



**BOR NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO*
KOŞULLARDA BETA AMİLOİD (A β) TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nurşah AYDIN

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

2019

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BOR NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO*
KOŞULLARDA BETA AMİLOİD ($A\beta$) TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nurşah AYDIN

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BOR NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA BETA
AMİLOİD (A β) TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Nurşah AYDIN tarafından hazırlanan bu çalışma, 19/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı – Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Başak TOĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Erdal SÖNMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 16.01/2020 tarih ve 03 / 60 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

BOR NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA BETA AMİLOİD (A β) TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Nurşah AYDIN

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

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer hastalığı (AH), histolojik olarak beyindeki intraselüler nörofibriller yumru oluşumu ve ekstraselüler amiloid birikimleriyle tanımlanan, demans olgularının %75'inden sorumlu yaşa bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalık ilerleyici bilişsel bozukluklar, çeşitli nöropsikiyatrik-davranış bozukluklar ve günlük yaşam aktivitelerindeki kısıtlamalar ile karakterize olmaktadır. Hastalığın oluşmasına neden olan etkenlerin yok edilmesine yönelik tedavi henüz bulunamamıştır. Nanopartiküller boyutlarından dolayı birçok eşsiz özelliğe sahiptir. Bu üstün özelliklerinden dolayı çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan nanopartiküller sağlık alanında da oldukça önemli hale gelmiştir ve bilim insanlarının dikkatini üzerine çekmiştir. Bu nedenle nanopartiküllerle yapılan terapötik çalışmalar büyük öneme sahiptir. Bu çalışmamızda kararlı yapıdaki kimyasal özellikler, antioksidan özellikler gibi boyut kaynaklı üstün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı hekzagonal bor nitrür nanopartikülleri kullanılmıştır. Mevcut tez kapsamında, retinoik asit uygulamasıyla farklılaştırılmış insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki hekzagonal bor nitrür (hBN) nanopartiküllerinin beta amiloid (A β) toksisitesi üzerine etkilerinin ilk defa araştırılması amaçlanmıştır. *İn vitro* Alzheimer hastalığı modelinde hücre canlılık oranları 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınım testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ardından, hücre kültüründeki oksidatif değişimler toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılarak belirlenmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (qRT-PZR) metodu kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hücrelerdeki apoptozisin gösterilmesi amacıyla Hoechst 33258 floresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca hücrelerde toksisitenin neden olduğu ölüm türünü tespit etmek için akış sitometri yöntemi kullanılmıştır. Son olarak, A β protein miktarının belirlenmesi amacıyla western blot yöntemi yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, farklı hBN nanopartikül konsantrasyonlarının A β toksistesine karşı doza bağlı koruyucu etki gösterdiği hücre canlılık testleriyle belirlenmiştir. hBN nanopartikül uygulamasının deneysel Alzheimer hastalığı modelinde A β toksistesinin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı, antioksidan kapasiteyi desteklediği gözlenmiştir. Moleküler genetik analizler ile hBN nanopartikül uygulamasının β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitelerini azaltırken α -sekretaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. hBN nanopartikül uygulamasının deneysel Alzheimer hastalığı modelinde hücrelerde gerçekleşen nekroz ölümlerinde önemli ölçüde azalmaya sebep olduğu bunun sonucunda da hücre canlılığını arttırdığı akış sitometri sonuçlarıyla belirlenmiştir. Ayrıca hBN nanopartikül uygulamasının A β protein miktarında azalmaya neden olduğu western blot yöntemiyle tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, hBN nanopartiküllerinin A β 'ye bağlı toksisteye karşı nörokoruyucu etkiye sahip olduğu ve ileri çalışmalarla desteklenerek AH tedavisine yönelik araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2019, 152 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Beta amiloid, Bor nitrür nanopartikül, Nöroprotektif, SH-SY5Y

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BORON NITRIDE NANOPARTICLES ON BETA AMYLOID (A β) TOXICITY IN *IN VITRO* CONDITIONS

Nurşah AYDIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease that is responsible for 75% of dementia cases histologically defined by intracellular neurofibrillary tuber formation and extracellular amyloid deposits in the brain. This disease is known to be characterized by progressive cognitive disorders, various neuropsychiatric-behavioral disorders, and restrictions on daily life activities. Treatment for the elimination of the factors that cause the formation of the disease has not yet been found. Nanoparticles have many unique properties due to their size. Because of these superior properties, nanoparticles, which are widely used in various fields, have become important in the health field and have attracted the attention of scientists. Therefore, therapeutic studies with nanoparticles are of great importance. In this study, hexagonal boron nitride nanoparticles were used due to their superior physical, chemical and biological properties resulting from the nano dimension such as stable structure chemical properties and antioxidant properties. In scope of the present thesis it is for the first time aimed to investigate the effects of different concentrations of hexagonal boron nitride (hBN) nanoparticles on beta amyloid (A β) toxicity by using human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) differentiated by retinoic acid administration. Cell viability rates in the *in vitro* Alzheimer model were evaluated using 3- (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) release tests. Subsequently, oxidative changes in cell culture were determined using the total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant state (TOS) parameters. Gene expression levels were examined using the real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. Hoechst 33258 fluorescent staining method was used to demonstrate apoptosis in cells. In addition, flow cytometry method was used to determine the type of death caused by toxicity in cells. Finally, western blot method was performed determine the amount of A β protein.

According to the results, it was determined by cell viability tests that different concentrations of hBN nanoparticles showed a dose-dependent protective effect against A β toxicity. It was observed that hBN nanoparticle application reduces oxidative stress caused by A β toxicity and supports antioxidant capacity in experimental Alzheimer disease model. By molecular genetic analysis were founded that hBN nanoparticle application β -secretase and γ -secretase decreases activities while increasing α -secretase activity. It was identified by flow cytometry that hBN nanoparticle application in experimental Alzheimer's disease model caused a significant decrease in necrosis deaths in cells and as a result increased cell viability. In addition, it was also determined by the western blot method that hBN nanoparticle application causes a reduction in the amount of A β protein. According to the results obtained, the hBN nanoparticles was thought to be a neuroprotective effect against A β -induced toxicity and contribute to the researches about the treatment of AD by supporting with further studies.

2019, 152 pages

Keywords: Alzheimer's disease, Beta amyloid, Boron nitride nanoparticle, Neuroprotective, SH-SY5Y

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, araştırma aşamasında ve tamamlanmasında yardım ve katkılarıyla bana destek olan ve tecrübelerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Tez sürecimde ki katkılarından, sabrından ve güler yüzlülüğünden dolayı birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Arş. Gör. Özlem ÖZDEMİR TOZLU'ya,

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımlarından ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi M. Enes ARSLAN'a,

Bu süreçte yardım ve katkılarıyla yanımda olan Arzugül TANAS ve Tuğba GEZMİŞ'e,

Desteklerini her zaman hissettiğim, bilgileri ve becerileriyle zor anlarımda sorunları çözmemde yardımcı olan, her konuda bana yol gösteren, üzerimde yadsınamaz emekleri olan çok kıymetli arkadaşlarım Hande UNGAN, Arş. Gör. Ayşenur ÖZTÜRK ve Arş. Gör. Ayşe YENİLMEZ'e,

Tezimi kısmen destekleyerek katkıda bulunan TÜBİTAK'a,

Hayatımın her döneminde sevgi, sabır ve destekleri ile daima yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, varlıkları ile bana güç veren sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurşah AYDIN

Aralık, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nano Nedir?	1
1.2. Nanoteknoloji	2
1.2.1. Nanoteknolojinin tarihi gelişimi.....	3
1.2.2. Nanoteknolojinin potansiyel uygulama alanları.....	5
1.2.3. Nanoteknolojinin bilimsel yaklaşımları	12
1.2.3.a. Yukarıdan-aşağıya (Top-Down) yaklaşımı	12
1.2.3.b. Aşağıdan-yukarıya (Bottom-up) yaklaşımı	14
1.3. Nanobiyoteknoloji	15
1.4. Nanoyapılı Materyallerin Sınıflandırılması.....	17
1.5. Nanopartiküller.....	22
1.5.1. Nanopartikül türleri	24
1.5.1.a. Fullerenler (Karbon 60)	24
1.5.1.b. Katı lipid nanoparçacıkları (SLN'ler).....	25
1.5.1.c. Lipozomlar.....	26
1.5.1.d. Nanokabuklar	26
1.5.1.e. Kuantum noktaları (QD).....	27
1.5.1.f. Dendrimerler	28
1.5.1.g. Karbon nanotüp (CNT)	29
1.5.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	29
1.5.2.a. Parçacık boyutu	29
1.5.2.b. Yüzey Yüğü.....	32
1.5.2.c. Yüzey hidrofobikliği.....	32

1.6. Nanotoksikoloji	32
1.6.1. Nanotoksistide etkili olan önemli faktörler	33
1.6.1.a. Boyut	33
1.6.1.b. Kimyasal bileşenler	34
1.6.1.c. Parçacık yüzeyi.....	34
1.6.1.d. Dozaj	35
1.6.1.e. Serbest radikal üretimi.....	35
1.6.1.f. Yüzey kimyası.....	35
1.6.2. Nanopartikül toksisitesi.....	36
1.7. Tez Kapsamında Kullanılan Bor Nitrür Nanopartikülleri.....	39
1.8. Alzheimer Hastalığı.....	42
1.8.1. Amiloid.....	45
1.8.2. Beta amiloid (A β).....	46
1.9. Sitotoksik Testleri	50
1.9.1. MTT testi	52
1.9.2. LDH salınım testi	54
1.10. Apoptoz	55
1.11. Nekroz	58
2. KAYNAK ÖZETLERİ	63
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	71
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	71
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	72
3.3. hBN Nanopartikülünün Sentezi.....	73
3.4. hBN Nanopartikülünün Karakterizasyonu	73
3.5. Hücre Hattının Temini.....	74
3.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	74
3.7. Hücre Hattının Açılması, Pasajlanması ve Kültüre Edilmesi.....	75
3.8. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması	76
3.9. MTT Testi.....	76
3.10. LDH Salınım Testi	77
3.11. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)	78
3.12. Toplam Oksidan Durumu (TOD)	79

3.13. RNA İzolasyonu	80
3.14. c DNA Sentezi.....	81
3.15. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR).....	82
3.16. Hoechst 33258 Floresan Boyama.....	84
3.17. Akış Sitometrisi.....	84
3.18. Protein İzolasyonu.....	85
3.19. Bradford Yöntemi.....	85
3.20. Western Blot Yöntemi.....	86
3.20.1. Western Blot yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.....	87
3.20.2. Western Blot yönteminde kullanılan jeller ve hazırlanışı	88
3.20.3. Western Blot yönteminin yapılışı.....	89
3.21. İstatistiksel Analizler	92
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	93
4.1. hBN Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	93
4.1.1. X Işını Kırınım Deseni (XRD)	93
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	94
4.2. Retinoik Asit Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması	98
4.3. <i>In Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinin A β İle İndüklenen Sitotoksitesinde hBN Nanopartiküllerinin Nöroprotektif Etkileri.....	101
4.4. <i>In Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinin A β İle İndüklenen Sitotoksitesinde hBN Nanopartiküllerinin TAK ve TOD Değerleri.....	109
4.5. <i>In Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturulan Farklılaşmış SH-SY5Y Hücre Hattında Moleküler Genetik Yanıtlar.....	112
4.6. <i>In Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinde A β İle İndüklenen hBN Nanopartiküllerinin Hoechst 33258 Floresan Boyama ve Akış Sitometri Analiz Değerleri.....	117
4.7. <i>In Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinde A β İle İndüklenen hBN Nanopartiküllerinin Western Blot Analiz Değerleri.....	121

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	125
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	153



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

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

Kısaltmalar

AH	Alzheimer hastalığı
APP	Amiloid Prekürsör Protein
ATP	Adenozin trifosfat
Aβ	Amiloid beta
BACE	β sekretaz enzimi
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CTF-α	C-terminal fragmanı-α

GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
hBN	Hekzagonal bor nitrür
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum hidrojen fosfat
LDH	Laktat dehidrojenaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
MMP	Mitokondriyal membran
MTT	3-(4,5dimetylthiazol-2-yl)-2,5 diphenltetrazolium bromide
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
NFY	Nörofibriler yumaklar
PBS	Fosfat tamponlu salin
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TNF- α	Tümör Nekrozu Faktörü α
TOD	Toplam oksidan durumu
XRD	X-ışın kırınımı
γ -sekretaz	Gama sekretaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mikro ve nano boyutlu yapıların karşılaştırılması.....	2
Şekil 1.2. Lycurgus'un kadehi (sol) ve 1364 yılında inşa edilen St.Vitus katedralinden bir mozaik cam örneği (sağ)	4
Şekil 1.3. Nanoyapılı materyallerin sentezi veya üretimi için yaygın olarak kullanılan yukarıdan-aşağıya yaklaşımının sınıflandırılması.....	13
Şekil 1.4. Nanobiyoteknolojinin sınıflandırılması	18
Şekil 1.5. Çeşitli 0D nanoyapıların görüntüleri	19
Şekil 1.6. Çeşitli 1D nanoyapıların görüntüleri	20
Şekil 1.7. Çeşitli 2D nanoyapıların görüntüleri	21
Şekil 1.8. Çeşitli 3D nanoyapıların görüntüleri	22
Şekil 1.9. a) kübik (cBN), b) wüstitik (wBN), c) altıgen (hBN) ve d) eşkenar dörtgen (rBN) bor nitrür modifikasyonlarının yapısı.....	40
Şekil 1.10. Bor nitrit ve grafitin kristal yapısı	41
Şekil 1.11. Sağlıklı beyin ve alzheimer hastalıklı beyin arasındaki karşılaştırma	43
Şekil 1.12. Amiloid kaskad hipotezi	44
Şekil 1.13. Amiloid prekürsör protein (APP) proteolizi ve iki alternatif yol	48
Şekil 1.14. MTT ve renkli formazan ürününün yapıları	53
Şekil 1.15. Apoptotik hücrenin morfolojik özellikleri.....	57
Şekil 3.1. Western blot yönteminde yükleme aşaması	90
Şekil 3.2. Elektroforezde yürütme işlemi	91
Şekil 4.1. hBN nanopartiküllerinin XRD deseni	94
Şekil 4.2. hBN nanopartiküllerinin 100 nm ölçekteki SEM görüntüleri	95
Şekil 4.3. hBN nanopartiküllerinin 200 nm ölçekteki SEM görüntüleri	95
Şekil 4.4. hBN nanopartiküllerinin 300 nm ölçekteki SEM görüntüleri	96
Şekil 4.5. hBN nanopartiküllerinin 200 nm ölçekteki TEM görüntüleri	97
Şekil 4.6. hBN nanopartiküllerinin 1.0 µm ölçekteki TEM görüntüleri.....	97
Şekil 4.7. hBN nanopartiküllerinin 2.0 µm ölçekteki TEM görüntüleri.....	98

Şekil 4.8. (a) Farklılaşmamış SH-SY5Y Hücreleri, RA Kullanılarak Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri (b) 3.gün, (c) 6.gün, (d) 9.gün, (e) 12.gün ve (f) 15.gün.....	100
Şekil 4.9. hBN nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	103
Şekil 4.10. hBN nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen LDH aktivitesi.....	103
Şekil 4.11. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde A β toksisitesine karşı hBN nanopartiküllerinin etkisi.....	105
Şekil 4.12. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde A β toksisitesine karşı hBN nanopartiküllerinin LDH aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.13. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde hBN nanopartikül+A β muamelesinin TAK düzeyleri üzerine etkileri	111
Şekil 4.14. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde hBN nanopartikül+A β muamelesinin TOD düzeyleri üzerine etkileri	111
Şekil 4.15. A β toksisitesine karşı hBN nanopartikül uygulamasının gen ifadeleri üzerine etkileri.....	116
Şekil 4.16. Hoechst 33258 boyası ile hücre çekirdeklerinin boyanması a- sadece SH-SY5Y hücreleri, b- hBN nanopartikülleri, c- sadece A β içeren hücre kültürü d- hBN nanopartikülleri+A β (Oklar apoptotik cisimcikleri göstermektedir).....	118
Şekil 4.17. Hücre akış sitometrisi analizi a- sadece SH-SY5Y hücreleri, b- sadece A β içeren hücre kültürü, c- hBN nanopartikülleri, d- hBN nanopartikülleri+A β	119
Şekil 4.18. hBN nanopartiküllerinin A β protein düzeyine etkisinin Western blot ile 30.sn. elde edilen görüntüsü.....	123
Şekil 4.19. hBN nanopartiküllerinin A β protein düzeyine etkisinin Western blot ile 150.sn. elde edilen görüntüsü.....	123
Şekil 4.20. hBN nanopartiküllerinin A β protein düzeyine etkisinin Western blot ile 300.sn. elde edilen görüntüsü.....	124

