeltileri:

Vial, 100 µl sığır eritrosit SOD stok çözeltisi (Cu/Zn-SOD şeklinde) içermektedir. SOD standart çözeltilerini hazırlamak için kullanılır. 20 µl SOD stok çözeltisi 1,98 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Seyreltilmiş SOD stok çözeltisinden sırasıyla 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak, 1000 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 880 µl, 840 µl ve 800 µl örnek tamponu ile seyreltilir ve 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 ve 0,05 U/ml SOD aktivitesi içeren bir dizi standart çözeltisi hazırlanır. Standart çözeltiler taze olarak hazırlanmalıdır.

Ksantin Oksidaz:

Kit, 150 µl ksantin oksidaz içermektedir. Kullanmadan önce 50 µl’si başka bir vial e aktarılarak 1X örnek tamponu (1,95 ml) ile seyreltilir. Seyreltilmiş enzim bir saat dayanıklıdır. Buzda bekletilerek kullanılır.

3.4.7. Katalaz Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Deney Tamponu (10X):

2 ml katalaz deney tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 100 mM potasyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. 4°C’de 2 ay dayanıklıdır.

Örnek Tamponu (10X):

5 ml katalaz örnek tamponu 45 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 1 mM EDTA ve %0,1 sığır serum albümin içeren 25 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. Elde edilen örnek tamponu analizden önce formaldehit standartlarını ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C’de 2 ay dayanıklıdır.

Formaldehit Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, 4,25M formaldehit stok çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. Formaldehit stok çözeltisinin 10 µl'si 9,99 ml seyreltilmiş örnek tamponu ile seyreltilir ve 4,25 mM formaldehit ara stok çözeltisi elde edilir. Ara stok çözeltisinden alınan 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl formaldehit, 1X örnek tamponuyla (sırasıyla 1000 µl, 990 µl, 970 µl, 940 µl, 910 µl, 880 µl, 850 µl alınarak) seyreltilir ve 0, 5, 15, 30, 45, 60 ve 75 µM konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanır.

Potasyum Hidroksit:

Kit, 4 ml 10M potasyum hidroksit (KOH) içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de 3 ay dayanıklıdır.

Hidrojen Peroksit:

Kit, 8,82 M H₂O₂ çözeltisi içermektedir. Bu çözeltinin 40 µl'si 9,96 ml distile su ile seyreltilerek 35,28 mM çözelti elde edilmiştir. Çözelti 2 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Purpald (Kromojen):

0,5 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde hazırlanmış 4 ml "4-amino-3-hidrazino-5-merkaptto-1,2,4-triazol" (purpald) içermektedir. Katalaz deney kiti içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

Potasyum Periyodat:

0,5 M potasyum hidroksit içerisinde 1,5 ml potasyum periyodat içermektedir. Katalaz deney kiti içerisinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

3.4.8. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkoninik asit (BCA) Deneyi] Kullanılan Çözeltiler

QuantiPro Buffer QA:

Reaktif QA 0,2 M NaOH içerisinde sodyum karbonat, sodyum tartarat ve sodyum bikarbonattan oluşan 250 ml'lik bir çözeltidir (pH 11,25). QuantiPro BCA Kiti içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

QuantiPro BCA QB:

Reaktif QB, 250 ml %4'lük bişinkoninik asit (BCA) çözeltisidir (pH 8,5). Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

Bakır (II) Sülfat:

12 ml %4'lük bakır(II)sülfat, pentahidrat çözeltisi halinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir.

Protein Stok ve Standart Çözeltileri:

Koruyucu olarak %0,05 sodyum azid içeren, 0,15 M NaCl'de 1,0 mg/ml sığır serum albümininden oluşan 1,0 ml'lik çözelti "stok protein çözeltisi" olarak kullanılır. 100 µl stok çözeltisi 1,9 ml tampon çözelti ile seyreltilmiş ve 50 µg/ml ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Protein ara stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 0, 0,5, 5, 10, 20, 30, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri hazırlanır.

3.4.9. Glutasyon Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

2-(N-morfolin)etansülfonik Asit Tamponu (2X):

Tampon, 0,4 M 2-(N-morfolin)etansülfonik asit, 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA içermektedir (pH 6,0). 60 ml MES tamponu 60 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir.

Okside Glutasyon Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, MES tamponu içerisinde 2 ml okside glutasyon (GSSG, 25 µM) içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 0 - 4°C'de saklandığında 1 yıl dayanıklıdır. GSSG stok çözeltisi (sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 µl) ve 1X MES tampon çözeltisi (sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 420, 380, 340 µl) kullanılarak 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 µM konsantrasyonlarında GSSG standartları hazırlanmıştır.

Ko-Faktör Karışımı:

Kit, içerisinde liyofilize toz halinde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat içermektedir. Kullanmadan önce vial 0,5 ml distile suda çözülür. 0 - 4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı:

Kit içerisinde bulunan tampon çözelti (0,2 ml), GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içermektedir. 1X MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0 - 4°C'de saklandığında 2 hafta dayanıklıdır.

5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit:

Kit, liyofilize toz halinde 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktifi) içermektedir. Kullanmadan önce vial 0,5 ml distile suda çözülür. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan itibaren 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.10. TBARS Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit:

Kit içerisinde 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) bulunmaktadır. Renk reaktifini hazırlamak için kullanılır.

Asetik Asit:

Kit, 20 ml konsantre asetik asit içermektedir. 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Sodyum Hidroksit (10X):

20 ml NaOH çözeltisi 180 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri:

Kit, 500 µM malondialdehit (MDA) stok çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 250 µl MDA stok çözeltisi 750 µl distile su ile seyreltilmiş ve 125 µM ara stok çözeltisi elde edilmiştir. Ara stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 0, 0,625, 1,25, 2,5 5, 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarında MDA standartları hazırlanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi:

Kit, tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi içermektedir.

Renk Reaktifi:

Renk reaktifi; 530 mg TBA'nın, seyreltilmiş asetik asit çözeltisi (50 ml) ve seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti 24 saat dayanıklıdır.

3.4.11. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik Asit:

Kit ile 12 M hidroklorik asit (HCl) temin edilir. 40 ml distile suya 2,5 M HCl elde etmek için 1 ml HCL çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

2,4-dinitrofenilhidrazin:

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) 10 ml HCl (2,5 M) içerisinde çözülmüştür. 4°C'de saklandığında 1 hafta dayanıklıdır. Karanlıkta saklanmalıdır.

Trikloroasetik Çözeltisi (%20):

Kit içerisinde 1 g/ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi içermektedir. 12 ml TCA çözeltisi 48 ml distile su ile seyreltilmiştir (%20). %20'lik TCA çözeltisinin 20 ml'sine 40 ml distile su eklenerek %10'luk TCA çözeltisi elde edilir. Oda sıcaklığında 1 ay dayanıklıdır.

Guanidin Hidroklorür:

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilir.

Etanol:

Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilir (30 ml).

Etil Asetat:

Kit içerisinde 30 ml etil asetat bulunmaktadır.

Etanol : Etil Asetat:

30 ml etil alkol 30 ml etanol ile karıştırılır, 1:1 oranında etanol:etil asetat çözeltisi elde edilir.

3.4.12. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Genomik Liziz Tamponu:

50 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Ön Yıkama Tamponu:

15 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

g-DNA Yıkama Tamponu:

50 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Elüsyon Tamponu:

10 ml çözelti kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3.4.13. DNA Baz Hasarı Tespitinde Kullanılan Çözeltiler**Primer Antikor Seyreltme Tamponu:**

6 ml fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içermektedir.

Primer Antikor Çözeltisi:

Kit içinde bulunan primer antikor, primer antikor seyreltme tamponu ile çözülerek taze kullanılmıştır.

Sekonder Antikor Seyreltme Tamponu:

12 ml PBS içermektedir.

Sekonder Antikor Çözeltisi:

Kit içinde bulunan HRP-konjuge sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme tamponu ile çözülerek taze kullanılmıştır.

Kromojen:

3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (250 µl) içermektedir.

Kromojen Seyreltme Tamponu:

Hidrojen peroksit/sitrat – PBS (12 ml) içermektedir.

Yıkama Tamponu (5X):

Konsantre PBS (26 ml) içermektedir. Distile su ile 1'e 5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Durdurma Çözeltisi:

1 M fosforik asit çözeltisi (12 ml) içermektedir.

Standart Çözeltileri:

Kit içerisinde her biri 1 ml olmak üzere 0,5 ng/ml, 2 ng/ml, 8 ng/ml, 20 ng/ml, 80 ng/ml, 200 ng/ml 8-OHdG standart çözeltileri bulunmaktadır.

Reaktifler kit içerisinde kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Reaktifler karanlık ortamda ve 2-8°C'de saklanmalıdır.

3.5. Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan hepatosellüler karsinoma hücre (HepG2) hattı kullanılmıştır. HepG2 hücre hattı epitel kökenli ve adheren hücre hattıdır. Hücreler, DMEM besiyeri içerisinde 75 cm²'lik hücre kültür plaklarına ekilerek, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında çoğaltılmıştır. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde uygun aralıklarla besiyeri değiştirilmiş, uygun zamanlarda pasajlanarak HepG2 hücreleri çoğaltılmıştır.

3.5.2. Altın Nanopartiküllerin Eldesi

Boyutları 45 – 65 nm arasında değişen Au NP, PEG ile kaplanmış Au NP, PEI2000 ve PEI25000 ile kaplanmış Au NP'leri Hacettepe Üniversitesi Temel Eczacılık Anabilim Dalı Laboratuvarlarında elde edilmiştir.

3.5.3. Çalışma Grupları

Tez çalışması kapsamında, HepG2 hücre hattında aşağıdaki çalışma grupları oluşturulmuştur (**Çizelge 3.1**).

Çizelge 3.1. Çalışma Grupları.

Test Maddesi	Doz	İnkübasyon Süresi
Kontrol	Herhangi bir maddeye maruz bırakılmamış hücreler	-
Altın Nanopartikül Grubu (Au) (Partikül çapı: 50 nm)	25 µg/ml*	24 saat
Polietilen glikol ile kaplanmış altın nanopartikül grubu (Au-PEG)	25 µg/ml*	24 saat
Polietilenimin 2000 ile kaplanmış altın nanopartikül grubu (Au-PEI 2000)	25 µg/ml*	24 saat
Polietilenimin 25000 ile kaplanmış altın nanopartikül grubu (Au-PEI 25000)	25 µg/ml*	24 saat

*MTT deneyi ile tayin edilen Au grubuna ait IC₃₀ dozları kullanılmıştır. IC₃₀, hücre canlılığında %30 inhibisyona neden olan konsantrasyonu ifade etmektedir.

3.5.4. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi

1. Flaskta tutunmuş HepG2 hücreleri üzerinden besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır.
2. Flaska tutunmuş hücreler 2 ml D-PBS çözeltisi ile ikişer kez yıkanmıştır.
3. Daha sonra, flaska 2 ml tripsin-EDTA eklenmiş, hücreler 2 – 4 dk inkübatörde tutulmuştur.
4. Işık mikroskopunda hücrelerin tutundukları yerden ayrılarak süspende oldukları kontrol edilmiştir.
5. Flask üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırılmıştır.
6. Steril Falkon tüpe 6 ml besiyeri eklenmiştir.

7. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler steril falkon tüpe aktarılmıştır, besi yeri 10 ml'ye tamamlanmıştır.
8. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 6 ml besiyeri ile süspand edilmiştir.
9. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak steril bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 50 µl tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek süspand edilmiştir.
10. Hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı üzerinde ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Neubauer hücre sayım lamının üst ve alt kısımlarında bulunan dört karenin kenar çizgileri üzerindeki hücreler hariç, karelerdeki hücreler soldan sağa ilerleyerek sayılmıştır. Sekiz ayrı kareden elde edilen hücre sayılarının ortalamaları alınmıştır ve ml'deki canlı hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

Toplam hücre/ml=Sayılan toplam hücre sayısı x (dilüsyon faktörü /*8) x 10.000 hücre/ml

*8: hücre sayım lamında sayılan kareler.

11. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, her bir kuyucukta 10.000 hücre/200 µl olacak şekilde seyreltilmiş, 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapılmıştır.
12. 48 saat inkübasyon süresince hücrelerin kuyucuklara tutunması ve çoğalması sağlanmıştır.

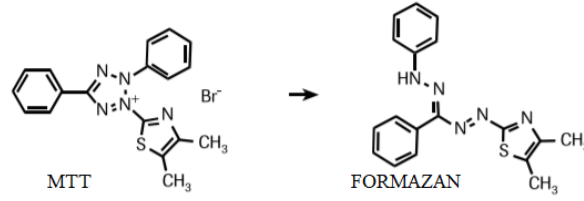
3.5.5. HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

3.5.5.1.Yöntemin Esası:

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür kullanılarak gerçekleştirilen, radyoaktif olmayan, kolorimetrik deney sistemi ilk olarak T.Mosmann tarafından gerçekleştirilmiştir. Test, radyoaktif izotoplar kullanmadan hücre büyümesi ve canlılığının spektrofotometrik olarak nicelendirilmesi için tasarlanmıştır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve besin öğeleri yanıt olarak hücre proliferasyonunun ölçümü için kullanılmaktadır. Aynı zamanda MTT, hücre aktivasyonu ve sitotoksitenin ölçümü için de kullanılmaktadır [75, 76].

Test, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkteki tetrazolyum tuzunu (MTT) kullanarak mor renge dönüştürmesi ve

gözlenen renk şiddetinin spektrofotometre ile ölçülmesine dayanır (**Şekil 3.1**). Hücresel indirgenme piridin nükleotid kofaktörleri NADH ve NADPH ile gerçekleşmektedir [77].



Şekil 3.1. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması [78].

3.5.5.2.Yöntemin Uygulanışı:

1. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml konsantrasyonlarda Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 ile 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Kontrol olarak test maddesi uygulanmayan HepG2 hücre hatları kullanılmıştır.
3. İnkübasyon süresi sonunda madde çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa hazırlanan MTT çözeltisinden (0,5mg/ml) 100 µl eklenmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 5 – 10 dk süre ile çalkalanmıştır.
5. Kuyucukların absorbans değerleri 570 nm’de ölçülmüştür.
6. MTT çözeltisinin ışık ile bozunmasını önlemek için deney karanlık ortamda yapılmıştır.
7. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiştir. IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.
8. Çalışma dört kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama alınarak hesaplanmıştır.

3.5.5.3.Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin canlılığı kontrole kıyasla % olarak hesap edilmiştir.

3.5.6. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

3.5.6.1.Yöntemin Esası:

Reaktif oksijen türleri (ROS), aerobik solunum sırasında oksijenin indirgenmesi ve hücre içindeki çeşitli enzimatik sistemlerin bir sonucu olarak üretilmektedir. Fizyolojik seviyelerde, ROS, hücre sinyalleme ve savunmaya katkıda bulunmaktadır. Biyolojik sistemin detoksifikasyon kapasitesinin üzerinde artmış ROS üretimi, oksidatif stres ve

hücrel hasar ile sonuçlanmaktadır. ROS, Alzheimer, Parkinson, kanser ve yaşlanma gibi hastalık durumlarıyla ilişkilendirilmektedir [79].

Yöntemin esası floresan olmayan bir prob olan 5-(ve 6-) klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H2DCFDA)'ın canlı hücreler tarafından yeşil-floresans veren 2',7'-diklorofloresein (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi ve oluşan floresans şiddetinin ölçülmesine ($\lambda_{ex}=640$ nm, $\lambda_{em}=675$ nm) dayanmaktadır [79].

Florometrik Hücre içi ROS Kiti, 1 saatlik inkübasyondan sonra canlı hücrelerdeki hücre içi ROS (özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri) düzeylerini tespit etmek için hassas, tek aşamalı bir florometrik analiz sağlamaktadır. ROS, sitoplazma içinde bulunan florojenik bir sensörle reaksiyona girerek mevcut ROS miktarıyla orantılı florometrik bir ürün oluşturur.