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Nanoteknolojideki periyodik gelişmeler.....	4
Çizelge 1.2. Nanoteknoloji uygulamaları	6
Çizelge 3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan kimyasallar	71
Çizelge 3.2. Araştırmalar süresince kullanılan aletler ve cihazlar	72
Çizelge 3.3. c DNA reaksiyonu	81
Çizelge 3.4. PZR programı	82
Çizelge 3.5. RT-PZR’de kullanılan primerler.....	82
Çizelge 3.6. RT-PZR için kullanılan bileşikler ve miktarları	83
Çizelge 3.7. PZR programı	83
Çizelge 3.8. 2X Resolving Jel.....	88
Çizelge 3.9. 2X Stacking Jel.....	89
Çizelge 4.1. Gruplar arasındaki gen ekspresyon değişiklikleri.....	113

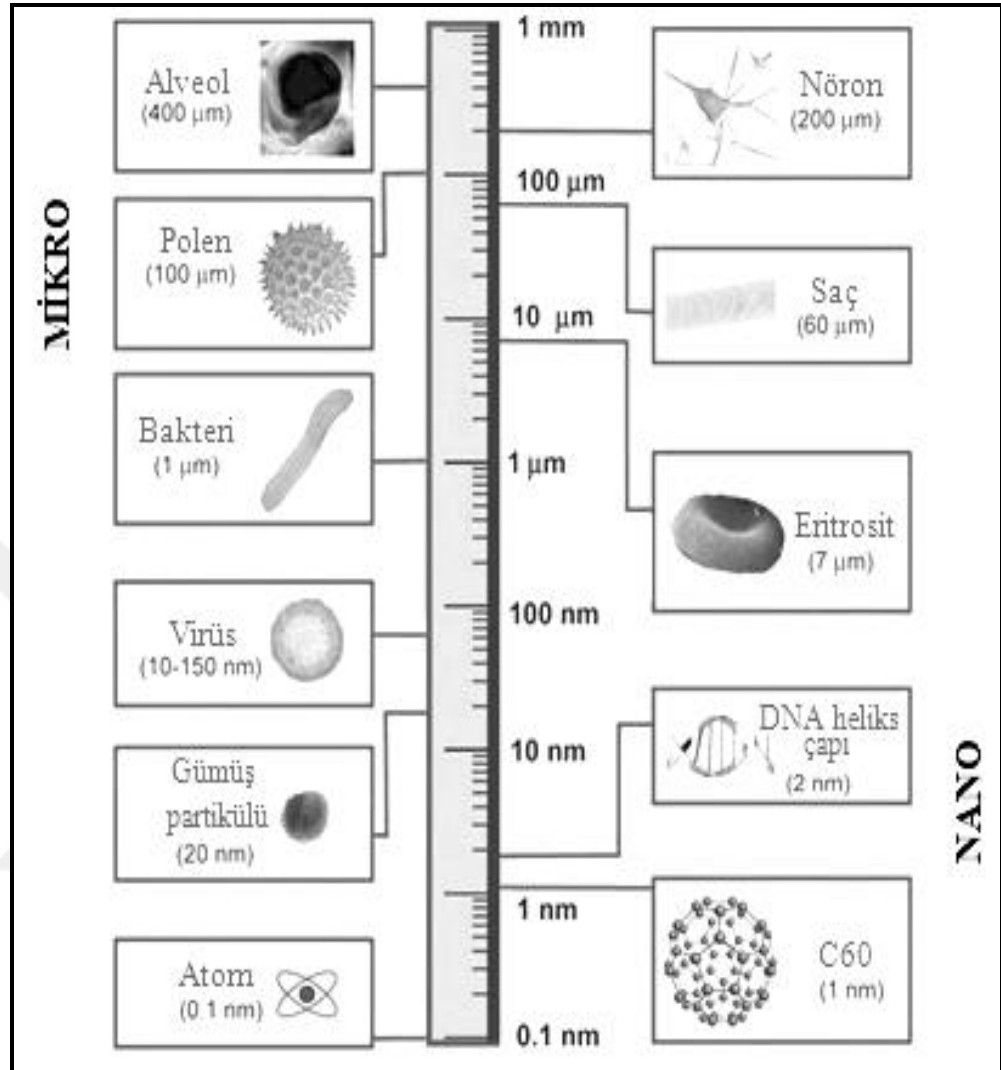
1. GİRİŞ

1.1. Nano Nedir?

"Nano" Yunanca da "Cüce" anlamına gelen nanos kelimesinden türetilmiş olan ve nanometre ölçeğinden kaynaklanan özelliklere sahip nesneleri, sistemleri veya olayları tanımlamak için kullanılan bir sıfat olup bilim literatüründe giderek yaygınlaşmaktadır. "Nano" ön eki modern bilimlerin çoğunda popüler bir etiket olup nanometre, nanobilim, nanoteknoloji, nanoyapı, nanotüp, nanotel ve nanorobot gibi birçok sözcükle beraber kullanılmaktadır (Feynman 1959; Buzea *et al.* 2007)

Nano, bir fizikî büyüklüğün milyarda biri anlamına gelmektedir. Ölçü birimi olarak bakıldığında genellikle metre ile birlikte kullanılmakta olup, 1 nanometre metrenin milyarda birine tekabül etmektedir (Kamel 2007). Başka bir ifade ile, bir nanometre (nm) 6 karbonun enine ya da 10 su molekülüne eşittir. Bir insan saç teli yaklaşık 80.000 nm, bir kırmızı kan hücresi ise yaklaşık olarak 7000 nm genişliğe sahip olduğu bilinmektedir (Whitesides 2003). Bu ölçek çok küçük bir uzunluğu ifade ettiği için atom ve molekül dünyasına uzanmamızı sağlamaktadır. Bu büyüklüğü daha iyi kavramak için Şekil 1.12'de nano ve mikro olarak tanımladığımız ölçeklerin biyolojik bileşenler yardımıyla karşılaştırılması gösterilmektedir.

'Mikro' küçük bir şey ifade ederken, 'nano' nanosistemde gözlemlenen benzersiz olayları oluşturan atom parçacıklarını vurgulamaktadır (Buzea *et al.* 2007). Bu sebeplerden dolayı nanoboyutta malzemeler farklı özellikler göstermektedir.



Şekil 1.1. Mikro ve nano boyutlu yapıların karşılaştırılması (Buzea *et al.* 2007)

1.2. Nanoteknoloji

Nanobilim ve nanoteknolojinin tam bir tanımı olmamakla birlikte genel görüşe göre nanoteknoloji, maddenin nm ölçeğinde şeklinin ve boyutunun kontrol edilmesiyle işlevsel materyallerin, cihazların ve sistemlerin çalışılması, tasarlanması, oluşturulması, sentezlenmesi, manipülasyonu ve uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Yani atomik ve moleküler seviyelerdeki ölçekte yeni fenomenlerin ve maddelerin özelliklerinin kullanılmasıdır (Salamanca-Buentello *et al.* 2005). Bir başka ifade ile nanoteknoloji, temel olarak yeni özelliklere sahip materyalleri, yapıları, cihazları ve sistemleri

oluşturmak ve kullanmak için atomik, moleküler ve süper moleküler seviyelerde çalışabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Roco 2003).

Nanoteknoloji atomik ölçeklerde materyallerin ve ara yüzlerin nasıl oluşturulduğunun belirlenmesi ve değiştirilmesi sonucu yeni malzemelerin ve yeni ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yeteneğinden dolayı nanoteknoloji, malzemelerin performanslarını ve işlevselliğini artırmak amacıyla yeni nesil ürünler geliştirerek önümüzdeki yıllarda yeni pazar segmentleri oluşturmak için önemli bir fırsat olanağı sunmaktadır (Wegner *et al.* 2005; Kamel 2007).

Nanoteknolojinin günümüzde bu kadar önemli olmasının temel nedenleri arasında

- I) Daha az alan, daha az malzeme ve daha az enerji,
- II) Yeni mülkler, olgular ve uygulamalar,
- III) İmalat için en verimli uzunluk ölçeği,
- IV) Canlı yapılarla cansız yapıların bir arada işlev görmesini sağlamak gibi özellikler sayılmaktadır (Moon *et al.* 2006).

1.2.1. Nanoteknolojinin tarihi gelişimi

1950’li yıllardan beri yoğun olarak araştırılan ve son yıllarda hükümetlerce de desteklenerek geliştirilen nanoteknolojinin yeni bir teknoloji olmadığı, tarihinin çok eskilere dayandığı tespit edilmiştir. Yaklaşık 1600 yıl önce kelebek kanatlarının renk efektleri Romalılar tarafından kopyalanmıştı. İngiliz kraliyet müzesinde sergilenmekte olan IV. yüzyıla ait Lycurgus fincanı olarak bilinen cam kap, altın ve gümüş nanopartiküllerine bağlı olarak doğal ışık altında yeşim yeşili ve parlak bir ışık kaynağıyla etkileyici kırmızı bir renkte görünmektedir (Poole *et al.* 2003)

Ayrıca 17. Yüzyılda nanopartiküllerin, Çinli zanaatkarlar tarafından altına kırmızı renk verilerek Avrupalılar tarafından katedral pencerelerinde kullanılmak üzere cam ve vazoların yapımında kullanıldığı ifade edilmiştir (Leonhardt 2007).



Şekil 1.2. Lycurgus'un kadehi (sol) ve 1364 yılında inşa edilen St.Vitus katedralinden bir mozaik cam örneği (sağ) (Leonhardt 2007)

Bu kadar eski tarihe sahip olup, ürünlerinin yaygın olarak kullanılmasına rağmen nanoteknoloji kavramı ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik ödüllü Richard Feynman tarafından bir toplantıda ortaya atılmıştır. Nanoteknoloji terimi ilk kez 1974 yılında Tokyo Bilim Üniversitesinde araştırmacı olan Prof. Dr. Norio Taniguchi'nin "Nanoteknolojinin Temel Konsepti" adlı makalesinde kullanılmıştır (Miyazaki and Islam 2007; Zong *et al.* 2005; Sahoo *et al.* 2007). Bu tarihten itibaren nanoteknolojideki gelişmeler hız kazanmıştır. Çizelge 1.1'de nanoteknolojinin tarihsel gelişimi gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Nanoteknolojideki periyodik gelişmeler (Nikalje 2015)

Yıl	Nanoteknolojide Gelişim
M.Ö. 1200-1300	Çözülebilir altın keşfedildi.
1931	Geçirimli elektron mikroskopu (TEM)
1937	Taramalı elektron mikroskopu (SEM)
1959	Nanoteknoloji ifadesi Feynman tarafından ilk kez kullanıldı.
1965	Moore Yasası
1974	Nanoteknoloji terimi Taniguchi tarafından ilk kez kullanıldı.
1981	IBM Tarama Tünel Mikroskopunun keşfi

Çizelge 1.1. (devam)

1985	Fulleren keşfedildi.
1986	K. Eric Drexler tarafından Yaratılış Motorları adlı nanoteknolojinin ilk kitabı yayınlandı, Atomik Kuvvet Mikroskoku geliştirildi.
1989	S. Iijima Karbon Nano tüpünü keşfetti.
1991	IBM logosu bireysel atomlarla yapıldı.
1999	R. Freitas'ın 1. nano tıp kitabı "Nano tıp" yayınlandı.
2000	Ulusal Nanoteknoloji Girişimi ilk kez başlatıldı.
2001	Nm ölçekli elektronik cihazlar teorisini geliştirmek ve karbon nanotüpleri ve nanotellerin sentezi ve karakterizasyonu için Nanoteknolojide Feynman Ödülü verildi.
2004	Gelişmiş nanoteknoloji ile ilgili ilk politika konferansı düzenlendi. Nano mekanik sistemler için ilk merkez kuruldu.
2005-2010	Kullanım sırasında durumlarını değiştiren aktif nano ürünler, 3 boyutlu ağlar hazırlandı.
2011	Moleküler nanoteknolojisinin başladığı dönem.

1.2.2. Nanoteknolojinin potansiyel uygulama alanları

Nanoteknoloji, son endüstriyel devrim olarak kabul edilmekte ve gelecekte nanoteknolojinin toplum, ekonomi ve yaşam üzerinde çok büyük etkilere sahip olacağına inanılmaktadır. Makroskobik ölçeklerdeki malzemelerin özelliklerinden çok farklı özelliklere sahip olduğu için, nano ölçekli malzemeler ilgi odağı olmuştur. Nanoölçekli malzemelerin boyutlarının neden olduğu eşsiz özelliklerden dolayı nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, tıp, bilgi teknolojileri, biyoteknoloji, enerji üretimi ve depolanması, malzeme teknolojileri, imalat, savunma, çevre uygulamaları, elektronik, bilgisayar gibi teknolojik alanlarda çok geniş uygulama potansiyeline sahiptir (Miyazaki and Islam 2007). Nanoteknolojideki uygulamalara ilişkin bazı örnekler Çizelge 1.2’de gösterilmektedir (Ochekpe *et al.* 2009).

Çizelge 1.2. Nanoteknoloji uygulamaları (Ochekpe *et al.* 2009)

Nanoteknoloji Alanı	Uygulaması
Nanoelektronik	
Bilgi ve hesaplama	-Kamera ve kişisel bilgisayarlardaki kuantum noktaları ve nanoteller. -Televizyonlarda katot ışınları yerine nanotüpler. -Yarı iletken silikon nanoteller içeren elektronik ve optik cihazları.
Sensörler	-Nanomalzemesler, toprak ve su kalitesini değerlendirmek ve bitki, gıda ve diğer ürünlerin durumunu belirlemek için kullanılır.
Nanomalzemesler	
Tek boyutlu malzemesler	-Su geçirmez kumaşlar ve elektronikte kullanılan ince filmler ve katmanlar. -Yakıt hücrelerindeki yüzeyler.
İki dxboyutlu malzemesler	-Kataliz ve enerji depolaması için molibden disülfür gibi anorganik nanotüpler. -Veri depolama, elektronik ve optoelektronik cihazlar için silikon nanoteller.
İki boyutlu malzemesler	-Sensörler, elektrik akımı iletimi ve antistatik ambalaj için karbon nanotüpleri. -Hidrojen yakıt hücrelerinde hidrojen sızdırmazlığı için nanotüpler. -DNA molekülleri gibi biyopolimerler
Üç boyutlu malzemesler	-Kozmetik, tekstil, boya, kataliz ve ilaç dağıtımında kullanılan nanoparçacıklar. -Fullerenler, yağlayıcılar, ilaç dağıtım araçları ve elektrik devrelerinde kullanılan karbon malzemeslerdir.
Nanobiyoteknoloji	
Biyomimetik yapılar	-Hastalıkların teşhisi, moleküler görüntüleme ve ilaç verme.
İlaç Dağıtımı	-İlaç ve gen terapileri için yeni formülasyonlar.
Doku mühendisliği	-Hasar görmüş dokuların nanomateryal bazlı yapılar kullanılarak çoğaltılması ve onarımı.

Nanoteknolojinin etkisini gösterebileceği potansiyel araştırma ve uygulama alanları aşağıdaki gibidir:

- A. Sağlık ve Tıp
- B. Enerji ve Çevre
- C. Savunma
- D. Tarım ve Gıda
- E. Uzay Araştırması (Nikalje *et al.* 2015).

A) Sağlık ve Tıp

Tıbbi uygulamalar, insan refahı konusunda büyük beklentiler oluşturan alanların başında gelmektedir. Nanobilim uygulamasının tıbbi alanda birçok fayda sağladığı ve insanlık için potansiyel olarak değerlendirildiği belirtilmektedir. Nano tıp ile erken teşhis, uygun tedavi ve hastalıkların takibi mümkün olmaktadır (Nikalje *et al.* 2015). Nanoteknoloji, tıbbi teknolojinin birçok alanında çok önemli yeni araçların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Sadece malzeme ve tıbbi cihazları iyileştirmekle kalmayıp aynı zamanda mevcut ve daha geleneksel teknolojilerin sınırlarına erişebileceği yeni "akıllı" cihazlar ve teknolojiler oluşturmak için olağanüstü fırsatlar sunmaktadır (Logothetidis 2006).

Nanoteknoloji hasar görmüş dokuların onarımında, kanser teşhisi için sensör geliştirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu teknoloji, kök hücre araştırmalarında büyük gelişmelere olanak sağlamaktadır. Kuantum noktaları, kök hücrelerin moleküler görüntülenmesinde ve izlenmesinde, kök hücrelere gen veya ilaçların verilmesinde kullanılmaktadır. Bütün bu ilerlemeler, kök hücrelerin gelişimini rejeneratif tıptaki uygulamaya doğru hızlandırmaktadır (Wang *et al.* 2009).

Biyomedikal nanoteknoloji, birçok hastalıkla mücadelede devrimci fırsatlar sunmaktadır. Bu alandaki gelişmeler sayesinde kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili moleküllerin tespit edilmesinin yanı sıra, patojen bakteri, mantar ve

HIV virüsleri gibi enfeksiyonlarla ilişkili mikroorganizmalar ve virüsler tespit edilmektedir (Roszek *et al.* 2005).

Nanomalzemelerin tıp alanındaki bazı uygulamaları aşağıda verilmektedir (Salata *et al.* 2004).

- Floresan biyolojik etiketler
- İlaç ve gen iletimi
- Patojenlerin biyolojik tespiti
- Proteinlerin tespiti
- DNA yapısının araştırılması
- Doku mühendisliği
- Isıtma yoluyla tümör tahribatı (hipertermi)
- Biyolojik moleküllerin ve hücrelerin ayrılması ve saflaştırılması
- MR kontrast geliştirme
- Fagokinetik çalışmalar

Nanoteknolojinin, erken teşhis koyulmasına, hastaya özel hassas ve etkili tedavinin yapılmasına yönelik devrimci fırsatlar sağlayarak yarının tıbbında önemli bir rol oynayacağı ifade edilmektedir (Logothetidis 2006).

B. Enerji ve Çevre

Dünya enerji talebinin 2050 yılına kadar yaklaşık 30 terawatt olması beklenmektedir. Bu nedenle temel prensip, enerji verimliliğini arttırarak ve temiz enerji kaynakları geliştirerek çevreyi korumaktır. Çözüm, bilimsel atılımlar ve gerçekten devrimci gelişmeler gerektirmektedir. Bu bağlamda, nanoteknoloji bu zorlukların üstesinden gelmek için heyecan verici ve gerekli yaklaşımları sunmaktadır (Lee *et al.* 2010; Lota *et al.* 2011). Bu sebeplerden dolayı nanoteknoloji, çevreyi korumak ve büyüyen bir dünya için yeterli enerji sağlamak için günden güne daha fazla önem kazanmaktadır (Nikalje *et al.* 2015).

Enerji alanlarını etkilemekte olan nanoteknoloji araştırmaları, özellikle aydınlatma ve ısınma verimliliğini artırmaya, elektrik depolama seviyelerini yükseltmeye ve enerji üretiminden kaynaklanan kirliliğin temizlenmesine odaklanmaktadır (Jensen 2014). Nanoteknolojinin gelişmiş teknikleri, enerjinin depolanmasına, diğer formlara dönüşmesine,  evre dostu imalat malzemelerine ve daha iyi geliştirilmiş yenilenebilir enerji kaynaklarına yardımcı olmaktadır (Nikalje *et al.* 2015).

Nanoyapıya dayalı malzemeler çevreyi iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Düşük konsantrasyonda toksik gaz tespit edebilen nanosensörler, toprak ve yeraltı sularında bulunan kirleticilerin tespiti ve uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Nano adsorbentler ve nanomembranlar, ağır metaller, sentetik boyalar ve biyolojik kirleticiler de dahil olmak üzere çeşitli kirletici türlerin giderilmesiyle atık suların arıtılmasında, su ve havanın arındırılmasında etkin rol oynamaktadırlar (Sung *et al.* 2010).

Nanoteknoloji, nano-kataliz, yakıt hücreleri, güneş ve hidrojen teknolojisi gibi daha ucuz enerji üretimi ve yenilenme enerjileri için kullanılmaktadır. Nanoteknoloji, istenmeyen kirliliği en aza indirecek olan yeni çevreci ve yeşil teknolojilerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Nikalje *et al.* 2015). Nanoteknolojideki eğilimlerin, hammadde ve enerjinin kullanımını azaltarak temiz endüstriyel üretim süreçlerine veya ürünlerine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

C. Savunma

Nanoteknolojinin askeri alandaki uygulamaları, geleneksel sistemlerde gelişmelere ve niteliksel yeniliklere yol açtığı için pek çok alanda umut verici potansiyele sahiptir. Nanoteknoloji  alışmaları kapsamında nanoyapılı patlayıcı, zırh ve kimyasal- biyolojik savaş araçları tasarlamak, geliştirmek ve üretmek savunma sektörünün birincil hedefleri arasında yer almaktadır. Bu alandaki en önemli uygulamalardan birisi bireyler için akıllı üniformaların ve tedavi edici ilaçların tasarlanarak ölüm oranını azaltmaktır. Çok küçük ve son derece yetenekli olan bilgisayarlar silah, üniforma, lojistik ve iletişim sistemlerinde kullanılmaktadır. Nanoyapılar kullanılarak oluşturulan bombalar

geleneksel bombalarla karşılaştırıldığında daha büyük oranda yanma derecesine sahip patlamalara sebep olmaktadır. Nanoteknoloji savaş olanaklarının artmasına ve savaş alanının geniş kapsamlı haritalandırılmasına olanak sağladığı için savunma daha etkin ve ucuz hale gelmektedir (Altman 2004) .

Savunma alanındaki uygulamaları;

1. Nano elektronikler yoluyla bilgi hakimiyetini sürdürmek,
2. Nanokütleyle elektroniklere dayanan sanal gerçeklik sistemlerini kullanmak,
3. Askeri işgücündeki düşüşleri dengelemek, birliklere yönelik riskleri azaltmak ve araç performansını artırmak için otomasyon ve robotik kullanımını arttırmak,
4. Başarısızlık oranlarını düşürmek için askeri platformlarda ihtiyaç duyulan yüksek performansı elde etmek,
5. Kimyasal / biyolojik / nükleer algılamada ilerleme sağlamak,
6. Nükleer silahların yayılmasını önleme, izleme ve yönetimi için kullanılan sistemlerde yenilikler oluşturmak,
7. Nükleer savunma sistemlerinin kontrolü için kombine nanomekanik ve mikromekanik cihazlar üretmektir (Roco and Bainbridge 2001).

D) Tarım ve Gıda

Nanoteknolojinin, tarım ve gıda alanlarındaki uygulamalarla yaşam kalitesini yükselterek, devrim yapma potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir. Bu görüş, nano ölçekli biyomalzemelerin yeni özelliklerinin keşfedilmesi ve bunların mühendislik ile desteklenmesinden kaynaklanmaktadır (Scott and Chen 2002, 2013).

Nanoteknolojinin tarımda uygulanan materyal bilimi ve biyokütle dönüşüm teknolojileri uygulamaları gıda, yem, lif, ateş ve yakıtların temini için temel oluşturmaktadır. Toprak, su gibi kaynaklar sınırlı olduğu için gelecekte gıda talebinin muazzam bir şekilde artacağı düşünülmektedir. Doğalgaz ve petrol gibi sınırlı yakıt rezervlerinden dolayı kimyasal gübreler ve böcek ilacı gibi üretim girdilerinin maliyetinin endişe verici bir

oranda artması beklenmektedir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için hassas çiftçiliği geliştirmek, üretim maliyetlerini düşürmek ve üretimi arttırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmaktadır (Ditta 2012).

Düşük maliyetli, uzun süre salınan ve bitkilerle daha iyi temas ettikleri için böcek ilacı taşıyıcıları olarak geliştirilen kil nanotüpleri, pestisit miktarını %70-80 oranında azaltarak böcek ilacı maliyetlerini düşürmektedir. Nano barkodlar, benzersiz olarak tanımlanabilen nano ölçekli etiketler olarak hizmet etmekte ve tarım, gıda ve hayvancılık ürünlerinde kimlik doğrulama veya izleme gibi biyolojik olmayan uygulamalar için kullanılmaktadır (Ditta 2012).

Nanoteknoloji,

1. Besleyici bitkileri ve böcekleri korumak amacıyla tasarlanmış biyolojik olarak parçalanabilir kimyasallar,
2. Hayvanlar ve bitkiler için genetik iyileştirme,
3. Hayvanlara genlerin ve ilaçların verilmesi,
4. DNA testi için nano dizi tabanlı teknolojiler gibi gelişmeler sağlayarak tarım alanındaki uygulamalara doğrudan katkıda bulunmaktadır (Roco and Sims 2001).

Nanoteknoloji ilerledikçe, tarımsal ürünlerin sadece bilindik ürünlerin üretilmesiyle kalmayıp aynı zamanda tasarım gereği yeni malzemeler ve cihazlar da üretebileceği düşünülmektedir. Nitekim, parlak bir gelecek ve sürdürülebilir bir toplum yararı için tarımsal ve doğal kökenli biyolojik materyallerin, nanoboyutlarda araştırılması ve kullanılmasıyla elde edilebileceği tahmin edilmektedir (Scott and Chen 2002, 2013).

E) Uzay

Nanoteknoloji uçaklar, roketler, uzay istasyonları ve gezegen/güneş keşfi platformları için hafif, yüksek mukavemetli, termal olarak dengeli malzemelerin tasarımı ve üretiminde kritik önem taşımaktadır. Bu alanların maliyetli olmasına sebep olan uzay

araçlarının yapımında kullanılan malzemelerin ağırlığı, nanoteknoloji ile azaltılarak maliyet düşürülmektedir (Roco and Sims 2001).

Bu alanda nanoteknoloji kullanılarak düşük enerji gerektiren, radyasyona karşı dirençli, verimliliği yüksek bilgisayarlar, uzay araçlarında kullanılacak olan nanoboyutlu aletler, algılayıcılar ve kaplama malzemelerinin üretilmesi planlanmaktadır (Roco and Sims 2001).

1.2.3. Nanoteknolojinin bilimsel yaklaşımları

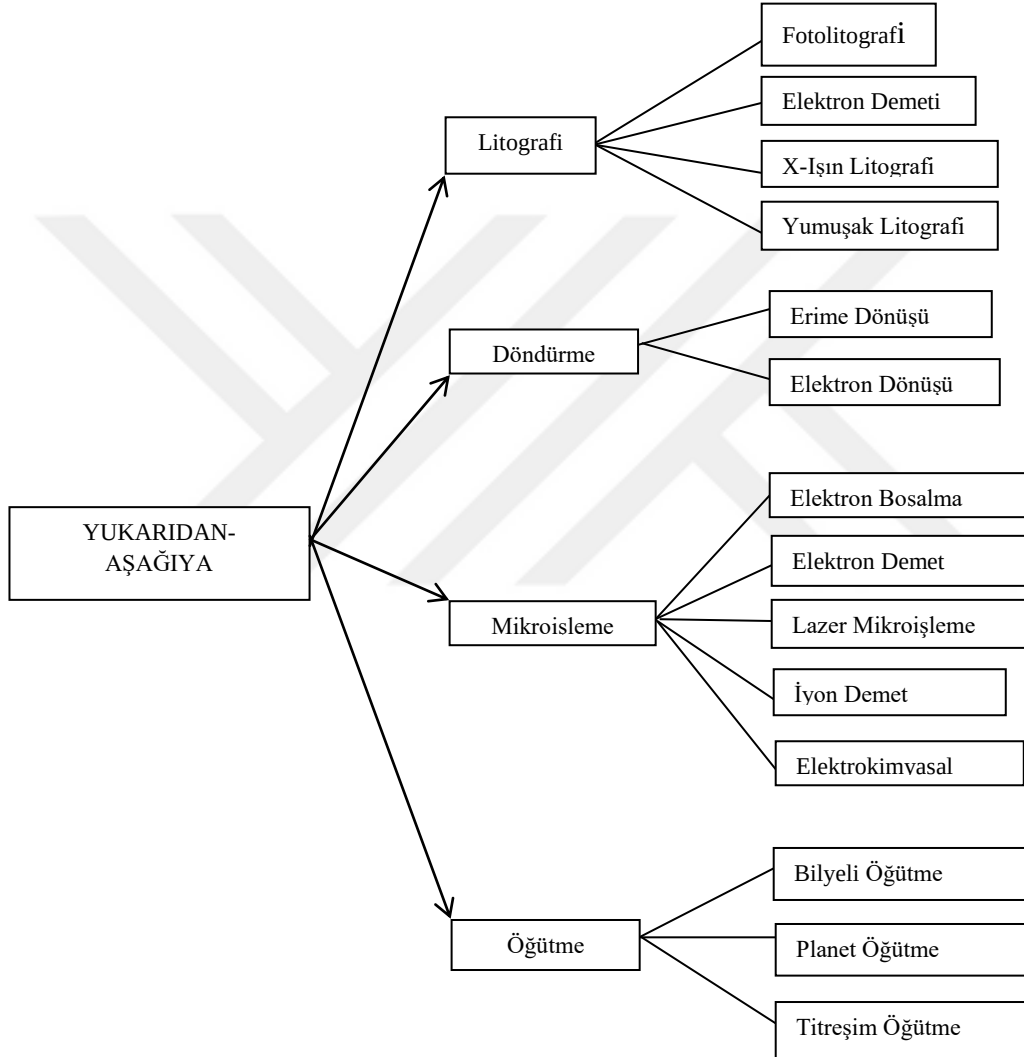
Geniş kapsamlı uygulama alanlarına sahip olan nanoteknoloji temelli ürünlerin sentezi ve üretimi, nanomühendislikte en aktif alanlardan biri olarak bilinmektedir. Nanoyapılı malzemelerin özelliklerinin boyut, şekil, bileşim, morfoloji ve kristal yapısına büyük ölçüde bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Bu parametreleri kontrol etmek ve çeşitli uygulamalardaki gereksinimleri karşılamak için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Nanoyapıların imalatı için sayısız teknoloji olmasına rağmen, temel olarak birbirinden çok farklı mekanizmaya sahip olan iki yaklaşım yaygın olarak kullanılmaktadır (Cao 2004).

Birincisi, bir katıya bir dış kuvvet uygulandığında daha küçük parçacıklara bölünmesine yol açan yukarıdan-aşağıya (top-down) yöntemidir. İkincisi, atom dönüşümleri veya moleküler yoğunlaşmalara dayanan gaz veya sıvı atomlarından başlayarak nanoparçacıklar üretebilen aşağıdan yukarıya (bottom-up) doğru olan yöntemdir.

1.2.3.a. Yukarıdan-aşağıya (Top-Down) yaklaşımı

Bu yaklaşım, bir katı parçanın arzu edilen şekil ve ebatla oluşturulması için öğütme, oyma veya kesme işlemleriyle modifiye edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemin malzeme israfı içermesi, kullanılan araçların çözünürlüğü gibi sınırlılıkları vardır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımlar, entegre devrelerin imalatında elektronik endüstrisi tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Cao 2004). Nanomalzemelerin

yukarıdan aşağıya yaklaşımlarla sentezi genellikle fiziksel veya mekanik yöntemlerle olmaktadır. Yukarıdan aşağıya doğru planlanan stratejiler esasen öğütme, işleme ve litografi üzerine kuruludur. Bu yöntemlerin kategorize edilmiş bir diyagramı Şekil 1.3'de gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Nanoyapılı materyallerin sentezi veya üretimi için yaygın olarak kullanılan yukarıdan-aşağıya yaklaşımının sınıflandırılması (Elnashaie *et al.* 2015)

Tüm yüzeyin aynı anda desenlendiği fotolitografi, en yaygın kullanılan yukarıdan-aşağıya tekniğidir. Bu teknik uygun maliyetli olup hızı oldukça yüksektir. Çözünürlüğü optik kırınım etkilerinden dolayı 0,2-0,5 mm ile sınırlıdır. Bunun aksine, elektron ve iyon temelli litografi, yaklaşık 50 nm yüksek çözünürlüklü düzenli nanoyapı dizilerinin

oluşturulmasını sağlamaktadır (Qiao *et al.* 2011). Daldırma kalemli litografi (DPN), bir atomik kuvvet mikroskop ucunun bir kimyasal sıvıya batırıldıktan sonra yüzeyi yazma amacıyla kullanılan bir tekniktir. DPN sıralı bir teknik olduğundan dolayı yüksek hacimli imalat teknolojileri için uygun değildir. Yumuşak litografide küçük özelliklerin kalıpları damgalanmaktadır. Bu kalıplar bir laboratuvarda bir çip veya sistem aygıtında nükleik asitlerin, proteinlerin veya hücrelerin analizi için mikro kanal haline gelmektedir. Diğer yukarıdan aşağıya teknikler, tarama tünelleme mikroskopisi (STM), mikro kontakt baskı (mCP) ve nanoetkili litografiyi (NIL) içermektedir (Liu *et al.* 2008).

Nanoyapı malzeme sentezinde, yukarıdan-aşağı yönteminin bir başka dalı öğütme yöntemidir. Öğütme bir katının boyutunu azaltmak için yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Fakat bu yöntemin uygulamada bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öğütme işlemi sırasında, iki önemli süreç parçacık özelliklerini etkilemektedir. Birincisi, soğuk kaynak işlemi kompozitin ortalama parçacık boyutunda bir artışa neden olmaktadır. İkincisi parçalanma işlemi, kompozit parçacıkların parçalanmasına neden olmaktadır (Salah *et al.* 2011).

Nanoyapılı malzeme sentezinin bir başka türü ise mikro işlemedir. Bu tür işlemde delme, kesme, çevirme gibi mekanik bir işleme lazer ışını, iyon ışını, X ışını ve kimyasal veya elektrokimyasal yöntemler kullanılarak nanoyapılar oluşturulmaktadır (Elnashaie *et al.* 2015).

1.2.3.b. Aşağıdan-yukarıya (Bottom-up) yaklaşımı

Aşağıdan-yukarıya yaklaşımı, kontrollü kimyasal reaksiyonlarla moleküler türlerin kendi kendine bir araya gelmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yaklaşım, maddenin, atom-atom, molekül-molekül veya makromoleküler düzeyde elde edilen yeni özelliklere ve işlevlere sahip materyallerin, cihazların ve sistemlerin oluşturulması ve kullanılmasını içermektedir.