3.5.6.2.Yöntemin Uygulanışı:

1. Bütün reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. 500X ROS tayin reaktif çözeltisi kit içinde yer alan ROS tayin reaktifi ile 40 μ l DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır.
3. 96 kuyucuklu siyah hücre kültür plağına HepG2 hücre örnekleri 90 μ l fosfat tamponlu salin (PBS) içinde olacak şekilde eklenmiştir. IC₃₀ konsantrasyonlarının 10 katı olacak şekilde Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 test maddeleri hazırlanmış ve her kuyucuğa 10 μ l eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına (test maddesi içermeyen HepG2 hücreleri) 10 μ l PBS eklenmiştir.
4. Hücre kültür plağı 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
5. Master reaksiyon karışımı (20 μ l 500X ROS tayin reaktifi ve 10 μ l deney tamponu içeren karışım) hazırlanmıştır. Karışım tek bir hücre kültür plağı için yeterlidir.
6. 100 μ l/kuyucuk olacak şekilde master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
7. Hücre kültür plağı 30 dakika – 1 saat aralığında inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
8. Kuyucukların floresansı ($\lambda_{ex}=640$ nm, $\lambda_{em}=675$ nm) ölçülmüştür.

3.5.6.3. ROS Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin ürettiği hücre içi ROS miktarı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin ürettiği ROS miktarı kontrole kıyasla % olarak hesaplanarak belirlenmiştir.

3.5.7. HepG2 Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması

Konflüent hale gelmiş flasklara IC₃₀ dozunda test maddesi uygulanarak 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda flasklara tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin

tutundukları yerden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücelere besi yeri eklenmiştir.

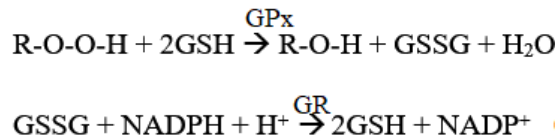
Lize etme işlemi hücre liziz tampon çözeltisi ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak yapılmıştır. Proteaz inhibitör kokteyli 100 ml liziz tampon çözeltisi içerisinde 1 ml proteaz inhibitörü içerecek şekilde hazırlanmıştır. Proteaz inhibitörü -20°C’de saklanmış, liziz tampon çözeltisi ise 4°C’de saklanmıştır.

Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 içeren her bir hücre grubuna 400 µl liziz tamponu eklenmiş takiben; hücre süspansiyonları iki gruba ayrılmış, ilk grup 3500 devir/dak hızda 15 dakika ikinci grup 13000 devir/dak hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar toplanarak -80°C’de saklanmıştır.

3.5.8. Glutatyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü

3.5.8.1.Yöntemin Esası

Yöntem GPx aktivitesini, GR ile gerçekleşen reaksiyon varlığında ölçmektedir. Hidroperoksitin GPx ile indirgenmesi sonucu oluşan okside GSSG, GR ve NADPH ile indirgenmiş durumuna geri döndürülmektedir. NADPH’ın NADP⁺’ye oksidasyonu, absorbansta azalma ile sonuçlanmaktadır ve absorbansta meydana gelen azalma ölçülmektedir. Bir ünite GPx dakikada 1 nmol NADPH’ı NADP’ye dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [80, 81].



3.5.8.2.Yöntemin Uygulanışı

1. Enzimatik olmayan kuyucuklar (3 kuyucuk): 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol kuyucukları (3 kuyucuk): 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 20 µl dilüe edilmiş GPx (kontrol) eklenmiştir.
3. Örnek kuyucukları: 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 25 µg/ml konsantrasyona sahip Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 içeren HepG2 hücre örneklerinden 20 µl belirlenen kuyucuklara eklenmiştir.
4. Kullanılan bütün kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Hücre kültür plağı birkaç saniye çalkalanarak reaktifin karışması sağlanmıştır.

5. En az 5 zaman noktası elde etmek koşulu ile spektrofotometre aracılığıyla 340 nm'de dakikada bir kez olmak üzere 5 dakika boyunca absorbanstaki azalma ölçülmüştür.

3.5.8.3. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Hesaplanması

Dakika başına absorbans değişiklikleri (ΔA_{340}) hesaplanarak, absorbans değerleri zamanın bir fonksiyonu olacak şekilde grafik çizdirilmiştir.

Enzimatik olmayan örneklerin dakika başına absorbans değerleri ile örneklerin absorbans değerleri arasındaki fark bulunmuştur. Aşağıdaki formül kullanılarak GPx aktivitesi hesaplanmıştır.

GPx aktivitesi (nmol/min/ml) = ($\Delta A_{340} / 0,00373 * \mu/M^{-1}$) x dilüsyon faktörü

*NADPH ekstinksiyon katsayısı

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{örnek}}} \times d_{\text{örnek}}$$

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi (0,19 ml)

$V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1)

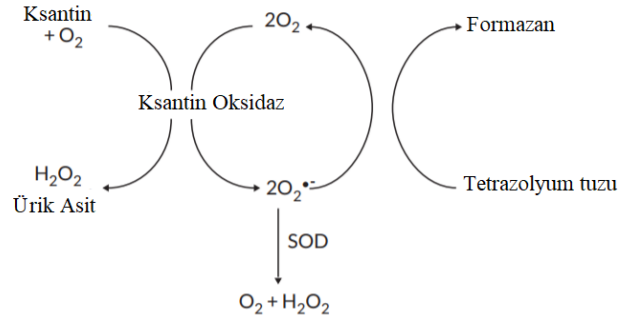
Spesifik Enzim Aktivitesi (nmol/min/mg protein) = GPx aktivitesi / protein (mg/ml)

3.5.9. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

3.5.9.1. Yöntemin Esası

SOD kiti, ksantin oksidaz ve hipoksantin ile üretilen süperoksit radikallerini tespit etmek için tetrazolyum tuzu kullanmaktadır ve üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve FeSOD) ölçülebilmektedir.

Total SOD aktivitesi ölçüm yöntemi, ksantin oksidazın ksantini ürik aside dönüştürürken oluşturduğu $O_2^{\cdot-}$ iyonunun SOD ile dismutasyonu esnasında ortama eklenen WST-1 formazan (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) maddesinin WST1'ye dönüşmesinin ölçülmesinde ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik bir yöntemle ölçülmesi esasına dayanmaktadır (**Şekil 3.2**) [82].



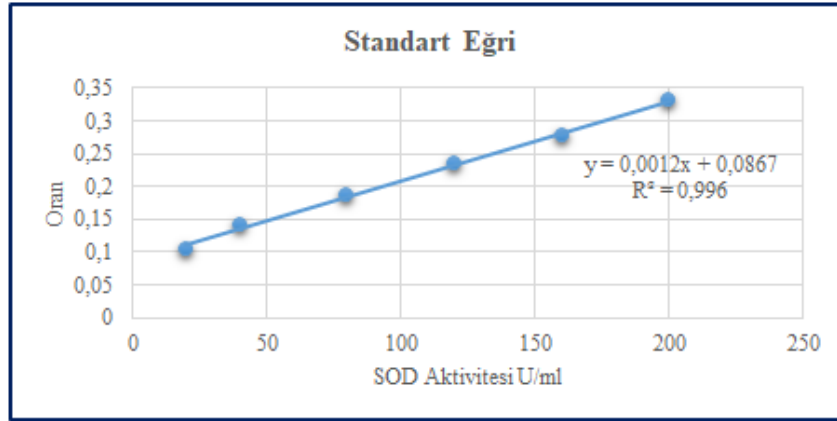
Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz ölçümü reaksiyon şeması [83].

3.5.9.2.Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara 200 µl dilüe edilmiş radikal detektörü ve 10 µl SOD standardı veya Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 içeren HepG2 hücre lizatlarından eklenmiştir.
2. Ksantin oksidaz (20 µl) eklenerek reaksiyon başlatılmış, birkaç saniye hücre kültür plağı çalkalanmıştır.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Örneklerin absorbans değerleri 460 nm’de ölçülmüştür.

3.5.9.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması

Kör, standart ve tüm örnekler için ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Köre ait absorbans değerinin kendisine ve standartların absorbans değerlerine bölünmesi ile elde edilen oran, standartların içerdiği SOD aktivitesine karşı grafiğe geçilerek “standart eğri” elde edilmiştir (Şekil 3.3). Bu standart eğriden hareketle, örnekler için SOD aktiviteleri belirlenmiş; dilüsyon faktörü ve protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanmıştır. Süperoksit radikallerinin %50’sininin dismutasyonu için gerekli olan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.3. Süperoksit Dismutaz Standart Eğrisi.

$$\text{Spesifik Aktivite (U / mg protein)} = \frac{\text{SOD (U/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{örnek}}} \times d_{\text{örnek}}$$

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi (0,23 ml)

$V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,01 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1)

3.5.10. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

3.5.10.1. Yöntemin Esası

Yöntem, hidrojen peroksit substratının CAT ile enzimatik olarak tepkimeye girmesi ve sonucunda oluşan formaldehitin, kromojen (4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol; purpald) ile renkli bir bileşik oluşturması ve oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır [84]. 1 ünite enzim 25°C’de, 1 dakikada 1 nmol formaldehit oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

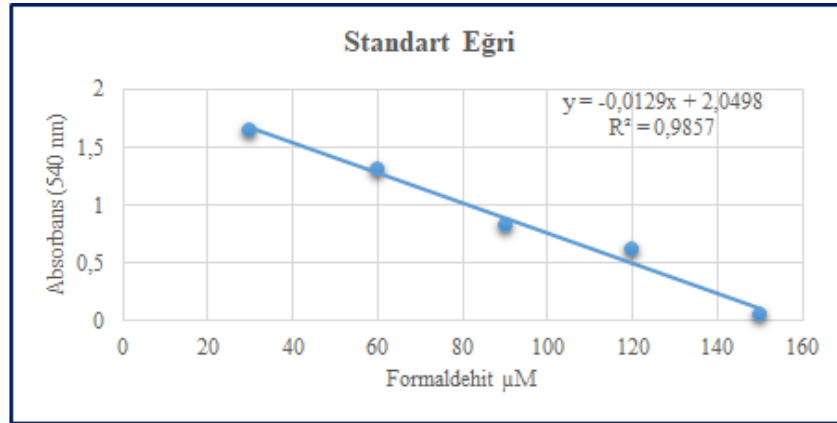
3.5.10.2. Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl seyreltilmiş deney tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl formaldehit standardı veya Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 içeren HepG2 hücre lizatları ilgili kuyucuklara eklenmiştir.
2. Tüm kuyucuklara 20 µl seyreltilmiş H₂O₂, reaksiyonun başlama zamanına dikkat edilerek hızlı bir şekilde eklenmiştir.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 20 dakika inkübe edilmiştir.
4. Tüm kuyucuklara reaksiyonu sonlandırmak üzere 30 µl potasyum hidroksit eklenmiş, ardından 30 µl katalaz purpald eklenmiştir.

5. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Kullanılan bütün kuyucuklara 10 µl potasyum periyodat eklenmiş, hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Örneklerin absorbens değerleri 540 nm'de ölçülmüştür.

3.5.10.3. Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

Formaldehit standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucunda elde edilen absorbens değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.4) formaldehit konsantrasyonları (µM) hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Formaldehit Standart Eğrisi.

CAT aktivitesi, formaldehit konsantrasyonu, tepkimenin izlenme süresi ve dilüsyon faktörü kullanılarak hesaplanmıştır; protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite belirlenmiştir.

$$\text{CAT Aktivitesi (nmol/dk/ml)} = \frac{\text{Formaldehit } (\mu\text{M})}{20 \text{ dk}} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{örnek}}} \times d_{\text{örnek}}$$

V_{final} = Kuyucuğun nihai hacmi (0,17 ml)

$V_{\text{örnek}}$ = Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (9)

$$\text{Spesifik Aktivite (nmol/mg protein)} = \frac{\text{Aktivite (nmol/dk/ml)}}{\text{mg protein/ml}}$$

3.5.11. Protein Oksidasyonunun Belirlenmesi

3.5.11.1. Yöntemin Esası

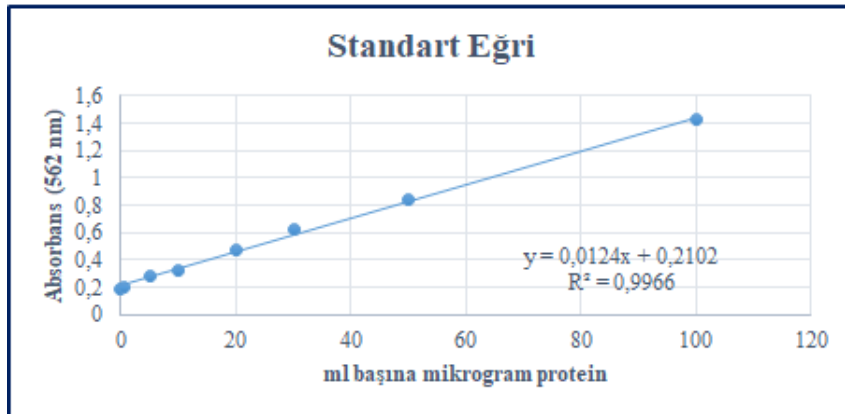
Bişikoninik asit (BCA) deneyinin esası, alkali koşullar altında Cu^{+2} – protein kompleksinin oluşumuna, ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Sistein, sistin, triptofan, tirozin ve peptid bağlarının Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeyebildiği gösterilmiştir. BCA, alkali ortamlarda Cu^{+1} ile mavi – mor renkli kompleks oluşturmakta ve böylece proteinler ile alkali Cu^{+2} indirgenmesi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir [85].

3.5.11.2. Yöntemin Uygulanışı

1. Hücre lizatları 1/100 oranında seyreltilmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol HepG2 hücre lizatları ve Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 10 μl eklenmiştir.
3. 7 ml QA tamponu, 7 ml QB tamponu ve 280 μl bakır (II) Sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanmış ve bu çalışma çözeltisi (150 μl) kuyucuklara eklenmiştir.
4. Plak, çalkalayıcıda 15 dakika ve takiben karbondioksit etüvde (37°C) 2 saat inkübe edilmiştir.
5. Örneklerin absorbans değerleri 562 nm'de ölçülmüştür.

3.5.11.3. Protein Miktarının Hesaplanması

Kör çözeltiliye ait absorbansın protein standartları ve örneklerin absorbansından çıkarılması ile net absorbans ($\lambda=562$ nm) bulunmuştur. Net absorbansa karşı protein standart konsantrasyonları çizdirilerek standart eğri (Şekil 3.5) oluşturulmuş, protein miktarları hesaplanmış ve dilüsyon faktörü ile çarpılmıştır.

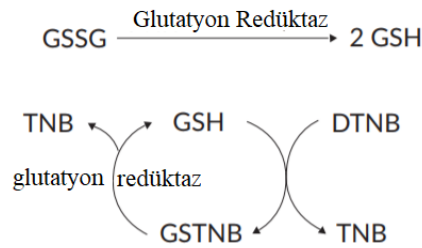


Şekil 3.5. Protein Mikrogramlarına Karşı Absorbans Eğrisi.

3.5.12. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.5.12.1. Yöntemin Esası

Yöntem, DTNB'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo- 2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Üretilen disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir (**Şekil 3.6**). Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorbansının ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir [86].



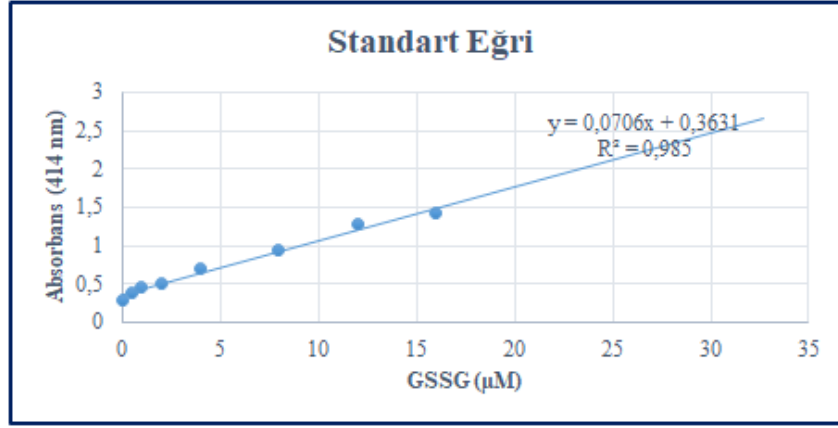
Şekil 3.6. GSH döngüsü [86].

3.5.12.2. Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisi eklenmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol HepG2 hücre lizatları ve Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 ile muamele edilmiş HepG2 hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. Deney kokteyli, 20 ml'lik vialde, MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1 ml), distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. Kuyucuklara taze olarak hazırlanmış deney kokteylinde 150 µl eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika inkübe edilmiştir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 414 nm'de ölçülmüştür.

3.5.12.3. Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması

GSSG standartlarının konsantrasyonlarına karşı standartlara ait absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (**Şekil 3.7**) örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

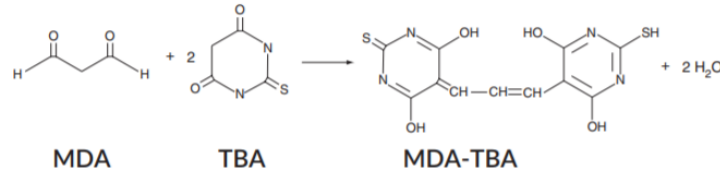


Şekil 3.7. GSSG Standart Eğrisi (414 nm).

3.5.13. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

3.5.13.1. Yöntemin Esası

Malondialdehit, lipit peroksidasyonunun doğal olarak meydana gelen ürünüdür. Yöntem, malondialdehit ve tiyobarbitürik asidin yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin kolorimetrik veya florometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.8) [87].



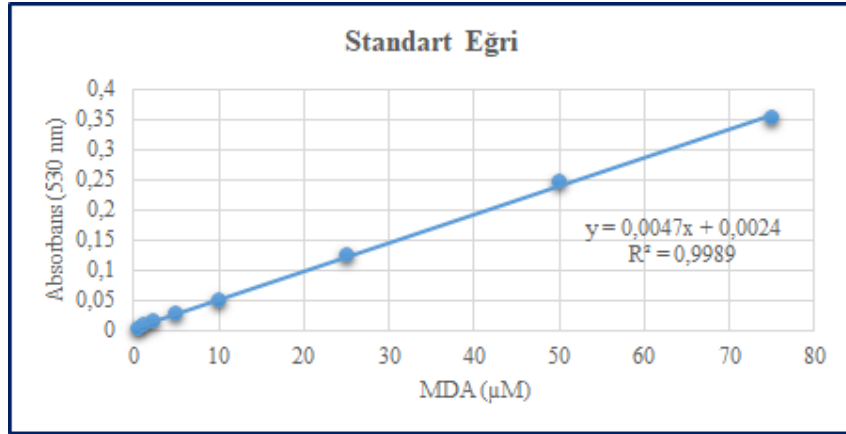
Şekil 3.8. MDA-TBA kompleksinin oluşumu [87].

3.5.13.2. Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl seyreltilmiş standart çözeltisi veya hücre lizatları 5ml'lik cam tüplere eklenmiş ve her tüpe 100 µl SDS çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılmıştır.
2. Her cam tüpe 4 ml renk reaktifi eklenerek karıştırılmıştır.
3. Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletilmiştir. Bir saat sonunda cam tüpler kaynayan sudan hızlıca alınarak buzda 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
4. Tüpler 3500 devir/dak 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
5. Tüplerden 150 µl alınarak hücre kültür plağına eklenmiştir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 530 nm'de ölçülmüştür.

3.5.13.3. MDA Düzeylerinin Hesaplanması

Her standart ve örneğin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 µM standardı kendi absorbans değerinden ve diğer absorbans değerlerinden (standartlar) çıkartılarak doğru absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu değerler MDA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizdirilmiş, standart eğri (Şekil 3.9) elde edilmiş, MDA düzeyleri µM cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.9. MDA standart eğrisi (530 nm).

3.5.14. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü

3.5.14.1. Yöntemin Esası

Protein oksidasyonunun en genel göstergesi protein karbonilleridir. Fe⁺² ve Cu⁺² gibi redoks döngüsü katyonları, proteinler üzerindeki katyon bağlama bölgelerine bağlanmakta ve H₂O₂ veya O₂'nin yardımı ile birkaç aminoasidin yan zincir amin gruplarını karbonillere dönüştürülmektedir. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ve protein karbonilleri arasındaki reaksiyon sonucu spektrofotometrik olarak analiz edilebilen hidrazon oluşmaktadır [88].

3.5.14.2. Yöntemin Uygulanışı

1. 200 µl standart, 200 µl hücre lizat veya 200 µl kontrol grupları hazırlanmıştır.
2. Örnek gruplarına 800 µl DNPH, kontrol gruplarına ise 800 µl HCl (2,5 M) eklenmiştir.
3. Örnek ve kontrol grupları oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince, her 15 dakikada bir örnek ve kontrol tüplerine vorteks uygulanmıştır.

4. Tüplere %20'lik TCA (1 ml) eklenmiş, tüpler vortekslenmiş ve buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
6. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml TCA (%10) ile süspand edilmiştir. Takiben tüpler buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
8. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml (1:1) etanol/etil asetat karışımı ile süspand edilmiştir. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır.
9. Protein pelletleri 500 µl guanidin hidroklorit ile süspand edilmiştir.
10. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
11. Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir.
12. Örneklerin absorbans değerleri 360 nm'de ölçülmüştür.

3.5.14.3. Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol gruplarının absorbans değerleri ile örnek gruplarının absorbans değerleri arasındaki fark hesaplanmıştır (CA). Aşağıdaki formül ile karbonil konsantrasyonları nmol/ml cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(CA) / (0,011 \mu\text{M}^{-1})] \times (500 \mu\text{l} / 200 \mu\text{l})$$

*DNPH 370 nm'deki ekstinksiyon katsayısı $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dir. Bu değer kuyucuktaki çözeltiye da bağlı olan yol uzunluğu da hesaba katılarak yeniden hesaplanmıştır.

Daha sonra karbonil düzeyleri nmol/mg cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Karbonil (nmol/mg)} = [\text{Protein Karbonil (nmol/ml)}] / \text{protein (mg/ml)}$$

3.5.15. DNA İzolasyonu

3.5.15.1. Yöntemin Esası

DNA izolasyonu, çeşitli biyolojik örnek kaynaklarından DNA'nın (genomik, mitokondriyal, viral) izolasyonunu sağlayan "Quick-DNA™ Miniprep" kiti ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.15.2. Yöntemin Uygulanışı

1. Hücreler 25 µg/ml konsantrasyonda Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 ile 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak test maddesi uygulanmayan HepG2 hücre hatları kullanılmıştır.

2. Flaskta tutunmuş HepG2 hücreleri üzerinden besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırılmış, hücreler D-PBS ile yıkanmış ve daha sonra, flaska 2 ml tripsin-EDTA eklenmiş, hücreler 2 – 4 dk inkübatörde tutulmuştur.
3. Işık mikroskopunda hücrelerin tutundukları yerden ayrılarak süspande oldukları kontrol edilmiştir.
4. Flask üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi ortadan kaldırılmış ve hücreler steril falcon tüplere aktarılmıştır.
5. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile süspande edilmiş ve ependorflara ayrılmıştır.
6. Hücre süspansiyonu 1500 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmış ve örnekler (Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 içeren HepG2 hücreleri ve kontrol HepG2 hücreleri) 500 µl genomik lizis tampon çözeltisi eklenmiştir.
8. Örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1500 devir/dak hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatantlar (400 µl) tüp içerisindeki deney kiti kolonlarına alınmış, 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Tüpler yenileri ile değiştirilerek 200 µl DNA ön yıkama tamponu örnekler eklenmiş ve örnekler 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Örnek kolonlarına 500 µl g-DNA yıkama tamponu eklenmiş, 15000 devir/dak hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj sonrası örnek kolonları temiz tüplere alınmış ve örnek kolonlarına 125 µl DNA elüsyon tampon çözeltisi eklenmiştir. Örnekler 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından 15000 devir/dak hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir.
13. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatantlar (125 µl) ependorflara alınmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.5.16. DNA Baz Hasarının Belirlenmesi

3.5.16.1. Yöntemin Esası

DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklı doku, serum, plazma ve idrarda 8-hidroksi-2'deoksiguanin (8-OHdG) oluşumunun ELISA ile ölçümü esasına dayanmaktadır. 8-

OHdG, DNA onarımı sırasında üretilmektedir ve ölçümü yaşlanma, kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak yararlı olabilir [89].

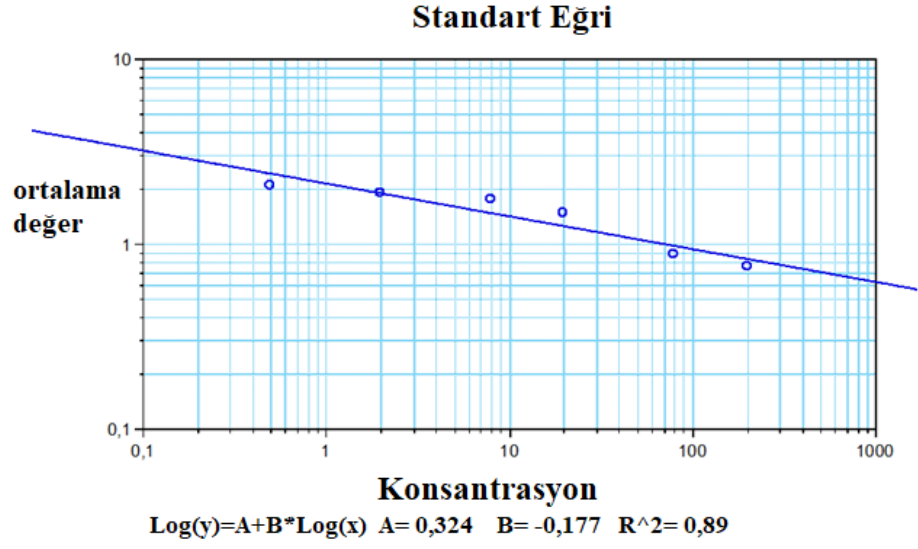
8 – OHdG – EIA™ Kiti 8-OHdG monoklonal antikoru ve örnek veya standartların 8-OHdG'lere bağlanma özelliğinden yararlanarak 8-OHdG tayini yapmaktadır. Standart veya örnekteki 8-OHdG'lere bağlanmış antikörlerin yıkanması ile sadece sabit 8-OHdG'ler ortamda kalmaktadır. Sabit 8-OHdG'leri belirlemek için ikinci bir antikör daha eklenmekte, bu antikör ortamda kalan monoklonal antikörlere bağlanmaktadır. Tekrar yıkama işleminden sonra kromojen eklenmesi ortamdaki antikör miktarı oranına göre renk değişimine neden olmaktadır. Renk reaksiyonu sonlandırıldıktan sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmaktadır [89].

3.5.16.2. Yöntemin Uygulanışı

1. Primer antikör, primer antikör seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
2. 50 µl standart çözeltisi veya kontrol HepG2 hücreleri, Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 içeren HepG2 hücreleri kuyucuklara eklenmiştir.
3. Kör dışında bütün kuyucuklara seyreltilmiş 50 µl primer antikör çözeltisi eklenmiş, hücre kültür plağı 1 saat boyunca inkübatörde (37°) bekletilmiştir.
4. Kültür plağı içindekiler dökülmüş, 250 µl yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
5. Sekonder antikör, sekonder antikör seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
6. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikör çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, hücre kültür plağı 1 saat boyunca inkübatörde (37°) bekletilmiştir.
7. Kromojen (1X) kromojen seyreltme tamponu (99X) ile seyreltilmiştir. 100 µl seyreltilmiş kromojen çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, hücre kültür plağı 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. 100 µl durdurma çözeltisi eklenmiş, 3 dakika beklemeden sonra örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

3.5.16.3. DNA Hasarı Hesaplanması

DNA hasarı, Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri uydurma algoritmalarından log-log algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.10). Sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.10. 8-OHdG Standart Eğrisi

4. BULGULAR

4.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan Au NP'lerin ortalama çap, Polidispersite İndeksi (PdI) ve zeta potansiyel ölçümleri için Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) kullanılmıştır. Ölçülen ortalama çap, PdI ve zeta potansiyelleri **Çizelge 4.1**'de ve örneklerin TEM görüntüleri **Şekil 4.1**'de verilmiştir. Her örnek için ardarda üç ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Altın Nanopartiküllerin Hidrodinamik Ortalama Çapı, Polidispersite İndeksi (PdI) ve Zeta Potansiyeli.

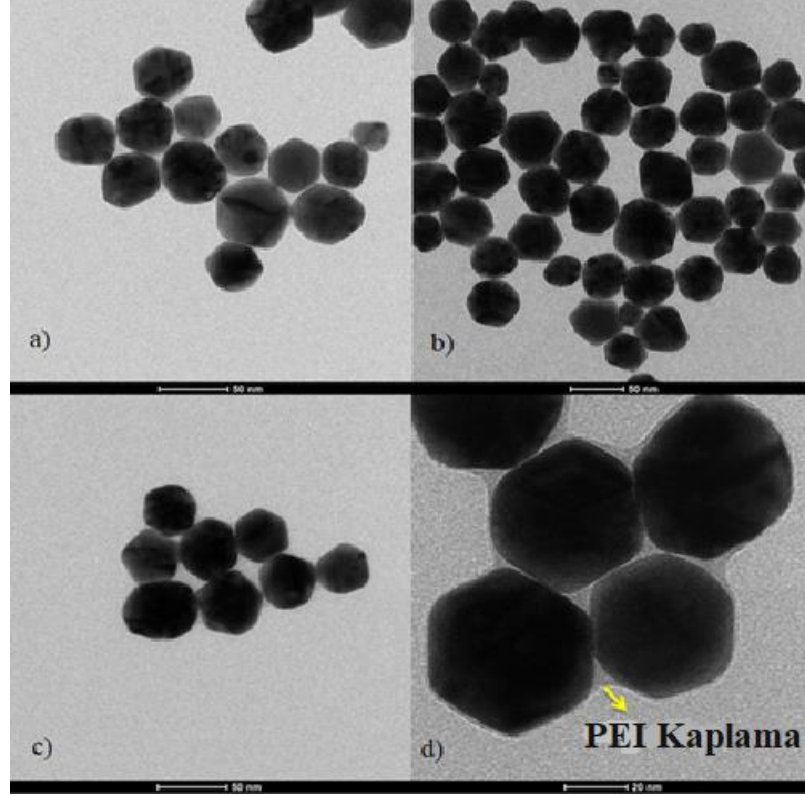
Örnek	Çap (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
Au	45,14 ± 1,3 nm	0,07	-36,6 ± 1,21
Au-PEG	65,6 ± 0,8 nm	0,04	-10,7 ± 0,8
Au-PEI 2000	55,28 ± 0,6 nm	0,06	+40,9 ± 1,44
Au-PEI 25000	58,03 ± 0,74 nm	0,1	+43,7 ± 1,28

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

Au NP'lerin büyüklüğü 45,14 ± 1,3 nm, Au-PEG NP'lerin büyüklüğü 65,6 ± 0,8 nm, Au-PEI 2000 NP'lerin büyüklüğü 55,28 ± 0,6 nm ve Au-PEI 25000 NP'lerin büyüklüğü 58,03 ± 0,74 nm olarak bulunmuştur. En yüksek partikül boyutu Au-PEG grubunda, en düşük partikül boyutu Au grubunda gözlenmiştir.

Polidispersite sonuçları tüm partiküllerde boyutlardaki sapmanın düşük olduğunu, Au NP'lerin yaklaşık olarak aynı boyutlarda olduğunu göstermiştir. .

Partiküllerin zeta potansiyelleri -10,7 ± 0,8 mV ile +43,7 ± 1,28 mV arasında değişmektedir. PEI'nin pozitif yüke sahip olması sebebiyle Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 zeta potansiyel (yüzey yükü) değerleri pozitif yönde artış göstermiştir. PEG polimer ile kaplama sonucunda zeta potansiyeli sıfıra yaklaşmıştır.



Şekil 4.1. Altın Nanopartiküllerin TEM görüntüleri
[a) Au NP, b) Au- PEG NP, c) Au-PEI 2000 NP, d) Au-PEI 25000 NP].

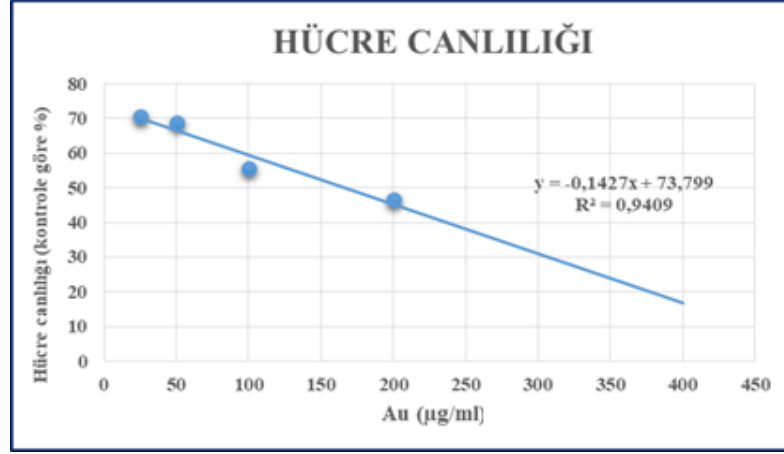
4.2. MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Au, Au-PEG, Au-PEI2000, Au-25000'lerinin 0 – 400 µg/ml konsantrasyon aralığında HepG2 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası, MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri **Çizelge 4.2**, **Şekil 4.2**, **Şekil 4.3**, **Şekil 4.4** ve **Şekil 4.5**'te verilmiştir. Sitotoksite deneyleri, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrar ile yapılmıştır. Hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC₅₀) değerleri ile %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC₃₀) değerleri hesaplanmıştır (**Çizelge 4.3**). IC₅₀ değerleri sırasıyla Au, Au-PEG, Au-PEI 2000 için 167 µg/ml, 257 µg/ml ve 198 µg/ml olarak belirlenmiştir.