Yukarıdan-aşağıya yaklaşım metodları katı fazda yapılırken, aşağıdan-yukarı yaklaşım metodları sıvı fazda yapılmaktadır. Yukarıdan-aşağı yaklaşımıyla karşılaştırıldığında, bu tekniğin daha etkin ve iyi kontrol edilen şekil, boyut, morfoloji, yapı, yüzey özelliklerine sahip çok çeşitli nanomalzemelerin sentezine elverişli olduğu görülmektedir (Cao 2004).

Nanoyapıya dayalı malzemelerin sentezi için aşağıdan-yukarıya yaklaşımı sıvı ve gaz fazı olmak üzere iki temel metoda ayrılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda kimyasal reaksiyonlar oluşurken diğerlerinde fiziksel olaylar meydana gelmektedir. Sıvı fazda sentez için örnekler çökeltme, sol-jel, hidrotermal, mikroemülsiyon ve elektrokimyasal çökeltmedir. Sıvı fazda aşağıdan yukarıya sentez prosedürlerinin en yaygın türleri sol-jel yönteminin kullanımına dayanmaktadır. Sol-jel yöntemi, çözeltiden hidroliz ve poliyoğunlaştırma reaksiyonları yoluyla jel oluşumuna olanak sağlayan sentez yöntemleri grubunu ifade etmektedir.

Aşağıdan-yukarı yaklaşımına dayalı olarak gaz fazında meydana gelen sentez çeşitleri; kimyasal buhar birikimi, kimyasal buhar sentezi, fiziksel buhar birikimi, ışık saçılması, lazerle ablasyonudur (Qiao *et al.* 2011). Gaz fazı sentez prosedürünün simgesi olarak kimyasal buhar birikimi tipik olarak karbon nanotüpler ve ince filmler gibi katı nanomalzemeler üretmek için kullanılan bir tekniktir. Kimyasal buhar birikim yüksek kaliteli materyal üretimi için mükemmel, ölçeklenebilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Elnashaie *et al.* 2015).

1.3. Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji; biyoteknoloji ve nanoteknoloji olmak üzere iki güçlü teknolojinin birleşmesinden ortaya çıkan hibrit biliminin, moleküler seviyenin ötesine geçme yeteneğini yansıtarak avantajlı sonuçlar elde edilmesine yardımcı olan bir bilim dalıdır (Medvedeva *et al.* 2007; Shelton *et al.* 2007).

Nanobiyoteknoloji alanında iki ana araştırma yaklaşımı vardır (Luther 2006):

"Nano-Biyo", çeşitli biyolojik süreçlerin ardındaki moleküler mekanizmaları tek molekül düzeyinde incelemek için nanoteknolojik araçların kullanılmasını ifade etmektedir. Bu açıdan nanoanaliz, biyolojik yapılar için nanomanipülasyon teknikleri, nanoteknolojik olarak üretilen canlı organizmalar için aktif maddeler, aktif maddeleri nakletmek için nano taşıyıcılar, nanomakineler, teşhis ve terapi için nanobotlar, nanoteknolojik olarak kaplanmış implantlar ve nanoelektronik implantlar olası uygulamalardır.

"Biyo-Nano" biyoteknolojik materyalleri ve teknik nanosistemleri üretmek için kullanılan tasarımları ifade etmektedir. Bunlar bilgi, iletişim, enerji, çevre ve teknik uygulamalar gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca biyo nanoya örnek olarak şunlar da verilebilir: Biyolojik paradigmalara dayalı nanoteknoloji uygulamaları (biyomimetikler), teknik sistemler için nanometre ölçeğinde biyolojik bileşenlerin kullanımı, biyolojik bileşenleri, işlevsel veya organizasyonel ilkeleri kullanan nanoelektronik ve nanoinformatik.

Biyolojik sistemlerin çoğu nanometre boyutunda olduğu için nano ölçekli materyallerin, biyomedikal cihazlara iyi entegre olması beklenmektedir (Laval *et al.* 1999). Nanobiyoteknolojinin farklı alanlardaki Ar-Ge çalışmaları çok işlevli biyosensörler, nanoboyutlu mikroçipler, moleküler anahtarlar ve doku analoglarının geliştirilmesini kapsamaktadır. Metalik, seramik, polimerik ve kompozit nanomalzemeler, yeni doku mühendisliği, hedefli ilaç dağıtım sistemleri, biyosensörler çeşitli biyomedikal uygulamalar için kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Atomik kuvvet mikroskobu, ikincil iyon kütle spektrometre, taramalı elektron mikroskobu, taramalı prob mikroskobu vb. sofistike aletler, biyomalzemelerin ve nanoboyuttaki doku ile olan arayüzlerin yapısal ve kimyasal olarak değerlendirilmesine izin vermektedir (Grainger and Castner 2008). Biyomedikal nanometri, biyolojik sistemlerin nasıl işlediği, metabolik süreçlerin birbiriyle nasıl ilişkili olduğu ve yeni moleküler ölçekli makinelerin nasıl çalıştığını gösteren yeni bilgileri sağlamaya yardımcı olmaktadır (Heng *et al.* 2008).

Nanoboyutlu kontrast ajanların, moleküler düzeyde biyolojik süreçleri belirlemede öncülük etmesi beklenmektedir. İlaç dağıtımına yönelik nanomedikal yaklaşımlar, bir ilacın biyoyararlanımını artırmak için nanoölçekli parçacıkların veya moleküllerin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Çipli nanoteknoloji, toplam kimyasal analiz sistemleri için yeni bir paradigma olarak kabul edilmektedir. Nanorobotik ve nanomanipülasyon teknolojileri, nano ölçekli materyallerin hareket ettirilmesine ve manipüle edilmesine izin vermektedir (Cavalcanti *et al.* 2008).

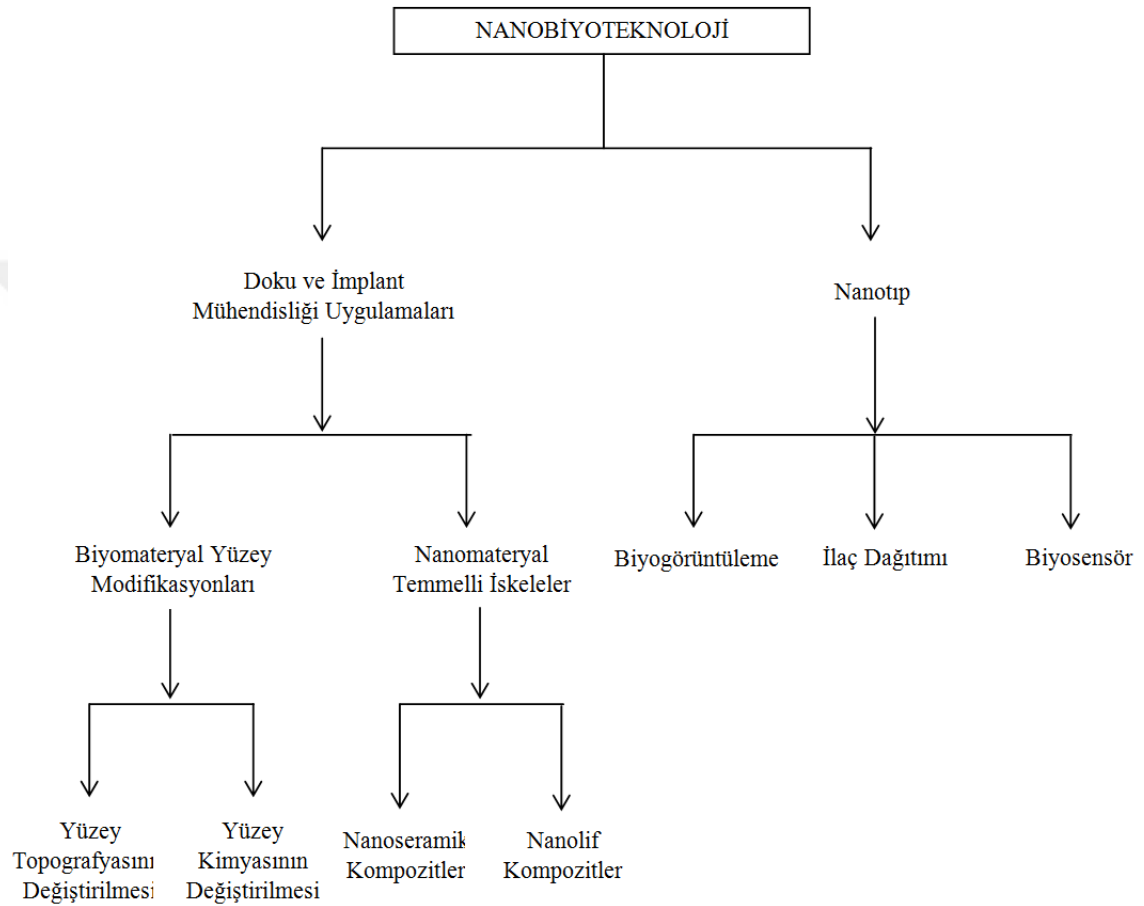
Çeşitli nanomedikal uygulamalar için kullanılan nanomalzemelerde uygun yüzey değişiklikleri yapılmaktadır. Bu yüzey modifikasyon stratejilerinin amacı, nano boyutlu malzemelerin sulu ortamda çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırarak biyolojik özellikler ve işlevler kazandırmaktır. İnorganik nanomalzemelerin kullanımı ile ilgili potansiyel güvenlik endişeleri bu şekilde hafifletilmektedir (Xu *et al.* 2007).

Tanısal veya terapötik araç olarak kullanılabilen yeni biyoteknolojik ve nanobiyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Antikanser tedavilerinin etkinliğini arttırmak, bu ilaçların sağlıklı dokularda dağılımını ve toksik etkilerini en aza indirmek birçok araştırmanın hedefi olmaktadır (Viswanathan *et al.* 2010). Şekil 1.4'te nanobiyoteknolojinin uygulandığı alanların şematik bir diyagramı gösterilmektedir.

1.4. Nanoyapılı Materyallerin Sınıflandırılması

Geçtiğimiz yirmi yılda, yüzlerce yeni nanoyapılı materyal elde edildiğinden dolayı bunların sınıflandırmalarına ihtiyaç duyulmuştur. Nanoyapılı materyaller, mikron veya nano boyutlu yapı birimlerini içeren ve boyut etkileri gösteren düşük boyutlu malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Bu materyalleri ilk sınıflandırma fikri Gleiter tarafından 1995 yılında ortaya atılmıştır ve 2000 yılında Skorokhod tarafından açıklanmıştır. Ancak, fullerenler, nanotüpler ve nanoakışkanlar gibi sıfır boyutlu, tek boyutlu, iki boyutlu ve üç boyutlu yapılar dikkate alınmadığı için Gleiter ve Skorokhod sınıflandırması kabul edilmemiştir. Bu nedenle, Pokropivny ve Skorokhod sıfır boyuta,

tek boyuta, iki boyuta ve üç boyuta sahip nanoyapılı materyalleri içeren yeni bir sınıflandırma yapmışlardır (Gleiter 2000; Skorokhod *et al.* 2001; Pokropivny and Skorokhod 2007).



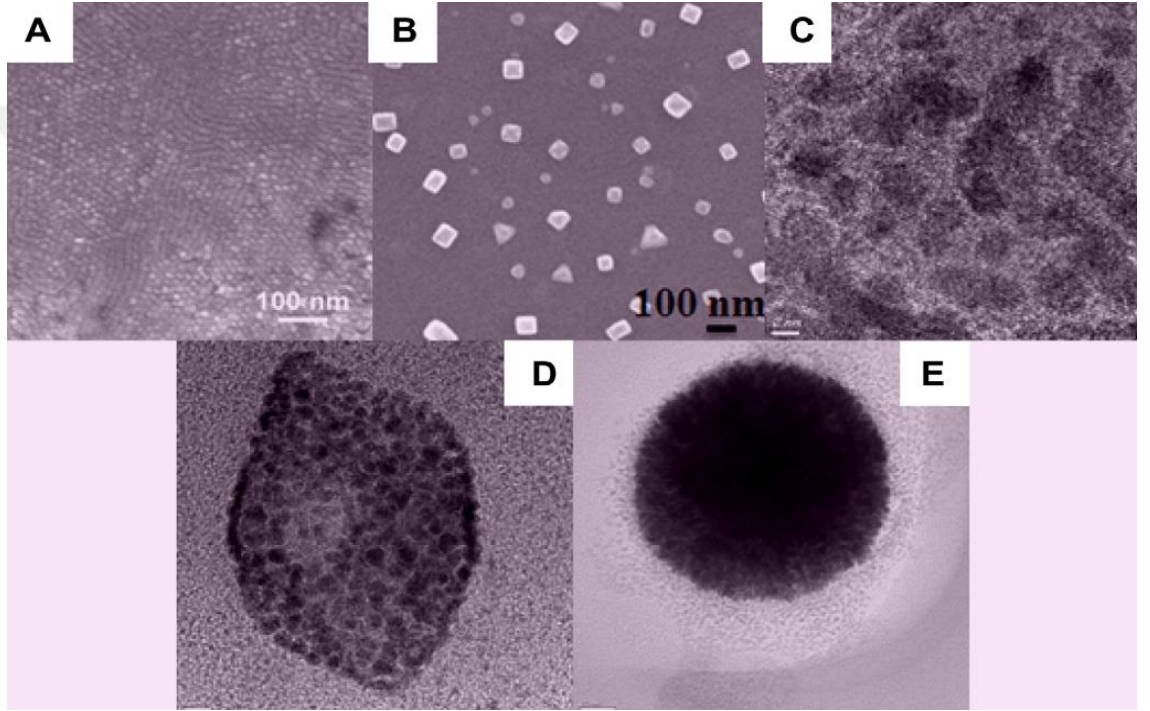
Şekil 1.4. Nanobiyoteknolojinin sınıflandırılması (Viswanathan *et al.* 2010).

Boyutsallık çeşitli nanoyapıları birbirinden ayıran en önemli özelliktir. Bundan dolayı boyut kullanılarak nanoyapılar sınıflandırılmıştır. Boyutlara göre nanoyapıların sınıflandırılması aşağıdaki gibidir;

a) Sıfır Boyutlu (0D) Nanoyapılar

Son yıllarda, 0D nanoyapılı materyal alanında önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. 0D nanoyapılı materyallerin imalatı için birçok fiziksel ve kimyasal yöntem

geliştirilmektedir. Yakın zamanda, birkaç araştırma grubu tarafından, üniform parçacık dizileri, heterojen parçacık dizileri, çekirdek kabuğu, kuantum noktaları, içi boş küreler ve nano lensler gibi 0D nanoyapılar sentezlenmiştir (Mokerov *et al.* 2000; Ustinov *et al.* 2000; Lee *et al.* 2009; Kim *et al.* 2010). Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen 0D nanoyapıların taramalı elektron mikroskopi (SEM) ve transmisyon elektron mikroskopi (TEM) görüntüsü Şekil 1.5'te gösterilmektedir (Tiwari *et al.* 2012).



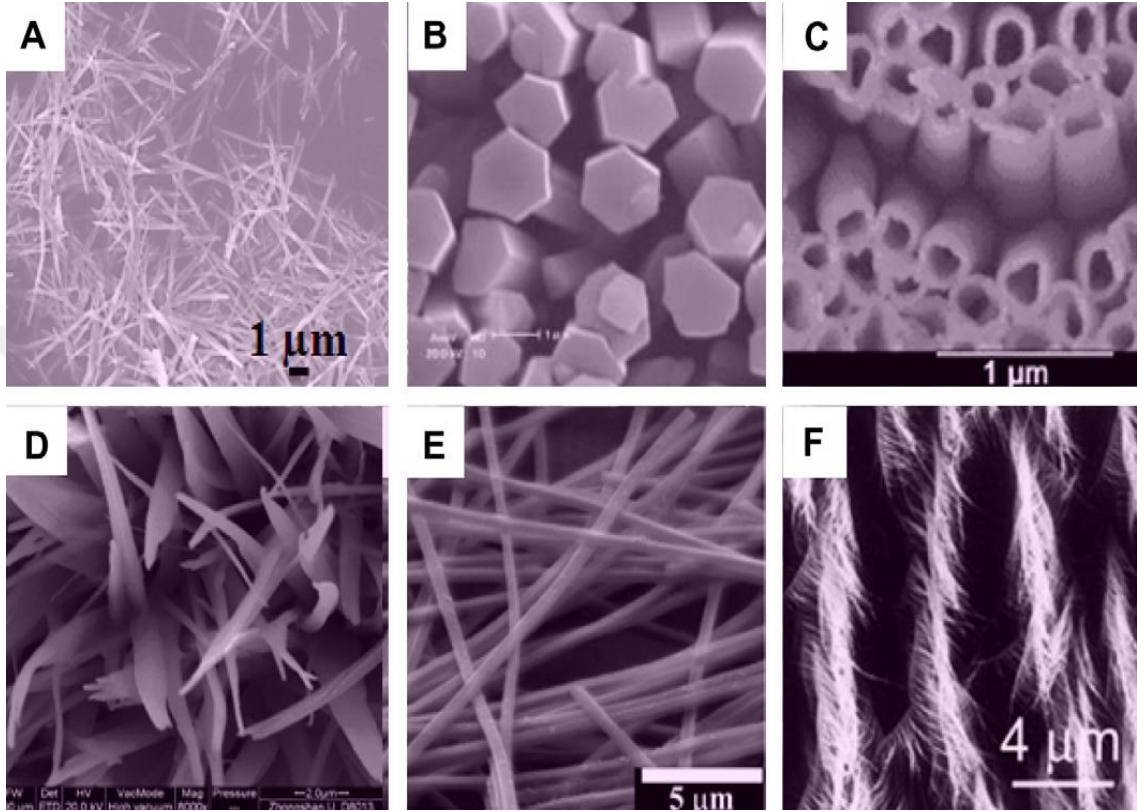
Şekil 1.5. Çeşitli 0D nanoyapıların görüntüleri

(A) Kuantum noktaları, (B) nanopartikül dizileri, (C) çekirdek kabuğu nanopartikülleri, (D) içi boş küpler ve (E) nano küreler (Tiwari *et al.* 2012)

b) Tek Boyutlu (1D) Nanoyapılar

1D nanoyapılı materyaller çok çeşitli potansiyel uygulamalar içermektedir. 1D nanoyapılar nano ölçekte çok sayıda yeni fenomeni keşfetmek ve fonksiyonel özelliklerin boyut bağımlılığını araştırmak için ideal sistemler olarak kabul edilmektedir. 1D nanoyapıların nanoelektronikler, nanocihazlar ve sistemler, nanokompozit malzemeler, alternatif enerji kaynakları ve ulusal güvenlik üzerine büyük etkileri bulunmaktadır (Huang *et al.* 2002; Kuchibhatla *et al.* 2007; Park *et al.* 2010).

Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen 1D nanoyapıların SEM görüntüsü Şekil 1.6'da gösterilmektedir (Tiwari *et al.* 2012).

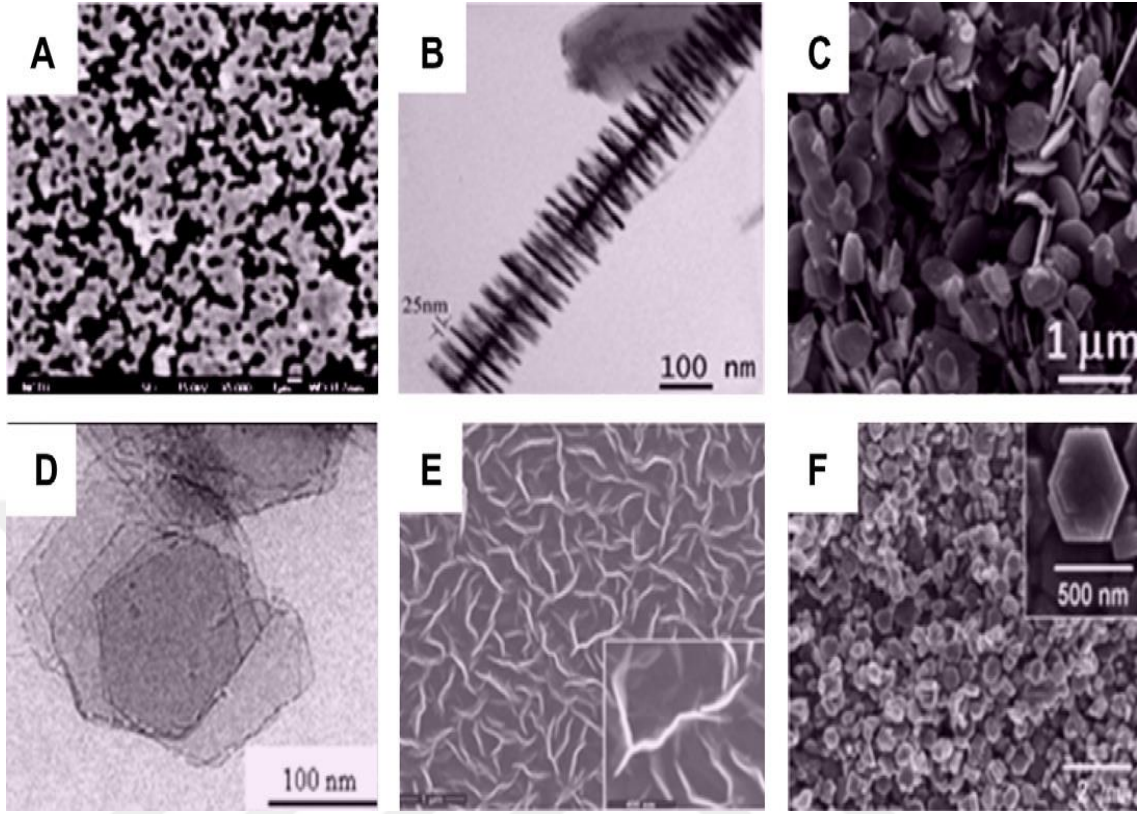


Şekil 1.6. Çeşitli 1D nanoyapıların görüntüleri

(A) Nanoteller, (B) nanoçubuklar, (C) nanotüpler, (D) nanobantlar, (E) nanoşeritler ve (F) hiyerarşik nanoyapılar (Tiwari *et al.* 2012).

c) İki Boyutlu (2D) Nanoyapılar

2D nanoyapılar, nanometrik boyut aralığının dışında iki boyuta sahip yapılar olarak bilinmektedir. Belirli geometrilere sahip 2D nanoyapılar nano cihazların anahtar bileşenlerinin yapı taşı olarak kullanılmaktadır. 2D nanoyapılar sensörler, fotokatalistler, nano kaplar, nano reaktörler ve diğer malzemelerin şablonlarda yeni uygulamalar geliştirmesine olanak sağlamaktadır (Jun *et al.* 2005; Pradhan and Leung 2008; Kim *et al.* 2009; Bae *et al.* 2010). Araştırmacılar tarafından sentezlenen 2D nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü Şekil 1.7'de gösterilmektedir (Tiwari *et al.* 2012).

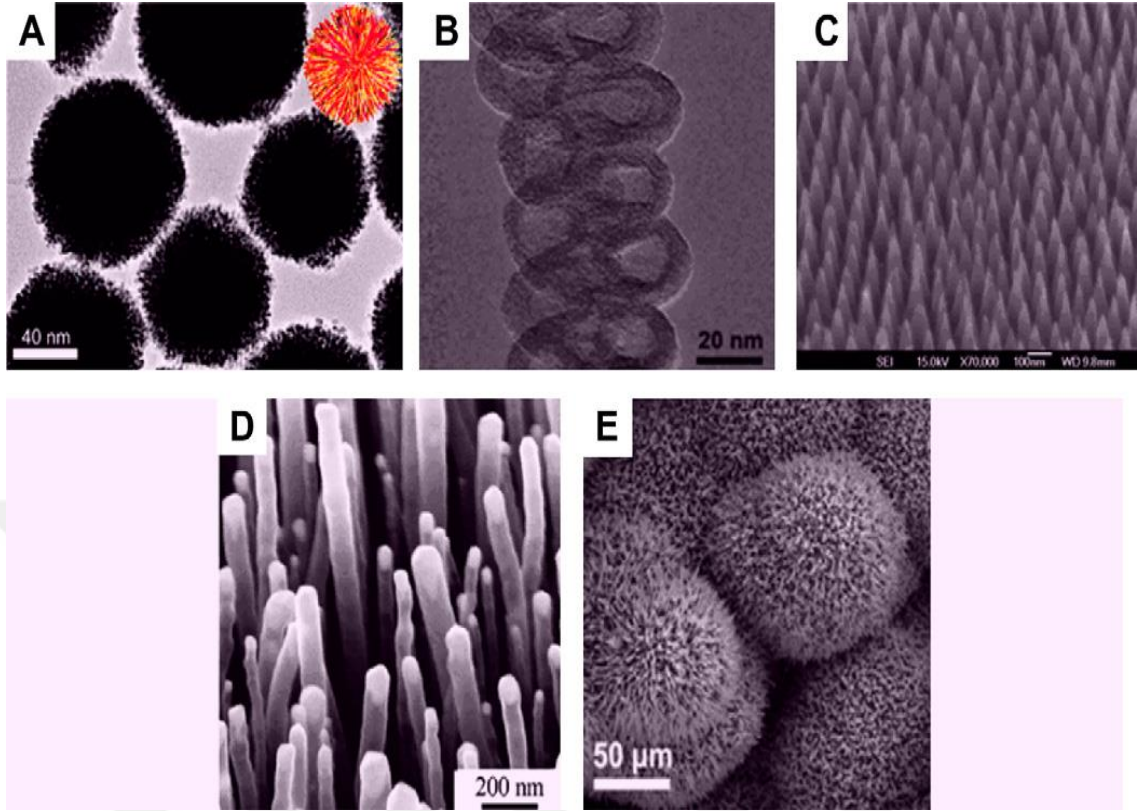


Şekil 1.7. Çeşitli 2D nanoyapıların görüntüleri

(A) Bağlantı noktaları(sürekli adalar), (B) dallanmış yapılar, (C) nanosütunlar, (D) nanolevhalar, (E) nanoduvallar ve (F) nanodiskler (Tiwari *et al.* 2012).

d) Üç Boyutlu (3D) Nanoyapılar

3D nanoyapılar büyük spesifik yüzey alanı ve kuantum boyut etkisinden kaynaklanan üstün özelliklerinden dolayı birçok araştırmacı tarafından yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Boyut, şekil, büyüklük ve morfoloji gibi birçok faktörün nanoyapıların davranışlarında nihai performans ve uygulamalar için temel oluşturduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, 3D nanoyapıları kontrollü bir yapı ve morfoloji ile sentezlemek çok önemlidir. Ayrıca, 3D nanoyapılar geniş bir uygulama yelpazesıyla önemli materyaller olarak bilinmektedir. Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen 3D nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü Şekil 1.8’de gösterilmektedir (Tiwari *et al.* 2012).



Şekil 1.8. Çeşitli 3D nanoyapıların görüntüleri

(A) Nanotoplar, (B) nanobobinler, (C) nanokoniler, (D) nanopiller ve (E) nanoakışkanlar (Tiwari *et al.* 2012).

1.5. Nanopartiküller

İngiliz Standartlar Enstitüsü nanopartikülleri, tüm alanları veya çapları nanometre aralığındaki parçacıkların bir formu olarak tanımlamaktadır (Horikoshi and Serpone 2013). Başka bir ifade ile nanopartikül terimi, üç boyutunun en az birinin 1 ile 100 nm arasında karakteristik bir boyuta sahip olduğu parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Nanoboyuttaki yapılar makro büyüklükteki benzerlerinden farklı fiziksel, kimyasal, optik, elektriksel, katalitik, termal ve mekanik özellikler göstermektedir (Hagens *et al.* 2007). Nanoparçacıkların ortaya çıkan benzersiz özellikleri, büyük boyutlu malzemelerin özelliklerinin basit ekstra polinasyonundan ötürü tahmin edilememektedir (Nagarajan 2008).

Nanopartiküllerin büyük boyutlu malzemelerden farklı özellikler göstermesinin temel sebepleri, bu boyut aralığında kuantum etkilerinin hakim olmaya başlaması ve yüzey alanı/hacim oranının artması olarak gösterilmektedir (Holister *et al.* 2003). Yüzey alan-hacim oranındaki artış, parçacıklar küçüldükçe aşamalı olarak ilerlemektedir. Bu da parçacık dışındaki atomların parçacık içindeki atomlara giderek daha fazla egemen olmaya başlamasına neden olmaktadır. Böylece parçacığın bireysel özelliklerini ve çevredeki diğer malzemelerle nasıl etkileşime girdiğini değiştirmektedir. Nispeten yüksek yüzey alanı, kataliz ve elektrotlar gibi yapılarda kritik bir faktör olduğu için nispi yüzey alanının artması, onları endüstri için çok ilginç kılmaktadır. Parçacıklar küçüldükçe kuantum mekanik davranış sergilemeye başlamaktadır. Klasik mekanik, büyük nesneler için gözlem ve teori arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Ancak, sadece kuantum mekaniği elektron kadar küçük nesnelerin davranışı hakkında bilgi vermektedir (Helland 2004).

Nanopartiküller, metaller, metal oksitler, silikatlar, yarı iletkenler, polimerler, karbon malzemeler, organikler veya biyomoleküller gibi büyük kimyasal çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca küre, silindir, disk, tel, nokta, kapsül ve tüp gibi şekillerle mükemmel morfolojik çeşitlilik sergilemektedirler. Genel olarak, bunlar kullanılacak özel uygulamaların ihtiyaçlarını gidermek için özel yüzey değişiklikleri ile tasarlanmaktadır. Geniş kimyasal yapıları, şekilleri ve morfolojileri, parçacıkların bulunduğu ortam, parçacıkların dispersiyon hali ve yüzey modifikasyonundan kaynaklanan nanopartiküllerin muazzam çeşitliliği bu alanı önemli bir bilim alanı haline getirmektedir (Nagarajan 2008).

Küçük parçacık boyutu, nanoparçacıkların birçok eşsiz özelliğine neden olmaktadır. Nanopartiküller emici olabildiğinden ve emisyon dalga boyları parçacık boyutu ve yüzey işlevselleştirme ile kontrol edilebildiğinden, ilginç optik özellikleri göstermektedir. Nanopartikül boyutu kritik ışık dalga boyunun altında ise, şeffaflık elde edilmektedir (Nagarajan 2008). Nanoparçacıklar katı bir matrisle dahil edilerek daha iyi termal iletkenlik sağlanmaktadır. Bazı metaller ve metal oksitler için parçacık boyutunun azalması manyetik davranışın iyileşmesine neden olmaktadır.

Nanoparçacıkların geniş spesifik yüzey alanı, bir takım benzersiz uygulamaların kökenini oluşturmaktadır. Kataliz, birim hacim başına yüksek yüzey alanı ve nanoparçacıkların homojen dağılımı ile arttırılmaktadır. Trombosit morfolojisi ve silikat parçacıklarının geniş spesifik yüzey alanları, polimer zarlarının bariyer özelliklerini büyük oranda arttırmaktadır (Nagarajan 2008).

Nanopartiküllerin amorf veya kristal biçimli olanları bulunmaktadır. Bu nanopartiküllerin yüzeyleri sıvı damlacıklar veya gazlar için taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. Nanopartikül madde, katı, sıvı, gaz ve plazma durumlarına ek olarak belirgin özelliklerinden dolayı farklı bir madde hali olarak düşünülmektedir. Kristal nanopartikül formundaki materyallerin örnekleri fullerenler ve karbon nanotüpler iken geleneksel kristal katı formlar grafit ve elmadır (Jiang *et al.* 2008).

1.5.1. Nanopartikül türleri

Farklı boyut, şekil ve malzemelerden oluşan, çeşitli kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip nanopartikül çeşitleri oluşturulmuştur. Nanoteknoloji alanı sürekli ve hızlı bir şekilde büyümekte ve yeni elemanlar bu çeşitliliği tamamlamaya devam etmektedir. Nanoparçacıklar genellikle boyutsallıkları, morfolojisi, bileşimi, tekbiçimi ve yığılması gibi özelliklere dayanarak sınıflandırılmaktadır. Aşağıda çok genel ve çok işlevsel olan nanopartiküller listelenmiştir (Mudshinge *et al.* 2011).

1.5.1.a. Fullerenler (Karbon 60)

28'den 100'e kadar karbon atomu içeren küresel kafesler olarak tanımlanmaktadır (Pal *et al.* 2011). Bir fulleren, içi boş bir küre, elipsoid veya tüp şeklinde tamamen karbondan oluşan herhangi bir molekül olarak ifade edilmektedir. Küresel fullerenler, karbon nanotoplar veya buckyballs olarak adlandırılırken; silindirik olanlar, karbon nanotüpler veya buckytubes olarak adlandırılmaktadır. Fullerenlerin yapısı, bağlanmış altıgen halkalı yığın halindeki grafen tabakalarından oluşan grafit ile benzerlik göstermektedir.

Ayrıca fullerenler potansiyel olarak gözenekli moleküller vermek için beş köşeli halkalar içermektedir (Holister *et al.* 2003).

Fullerenler ilginç elektriksel özelliklere sahip oldukları için veri depolama alanından güneş pilleri üretimine kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Fullerenlerin biyolojik aktif moleküllerle benzer boyutlarda olması bu moleküllerin tıp alanında birçok alanda yaygın olarak kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Böylece fullerenlerin bu özellikleri, sağlık ve kişisel bakım uygulamalarında büyük bir vaatte bulunmaktadır (Mudshinge *et al.* 2011; Pal *et al.* 2011).