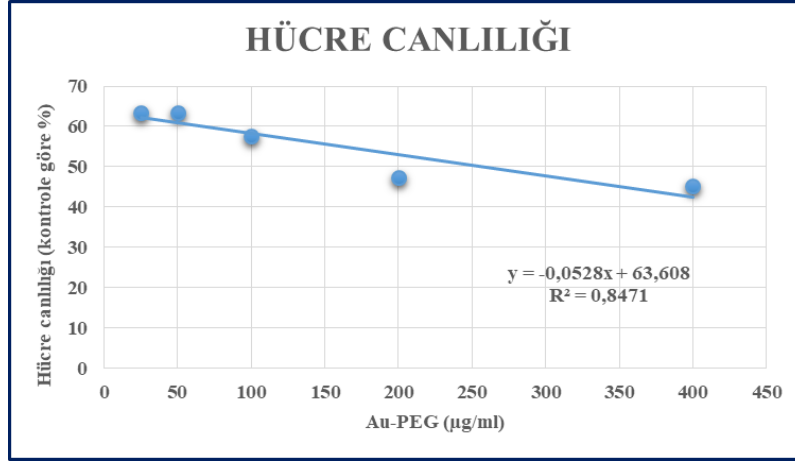
Çizelge 4.2. Çalışma gruplarında hücre canlılığı.

	Çalışma Grupları	Hücre Canlılığı (%)
1	Kontrol (HepG2)	100
2	25 µg/ml Au	70,63±9,07
3	50 µg/ml Au	68,86±10,99
4	100 µg/ml Au	55,52±8,52
5	200 µg/ml Au	46,66±5,74
6	400 µg/ml Au	42,46±5,85
7	25 µg/ml Au-PEG	63,50±5,41
8	50 µg/ml Au-PEG	63,50±7,96
9	100 µg/ml Au-PEG	57,62±6,88
10	200 µg/ml Au-PEG	47,43±5,14
11	400 µg/ml Au-PEG	45,10±8,14
12	25 µg/ml Au-PEI2000	72,78±12,70
13	50 µg/ml Au-PEI2000	73,56±9,34
14	100 µg/ml Au-PEI2000	54,40±6,09
15	200 µg/ml Au-PEI2000	42,17±7,71
16	400 µg/ml Au-PEI2000	31,69±7,87
17	25 µg/ml Au-PEI25000	20,45±2,91
18	50 µg/ml Au-PEI25000	15,35±0,98
19	100 µg/ml Au-PEI25000	14,86±2,75
20	200 µg/ml Au-PEI25000	19,22±2,78
21	400 µg/ml Au-PEI25000	20,44±0,10

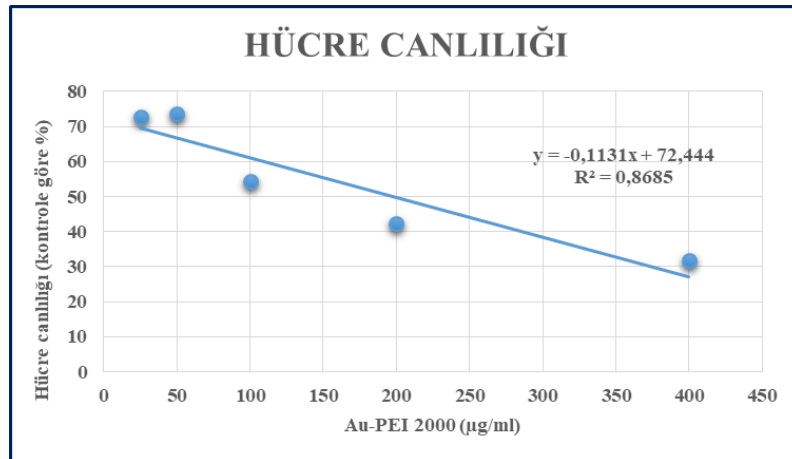
Sonuçlar, üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; ortalama ±SS olarak verilmiştir.



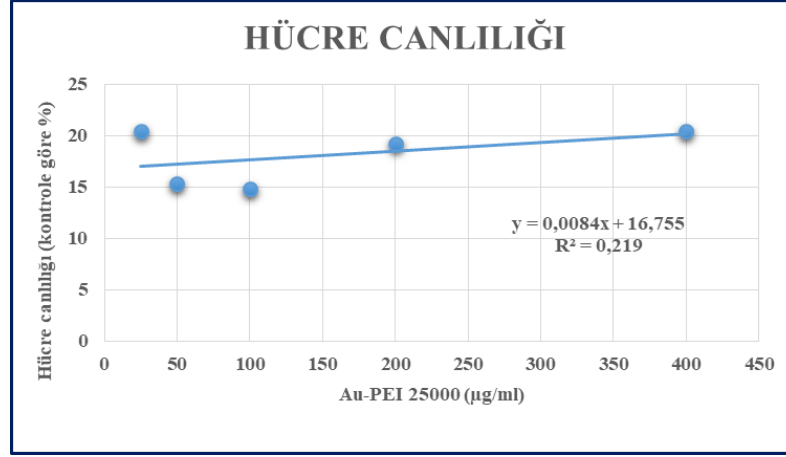
Şekil 4.2. HepG2 hücre canlılığı üzerinde Au NP'lerin 25 – 400 µg/ml konsantrasyon aralığında etkisi.



Şekil 4.3. HepG2 hücre canlılığı üzerinde Au-PEG'lerin 25 – 400 µg/ml konsantrasyon aralığında etkisi.



Şekil 4.4. HepG2 hücre canlılığı üzerinde Au-PEI2000'lerin 25 – 400 µg/ml konsantrasyon aralığında etkisi.



Şekil 4.5. HepG2 hücre canlılığı üzerinde Au-PEI25000'lerin 25 – 400 µg/ml konsantrasyon aralığında etkisi.

Çizelge 4.3. Çalışma Gruplarının IC₃₀ ve IC₅₀ Değerleri.

Çalışma Grupları	Au	Au-PEG	Au-PEI2000
IC ₃₀ (µg/ml)	26,62	68,33	21,61
IC ₅₀ (µg/ml)	166,77	257,73	198,44

Au-PEI25000 grubunda uygulanan en düşük konsantrasyonda bile hücre canlılığı kontrole göre %20,44'ü geçmediği için bu gruba ait değerler çizelgeye eklenmemiştir.

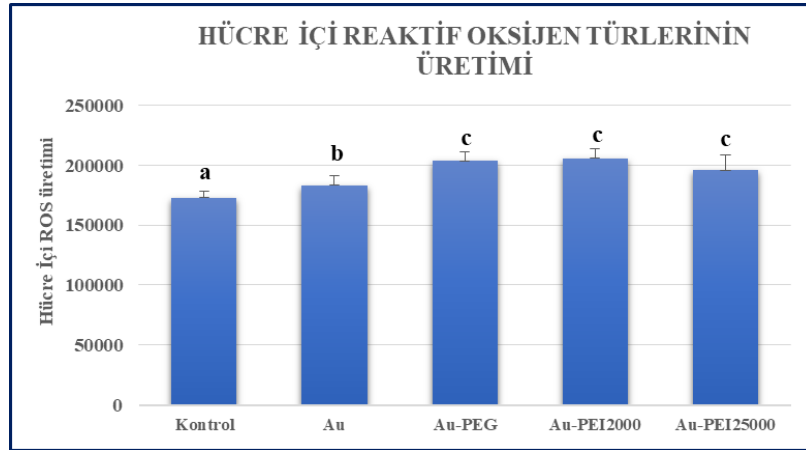
4.3. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar
Çalışma gruplarında tayin edilen intrasellüler ROS üretimi **Çizelge 4.4** ve **Şekil 4.6**'te verilmiştir. Au, Au-PEG, Au-PEI2000 ve Au-PEI25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen sırasıyla %6,02, %17,91, %18,96 ve %13,23 artışın istatistiksel olarak ($p < 0,05$) önemli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışma Gruplarında Hücre İçi ROS Üretimi.

Çalışma Grupları	ROS üretimi*
Kontrol	%100 ^a
Au	%106,01 ^b
Au-PEG	%117,91 ^c
Au-PEI 2000	%188,96 ^c
Au-PEI 25000	%113,23 ^c

*Kontrole göre % olarak ifade edilmiştir.

Au-PEI25000 grubunda beklenen hücre içi ROS artışının gözlenememe nedeni, uygulama ile hücre sayısındaki azalma ve bunu takiben de ROS üretiminde azalma olarak değerlendirilebilir.



Şekil 4.6. Çalışma Gruplarında Hücre İçi ROS Üretimi.

4.4. Glutatyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Çalışma gruplarında tayin edilen GPx aktiviteleri **Çizelge 4.5** ve **Şekil 4.7**'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde GPX aktivitesi $14,67 \pm 3,57$ nmol/min/mg protein; Au grubunda $17,39 \pm 3,97$ nmol/min/mg protein, Au-PEG grubunda $16,34 \pm 1,42$ nmol/min/mg protein, Au-PEI 2000 grubunda $26,66 \pm 4,27$ nmol/min/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $32,96 \pm 4,57$ nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu ve Au-PEG grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken; Au-PEI2000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %81,72 artışın ve Au-PEI25000 grubunda gözlenen %124,60 artışın istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) olduğu belirlenmiştir. Au

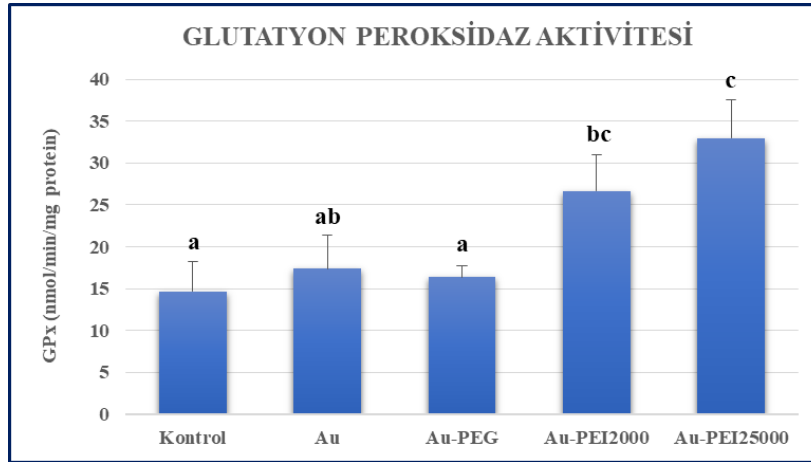
grubuna kıyasla sadece Au-PEI 25000 grubunda gözlenen %89,56 oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Au-PEI 2000 grubunda GPx aktivitesinde Au grubuna göre gözlenen %53,3 düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.5. Çalışma Gruplarında GPx Aktivitesi.

Çalışma Grupları	GPX aktivitesi (nmol/min/mg protein)
Kontrol	14,67±3,57 ^a
Au	17,39± 3,97 ^{ab}
Au-PEG	16,34±1,42 ^a
Au-PEI 2000	26,66± 4,27 ^{bc}
Au-PEI 25000	32,96± 4,57 ^c

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.7. Çalışma Gruplarında GPx Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

a, b Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.5. SOD Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Çalışma gruplarında tayin edilen SOD aktiviteleri **Çizelge 4.6** ve **Şekil 4.8**'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde SOD aktivitesi 213,81±29,96 U/mg protein; Au grubunda 229,36±27,81 U/mg protein, Au-PEG grubunda 236,56±23,69 U/mg protein,

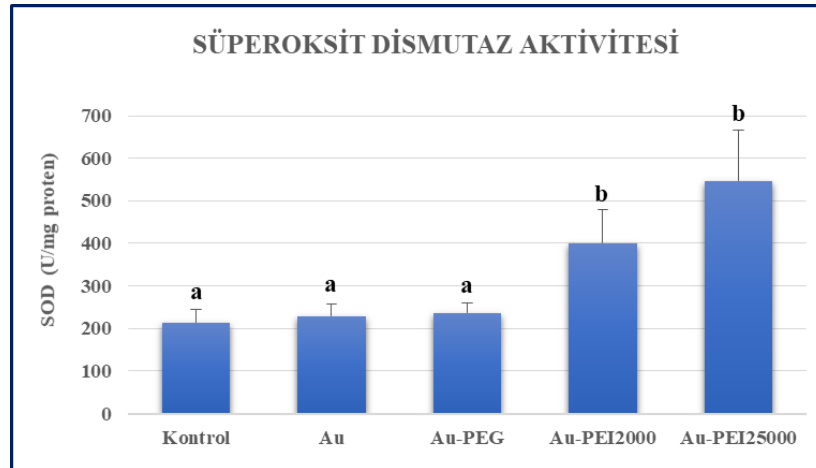
Au-PEI 2000 grubunda $401,25 \pm 76,94$ U/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $547,44 \pm 117,49$ U/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu ve Au-PEG grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı; Au-PEI2000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %87,67 artışın ve Au-PEI25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %156,04 artışın istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Au grubuna kıyasla Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 gruplarında gözlenen GPx aktivitesindeki artışlar (sırasıyla %74,94 ve % 38,68) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Çalışma Gruplarında SOD Aktivitesi

Çalışma Grupları	SOD aktivitesi (U/mg protein)
Kontrol	$213,81 \pm 29,96^a$
Au	$229,36 \pm 27,81^a$
Au-PEG	$236,56 \pm 23,69^a$
Au- PEI 2000	$401,25 \pm 76,94^b$
Au-PEI 25000	$547,44 \pm 117,49^b$

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.8. Çalışma Gruplarında SOD Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

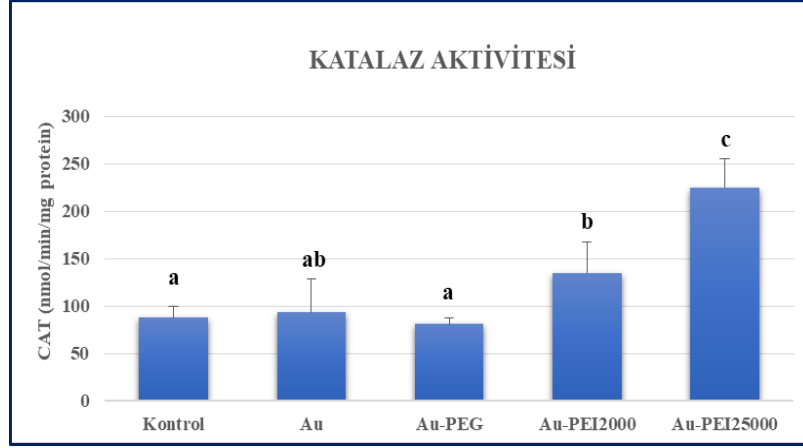
Çalışma gruplarında tayin edilen CAT aktiviteleri **Çizelge 4.7** ve **Şekil 4.9**'da verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde CAT aktivitesi $87,96 \pm 11,91$ nmol/min/mg protein; Au grubunda $93,29 \pm 35,21$ nmol/min/mg protein, Au-PEG grubunda $80,85 \pm 6,63$ nmol/min/mg protein, Au-PEI 2000 grubunda $134,72 \pm 32,20$ nmol/min/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $224,98 \pm 29,87$ nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu ve Au-PEG grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olmadığı; Au-PEI2000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %53,16 artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ve Au-PEI25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %155,78 artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Au grubuna kıyasla Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 gruplarında gözlenen CAT aktivitesindeki artışlar (sırasıyla %44,41 ve %141,71) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Ayrıca Au-PEI 25000 grubunda gözlenen CAT aktivitesindeki artışın Au-PEI 2000 grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Çalışma Gruplarında CAT Aktivitesi

Çalışma Grupları	CAT aktivitesi (nmol/min/mg protein)
Kontrol	$87,96 \pm 11,91^a$
Au	$93,29 \pm 35,21^{ab}$
Au-PEG	$80,85 \pm 6,63^a$
Au- PEI 2000	$134,72 \pm 32,20^b$
Au-PEI 25000	$224,98 \pm 29,87^c$

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.9. Çalışma Gruplarında CAT Aktivitesi.

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.7. Lipit Peroksidasyonu Ölçümleri

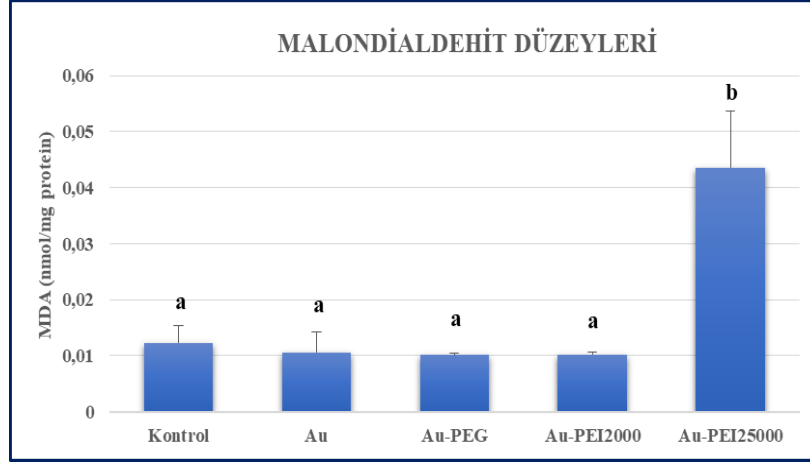
Çalışma gruplarında tayin edilen MDA düzeyleri **Çizelge 4.8** ve **Şekil 4.10**'da verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde MDA düzeyleri $0,012 \pm 0,003$ nmol/mg protein; Au grubunda $0,011 \pm 0,004$ nmol/mg protein, Au-PEG grubunda $0,010 \pm 0,000$ nmol/mg protein, Au-PEI 2000 grubunda $0,010 \pm 0,000$ nmol/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $0,044 \pm 0,010$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu, Au-PEG ve Au-PEI2000 grubu ile kontrol grubu arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı; Au-PEI25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %253,53 ve Au grubuna göre gözlenen %311,17 artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Çalışma Gruplarında MDA Düzeyleri.

Çalışma Grupları	MDA düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	$0,012 \pm 0,003^a$
Au	$0,011 \pm 0,004^a$
Au-PEG	$0,010 \pm 0,000^a$
Au- PEI 2000	$0,010 \pm 0,000^a$
Au-PEI 25000	$0,044 \pm 0,010^b$

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.10. Çalışma Gruplarında MDA Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.8. Glutasyon Düzeyi Ölçümleri

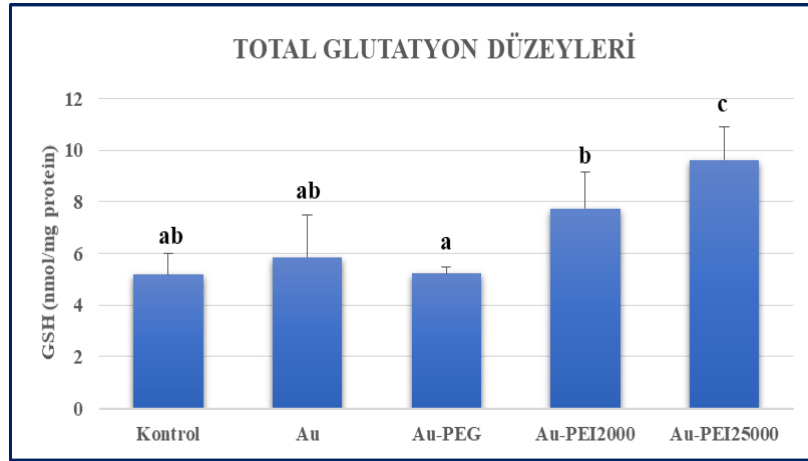
Çalışma gruplarında tayin edilen total GSH düzeyleri **Çizelge 4.9** ve **Şekil 4.11**'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde total GSH düzeyleri $5,19 \pm 0,83$ nmol/mg protein; Au grubunda $5,86 \pm 1,62$ nmol/mg protein, Au-PEG grubunda $5,23 \pm 0,22$ nmol/mg protein, Au-PEI 2000 grubunda $7,74 \pm 1,40$ nmol/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $9,63 \pm 1,26$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu, Au-PEG ve Au-PEI2000 grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olmadığı; Au-25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %85,66 artışın istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Au grubuna kıyasla Au-PEI 2000 ve Au-PEI 25000 gruplarında gözlenen total GSH düzeyindeki artışlar (sırasıyla %31,99 ve %64,17) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Ayrıca Au-PEI 25000 grubunda gözlenen total GSH düzeyindeki artışın Au-PEI 2000 grubuna kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu ($p < 0,05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Çalışma Gruplarında Total Glutasyon Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Total Glutasyon Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	5,19 ± 0,83 ^a
Au	5,86 ± 1,62 ^{ab}
Au-PEG	5,23 ± 0,22 ^a
Au- PEI 2000	7,74 ± 1,40 ^b
Au-PEI 25000	9,63 ± 1,26 ^c

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.



Şekil 4.11. Çalışma Gruplarında Total Glutasyon Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.9. Protein Oksidasyonu Ölçümleri

Çalışma gruplarında tayin edilen karbonil düzeyleri **Çizelge 4.10** ve **Şekil 4.12**'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde karbonil düzeyleri 0,26±0,09 nmol/mg protein; Au grubunda 0,31±0,13 nmol/mg protein, Au-PEG grubunda 0,42±0,26 nmol/mg protein, Au-PEI 2000 grubunda 0,65±0,31 nmol/mg protein, Au-PEI 25000 grubunda ise 1,46±0,35 nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Au grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olmadığı; Au-PEG grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %61,67 artışın, Au-PEI 2000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %152,32 artışın ve Au-PEI 25000 grubunda kontrol grubuna oranla gözlenen %462,41 artışın istatistiksel olarak

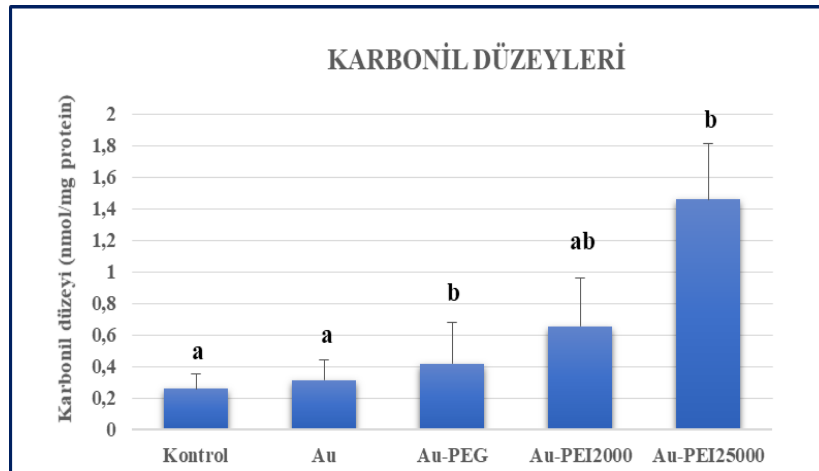
anlamli ($p < 0,05$) düzeyde yuiksek olduğu belirlenmiştir. Tüm kaplama gruplarında ołlen karbonil düzeylerinin Au grubuna kıyasla yükseldiği sırasıyla (%33,97, %109,10 ve %366,07) gözlenmiş olmakla birlikte, sadece Au-PEG ve Au-PEI 25000 gruplarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Çalışma Gruplarında Karbonil Düzeyleri.

Çalışma Grupları	Karbonil Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	$0,26 \pm 0,09^a$
Au	$0,31 \pm 0,13^a$
Au-PEG	$0,42 \pm 0,26^b$
Au-PEI 2000	$0,65 \pm 0,31^{ab}$
Au-PEI 25000	$1,46 \pm 0,35^c$

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı ssel harfleri tařımayan deđerler birbirinden önemli ołde farklıdır.



şekil 4.12. Çalışma Gruplarında Karbonil Düzeyleri.

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı ssel harfleri tařımayan deđerler birbirinden önemli ołde farklıdır.

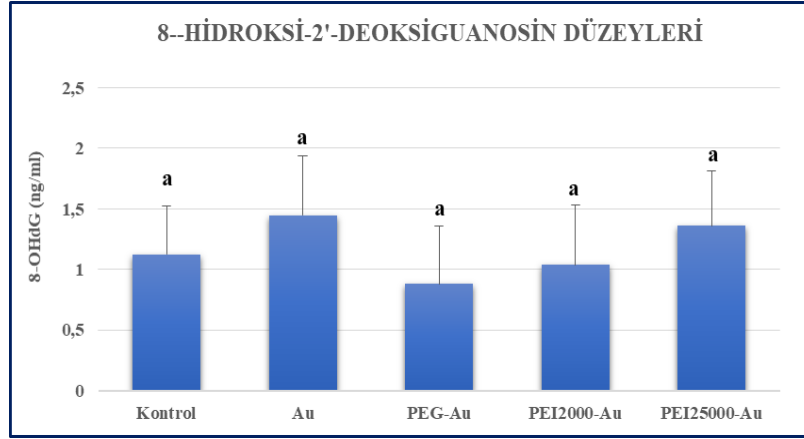
4.10. DNA Baz Lezyonu Ölçümleri

Çalışma gruplarında tayin edilen 8-OHdG düzeyleri **Çizelge 4.11** ve **Şekil 4.13**'de verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan örneklerde 8-OHdG düzeyleri $0,90 \pm 0,47$ ng/ml protein; Au grubunda $1,34 \pm 0,63$ nmol/mg protein, Au-PEG grubunda $0,64 \pm 0,54$ ng/ml protein, Au-PEI 2000 grubunda $0,80 \pm 0,60$ ng/ml protein, Au-PEI 25000 grubunda ise $1,20 \pm 0,60$ ng/ml protein olarak belirlenmiştir. Kontrol, Au, Au-PEG, Au-PEI 2000, Au-PEI 25000 grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Çalışma Gruplarında 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin Düzeyleri.

Çalışma Grupları	8-OHdG (ng/ml)
Kontrol	$0,90 \pm 0,47^a$
Au	$1,34 \pm 0,63^a$
Au-PEG	$0,64 \pm 0,54^a$
Au-PEI 2000	$0,80 \pm 0,60^a$
Au-PEI 25000	$1,20 \pm 0,60^a$

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.13. Çalışma gruplarında 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin düzeyleri.

Tüm değerler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.11. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin dağılımı “Kolmogorov-Smirnov” testi ile incelenmiştir. Gruplar arası farkların önem kontrolleri, ANOVA tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arasında fark çıkması halinde farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Student’s t testi yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. $p < 0,05$ düzeyinde farklar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde, Statistical Package for Social Sciences Programme (SPSS) versiyon 20.0 kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde boyut ve şekli kontrol ederek yeni yapılar, cihazlar ve sistemlerin tasarlanması, üretilmesi ve uygulanmasını sağlayan disiplinler arası bir alan olarak tanımlanabilir. Nanoteknoloji günümüzde fiber ve tekstil, tarım, elektronik, adli bilimler, uzay ve tıbbi tedavi alanlarındaki uygulamalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi araştırmalar, teşhis ve tedavi uygulamalarında geleneksel tedavi yöntemlerinin zamanla yerini almış ve biyomedikal alanda büyük bir potansiyele sahip olmuştur [90].

Nanopartiküller; enzimler, reseptörler ve antikorlar gibi büyük biyolojik moleküllerden boyut olarak birkaç yüz nanometre daha küçüktür. İnsan hücrelerinden yaklaşık 10-100 bin kat daha küçük boyutlara sahip NP'ler, biyomoleküllerle hücre yüzeyinde ve hücre içinde benzersiz etkileşimler gösterebilir. Pek çok NP esaslı ilaç taşıma sistemi, bilimin hem tıbbi alanda hem de farmasötik alanlarda artan ihtiyaçlarını karşılamak için tasarlanmıştır. Nanopartiküllerin kullanıldığı araştırmaların en çok çalışılmış alanı, hayatı tehdit eden hastalıklarla mücadele etmek için hücre içi seviyede hedeflenen ilaç taşınımına odaklanmıştır. Kanser, AIDS, diyabet, sıtma, prion hastalığı ve tüberküloz gibi hastalıklarda kullanılmak üzere tasarlanan nano-ilaçlar, test için farklı deneme evrelerinde olmakla beraber bazılarının ticarileştirildiği bilinmektedir. Literatürde en çok çalışılmış NP'lerin kuantum noktacıklar, karbon nanotüpler, paramanyetik NP'ler, lipozomlar olduğu görülmüştür [91, 92].

Boyut, şekil ve fiziksel özellikleri açısından farklı birçok Au NP çeşidi bulunmaktadır; nanoküreler, nanorodlar, nanokabuklar, nanokafesler, nanoyıldızlar, nanokutular, nanoküpler, nanokristaller ve üçgen-bipiramitler. Au NP'ler biyolojik olarak inerttir, elektronik, optik ve manyetik özellikleri onları çeşitli biyomedikal uygulamalar için önemli kılmaktadır. Au NP'lerin benzersiz optik özellikleri, onların görüntüleme ve NIR fototermal tedavide kullanılabileceklerini göstermiştir. Ayrıca Au NP'lerin biyoyumluluklarını arttırmak üzere yüzeyleri kolaylıkla modifiye edilebilmekte, bu sayede ilaçlar ve genetik materyal yüzeylerine bağlanabilmekte ve ilaçlar hedef hücrelere taşınabilmektedir. Biyoyumlu bir NP tasarlamak için Au NP'ü çevreleyecek, biyomoleküllerle spesifik olmayan etkileşimleri önleyecek PEG gibi polimerler kullanılabilir. Bu polimerik ligandlar, Au NP'lerin kararlılığını ve dış yüzeyin hidrofilitasını arttırmakta, çözünürlüğü ve Au NP boyutunu ayarlanabilir kılmaktadır [93, 94].

Metal NP'lerden olan Au NP'lerin ilaç dağıtım, teşhis ve tedavi uygulamalarındaki üstünlükleri göz önüne alındığında bu partiküllerin çok kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda benzersiz özelliklerinden faydalanılmasının yanında deneysel çalışmalar Au NP'lerin toksisitesinin değerlendirilmesine de odaklanmış, in vivo biyolojik dağılım ve in vitro toksisite üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. Bunun yanında teknolojik ilerlemelere rağmen, Au NP'lerin hücrelerle olan etkileşimlerini yönlendiren moleküler süreçler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu bilgi eksikliği düşük sitotoksositeye sahip, etkili teşhis ve tedavide kullanılabilir nanomalzemelerin tasarımını engellemektedir. Au NP'ler bazı çalışmalarda toksik bazı çalışmalarda toksik olmayan partiküller olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar boyut, yüzey yükü, agregasyon derecesi ve şeklin Au NP'lerin potansiyel toksisitesi ve stabilitesi ile ilgili temel parametreler olduğunu göstermiştir. Boyut, yüzey yükü, agregasyon derecesi ve şeklin neden olduğu toksisiteye ek olarak DNA hasarının (genotoksosite) Au NP'lerin kullanımında araştırılması gereken önemli bir konu olduğu düşünülmektedir [93, 95].

Altın nanopartiküllerinin tıp, biyoteknoloji ve gıda sektörü gibi farklı alanlarda kullanımının artması, toksisitelerinin değerlendirilmesini esansiyel hale getirmiştir. Au NP'leri genellikle non-toksik kabul edilmektedir. Bununla birlikte, Au NP'lerinin toksisitelerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır, ancak sonuçları çelişkilidir. Diğer taraftan, bu konudaki kılavuzlar yeterli değildir. Sitotoksitenin sadece şekil, yüzey kimyası veya boyutuna bağlı olarak değil, kullanılan hücre tipine bağlı olarak da değişebileceği bildirilmektedir. Au NP'lerin toksisite mekanizması olarak, protein denatürasyonu, membran hasarı, DNA hasarı ve immün reaktivite üzerinde durulduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra, genel olarak nanopartiküllerin toksik etkilerinin altında yatan mekanizmalardan biri olarak öne sürülen ROS oluşumu ve buna bağlı oksidatif stres varlığının; Au NP'lerinin toksisitesi için de olası mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir [95].