1.5.1.b. Katı lipid nanoparçacıkları (SLN'ler)

SLN'ler, oda sıcaklığında katı fazdaki lipidler ve emülsiyonlaşma için yüzey aktif cisimcikler içermektedir. Kolloid ilaç salınım uygulamaları için SLN'lerin ortalama çapları 50 nm ile 1000 nm aralığında olmaktadır. SLN'ler, küçük boyutu, geniş yüzey alanı, yüksek ilaç yükü, ara yüzlerdeki fazların etkileşimi gibi benzersiz özellikler sunmaktadır. SLN'lerin hazırlanmasında püskürterek kurutma, yüksek kesmeli karıştırma, ultra-sonikasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Cavalli *et al.* 1993; Freitas and Muller 1998; Mudshinge *et al.* 2011)

SLN'ler

- Fizyolojik lipidlerin kullanılması,
- Sulu dispersiyonlarının uzun süre stabil olması,
- Hazırlama işleminde organik çözücülerin kullanılmaması,
- Etkin maddenin kontrollü salınımının yapılması,
- Geniş bir potansiyel uygulama spektrumunun olması,
- Geliştirilmiş biyoyararlanımlarının olması,
- Endüstriyel ölçekte üretilmesi,
- Ekonomik olması,

- Biyolojik olarak parçalanabilmesi gibi pek çok avantaja sahiptir (Mudshinge *et al.* 2011).

1.5.1.c. Lipozomlar

Lipozomlar, fosfolipidlerin ekstrüzyonuyla oluşturulan, hidrofobik bir lipid çift tabakası ile çevrelenmiş sulu bir çekirdeğe sahip veziküler yapılardır. Nanometre aralığında veziküllere sahip olan lipozomlara nanolipozomlar denir (Zhang and Granick 2006).

Lipozomlar 15 nm'den birkaç μm 'ye kadar değişen boyutlara sahiptir. Ayrıca lipozomlar tek katmanlı (unilamellar) veya çift katmanlı membranlara (multilamellar) sahip olmaktadır. Tek katmanlı veziküller, boyut aralığına bağlı olarak küçük tek katmanlı veziküller ve büyük tek katmanlı veziküller diye sınıflandırılmaktadır (Vemuri and Rhodes 1995).

Sulu bir boşluğu çevreleyen lipid membran olan lipozomların benzersiz yapısı, kimyasal modifikasyon olmaksızın hem hidrofobik hem hidrofilik bileşikler taşımalarına olanak sağlamaktadır. Lipozomlar, bu çok yönlü özellikleri sayesinde antibakteriyel, antiviral, insülin, antineoplastikler ve plazmid DNA gibi çeşitli ilaçlar için güçlü taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır (Mudshinge *et al.* 2011).

1.5.1.d. Nanokabuklar

Nanokabuklar çekirdek kabukları olarak da bilinmektedir. Nanokabuklar, 1-20 nm kalınlığında olan malzemenin ince tabakasının bir kabukla kaplanmasıyla oluşan küresel çekirdeklerdir (Templeton *et al.* 2000; Xia *et al.* 2000; Liz-Marzan *et al.* 2001). Nanokabuk parçacıklar, aynı boyuttaki tek bileşenli benzerlerine göre modifiye edilmiş ve geliştirilmiş özelliklere sahip oldukça fonksiyonel malzemeler olarak bilinmektedir.

Nanokabuk malzemeler yarı iletkenlerden, metallere ve izolatörlerden sentezlenmektedir. Oldukça kararlı olan silika ve polistiren gibi dielektrik malzemeler sıklıkla çekirdek olarak kullanılmaktadır. Nanokabuklar biyomedikal görüntüleme ve terapötik uygulamalar için son derece elverişli optik ve kimyasal özellikler göstermektedir. Görüntüleme ve teşhis alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mudshinge *et al.* 2011).

1.5.1.e. Kuantum noktaları (QD)

QD, farklı yarı iletken malzemeler arasında arayüz içeren, 2 ile 10 nm arasında değişen kolloidal yarı iletken nanokristaller olarak bilinmektedir. QD serbest elektronların küçük bir damlasını içeren küçük cihazlardır. QD'lar kolloidal sentez veya elektrokimya yoluyla çeşitli yarı iletken malzemelerden sentezlenmektedir. En sık kullanılan QD'ler kadmiyum selenid (CdSe), kadmiyum tellür (CdTe), indiyum fosfit (InP) ve indiyum arsenür (InAs)'dür (Goldberg *et al.* 2007; Mudshinge *et al.* 2011).

Yarı iletken nanokristaller, özellikle çok katlı, kantitatif ve uzun vadeli floresan görüntüleme için biyomedikal araştırmaların vazgeçilmez bir aracı haline gelen benzersiz optik özellikler göstermektedir (Medintz *et al.* 2005; Michalet *et al.* 2005; Smith *et al.* 2006).

QD çekirdeği yapısal iskelet görevi görmektedir ve küçük moleküllü hidrofobik ilaçlar, inorganik çekirdek ile amfifilik polimer kaplama tabakası arasına gömülmektedir. Antikorlar, peptidler ve aptamerler gibi biyomoleküllerin hedeflenmesi, küçük engelleyici RNA (siRNA) ve antisens oligodeoksinükleotid de dahil olmak üzere hidrofilik terapötik ajanlar, kovalent veya kovalent olmayan bağlar vasıtasıyla amfifilik polimerin hidrofilik tarafını hareketsiz kılmaktadır. Bu entegre nanoyapılar, hastalıklı hücreleri tanımlamakla kalmayıp aynı zamanda hasta olan hücrelere bağlanmayı ve tedavi etmeyi sağlayacak sihirli elemanlar gibi davranmaktadır. Optik ve optoelektronik cihazlar, kuantum hesaplama ve bilgi depolama için kullanılmaktadır. Renk kodlu QD, hızlı DNA testlerinde kullanılmaktadır. QD'lar ayrıca, eşzamanlı ilaç

verme, *in vivo* görüntüleme ve doku mühendisliğinde terapötik maddelerin bağlanması için yeterli yüzey alanı sağlamaktadır. Bu avantajlar, medikal görüntülemede ve hastalık tespitinde QD'ların uygulanmasını mümkün kılmaktadır (Larson *et al.* 2003; Mudshinge *et al.* 2011).

1.5.1.f. Dendrimerler

Dendrimerler, iyi tanımlanmış, düzenli olarak dallanmış simetrik bir yapıya sahip, çevrelerinde yüksek yoğunlukta fonksiyonel uç grupları olan, yaklaşık 20 nm boyutunda tek molekül, tek dağılımlı nanoyapılardır. Dendrimerler, nanometrik boyuttaki kontrollü yapı polimerlerinin yeni bir sınıfını temsil etmektedir. Dendrimerlerin yapısı, bir odak bölgesi, çekirdekten çıkan dallı tekrar birimlerinin katmanları ve tekrar birimlerinin dış katmanındaki fonksiyonel uç grupları olmak üzere üç farklı mimari bölgeden oluşmaktadır (Tomali *et al.* 2007; Mudshinge *et al.* 2011).

İlaç salınım çalışmalarında kullanılan dendrimerler, poliamidoamin (PAMAM), melamin, poli L-glutamik asit (PG), polietilenimin (PEI), polipropilenimin (PPI) ve polietilen glikol (PEG) gibi polimerlerden birini veya daha fazlasını içermektedir. Dendrimerler, tanısal görüntüleme, ilaç verme, gen transfeksiyonu, kanser ve diğer hastalıkların tespiti ve terapötik tedavi amacıyla vektörleri kullanmaktadır. Vektörlerin hedeflenmesi amacıyla iki ana yöntem kullanılmaktadır. Bunlar;

1. Primer tümör vaskülarizasyonu veya organ spesifik hedeflemeyi içeren EPR etkisi vasıtasıyla aracılık edilen nano boyutlu pasif hedefleme,
2. Reseptör spesifik hedefleme gruplarını içeren aktif hedefleme reseptör aracılı hücre spesifik hedeflemedir.

Dendrimerler, görüntüleme, ilaç salınım, gen transfeksiyonu ve viral olmayan gen transferi gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hofmann *et al.* 2009).

1.5.1.g. Karbon nanotüp (CNT)

Karbon nanotüpler silindir içine sarılmış bir grafit tabakası olan, 1nm çapa ve 100 nm uzunluğa sahip altıgen bir karbon atom ağıdır. Karbon nanotüpler, iki duvarlı karbon nanotüpler ve çok duvarlı karbon nanotüpler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Karbon nanotüplerin küçük boyutları, dikkate değer fiziksel, mekanik ve elektriksel özellikleri ile birleştiğinde, onları benzersiz malzemeler haline getirmektedir. Nanotüplerin taşıdığı akım yoğunluğu son derece yüksektir ve metrekaşe başına bir milyar ampere ulaşmaktadır. Karbon nanotüplerin mekanik gücünün, en iyi çelikten bile altmış kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Karbon nanotüpler, moleküler absorpsiyon için büyük bir kapasiteye sahiptir ve üç boyutlu bir konfigürasyon sunmaktadır (Pal *et al.* 2011).

1.5.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Nanoparçacıklar genellikle, taramalı elektron mikroskobu, geçirimli elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu gibi gelişmiş mikroskopik teknikler kullanılarak boyutları, morfolojileri ve yüzey yükleri ile karakterize edilmektedir. Ortalama parçacık çapı, boyut dağılımı ve yük, nanopartiküllerin fiziksel kararlılığını ve *in vivo* dağılımını etkilemektedir. Nanoparçacıkların yüzey yükü, polimer dağılımının fiziksel kararlılığını ve *in vivo* performansını etkilemektedir (Pal *et al.* 2011). Nanopartikül karakterizasyonunda etkili olan faktörler;

1.5.2.a. Parçacık boyutu

Parçacık boyut dağılımı ve morfolojisi, nanoparçacıkların karakterizasyonunun en önemli parametrelerinden birisidir. Morfoloji ve büyüklük elektron mikroskopisi ile ölçülmektedir. Küçük boyuttaki parçacıklar daha büyük yüzey alanı sağlamaktadır. Bu da, nanoparçacıkların ilaç salınımı ve hedeflemede yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Küçük parçacıklar, nanoparçacık dispersiyonunun depolanması ve taşınması sırasında toplanmaktadır. Böylece, nanoparçacıkların küçük boyutu ile maksimum istikrarı arasında bir uzlaşma sağlanmaktadır (Redhead *et al.* 2001).

Polimerin parçalanması partikül boyutundan etkilenmektedir. Örneğin, poli (laktik-koglikolik asidin) bozunma hızının, *in vitro* olarak partikül boyutunun artması ile arttığı tespit edilmiştir (Betancor and Luckarift 2008).

Aşağıda nanoparçacık boyutunu belirlemek için kullanılan birkaç araç açıklanmıştır.

Dinamik ışık saçılması (DLS)

Parçacık boyutunu belirlemenin en hızlı ve en popüler yöntemlerinin başında DLS gelmektedir. DLS, nano ve alt mikron aralıklarındaki kolloidal süspansiyonlarda Brown nanopartiküllerinin boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Brown hareketindeki küresel parçacıkların bir solüsyonuna parlayan tek renkli ışık gönderilir; gönderilen ışığın dalga boyu değiştirilerek hareketli parçacığa çarpması, Doppler kaymasına neden olmaktadır. Bu değişiklik, parçacık büyüklüğü ile ilişkilidir (DeAssis *et al.* 2008).

Taramalı elektron mikroskopisi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), doğrudan görselleştirme ile morfolojik inceleme sağlamaktadır. Elektron mikroskopisine dayanan teknikler, morfolojik analizde ve boyutlandırma analizinde çeşitli avantajlar sunmasına rağmen boyut dağılımı hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadırlar.

SEM çalışma prensibine göre, nanoparçacık çözeltisi kuru toz haline getirildikten sonra numune tutucunun üzerine monte edilmektedir. Daha sonra bir püskürtme makinesi kullanılarak altın gibi iletken bir metal ile kaplanmaktadır. Numune daha sonra odaklanmış bir elektron demeti yardımıyla taranmaktadır (Jores *et al.* 2004). Numunenin yüzey özellikleri, numune yüzeyinden çıkan sekonder elektronlardan elde edilmektedir.

SEM ile elde edilen ortalama ebat, DLS ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmaktadır. Ayrıca, bu teknik zaman alıcı, masraflı ve dağılımın boyutlandırılması hakkında tamamlayıcı bilgiye ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara sahiptir (Molpeceres *et al.* 2000).

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

TEM, SEM'den farklı prensiplerle çalışmasına rağmen aynı tür verileri vermektedir. TEM için numunenin hazırlanması, elektron transmatrisinin ince olması gibi şartların yerine getrilmesinden dolayı karmaşık ve zaman alıcıdır. Nanopartikül dağılımı, destek ızgaralar veya filmler üzerine çöktürülmektedir. Nanopartiküllerin cihaz vakumuna dayanmasını sağlamak ve kullanımı kolaylaştırmak için, nanopartiküller negatif boyalar kullanılarak sabitlenmektedir. Bir elektron ışını, çok ince numuneye iletildiği esnada numuneyle etkileşime geçerek, numunenin yüzey özelliklerinin elde edilmesini sağlamaktadır (Molpeceres *et al.* 2000).

Atomik kuvvet mikroskopisi

Atomik kuvvet mikroskobu (AKM), partikül boyut ölçümünde ultra yüksek çözünürlük sunmaktadır. Atomik ölçeğin bir sonda ucu kullanılarak mikron seviyesinde numunelerin fiziksel olarak taranmasına dayanmaktadır (Muhlen *et al.* 1996). AKM, uç ve numune yüzeyi arasındaki kuvvetlere dayalı olarak numunenin topografik haritasını sunmaktadır. Numuneler, özelliklerine bağlı olarak genellikle temaslı veya temassız modda taranmaktadır. Topografik harita, temas modunda prob numunenin yüzeyine dokundurulurken, temassız modda ise iletken yüzey üzerinde gezdirilerek elde edilmektedir. AKM'nin, iletken olmayan numunelerin spesifik bir muamele edilmeksizin imgelelendirilmesine olanak sağlaması en önemli avantajı olarak bilinmektedir. Böylece hassas, biyolojik, polimerik nano ve mikro yapıların görüntülenmesine izin vermektedir (Shi *et al.* 2003). Ayrıca, AKM tekniği ile elde edilen parçacık boyutu, çeşitli biyolojik koşulların etkisini anlamaya yardımcı olacak gerçek resmi sunmaktadır (Polakovic *et al.* 1999).

1.5.2.b. Yüzey yükü

Nanoparçacıkların yüzey yükünün doğası ve yoğunluğu, biyolojik çevre ile olan etkileşiminin yanı sıra biyoaktif bileşiklerle bunların elektrostatik etkileşimini belirlediğinden dolayı çok önemlidir. Bir nanopartikülün zeta potansiyeli, nanoparçacıkların yüzey yük özelliklerini karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolloidal kararlılık, nanoparçacıkların zeta potansiyeli ile analiz edilmektedir. Bu, potansiyel yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsü olarak bilinmektedir. Zeta potansiyelinin ölçümü, kolloidal dispersiyonun depolama kararlılığı hakkında öngörüler sunmaktadır. Pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerleri, kararlılığı sağlamak ve parçacıkları bir araya getirmemek için önem arz etmektedir. Yüzeysel hidrofobiklik derecesi zeta potansiyeline göre tahmin edilmektedir. Zeta potansiyeli aynı zamanda nanokapsüller içerisinde kapsüllenen veya yüzey üzerine kaplanan maddenin doğasına ilişkin bilgi sağlamaktadır (Couvreur *et al.* 2002; Pangi *et al.* 2003).

1.5.2.c. Yüzey hidrofobikliği

Yüzey hidrofobisitesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, bifazik bölme, problemlerin adsorpsiyonu, temas açısı ölçümleri gibi çeşitli tekniklerle belirlenmektedir. Nanoparçacıkların yüzey analizi için literatürde çok sayıda sofistike analitik teknikler belirlenmiştir. X ışını foton korelasyon spektroskopisi, nanoparçacıkların yüzeyindeki spesifik kimyasal grupların tanımlanmasına izin vermektedir (Scholes *et al.* 1999).

1.6. Nanotoksikoloji

Nanotoksikoloji nanomateriyallerin toksisitesinin çalışılması ve uygulanması ile ilgilenen biyonanobilimin bir koludur. Altın gibi elementlerden yapılmış olsalar bile nanomalzemeler nm boyutlarda oldukça aktif hale gelmektedir. Kuantum boyut etkileri ve hacim yüzdesine göre, geniş yüzey alanından dolayı nanomalzemeler daha büyük boyuttaki eşdeğerlerine kıyasla benzersiz özellikler göstermektedir. Nanotoksikolojik çalışmalar, bu özelliklerin çevreye ve insan sağlığına bir tehdit oluşturup

oluşturmadığını ve tehditin seviyesini belirlemek için kullanılmaktadır (Buzea *et al.* 2007; Dwivedi and Paul 2013).

Toksikologlar, nanoparçacıkların büyüklüklerinden dolayı toksisitede özellikle solunum yolu hastalıklarında dikkate değer bir role sahip olduklarını ifade etmektedirler (Zhang *et al.* 1998; Hyuk Suh *et al.* 2009; Ai *et al.* 2011). Farklı karbon ve titanyum oksit materyal boyutları üzerine yapılan bazı çalışmalar, nanopartikül boyutundaki azalmanın akciğerlerdeki toksisiteyi artırdığını göstermektedir. Ayrıca bazı metallerin birbirleriyle birleştirilmesinin, tek metallerde görülmeyen karmaşık toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (Oberdorster *et al.* 1994; Ai *et al.* 2011). Boyut, yüzey kimyası ve oksidatif stres fonksiyonları gibi parçacık özelliklerinden bazıları nanotoksisitede önemli rol oynamaktadır. Kristallik, kaplama ve parçacıkların ömrü gibi diğer özellikler de önemli parametreler olarak incelenmektedir (Schlesinger 1995; Holsapple *et al.* 2005; Linkov *et al.* 2008; Ai *et al.* 2011).