Bu bilgiler ışığında planlanan ve yürütülen bu tez çalışmasında Au NP'lerinin sitotoksiteleri ile olası toksisitelerinin altında yatan mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres değerlendirilmiş; farklı kaplama yöntemlerinin toksisiteyi ne şekilde değiştirebileceği konusu irdelenmiştir.

Çalışılan Hücre Hatları ve Konsantrasyon NP'lere temas pek çok yoldan olmaktadır. İn hale edildiğinde ana temas yolu akciğerlerdir. Boyutuna bağlı olarak alveolar bölgede birikebilir. Alveolar bölgenin endotel ile bağlantısı nedeniyle NP kan dolaşımına ulaşabilir ve karaciğer, böbrek gibi diğer organlara dağılabilir. İn vivo çalışmalar, Au NP'lerinin ana akümülyasyon bölgesinin karaciğer olduğunu göstermiştir. HepG2 hücre hatlarının kullanıldığı çalışmalarda hücre hattının seçilme nedeni bu şekilde açıklanmaktadır [96]. Sunulan tez çalışmasında da karaciğerin ana hedef organlardan biri olması nedeniyle HepG2 hücreleri tercih edilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında 0-400 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışılmış olup; IC₅₀ ve IC₃₀ dozları hesaplanmıştır. Kullanım alanları ve sıklığı göz önüne alındığında, Au NP'lerinin oksidan/antioksidan statü parametreleri ve DNA hasarı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için maruziyet dozu olarak IC₅₀ değerinin yüksek olacağı ve gerçekçi bir sonuç vermeyeceği öngörülmüştür. Bu nedenle, tez kapsamında HepG2 hücrelerinin maruz bırakılacağı Au NP dozu IC₃₀ değeri olarak seçilmiştir.

Altın Nanopartiküllerinin Sitotoksik Etkileri Altın nanopartiküllerinin sitotoksisitesine ilişkin literatür değerlendirildiğinde çelişkili bulguların yer aldığı görülmüştür [94, 97 - 103]. Birçok in vitro çalışmada, farklı hücre hatlarında Au NP'lerinin non-toksik olduğu bildirilmekle birlikte; bazı çalışmalarda sitotoksik etkileri vurgulanmıştır. Kullanılan hücre hattı, nanopartiküllerin konsantrasyonu ve boyutu, yüzey yükü ve kaplama gibi pek çok etmenin sitotoksisitede rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Altın nanopartiküllerinin sitotoksisitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, insan lösemi (HL-60) ve insan hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücre hatlarında 30, 50 ve 90 nm çapında Au NP'lerinin sitotoksisitesi, tarafımızdan yapılan tez çalışmasında olduğu gibi MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. IC₅₀ değerleri, HL-60 hücrelerinde 24 saat inkübasyonu takiben 30 nm Au NP için 15,4 µg/mL; 50 nm Au NP için 16,8 µg/mL ve 90 nm Au NP için 18,2 µg/mL olarak saptanmıştır. 30 nm çapındaki, 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarındaki Au NP'lere 72 saatlik inkübasyondan sonra HL-60 hücre canlılığı sırasıyla %79, %73 ve %60 olarak bulunmuştur. 30 nm çapındaki 15 µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetten sonra HL-60 hücre canlılığı sırasıyla %53,3, %42,4 ve %33,2 olarak belirlenmiş, gerek inkübasyon süresi gerekse konsantrasyon arttıkça hücre canlılığındaki azalmanın daha fazla olduğu vurgulanmıştır. 50 ve 90 nm, 15 µg/mL Au NP'lere 72 saatlik maruziyet sonucu HL-60 hücre canlılığının sırasıyla %47,8 ve %56,1 bulunması; NP çapı küçüldükçe sitotoksik

etkinin artacağını göstermiştir. Hücresel metabolik aktivite en yüksek Au NP konsantrasyonunda (25 µg/mL) 24-72 saatlik maruziyetten sonra %7'den az olarak gözlenmiştir. Bu bulgular, Au NP'lerinin HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkisinde NP çapı, konsantrasyonu ve maruziyet süresinin belirleyici faktörler olduğu görüşünü doğrulamıştır [103].

Aynı çalışmada, HepG2 hücrelerinde 24 saat inkübasyonu takiben IC₅₀ değerleri 30 nm Au NP için 19,3 µg/mL; 50 nm Au NP için 20,2 µg/mL ve 90 nm Au NP için 22,4 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu değerler, sunulan tez çalışmasında HepG2 hücrelerinin 45 nm Au NP ile 24 saat inkübasyonunu takiben saptanan IC₅₀ değerinden (167 µg/mL) düşüktür. Bu çalışmada ticari olarak satılan Au NP'lerin kullanıldığı belirtilmiştir; NP'lerin eldesi için kullanılan yöntemlerde olabilecek farklılıkların da sitotoksitesiyi etkileyebileceğini düşündürmektedir. HepG2 hücrelerinin 30 nm 15µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 72 saatlik maruziyetinden sonra %58 hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, HepG2 hücrelerinin 50 ya da 90 nm 15 µg/mL konsantrasyonundaki Au NP'lere 72 saatlik maruziyeti sonucu hücre canlılığı %80'den fazla olmuştur. 25 µg/mL konsantrasyonda 72 saatlik maruziyet sonucu HepG2 hücre canlılığının 30, 50 ve 90 nm Au NP'lerde sırasıyla %6,3, %12,4, %30 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, test edilen Au NP'lerin HepG2 hücre hattındaki sitotoksitesinin de maruziyet süresi, NP çapı ve konsantrasyonuna bağımlı olduğunu göstermiştir. MTT sonucunda her iki hücre hattında elde edilen IC₅₀ konsantrasyonları karşılaştırıldığında, HepG2 hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin daha yüksek olması Au NP'lerinin HL-60 hücrelerinde sitotoksitesinin daha fazla olduğunu ve bu hücrelerin Au NP'lerine daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, hücre tipinin de toksisitede önemli olduğunu düşündürmektedir [103]. Kang ve ark. (2009) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 4, 5, 100 ve 200 nm çapında Au NP'leri kullanılmış; sadece 4 nm çapındaki Au NP'leri ile 200 µg/mL konsantrasyonda L5178Y fare lenfoma hücre hattında hücre canlılığının önemli düzeyde azaldığı rapor edilmiştir [103]. Bu bulguların aksine, Vijayakumar ve ark. (2013) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise sadece 30 nm Au NP'leri hücre ölümüne neden olurken, 5, 6 ve 17 nm çapındaki NP'lerin insan meme kanseri (MCF-7) ve insan prostat kanseri (PC-3) hücre hatlarında non-toksik olduğu rapor edilmiştir [102]. Au NP'lerinin (33 nm) üç farklı hücre hattında toksitesinin test edildiği bir diğer çalışmada, sonuçlar Au NP'lerin BHK21 ve HepG2 hücrelerinde aynı doz aralıklarında toksik olmamasına rağmen, A549 hücrelerinde toksik olduğu gösterilmiştir [30].

Gözlenen bu farklılıklar, farklı Au NP'lerinin ve hücre hatlarının kullanılması ile açıklanmıştır. Sunulan tez çalışmasında, HepG2 hücre hattında 24 saat inkübasyonu takiben 45 nm çapındaki Au NP'lerinin sitotoksik etkileri olduğu saptanmış; ancak saptanan IC₅₀ değerlerinde diğer çalışmalar ile farklılıklar gözlenmiştir. Çalışmamızda maruziyet süresi ve farklı çaptaki Au NP'lerinin karşılaştırılması, bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeniyle yapılamamıştır. Aynı hücre hatlarının kullanılması durumunda bile çelişkili sonuçların alınması, Au NP'leri için referans materyal geliştirilmesi ve negatif veya pozitif kontrol olarak kullanılması gerektiği görüşünün farklı araştırmacı gruplar tarafından ileri sürülmesine yol açmıştır [103]. Bu doğrultuda, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından sıfır değerlikli 10, 30 ve 60 nm boyutlarında steril Au NP'ler geliştirilmiştir. Bu partiküllerin nanotoksikoloji çalışmalarında pozitif veya negatif kontrol olarak kullanılabilmesi için toksikolojik etkilerinin karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada Au NP'ler HepG2 hücrelerinde DNA'daki oksidatif hasar potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Sitotoksitesileri MTT deneyi ile değerlendirilmiş, akış sitometrisi ise partiküllerin hücre döngüsünü etkileyip etkilemediğini görmek için kullanılmıştır. Son olarak oksidatif DNA hasarı incelenmiştir. HepG2 hücreleri 0,0002 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml veya 0,2 µg/ml konsantrasyonlarda Au NP'lere 3 saat maruz bırakılmıştır. Sonuçta, Au NP'lerin 0,2 µg/ml veya 2 µg/ml'den düşük dozlarda HepG2 hücrelerinde ve DNA'da doza bağlı oksidatif hasar oluşturmadığı, hücre ölümüne ve serbest radikal üretimine neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar NIST Au NP'lerin *in vitro* / *in vivo* genotoksitesite çalışmaları için kontrol malzemeleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir [70].

Sitotoksitesite çalışmalarında, Au NP'lerin şeklinin toksitesite üzerinde etkileri de değerlendirilmiş; bu konuda yapılan bir çalışmada altın nanoküpler (AuNC) ve altın nano-oktahedralar (AuNO) kullanılmıştır. NP'lerin yüzeyi poli(akriloil-L(D)-valin (L(D)-PAV) ile kaplanmıştır. SEM ve TEM sonuçları, L-PAV-AuNC ve D-PAV-AuNC'lerin boyut (~165 nm) ve yüzey molekül yoğunluğu açısından (2,0 molekül/benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde, L-PAV-AuNO ve D-PAV-AuNO'nun da boyut (~110 nm) ve yüzey molekül yoğunluğu açısından (~1,9 molekül/benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. NP'lerin hücre alım miktarı ve hücre içi dağılımını incelemek üzere A549 hücreleri 4 pM konsantrasyonunda PAV-AuNC ve PAV-AuNO'lara maruz bırakılmış, sonuçlar sitoplazmada çekirdek çevresinde toplandıklarını ve L-PAV kaplı NP'lerin, D-PAV kaplı

olanlardan daha fazla hücre içine alındığını göstermiştir. AuNC'lerin hacminin AuNO'lardan daha büyük olması nedeniyle, aynı konsantrasyonlarda (4pM) AuNC'lerin altın (Au) konsantrasyonu, AuNO'larınkinden daha fazladır. Bu nedenle A549 hücreleri aynı kaplamaya sahip AuNC'ler yerine AuNO'ları hücre içine almayı tercih etmiştir. Bu durum parçacık şeklinin hücre içine alımda önemli olduğunu göstermiştir. MTT sonuçları L- ve D-PAV-AuNC'ler ya da L- ve D-PAV-AuNO'ların konsantrasyona bağlı (0,5 – 8 pM) sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. 8 pM konsantrasyonda L-PAV kaplı Au NP'ler ile, D-PAV kaplı Au NP'lerden daha fazla sitotoksosite gözlenmiş, hücre canlılıkları sırasıyla partikül içermeyen kontrole (%100) göre 76% ve 87% olarak bulunmuştur [69].

Altın Nanopartiküllerinin Oksidatif Stresi İndükleyici Etkileri Altın nanopartiküllerinin toksik etkilerinin altında yatan olası mekanizmalardan birinin diğer NP'lerde olduğu gibi oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir. Bu konuda sınırlı sayıda in vivo çalışmanın yanısıra, farklı hücre hatlarında yapılmış in vitro çalışmalar da bulunmaktadır [53, 94, 104 - 107]. Au NP'lerin toksisitesinin farklı hücre hatlarında in vitro incelendiği çalışmalar değerlendirildiğinde, sitotoksosite ve ROS oluşumunu irdeleyen çalışmaların daha fazla sayıda olduğu; tüm oksidan/antioksidan statü parametrelerinin kapsamlı olarak bir arada değerlendirildiği çalışmaların ise son derece sınırlı sayıda olduğu görülmüştür.

Mateo ve ark (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, HL-60 ve HepG2 hücre hatlarında 30, 50 ve 90 nm çapında Au NP'lerinin ROS düzeyleri, GSH konsantrasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. HL-60 hücrelerinde total GSH seviyeleri, IC₅₀ konsantrasyonunda 24 saatlik maruziyet sonrası 30, 50 ve 90 nm Au NP'leri için sırası ile kontrol grubuna oranla %16, %53 ve %66 iken HepG2 hücrelerinde %46, %56 ve %74 olmuştur. Bu sonuçlar, Au NP'nin GSH ile etkileşiminin Au NP'lerinin indüklediği sitotoksositeye karşı önemli bir detoksifikasyon mekanizması olduğunu göstermektedir [103]. Chen ve ark (2004) da güçlü bir Au-S bağı oluştuğunu tanımlamış; bu etkileşimin Au NP'lerine teması takiben GSH düzeylerinde gözlenen azalmayı açıklayabileceğini bildirmişlerdir [103]. Benzer bir bulgu Gao ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiş; insan hepatik hücrelerinde Au NP'lerinin çapı ile ters orantılı olarak GSH düzeylerinde azalma olduğu rapor edilmiştir [106]. Sunulan tez çalışmasında IC₃₀ dozunda 45 nm Au NP'lerine 24 saat maruziyet sonucu HepG2 hücrelerinde total GSH düzeylerinde kontrol grubuna oranla anlamlı bir fark olmadığı; PEG ile kaplamanın da sonucu etkilemediği; ancak PEI ile kaplama durumunda

GSH düzeylerinde anlamlı düzeyde artışların olduğu gözlenmiştir. Bu farkın doz ve kullanılan Au NP'lerinin yapısal farklılıkları ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür.

Mateo ve ark. tarafından yapılan çalışmada, HL-60 hücrelerinin SOD aktivesinde Au NP ile önemli değişiklik gözlenmemiştir. Ancak HepG2 hücrelerinin 30 ve 50 nm Au NP'lere 24 saatlik IC₅₀ konsantrasyonlarında maruziyeti sonrası SOD aktivite seviyeleri %74 ve %82 olarak bulunmuştur. HL-60 hücrelerinde ROS seviyeleri 24 saatlik inkübasyondan sonra maksimum seviyelerine ulaşmıştır, ancak 48 saat sonunda bazal seviyelere inmiştir. HepG2 hücreleri için ise maksimum ROS seviyeleri 1 saatlik inkübasyondan sonra gözlenmiş, 24 saat sonunda bazal seviyeye inmiştir. En fazla ROS oluşumunun 50 nm Au NP'leri ile gözlendiği rapor edilmiştir [66]. Tarafımızdan yapılan çalışmada Au NP'lerinin gerek SOD gerekse diğer antioksidan enzimler, GPx ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. Hücre içi ROS düzeylerinde ise IC₃₀ dozunda Au NP'lerinin 24 saat inkübasyonu sonucunda anlamlı düzeyde artışlar gözlenmiştir. Bununla birlikte, kontrol grubuna göre gözlenen artış oranı (%6) yüksek değildir. Bu bulgu, Mateo ve ark. tarafından ifade edilen HepG2 hücrelerinde maruziyetten 24 saat sonra ROS düzeylerinin bazal seviyelere inmesi açıklaması ile kısmen uyumludur. ROS oluşumu, NP'lerin neden olduğu toksisitede hücre içi yollarda oksidan/antioksidan dengesi bozabilen önemli bir mekanizmadır. Metalik NP'lerin ROS oluşumu ve oksidatif strese sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu etkilerin, farklı hücre hatlarında Au NP'lerinin toksisitesi için ana mekanizmalar olduğunu düşündüren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [108 - 110]. Bununla birlikte, Au NP'lerine maruziyet ile hücre içi ROS düzeylerinde herhangi bir değişikliğin oluşmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Aueviriyavit 2013). Ayrıca, NP çapı ile ROS oluşumu arasındaki ilişki konusunda da çelişkili bulgular yer almaktadır. Daha küçük çaptaki NP'lerin daha fazla ROS oluşumuna yol açtığını belirten araştırmacıların yanısıra, ROS oluşumunun partikül büyüklüğünden bağımsız olduğunu ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (Raghunathan 2013). Diğer taraftan, Au NP'lerinde hidrofobik özellikteki alkil zinciri uzunluğuna bağlı olarak sitotoksikite ve ROS oluşumunun değişebileceğini; alkil zincir uzunluğunun artması ile toksisitenin artacağını rapor eden araştırmalar mevcuttur [109]. Tez çalışmada kullanılan PEI polimerleri hidrofobik özellikte olmaları nedeniyle Au-PEI gruplarında gözlenen oksidatif stresin bu açıklama ile uyumlu olduğu düşünülebilir.

Altın nanopartiküllerin şeklinin toksisite üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmada, altın nanoküpler (AuNC) ve altın nano-oktahedralar (AuNO) kullanılmış;

poli(akriloil-L(D)-valin (L(D)-PAV) ile kaplanan NP'lere 24 saat maruziyet sonucu A549 hücrelerinde önemli miktarda ROS üretimi gözlenmiştir. AuNO'lar, AuNC'lerden ve ek olarak L-PAV kaplı partiküller D-PAV kaplı olanlardan daha fazla ROS üretimine neden olmuştur. COMET yöntemi kullanılarak, PAV-AuNO'lara maruz kalan A549 hücrelerinde, PAV-AuNC'lere göre daha fazla DNA hasarı olduğu gözlenmiştir. Özetle, A549 hücrelerinde DNA hasarı PAV-AuNC'lerin ve PAV-AuNO'ların hücre içine alınması ile tetiklenen ROS üretiminden kaynaklandığı rapor edilmiştir [69].

Bu araştırmanın yanısıra, Au NP'lerinin DNA hasarı üzerine etkilerini değerlendiren sınırlı sayıda in vivo ve farklı hücre hatlarında yürütülen in vitro çalışmalar da bulunmaktadır [105]. Bu çalışmalarda DNA hasarı COMET yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Kang ve ark (2009), 4, 15, 100 ve 200 nm boyutlarında Au NP'lerini L5178Y hücrelerine uygulamış; sitotoksosite ile birlikte DNA hasarı tayin edilmiştir [103]. Çalışmanın sonunda sadece 4 nm boyuttaki Au NP'lerinin doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksositeyi indüklediği belirlenmekle birlikte; bu boyuttaki NP'lerin DNA hasarını indüklemediği; 100 ve 200 nm Au NP'leri ile DNA hasarı gözlemediği rapor edilmiştir. 4 nm Au NP'leri hücrel toksisiteyi doğrudan yolak/lar ile indükleyebileceği; 100 ve 200 nm boyuttaki NP'lerin ise DNA hasarını oksidatif stres ile ilişkili dolaylı mekanizmalarla indükleyebileceği yorumu getirilmiştir [101]. Chompoosor ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, 20 nm Au NP'leri hidrofobik alkil zincir uzunluğuna göre 4 gruba ayrılmış; HeLa hücreleri 24 saat süreyle söz konusu NP'lere maruz bırakılmıştır [109]. NP'lerin hidrofobikliği sitotoksosite ve ROS oluşumunu artırırken; DNA hasarı artan partikül hidrofobikliği ile azalmıştır. ROS oluşumu ile gözlenen oksidatif stres ortamı, hücre ölümünü engellemek üzere yabancı molekülleri uzaklaştıran otofajik süreçleri başlatabilir. Bu süreci NP'lerin oksidatif ortamında hücre yaşamına katkıda bulunabilir. Bu nedenle, hidrofobik zincirlere sahip Au NP'leri daha fazla ROS oluşturabilir, ancak otofaji nedeniyle bu moleküller degrade olabilir ve DNA hasarının görülmesi azalabilir [109]. Benzer bir mekanizmanın varlığı, Li ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada da vurgulanmıştır. Akciğer fibroblast hücrelerinde 20 nm Au NP'lerine 24 saat maruziyet ile lipid hidroperoksit düzeylerinde artış olduğu; MDA protein düzeylerinde önemli düzeyde artış gözlemediği rapor edilmiştir. Otofagozom oluşumu ve otofaji proteinlerinin up-regülasyonu gözlenmiştir. Bu çalışmada, Au NP'lerinin oksidatif bir çevre yaratırken, hücrel stres yanıt mekanizmalarının regülasyonunu da etkilediği ve aynı zamanda

oksidatif streten hücreyi korumak üzere otofagozomların oluşumunu da indüklediği vurgulanmıştır [111].

Tarafımızdan yapılan tez çalışmasında da Au NP'leri ile ROS düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen DNA hasarı dahil incelenen diğer oksidatif stres parametrelerinde bir değişiklik saptanmamasında böyle bir mekanizmanın da rol oynayabileceği öngörülebilir. Çalışmamızda, Au NP'lerinin DNA hasarı yapıcı etkisi 8-OHdG düzeylerinin ölçülmesi ile saptanmış olup; hiçbir deney grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgular, incelenen konsantrasyonda Au NP'lerinin HepG2 hücrelerinde DNA baz lezyonu oluşumuna yol açmadığını göstermektedir. Au NP'lerine maruziyet ile DNA baz lezyonlarının incelendiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Altın Nanopartiküllerinin Kaplanması Altın nanopartiküllerinin biyoyumlu olmaları ve biyoyumlu polimerlerle kaplanabilir olmaları ayırt edici özellikleri arasında sayılmaktadır. Bu polimerler, nanopartiküllere uygun yüzey yükü ve kararlılık sağlar. Genel olarak, özellikle küresel olmayan Au NP'lerin anizotropik özelliklerinden dolayı agregat oluşturma eğilimi olduğu bilinmektedir. Ligand ile kaplanmış küçük Au NP'lerde agregat oluşturmaya karşı afinitenin azaldığı bildirilmektedir; daha büyük Au NP'ler çözülme-yen agregatlar oluşturmaktadır. Agregasyona bağlı kararsızlık Au NP yüzeyinin polimerler ile kaplanmasıyla önlenmektedir. Au NP'lerin yüzey kaplamasında genellikle heparin, hiyalüronik asit, kitosan, dekstran, pullulan, selüloz türevleri, jelatin, PEG, PEI, PVCL, PDDA, maltoz gibi polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerik ligandlar, Au NP'lerin uzun-dönem kararlılığını iyileştirmekte, biyoyumluluğunu ve dış yüzeyin hidrofilitasını arttırmakta, çözünürlüğü ayarlanabilir kılmaktadır [4, 11, 15, 16].

Altın nanopartiküllerin toksisitesinin tek başına farklı hücre hatlarında değerlendirildiği çalışmaların yanı sıra, farklı kaplama yöntemlerinin etkilerinin de incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. PEI ile fonksiyonelleştirilmiş Au NP'lerin sitotoksitesinin incelendiği bir çalışmada insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), HeLa, insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri (Coco-2) ve HepG2 hücre hatları kullanılmış; sadece PEI ve Au NP-PEI maruziyetinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemi kullanılarak kontrol grubu ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Au NP-PEI maruz bırakılmayan kontrol hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası, Au NP-PEI maruziyeti ile maksimum hücre canlılıkları HEK293 hücreleri için %95,4, HeLa için %94,9, HepG2 için %98,2 ve Caco-2 için %76,7 olarak belirlenmiştir. HeLa

ve HepG2 hücreleri %90'dan fazla hücre canlılığı göstermiştir [17]. Sunulan tez çalışmasında da Au NP'lerinin PEI-2000 ile kaplanması sonucu hücre canlılığı tek başına Au NP grubuna göre yüksek bulunurken; PEI-25000 ile kaplamada hücre canlılığında önemli düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, kaplamada kullanılan polimer özelliklerinin de sitotoksisteye önemli olduğunu göstermektedir.

Bir diğer araştırmacı grubu, sitrat ile stabilize edilmiş Au NP (Cit-Au NP) ve karboksil (COOH) terminaline sahip PEG ile modifiye Au NP'lerin (COOH-PEG Au NP) hücre alım ve ekzositoz ile sitotoksistelerini HepG2 ve HEK293 hücre hatlarında değerlendirmiştir. Sitotoksiste ölçümleri için in vitro olarak hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını izlemek, farklı test maddelerinin doza bağlı tepkisini belirlemek için gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) kullanılmıştır. Cit-Au NP'lere 5, 2, 1 ve 0,5 nM konsantrasyonlarda 8 saat maruziyet ile HEK293 hücre canlılığında düşüşlerin başladığı gözlenmiş, 22 saat sonunda ise önemli düzeyde azalmalar saptanmıştır. Cit-Au NP yüzeylerinde sitrat iyonlarının varlığı gözlenen toksiste ile ilişkilendirilmiş, test edilen bütün konsantrasyonlarda HEK293 hücre canlılığın azaldığı görülmüştür. COOH-PEG Au NP'lere (5, 2, 1 ve 0,5 nM) maruz kalan HEK293 hücrelerinde ise 56 saatlik inkübasyon sonunda konsantrasyona bağlı toksik yanıt oluştuğu saptanmıştır. HepG2 hücrelerinin proliferasyon eğrileri 98 saatlik maruziyet sonrası Cit-Au NP'lerin hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve test edilen bütün konsantrasyonlarda (5, 2, 1 ve 0,5 nM) sitotoksik olduğunu göstermiştir. COOH-PEG Au NP'lerde aynı koşullarda konsantrasyona bağlı sitotoksik yanıt oluşmuştur. En yüksek konsantrasyonlarda (5 nM ve 2 nM) Au NP'lerin eklenmesinden sonra HepG2 hücre canlılığı sıfıra inmiştir. Ancak, COOH-PEG Au NP'ler düşük konsantrasyonlarda (0,5 nM ve 1 nM) herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Sonuçlar, her iki hücre tipinin yüzey kimyası dikkate alınmaksızın Au NP'lere duyarlı olduğuna, ancak COOH-PEG Au NP'lerin daha toksik olduğuna işaret etmekte ve HepG2 hücrelerinde HEK293 hücrelerine göre daha yüksek sitotoksiste varlığını göstermektedir [68].

Bir diğer çalışmada, sodyum sitrat ve poliamidoamin dendrimerleri (PAMAM) ile kaplanmış Au NP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri ile ROS oluşumu üzerindeki etkileri, HepG2 ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) incelenmiştir. Her iki hücre hattında da kaplı Au NP'lerinin doz bağımlı olarak sitotoksisteyi, ROS oluşumunu ve DNA hasarını indüklediği saptanmıştır [94].

Farklı polimerler ile kaplanmış Au NP'lerinin sitotoksosite ile lipit peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein oksidasyonu parametreleri dahil oksidatif stres indükleyici etkisinin ve antioksidan savunma sistemindeki değişikliklerin bir arada değerlendirildiği kapsamlı bir in vivo veya in vitro çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmaların sitotoksosite ile birlikte ROS oluşumu ve COMET yöntemi kullanılarak DNA hasarının saptanması ile sınırlı olduğu belirlenmiştir. Sunulan tez çalışması, PEG ve farklı molekül ağırlıklarında PEI ile kaplanmış Au NP'lerinin HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkilerinin kontrol grubu ve kaplı olmayan Au NP'lere ait sonuçlar ile karşılaştırmalı değerlendirmesinin yapıldığı; bunun yanısıra tüm oksidan/antioksidan statü parametreleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı incelendiği kapsamlı ilk çalışma niteliğindedir.

Elde edilen bulgular; 45 nm Au NP'lerinin HepG2 hücre hattında IC₃₀ dozuna 24 saat inkübasyonunu takiben hücre içi ROS düzeylerinde düşük, ancak anlamlı düzeyde bir artışa neden olmakla birlikte; protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu, DNA hasarını indüklemediği; antioksidan enzim aktiviteleri ve total GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir. Au NP'lerinin PEG ile kaplanması sonucu ROS düzeylerinde artış ile birlikte karbonil düzeylerinde anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir. PEI ile kaplama sonucu oksidan-antioksidan dengede bozulmaların olduğu gözlenmiş; özellikle yüksek molekül ağırlıklı PEI ile kaplanan Au NP'lerinin sitotoksitesinin önemli düzeyde arttığı; DNA baz lezyonları hariç incelenen diğer tüm oksidan/antioksidan statü parametrelerinde önemli düzeyde artışlar gözlemlendiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular, PEI ile kaplamanın sitotoksosite ve oksidatif stresi indüklediğine; oksidan/antioksidan dengede bozulmalara yol açtığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, farklı partikül büyüklüğü; doz ve inkübasyon süreleri kullanılarak değerlendirmelerin genişletilmesi Au NP'lerinin HepG2 hücrelerinde etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Mohammed S. Khan, Gowda D. Vishakante, Siddaramaiah H, Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 199–200, **2013**.
- [2] Aneta J. Mieszawska, Willem J. M. Mulder, Zahi A. Fayad, and David P. Cormode, Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease, *Molecular Pharmacy*, 10, 831–847, **2013**.
- [3] Weibo Cai, Ting Gao, Hao Hong, Jiangtao Sun Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology, Science and Applications*, 1, 17–32, **2008**.
- [4] Omkara Swami Muddineti, Balaram Ghosh, Swati Biswas, Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, 484, 252–267, **2015**.
- [5] A. Reznickova, P. Slepicka, N. Slavikova, M. Staszek, V. Svorcik, Preparation, Aging and temperature stability of PEGylated gold nanoparticles, *Colloids and Surfaces*, 523, 91–97, **2017**.
- [6] S. Sudhakar, P.B. Santhosh, Gold Nanomaterials: Recent Advances in Cancer Theranostics, *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, ISSN 2451-9634, **2017**.
- [7] Yan-Peng Jia, Bu-Yun Mab, Xia-Wei Weia, Zhi-Yong Qian, The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles, *Chinese Chemical Letters*, DOI:10.1016/j.ccllet.2017.01.021, **2017**.
- [8] Sohyoung Her, David A. Jaffray, Christine Allen, Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 84–101, **2017**.
- [9] Giimel Ajnai, Amy Chiu, Tzuchun Kan, Chun-Chia Cheng, Teh-Hua Tsai, Jungshan Chang, Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 6, 172-178, **2014**.
- [10] Andreas Wicki, Dominik Witzigmann, Vimalkumar Balasubramanian, Jörg Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *Journal of Controlled Release*, 200, 138–157, **2015**.
- [11] Sílvia Castro Coelho, Gabriela M Almeida, Maria Carmo Pereira, Filipe Santos-Silva, Manuel AN Coelho, Functionalized gold nanoparticles improve afatinib delivery into cancer cells, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13, 133-141, **2016**.

- [12] Rochelle Arvizo, Resham Bhattacharya, Priyabrata Mukherjee, Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 753–763, **2010**.
- [13] Aaron C. Anselmo, Samir Mitragotri, A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles, *The AAPS Journal*, DOI:10.1208/s12248-015-9780-2, **2015**.
- [14] Dzmitry Shcharbin, Natallia Shcharbina, Antos Shakhbazau, Serge Mignani, Jean-Pierre Majoral, Maria Bryszewska, Phosphorus-containing nanoparticles: biomedical patents review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25, 539-548, **2015**.
- [15] Avnesh Kumari, Sudesh Kumar Yadav, Subhash C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1–18, **2010**.
- [16] Sónia Fraga, Helena Faria, Maria Elisa Soares, José Alberto Duarte, Leonor Soares, Eulália Pereira, Cristiana Costa-Pereira, João Paulo Teixeira, Maria de Lourdes Bastos, Helena Carmo, Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells, *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1111–1119, **2013**.
- [17] Geraldine Genevive Lazarus, Moganavelli Singh, In vitro cytotoxic activity and transfection efficiency of polyethyleneimine functionalized gold nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 906–911, **2016**.
- [18] Abhijeet P. Pandey, Krutika K. Sawant, Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery, *Materials Science and Engineering*, 68, 904–918, **2016**.
- [19] Jiang Guancheng, Qi Yourong, An Yuxiu, Huang Xianbin, Ren Yanjun, Polyethyleneimine as shale inhibitor in drilling fluid, *Applied Clay Science*, 127, 70–77, **2016**.
- [20] J. Prasad Rao, Kurt E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36, 887–913, **2011**.
- [21] C.E. Mora-Huertasa, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113–142, **2010**.
- [22] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi, Protein-Nanoparticle Interactions, *The Bio-Nano Interface*, DOI:10.1007/978-3-642-37555-2_2, **2013**.
- [23] Charlotte M. Beddoes, C. Patrick Case, Wuge H. Briscoe, Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective, *Advances in Colloid and Interface Science*, 218, 48–68, **2015**.