1.6.1. Nanotoksisitede etkili olan önemli faktörler

1.6.1.a. Boyut

Nano boyutlu parçacıkların boyutundaki bir azalma, parçacık yüzey alanının artmasına neden olmaktadır. Yüzey alanındaki bu artış, yüzeye daha fazla kimyasal molekül eklenmesine olanak sağlamaktadır. Bu da onun reaktivitesini artırarak, toksik etkilerinde artışa neden olmaktadır (Linkov *et al.* 2008; Hyuk Suh *et al.* 2009).

Nanoparçacıkların mukustan emilmesi ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalara göre nanoparçacıklar emildikten sonra, nanoparçacıklar kan dolaşımına ulaşmakta ve sonra dokuya yayılmaktadır (Ai *et al.* 2011). Bir başka çalışmada, 50 nm boyuttaki parçacıkların %30'u, 100 nm boyuttaki parçacıkların %26'sı ve 500 nm boyuttaki parçacıkların %50'si bağırsağın mukozal ve lenfatik dokularında tespit edilmiştir (Hyuk Suh *et al.* 2009; Ai *et al.* 2011).

Araştırmacılar boyut üzerine birçok araştırma yapmıştır. Yapmış oldukları araştırmalar sonucunda aşağıdaki verileri elde etmişlerdir (Hyuk Suh *et al.* 2009):

- 100 nm'den küçük nanopartiküller bağırsak hücreleri tarafından absorbe edilirken daha büyük nanopartiküller (300 nm) absorbe edilmemektedir.
- Lenfatik dokuda küçük nanopartiküllerin (100 nm) Emilimi bağırsak hücrelerinden daha mükemmel bir şekilde olmaktadır.
- Bağırsak hücreleri, 400 nm'den daha büyük nanoparçacıkları geçirmemektedir.
- Dolaşım sistemine sadece 500 nm'den küçük nanopartiküller girmektedir.

1.6.1.b. Kimyasal bileşenler

Parçacık yüzeyinin kimyasal bileşenleri, metallerle reaksiyona girebildikleri için nanoparçacıklar üzerinde önemli etkilere sahiptir. Demir gibi birçok metalin serbest hücre sisteminde reaktif oksijen türlerinin indüksiyonunu arttıran nanoparçacıklardan etkilendiği tespit edilmiştir. Nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu, toksisiteyi azaltmaktadır. Araştırmacılar bazı bileşenlerin etki ettikleri nanopartikül toksisitesinin bazı malzemelerle kaplanılarak azaltıldığını bulmuşlardır (Singh *et al.* 2007; Clift Martin *et al.* 2008; Oberdorster 2010).

1.6.1.c. Parçacık yüzeyi

In vitro çalışmalar, çok daha küçük parçacıkların büyük boyuttaki yüzey alanlarından, daha büyük konjonktür eğilimlerinden ve enerji sürdürülebilirliğinden dolayı çok daha küçük parçacıkların, büyük boyuta sahip benzerlerine göre birçok organda daha patolojik ve yıkıcı güce sahip olduğunu göstermiştir (Oberdorster *et al.* 1994; Holsapple *et al.* 2005; Clift Martin *et al.* 2008; Linkov *et al.* 2008).

1.6.1.d. Dozaj

Toksisite ve diğer tepkiler, belirtilen dozaja ve kullanılan maddelere bağlılık göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, küçük veya büyük parçacıklardaki yüksek dozda nanopartiküllerin sağlığa zararlı olduğu tespit edilmiştir (Singh *et al.* 2007; Clift Martin *et al.* 2008; Oberdorster 2010).

1.6.1.e. Serbest radikal üretimi

Patojenik parçacıkların çoğu veya tamamı serbest hücre sisteminde serbest radikaller üretmektedir. Bu yetenek, oksidatif strese neden olarak iltihaplanma, hücre tahribatı ve genotoksisiteye sebep olmaktadır. Serbest radikallerin parçacık yüzeyi, redoks döngüsünü aktive ederek parçacık toksisitesini oluşturmaktadır (Singh *et al.* 2007; Hussain *et al.* 2009).

1.6.1.f. Yüzey kimyası

Bir parçacık yüzeyindeki reaktif gruplar biyolojik etkileri kesinlikle değiştirmektedir. Bu farklılıklar temel olarak parçacık yüzey özelliklerine bağlıdır. Birçok maddenin özgül sitotoksitesinin, çoğu kanserin gelişiminde önemli bir olay olarak kabul edilen yüzey radikallerinin ve reaktif oksijen türlerinin görülmesi ile kuvvetli şekilde ilişkili olduğu bilinmektedir (Fubini 1997; Schins *et al.* 2002).

Bazı durumlarda nanopartikül yüzeyinin reaktivitesini tahmin etmek mümkün olmaktadır. Bununla birlikte, veri yetersizliği, bu tahminlerin laboratuvar testleriyle doğrulanmasının mantıklı olacağını önermektedir. Bir yüzeyin hidrofobiklik derecesi ve hidrofilitesi, toksisitenin tahmini için kullanılan en önemli özelliktir (Fubini 1997; Schins *et al.* 2002; Singh *et al.* 2007; Clift Martin *et al.* 2008; Oberdorster 2010).

1.6.2. Nanopartikül toksisitesi

Nanopartiküllerin eşsiz fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı çok geniş bir endüstriyel ve tıbbi uygulamaya sahip oldukları bilinmektedir. Ancak, nanopartiküllere uzun süre maruz kalmanın insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri hakkında bilgi eksikliği mevcuttur. Nanoparçacıkların sağlık ve çevre üzerindeki etkisinin, çeşitli alanlardaki büyük ölçekli üretim ve uygulamalardan önce tamamen değerlendirilmesi gerekmektedir. Nanoparçacıkların neden olduğu toksisite üzerine yapılan araştırmalar bu parçacıkların organ, doku, hücresel, subselüler ve protein seviyelerindeki biyolojik davranışları etkileyebildiğini ortaya çıkarmıştır. Nanoparçacıklar, boyutları küçük olduğu için akciğerler, cilt ve beyne kolayca erişerek olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Finney and O'Halloran 2003; Braydich *et al.* 2005; Canesi *et al.* 2008; Lanone *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2009).

İnsan akciğer epitel hücrelerinin metal bazlı nanoparçacıklara maruz kalması, reaktif oksijen türlerinin oluşmasına böylece oksidatif strese ve hücre hasarına neden olmaktadır. Nanopartiküllerin toksisitesi birtakım *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmektedir. Örneğin, hızlı gelişimi ve şeffaf vücut yapısından dolayı model olarak kullanılan zebra balıkları, nanoparçacıkların toksik etkilerini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Ai *et al.* 2011). Hücre kültürü tabanlı tahliller, nanoparçacıkların biyolojik etkilerini anlamak için bir ön tarama aracı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *in vitro* deneylerle, hayvan modellerinde nanoparçacıkların *in vivo* biyolojik aktivitelerinin, bunların uygulanabilirliğinin teyit edilmesi gerekmektedir (Asharani *et al.* 2008; Shaw *et al.* 2008; Schrand *et al.* 2010).

Nanoparçacıklardan kaynaklanan akut toksisite, sıçanların ağızlarında araştırılmıştır. Sonuçlar, toksisitenin nanoparçacıkların boyutuna, kaplamasına ve kimyasal bileşimine bağlı olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, nanoparçacıkların sistemik etkileri farklı organ ve dokularda gösterilmiştir. İnflamatuar ve immünolojik sistemler üzerindeki etkiler, akciğer, karaciğer, kalp ve beyinde oksidatif stres veya ön inflammatuar sitotoksin aktivitesini içermektedir. Genotoksisite, kanserojenite ve teratojenite nanoparçacıkların

etkilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı nanoparçacıklar kan-beyin bariyerini geçerek beyinde önemli hasarlara neden olmaktadır (Ali *et al.* 2011; Jain *et al.* 2011).

Akciğerler

Nanopartiküller için giriş organ hedefinin en önemli portallarından biri de solunum sistemidir. Akciğerlerin atmosferik kirleticilere ve termo bozunumun birçok ürününe kolayca maruz kaldıkları bilinmektedir. Bu bağlamda nanoparçacıklar, solunum yolu hastalıklarının ilerlemesiyle ölüm ve kardiyovasküler hastalıktan hastaneye yatırılma gibi çeşitli olumsuz sağlık etkileri için muhtemel bir etiyolojik faktör olarak büyük ölçüde araştırılmıştır (Donaldson 2005). Teksas Üniversitesi'ndeki araştırmacılar, farelerin trakeasına verilen karbon nanotüplerin akciğerlerin ve granülomların ciddi şekilde iltihabına neden olduğunu ve yüksek doz uygulanan farelerin öldüğünü tespit etmişlerdir (Oberdorster *et al.* 2005). Araştırmacılar, Tottori Üniversitesi'ndeki bir başka benzer deneyde de, nanopartiküllerin farelerin en ince hava yollarıyla temas etmesiyle yüzey astar hücreleri arasındaki boşluklarda kırmızı kan hücrelerinin yığılmasına bunun sonucunda kanın pıhtılaşmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir (Lam *et al.* 2004).

Kalp

Tıp Amerika Enstitüsü, çeşitli nanoparçacıkların kan dolaşımına verildiğinde kalp dokusunda hasara neden olduğunu göstermiştir. Bu hasar oksidatif stres, apoptoz ve nekroza yol açan inflamasyon yoluyla ortaya çıkmaktadır (Tomii 2002). Bazı raporlar nanoparçacıkların, özellikle kalsiyum nanopartiküllerinin kalp krizine neden olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar kalsiyum nanopartiküllerini laboratuvarında hayvan arter duvarına enjekte ettiklerinde, duvarın iltahaplandığını tespit etmişlerdir (Oberdorster *et al.* 1995).

Beyin

Farelerde beyin hücresi kültürleri kullanılarak gerçekleştirilen deneylerin bir kısmında, nano ölçekli titanyum dioksitin kullanılmasının nöronlarda oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur. Nöron hücrelerinin oksidatif stresinin nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olması endişe verici olarak kabul edilmektedir (Jain *et al.* 2011). Bununla birlikte, aşırı gerilim ve alerjik ensefalomiyelit gibi bir takım patolojilerin kan beyin bariyerinin nanoparçacıklara geçirgenliğinin artması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Dagani 2003; Jain *et al.* 2011). Nanoparçacık yüzey yükünün, kan-beyin bütünlüğünü değiştirdiği ve beyin toksisitesindeki rolleri konusunda dikkate alınması gerektiği gösterilmiştir. Nanopartiküllerin reaktif oksijen türlerinin üretimini indüklediği ve oksidatif stresin, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol aldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Dagani 2003; Jain *et al.* 2011).

Cilt

Nano ölçekli titanyum dioksit ve çinko oksit gibi nanomalzemeler merhem ve kremlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle cilt üzerindeki etkilerinin anlaşılması hem insan hem de hayvanlar için risk değerlendirilmesinde önemlidir. Diğer üretilmiş nanomalzemelerin yaygın çevre varlığı cilt maruziyetine yol açmaktadır. İlk çalışmalar, bazı nanomalzemelerin deri hücrelerine zarar verebileceğini ve cildin epidermal tabakasından derin katmanlara daha sonra vücuda ve kana geçtiğini göstermektedir. Küçük boyutlarından dolayı nanomalzemelerin cilt yoluyla absorbe edilip, kan dolaşımı veya lenfatik sisteme girme potansiyeline de sahip olduğu bilinmektedir. Nanopartiküller cilt seviyesinde lenfatik düğümler tarafından alınarak, lenfatik yollarla kan dolaşımına taşınmaktadır (Kim *et al.* 2004; Jain *et al.* 2011).

1.7. Tez Kapsamında Kullanılan Bor Nitrür Nanopartikülleri

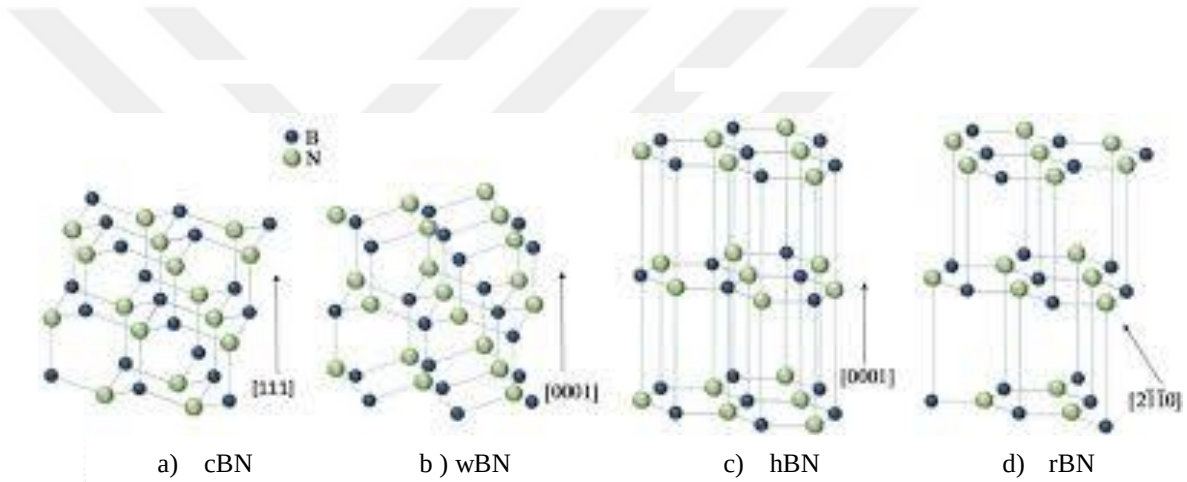
Bor elementi, B harfi ile gösterilen atom ağırlığı 5 ve molekül ağırlığı 10.81 g/mol olan periyodik cetvelin en hafif beşinci elementidir. Periyodik cetvelde bulunduğu 3A grubunun ilk ve metalik olmayan tek elementi olup, diğer grup üyelerine göre iyonlaşma enerjisi en yüksek olan elementtir (Taşcıoğlu 1992; Köken 2016). Ayrıca bor elementi oda sıcaklığında düşük elektrik iletkenliği göstermektedir. Temel haldeki elektron dizilimi $1s^2 2s^2 2p^1$ şeklindedir. Kararlı bir yapıya sahip, B^{10} ve B^{11} şeklinde iki izotopa sahip olduğu bilinmektedir. Bu iki izotop da nükleer manyetik rezonans araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bor elementi tel, boru, şerit, tüp gibi çeşitli morfolojiler göstermektedir. Bor elementinin kimyasal özellikleri, morfoloji ve parçacık büyüklüğüne göre farklılık sergilemektedir. Mikron boyutlardaki amorf yapıdaki borun reaksiyona girme eğilimi fazla olmasına rağmen kristal yapıdaki borun reaksiyona girme eğiliminin oldukça düşük olduğu bilinmektedir (Boustani and Quandt 1997; Martinez 2011).

Saf halde bor elementi doğada bulunmamaktadır. Saf bor, boraks veya uleksit minerallerden saflaştırılarak elde edilmektedir. Saf bor, üç tane çok iyi bilinen kristal allotropa sahiptir. Bunlar, alfa romboedrik, beta romboedrik ve beta tetragonal'dır. Bu kristal allotroplar, kovalent bağlarla çok iyi bağlanmış ikosahedral kümelerin B^{12} düzenlemeleri ile oluşmaktadır. Bu kristal oluşum, bor elementine büyük oranda sertlik, kimyasal kararlılık ve yüksek erime noktası sağlamaktadır (Boustani and Quandt 1997; Martinez 2011).

Bor elementinden meydana gelen malzemeler, yarı iletkenler, koruyucu kaplamalar, yüksek yoğunluklu yakıtlar, kanser tedavisi, cam ve seramik üretimi, sanayi gibi alanlarda çok çeşitli uygulamalara sahiptir. Temel bor bileşikleri, bor karbür, bor nitrür, borik asit, boraks, sodyum perborat ve boranlar olarak adlandırılmaktadır. Bor bileşiklerinin önemli özelliklere sahip olması, uygulama alanlarının gün geçtikçe çoğalması bor elementine olan ilginin artmasına neden olmaktadır. Bor elementinin

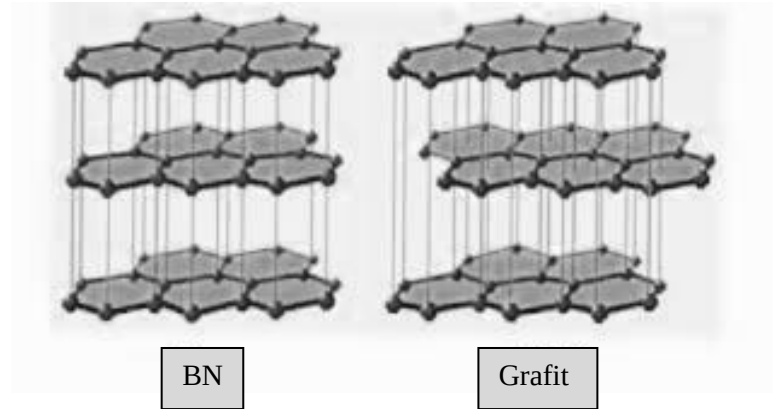
değerlenmesi, dünya bor rezervinin %53'üne sahip olan ülkemiz için büyük önem arz etmektedir (Addemir 2004; Li and Xia 2006; Shin *et al.* 2011).