- [24] Ignác Capek, Polymer decorated gold nanoparticles in nanomedicine conjugates, *Advances in Colloid and Interface Science*, DOI:10.1016/j.cis.2017.01.007, **2017**.
- [25] Livia Palmerston Mendes, Jorge Miguel Ferreira Delgado, Angela Daniela A. Costa, Marcelo Sousa Vieira, Poliana Lopes Benfica, Eliana Martins Lima, Marize Campos Valadare, Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity, *Toxicology in Vitro*, 29, 1268–1274, **2015**.
- [26] Valérie Forest, Jérémie Pourchez, Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona, *Materials Science and Engineering*, 70, 889–896, **2017**.
- [27] Rahul Rattan, Somnath Bhattacharjee, Hong Zong, Corban Swain, Muneeb A. Siddiqui, Scott H. Visovatti, Yogendra Kanthi, Sajani Desai, David J. Pinsky, Sascha N. Goonewardena, Nanoparticle-macrophage interactions: A balance between clearance and cell-specific targeting, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 4487–4496, **2017**.
- [28] Eleonore Fröhlich, Cellular elimination of nanoparticles, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, 90–94, **2016**.
- [29] Anna Huefner, Dedy Septiadi, Bodo D. Wilts, Imran I. Patel, Wei-Li Kuan, Alexandra Fragniere, Roger A. Barker, Sumeet Mahajan, Gold nanoparticles explore cells: Cellular uptake and their use as intracellular probes, *Methods*, 68, 354–363, **2014**.
- [30] Catherine Carnovale, Gary Bryant, Ravi Shukla, Vipul Bansal, Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity, *Progress in Materials Science*, 83, 152–190, **2016**.
- [31] Paulo Emílio Corrêa Leite, Mariana Rodrigues Pereira, Carlos Antonio do Nascimento Santos, Andrea Porto Carreiro Campos, Ticiania Mota Esteves, José Mauro Granjeiro, Gold nanoparticles do not induce myotube cytotoxicity but increase the susceptibility to cell death, *Toxicology in Vitro*, 29, 819–827, **2015**.
- [32] Kevin M. Nash, Salahuddin Ahmed, Nanomedicine in the ROS-mediated pathophysiology: Applications and clinical advances, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11, 2033–2040, **2015**.
- [33] Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncola, Mark T.D. Cronin, Milan Mazura, Joshua Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84, **2007**.
- [34] Jennifer N. Moloney, Thomas G. Cotter, ROS signalling in the biology of cancer, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, DOI:10.1016/j.semcdb.2017.05.023, **2017**.

- [35] Volodymyr I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175, **2014**.
- [36] Janusz M. Dabrowski, Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation, *Advances in Inorganic Chemistry*, ISSN: 0898-8838, DOI:10.1016/bs.adioch.2017.03.002, **2017**.
- [37] Franz-Josef Schmitt, Gernot Renger, Thomas Friedrich, Vladimir D. Kreslavski, Sergei K. Zharmukhamedov, Dmitry A. Los, Vladimir V. Kuznetsov, Suleyman I. Allakhverdiev, Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837, 835–848, **2014**.
- [38] Christine C. Winterbourn, The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide, *Methods in Enzymology*, 528, 0076-6879, **2013**.
- [39] Yu Pan, Matthias Bartneck, and Willi Jahnen-Dechent, Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, *Methods in Enzymology*, ISSN 0076-6879, DOI:10.1016/B978-0-12-391858-1.00012-5, **2012**.
- [40] K Shankar, HM Mehendale, Oxidative Stress, *Encyclopedia of Toxicology*, 3, **2014**.
- [41] Manashi Bagchi, Shirley Zafra-Stone, Debasis Bagchi, Sangeeta Patel, Oxidative stress and chemical toxicity, *Veterinary Toxicology*, ISBN: 978-0-12-385926-6, DOI:10.1016/B978-0-12-385926-6.00027-2, **2012**.
- [42] Rachana Singha, Parul Parihara, Samiksha Singha, Rohit Kumar Mishraa, Vijay Pratap Singhb, Sheo Mohan Prasada, Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives, *Redox Biology*, 11, 213–218, **2017**.
- [43] Karihtala, P., Soini, Y., Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115, 81-103, **2007**.
- [44] Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603, **1999**.
- [45] Jingga Morrya, Worapol Ngamcherdtrakul, Wassana Yantasee, Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles, *Redox Biology*, 11, 240–253, **2017**.
- [46] Aurelia Magdalena Pisoschi, Aneta Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74, **2015**.
- [47] Etsuo Niki, Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress?, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 19-24, **2016**.

- [48] Mircea Oroian, Isabel Escriche, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*, 74, 10–36, **2015**.
- [49] Jing Qin Wu, Thomas R. Kosten, Xiang Yang Zhang, Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 46, 200–206, **2013**.
- [50] Saibal K. Biswas, Irfan Rahman, Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 60–76, **2009**.
- [51] Shelly C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 42–59, **2009**.
- [52] Gavin E. Arteel, Helmut Sies, The biochemistry of selenium and the glutathione system, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 153–158, **2001**.
- [53] Marcos M. S. Paula, Fabricia Petronilho, Francieli Vuolo, Gabriela K. Ferreira, Leandro De Costa, Giulia P. Santos, Pauline S. Effting, Felipe Dal-Pizzol, Alexandre G. Dal-Bo, Tiago E. Frizon, Paulo C. L. Silveira, Ricardo A. Pinho, Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner, *Journal Of Biomedical Materials Research*, DOI: 10.1002/jbm.a.35469, **2015**.
- [54] Cristina Espinosa-Diez, Verónica Miguel, Daniela Mennerich, Thomas Kietzmann, Patricia Sánchez-Pérez, Susana Cadenas, Santiago Lamas, Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress, *Redox Biology*, 6, 183–197, **2015**.
- [55] Patrik Poprac, Klaudia Jomova, Miriama Simunkova, Vojtech Kollar, Christopher J. Rhodes, Marian Valko, Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases, *Trends in Pharmacological Sciences*, DOI: 10.1016/j.tips.2017.04.005, **2017**.
- [56] Michael M. Gaschler, Brent R. Stockwell, Lipid peroxidation in cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 419–425, **2017**.
- [57] Wan Seok Yang, Brent R. Stockwell, Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation, *Trends in Cell Biology*, DOI:10.1016/j.tcb.2015.10.014, **2016**.
- [58] Sarah J. Storr, Caroline M. Woolston, Yimin Zhang, Stewart G. Martin, Redox Environment, Free Radical, and Oxidative DNA Damage, *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2012.4920, **2013**.
- [59] Joost P.M. Melis, Harry van Steeg, Mirjam Luijten, Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair, *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2012.5036, **2013**.

- [60] Timothy L. Scott, Suganya Rangaswamy, Christina A. Wicker, Tadahide Izumi, Repair of Oxidative DNA Damage and Cancer: Recent Progress in DNA Base Excision Repair, *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5529, **2014**.
- [61] Sandra Reeg, Tilman Grune, Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression?, *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2014.6062, **2015**.
- [62] Peter Karran, Reto Brem, Protein oxidation, UVA and human DNA repair, *DNA Repair*, 44, 178–185, **2016**.
- [63] Earl R. Stadtman, Protein oxidation and aging, *Free Radical Research*, 40, 1250-1258, **2006**.
- [64] Peter P. Fu, Qingsu Xia, Huey-Min Hwang, Paresh C. Ray, Hongtao Yu, Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 64-75, **2014**.
- [65] Javad Khalili Fard, Samira Jafari, Mohammad Ali Eghbal, A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, 447-454, **2015**.
- [66] Diego Mateo, Paloma Morales, Alicia Ávalos, Ana I. Haza, Oxidative stress contributes to gold nanoparticle induced cytotoxicity in human tumor cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24, 161-172, **2014**.
- [67] Yu Pan, Sabine Neuss, Annika Leifert, Monika Fischler, Fei Wen, Ulrich Simon, G nter Schmid, Wolfgang Brandau, Willi Jahnen-Dechent, Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, *small*, 3, 1941 – 1949, **2007**.
- [68] Nonhlanhla Tlotleng, Melissa A. Vetten, Frankline K. Keter, Amanda Skepu, Robert Tshikhudo, Mary Gulumian, Cytotoxicity, intracellular localization and exocytosis of citrate capped and PEG functionalized gold nanoparticles in human hepatocyte and kidney cells, *Cell Biology Toxicology*, 32, 305–321, **2016**.
- [69] Jun Deng, Mengyun Yao, Changyou Gao, Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers, *Acta Biomaterialia*, 53, 610–618, **2017**.
- [70] Bryant C. Nelson, Elijah J. Petersen, Bryce J. Marquis, Donald H. Atha, John T. Elliott, Danielle Cleveland, Stephanie S. Watson, I-Hsiang Tseng, Andrew Dillon, Mellisa Theodore, Joany Jackman, NIST gold nanoparticle reference materials do not induce oxidative DNA damage, *Nanotoxicology*, 7, 21-29, **2013**.
- [71] Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75, **1951**.

- [72] Shahbazi R, Ozcicek, Ozturk G, Ulubayram K. Functionalized gold nanoparticles manifested as potent carriers for nucleolar targeting. *Nanotechnology*, DOI:10.1088/1361-6528/28/2/025103, **2016**.
- [73] Reza Shahbazi, Elif Asik, Nermin Kahraman, Mustafa Turk, and Bulent Ozpolat, Kezban Ulubayram. Modified Gold based siRNA Nanotherapeutics for Targeted Therapy of Triple-Negative Breast Cancer, *Nanomedicine*, ISSN 1743-5889, DOI: 10.2217/nmm-2017-0081, **2017**.
- [74] Perrault, S. D., Chan, W. C. W., Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 nm, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 17042-17043, **2009**.
- [75] David T. Vistica, Philip Skehan, Dominic Scudiero, Anne Monks, Angela Pittman and Michael R. Boyd, Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production, *Cancer Research*, 51, 2515–2520, **1991**.
- [76] Maehara Y., Kusumoto T., Kusumoto H., Anai H., Sugimachi K, Sodium Succinate Enhances the Colorimetric Reaction of the in vitro Chemosensitivity Test: MTT Assay, *Oncology*, 45, 434–436, **1988**.
- [77] Berridge, M. V., Tan, A. S., Characterization of the Cellular Reduction of MTT, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 474, **1993**.
- [78] Slater Tf, Sawyer B, Straeuli U., Studies On Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. III. Points Of Coupling Of Four Different Tetrazolium Salts, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 77, 383-93, **1963**.
- [79] A Wojtala, M Bonora, D Malinska, P Pinton, J Duszynski, Mariusz R. Wieckowski, Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry, *Methods in Enzymology*, ISSN: 0076-6879, DOI: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3, **2014**.
- [80] Paglia, D.E., and Valentine, W.N., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169, **1967**.
- [81] Forstrom, J.W., Zakowski, J.J., and Tappel, A.L., Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine, *Biochemistry*, 17, 2639-2644, **1978**.
- [82] Maier, C.M., and Chan, P.H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders, *Neuroscientist*, 8, 323-334, **2002**.
- [83] Liu, D. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of Molecular Neuroscience*, 7, 159-167, **1996**.

- [84] Johansson, L.H., and Borg, L.A.H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples, *Analytical Biochemistry*, 174, 331-336, **1988**.
- [85] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochemistry*, 150, 76-85, **1985**.
- [86] Eyer, P., and Podhradsky, D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent, *Analytical Biochemistry*, 153, 57-66, **1986**.
- [87] Minette Lagman, Judy Ly, Tommy Saing, Manpreet Kaur Singh, Enrique Vera Tudela, Devin Morris, Po-Ting Chi, Cesar Ochoa, Airani Sathananthan, Vishwanath Venketaraman, Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes, *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0118436, **2015**.
- [88] Halliwell B., Oxidative Stress, nutrition and health, Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans, *Free Radicals Research*, 25, 57-74, **1996**.
- [89] RG Cutler, Antioxidants and aging, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 373S-379S, **1991**.
- [90] Alireza Gharatape, Roya Salehi, Recent progress in theranostic applications of hybrid gold nanoparticles, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 221-233, **2017**.
- [91] Kyoungju Choi, Jim E. Riviere & Nancy A. Monteiro-Riviere, Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity, 11, 64-75, **2017**.
- [92] Elisabetta de Alteriis, Annarita Falanga, Stefania Galdiero, Marco Guida, Valeria Maselli, Emilia Galdiero, Genotoxicity of gold nanoparticles functionalized with indolicidin towards *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal Of Environmental Sciences*, DOI:10.1016/j.jes.2017.04.034, **2017**.
- [93] Giulia Rossi, Luca Monticelli, Gold nanoparticles in model biological membranes: A computational perspective, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, 2380–2389, **2016**.
- [94] Iêda Maria Martinez Paino, Valéria Spolon Marangoni, Rita de Cássia Silva de Oliveira, Lusânia Maria Greggí Antunes, Valtencir Zucolotto, Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells, *Toxicology Letters*, 215, 119– 125, **2012**.
- [95] Mian Muhammad Sufian, Jabar Zaman Khan Khattak, Shahzad Yousaf, Muhammad Suleman Rana, Safety issues associated with the use of nanoparticles in human body, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 19, 67–72, **2017**.

- [96] Sonavane G, Tomoda K, Sano A, In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 65, 1-10, **2008**.
- [97] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, et al., Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small*, 1, 325–7, **2005**.
- [98] Villiers C, Freitas H, Couderc R, et al., Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 55–60, **2010**.
- [99] Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, et al., A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity, *Critical Reviews in Toxicology*, 40, 328–46, **2010**.
- [100] Pan Y, Neuss S, Leifert A, et al., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, 3, 1941–9, **2007**.
- [101] Kang JS, Yum YN, Kim JH, et al., Induction of DNA damage in L5178Y cells treated with gold nanoparticle, *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*, 17, 92–7, **2009**.
- [102] Vijayakumar S, Ganesan S., Size-dependent in vitro cytotoxicity assay of gold nanoparticles, *Toxicological Environmental Chemistry*, 95, 277–87, **2013**.
- [103] Diego Mateo, Paloma Morales, Alicia Ávalos, Ana I. Haza, Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24, 161-172, **2014**.
- [104] Eria Cardoso, Gislaine Tezza Rezine, Elton Torres Zanon, Frederico de Souza Notoyaa, Daniela Dimer Leffac, Adriani Paganini Damiani, Francine Daumannc, Juan Carlos Ortiz Rodriguezd, Roberto Benavidesd, Luciano da Silva, Vanessa M. Andraded, Marcos Marques da Silva Paulaa, Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats, *Mutation Research*, 766, 25-30, **2014**.
- [105] Markus Schulz, Lan Ma-Hock, Sandra Brill, Volker Strauss, Silke Treumann, Sibylle Gröters, Bennard van Ravenzwaay, Robert Landsiedel, Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats, *Mutation Research*, 745, 51– 57, **2012**.
- [106] Carrie A. Simpson, Kenneth J. Salleng, David E. Cliffel, Daniel L. Feldheim, In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9, 257–263, **2013**.
- [107] Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al., Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage, *Small*, 5, 2067–2076, **2009**.
- [108] Rizwan Wahab, Sourabh Dwivedi, Farheen Khan, Yogendra K. Mishrac, I.H. Hwang, Hyung-Shik Shine, Javed Musarrat, Abdulaziz A. Al-Khedhairi, Statistical analysis of

gold nanoparticle-induced oxidative stress and apoptosis in myoblast (C2C12) cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 664–672, **2014**.

- [109] A. Chomposor, K. Saha, P.S. Ghosh, D.J. Macarthy, O.R. Miranda, Z.J. Zhu, K.F. Arcaro, V.M. Rotello, The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles, *Small*, 6, 2246–2249, **2010**.

- [110] Show-Mei Chuang, Yi-Hui Lee, Ruei-Yue Liang, Gwo-Dong Roam, Zih Ming Zeng, Hsin-Fang Tu, Shi-Kwun Wang, Pin Ju Chueh, Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 4960–4973, **2013**.

- [111] Jasmine J. Li, Deny Hartono, Choon-Nam Ong, Boon-Huat Bay, Lin-Yue L. Yung, Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles, *Biomaterials*, 31, 5996–6003, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Gamze Tilbe ŞEN

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekâr

E-posta: tilbesen92@gmail.com

Adresi: 1578. Cadde Ankara Evleri B Blok No:13 Daire:7 Çiğdem Mah. Çankaya

Eğitim

Lise: Başkent Üniversitesi Özel Ayşeabla Fen Lisesi (2006-2010)

Lisans: Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü (2010-2014)

Yabancı Dil

İngilizce

İş Deneyimi

Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi (2015,-)

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP..... ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Tarih 06.09./2017

Tez Başlığı / Konusu: Altın Nanopartiküllerde Polimer Kaplamanın Oksidatif
Stres ve DNA Havanı Üzerine Etkileri

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 33... sayfalık kısmına ilişkin, 22./09./2017 tarihinde ~~salım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin..... adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

06.09.2017

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gamze Tilbe Şen
Öğrenci No: N14120699
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotip
Programı: Nanoteknoloji ve Nanotip Programı
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. Belma Güneşel
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