Bor nitrür ilk kez 1842'de Balmain tarafından üretilmiştir (Balmain 2011). Bor nitrür (BN), bor (B) ve azot (N) atomlarının kombinasyonu sonucu kimyasal yöntemlerle elde edilen bir moleküldür. Genellikle bor oksit, karbon ve azotun 1450-1600°C'de kimyasal reaksiyona girmesiyle oluşmaktadır (Angın ve Aydın 2003). BN molekülü altıgen (h-BN), würstitik (w-BN), eşkenar dörtgen (r-BN) ve kübik (c-BN) şeklinde farklı kristal yapıları sahiptir. Şekil 1.9'da BN'nin kristal yapıları gösterilmektedir.



Şekil 1.9. a) kübik (cBN), b) würstitik (wBN), c) altıgen (hBN) ve d) eşkenar dörtgen (rBN) bor nitrür modifikasyonlarının yapısı (Izyumskaya *et al.* 2017).

h-BN iki karbon atomu ile aynı sayıda elektrona sahip olmasından dolayı grafit yapıya benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikten dolayı hBN “beyaz grafit” veya “beyaz karbon” olarak adlandırılmaktadır. hBN ve grafit sp^2 bağ yapısı sergilemektedir. Yüksek sıcaklık ve basınçta hem grafit hem de BN sıvı fazdadır. Yüksek basınçta, ultra sert malzemelerdir. hBN'nin yüksek termal stabilite, aşırı sertlik, asit-baz direnci, oksidasyon direnci ve yüksek termal iletkenlik gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu iyi bilinmektedir. Bu özellikler, hBN'nin, optik malzemeler, hidrojen depolama ortamı ve katalizör destekleri gibi nispeten zor koşullar altında geniş bir uygulama alanına sahip olduğu anlamına gelmektedir (Xiong and Tu 2014).



Şekil 1.10. Bor nitrit ve grafitin kristal yapısı (Lipp *et al.* 1989)

cBN elmasan daha üstün termal ve kimyasal stabiliteye sahip en sert malzeme olarak bilinmektedir. cBN, h-BN'nin yüksek sıcaklık ve basınçta işlenmesiyle elde edilmektedir. Ayrıca, iyi bir ısı iletkenidir ve elektriksel yalıtkan olarak kullanılmaktadır. 1300°C sıcaklığa kadar oksidasyona dayanıklı olması, demir içerikli malzemelerle reaksiyona girmemesi, görünür ve kızılötesi aralıkta saydam olması gibi birçok üstün özelliğe sahiptir. Bu üstün özelliklerinden dolayı bilim dünyasının ilgisini çekmektedir (Vel *et al.* 1991; Ronning *et al.* 1997).

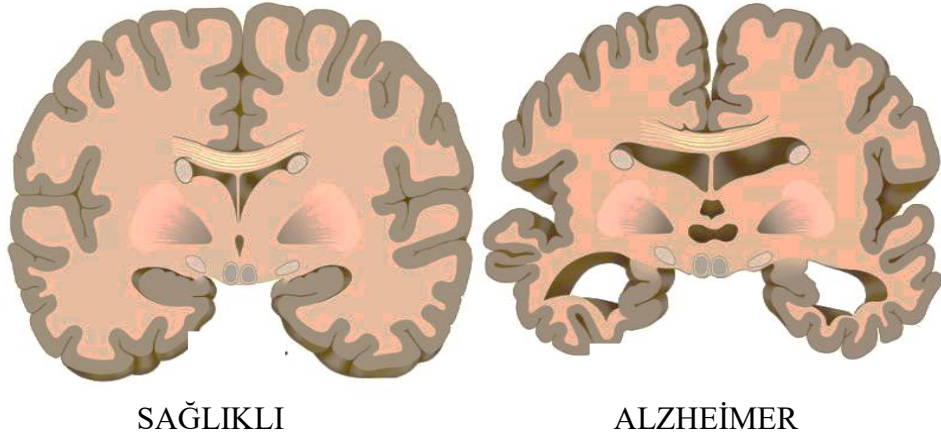
BN'nin katmanlı kafes yapısı; iyi yağlama özellikleri, iyi yalıtım özellikleri, kimyasal saldırılara karşı yüksek direnç, yüksek dielektrik bozulma gücü, yüksek hacim direnci, yüksek nötron yakalama kapasitesi, mükemmel termoelektrik özellikler ve oksidasyona karşı iyi direnç gösterme gibi birçok özelliğin temelini oluşturmaktadır. Bu özelliklere dayanarak endüstride, yağlayıcı, kozmetik homojenizasyon ajanı, yüksek sıcaklık uygulamaları, optik depolama, tıbbi tedavi, fotokataliz, optoelektronik cihazlar ve elektriksel yalıtım gibi geniş çaplı uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca BN'nin yüksek termal iletkenliğe ve düşük yoğunluğa sahip olması, onu en yeni elektronik cihazlar, iletişim ekipmanları ve aydınlatma cihazları için uygun bir aday haline getirmektedir (Salles *et al.* 2011).

BN'nin nanoteknoloji alanındaki uygulamaları göz önüne alındığında nanoyapıda BN üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi konusundaki çalışmalar önem kazanmaktadır. BN

nanopartiküller merkezden dışarı doğru ponpon benzeri çıkıntı yapan, yüzeyleri yaprak şeklinde görünen çok sayıda katmanlı nano-tabakalardan oluşmaktadır. BN nanopartiküller içi boş, pürüzsüz yüzeyi olan küresel bir merkeze sahiptir. BN nanoparçacık ürünleri, toz formundaki mevcut bor nitrür ürünlerine göre çok daha hafif, daha elastik, daha sert gibi birçok üstün özelliğe sahiptir (Mondal and Banthia 2004; Mohammadi and Cass 2009). Ayrıca BN nanopartiküllerin düşük sitotoksositeye, yüksek kimyasal stabiliteye, yüksek ilaç yükleme verimliliğine, hızlı hücre alımına sahip olduğu bilinmektedir. BN nanoparçacıkların bu özelliklerinin kombinasyonu üretilen malzemelere daha etkin özellikler kazandırmaktadır. Bu nedenle BN nanoparçacıklar daha geniş bir uygulama alanına sahip olmaktadır (Sukhorukova *et al.* 2015).

1.8. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) ilk olarak 1900'lerin başında Alman psikiyatr Alois Alzheimer tarafından 51 yaşında hayatını kaybeden bir kadının beyin dokusundaki değişikliklerin incelenmesi sonucu tanımlanmıştır. AH, demans olgularının %75'inden sorumlu olan ilerleyici bilişsel bozukluklar, çeşitli nöropsikiyatrik-davranış bozukluklar ve günlük yaşam aktivitelerindeki kısıtlamalar ile karakterize olmaktadır. AH, histolojik olarak beyindeki intraselüler nörofibriller yumak oluşumu ve ekstraselüler amiloid birikimleriyle tanımlanan en yaygın yaşa bağlı nörodejeneratif bozukluk olarak kabul edilmektedir. Demansın en yaygın biçimi olan AH'nin ana risk faktörü yaş olup genetik, epigenetik, beslenme ve yaşam tarzı gibi faktörleri içeren çoklu risklerle de ilişkisi bulunmaktadır (Lleo *et al.* 2006; Lahiri and Maloney 2010; Eteghad *et al.* 2015). AH sebepleri nöronal ve sinaptik kayıplar olarak bilinmektedir. Nöron ve sinaptik kayıplar ilk olarak beynin parahipokampal bölgesinde görülmektedir. Hastalık ilerledikçe beynin diğer bölgelerinde de görülerek kortikal atrofi ile ventriküler genişlemeye neden olup toplam beyin kitlesini %35'e kadar azaltmaktadır (Şekil 1.11) (Farfara *et al.* 2008; Alves *et al.* 2012).



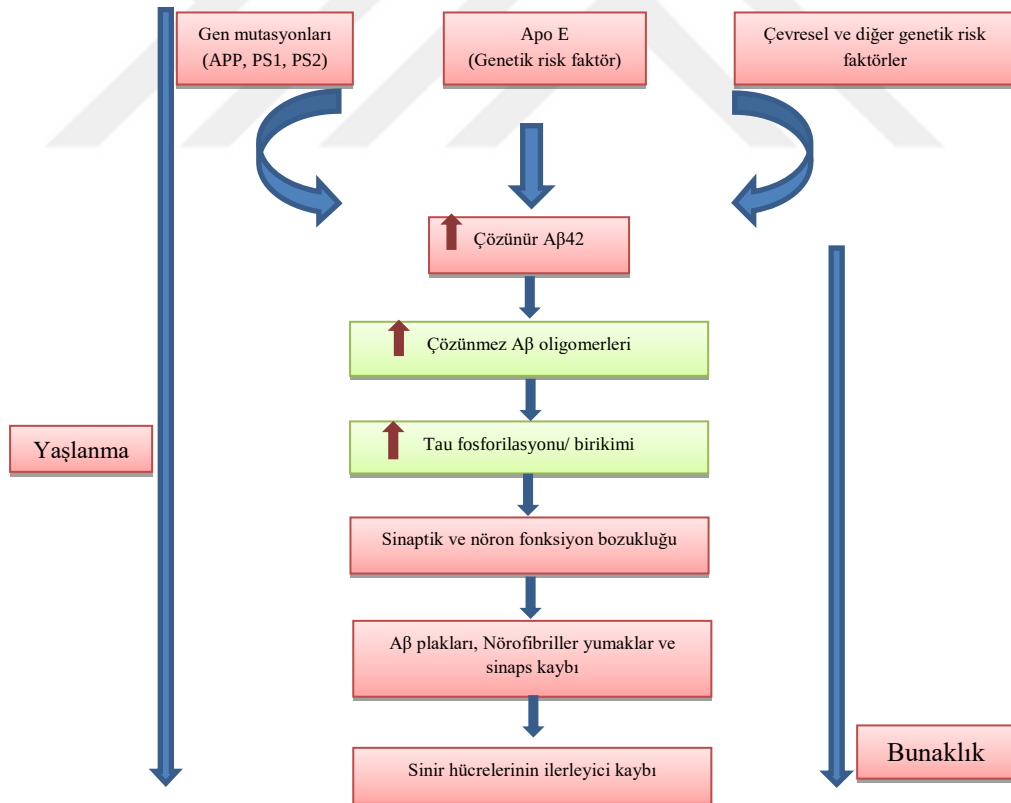
Şekil 1.11. Sağlıklı beyin ve alzheimer hastalıklı beyin arasındaki karşılaştırma (Anonymous 2019)

Birleşmiş Milletler nüfus araştırmalarına göre, 80 yaşından büyük insanların 2050 yılına kadar 370 milyona yaklaşacağı tahmin edilmektedir. Halen, 85 yaşından büyük yaştaki insanların %50'sinin AH'ye sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu istatistiklere göre, 50 yılda dünya genelinde 100 milyondan fazla insanın bunama yaşayacağı ifade edilmektedir. AH'li insanların sayısı ve hastalığa bağlı maliyetler, AH'nin toplum üzerinde ağır bir ekonomik yük oluşturacağı anlamına gelmektedir. AH hastalarının bakımının doğrudan ve dolaylı maliyetlerinin yıllık ulusal 100 milyar dolara kadar çıkacağı tahmin edilmektedir. Sürekli bakım ve diğer hizmetleri isteyen çok sayıda insanın; tıbbi, parasal ve insan kaynaklarını ciddi derecede zorlayarak toplumlar için önemli bir sorun haline geleceği gösterilmektedir (Suh and Checler 2002). Bu sebepler, hastalığı acil bir araştırma önceliği haline getirmektedir. AH'nin başlamasını erteleyebilecek müdahalelerin, hastalıkları olan kişilerin sayısını azaltacağı için, halk sağlığında muazzam pozitif etkiye neden olacağı düşünülmektedir. Bu da onların bakımıyla ilişkili kişisel ve mali masrafları kolaylaştıracaktır.

Yaşlanmakta olan sinir sisteminin temel biyolojisine ilişkin araştırma, AH'li bir kişinin beyinde neyin yanlış gittiğini anlamak için kritik önem taşımaktadır. Sinir hücrelerinin birbirleriyle iletişim kurma yeteneklerini nasıl kaybettiğini ve bazı sinir hücrelerinin neden öldüğünü anlamak, AH'ye neden olan faktörleri keşfetmek için bilimsel çabaların temel bir unsuru olarak görülmektedir. AH'nin patolojik özelliklerinin saptanmasında,

amiloid prokürsör protein (APP) ve Presenilin genlerinde mutasyon varlığının bulunması önemli biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. AH'nin ilk evresinde 3 gen mutasyonu ve geç evresinde bir yatkınlık faktörünün etkisi tespit edilmiştir. Bu 3 gen ürün proteinleri; APP, Presenilin 1 ve Presenilin 2'dir. Yatkınlık faktörü ise Apolipoprotein E genidir (Alzheimer 1990; Bertram and Tanzi 2001; Tanzi and Bertram 2001).

AH'nin patolojik özelliklerini açıklamak için birçok hipotez geliştirilmiş olmasına rağmen en çok göze çarpan amiloid kaskad hipotezidir. Bu hipoteze göre APP'den oluşan beta amiloid 40 ve 42 peptidlerinin beyinde birikmesi sonucu AH ortaya çıkmaktadır (Hardy and Higgins 1992; Alzheimer 1990; Robinson, and Bishop 2002; Tayeb *et al.* 2012).



Şekil 1.12. Amiloid kaskad hipotezi

Histolojik araştırmalarla AH'nin belirlenmesi 3 kardinal nöropatolojik özellikle ilifkilidir:

1. Amiloid beta (A β),
2. Hücre içi nörofibriller yumaklar (NFY),
3. Sinaptik dejenerasyon aracılı hücre dışı senil plakların birikimidir.

Bu olaylar çoğunlukla neokorteks, hipokampus ve bilişsel işlev için gerekli olan diğer subkortikal bölgelerde görülmektedir. Bu belirteçlerin görünüşü, hastalığın klinik belirtileri ve semptomlarından çok önce gözlemlenerek AH tahmini için iyi belirteçler olmaktadır (Eteghad *et al.* 2015).

1.8.1. Amiloid

Amiloid terimi, 1854 yılında Alman hekim Rudolph Virchow tarafından tanıtıldı. Zamanın en iyi bilimsel metodolojisini ve tıbb  bilgisini kullanarak Virchow, anormal makroskopik görünümü olan serebral corpora amylacea lekesi için iyot kullandı. Virchow, corpora amylacea'nın iyot ile muamele edildiğinde soluk mavi lekeli olduğunu ve ardından sülfürik asidin ilavesiyle menekşe rengine döndüğünü keşfetmiştir. Bu belirgin makroskopik anormalli in altında yatan maddenin selüloz olduğunu tespit ederek bu maddeye Latince amyllum kelimesinden türetilen amiloid ismini vermiştir (Sipe and Cohen 2000). Amiloid terimi, primer veya miyeloma ile ilifkili, edinsel, lokal, kalıtsal, miyelomik, serebrovasküler hastalıklar olarak sınıflandırılan çeşitli klinik sendromlar ile ortaya çıkan, vücut organlarının ve dokularının otopsisinde spesifik makroskopik anormallikleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bir başka ifadeyle amiloid, birçok organda aşırı miktarda hücre dışı bırakılan materyal olarak ifade edilmektedir (Westermarck 2005). Amiloid birikimlerini belirlemek için birçok histokimyasal yöntem kullanılmaktadır. Işık mikroskobu yardımıyla doku birikimlerinde kırmızı renk oluşumuna neden olan Kongo kırmızısı ve tioflavin gibi histopatolojik boyalar en yaygın kullanılanlardır (Sipe and Cohen 2000; Kazak 2012).

Amiloidin ana bileşeni protein fibrilleridir. Optimal koşullar sağlanarak, herhangi bir proteinin kendine özgü özelliğinden dolayı, amiloid fibrillerinin oluştuğu öne sürülmektedir. Bugüne kadar 25 insan proteini ana amiloid fibril bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Westermarck 2005). Amiloid fibrilleri 5-10 nm genişlikte, 3 nm çapında, dallanmamış, birçok filamentöz alt gruptan meydana gelen, amorf şekilli tek yapılı bir morfolojiye sahiptir. Amiloid fibrilleri karakteristik olarak beta katlantılı katman dizilimine sahiptir. Amiloid fibrilleri çözünür değildir, doku yapısına zarar vererek dokunun temel elementlerinin kaybına neden olmaktadır (Westermarck 2005; Kazak 2012).

1.8.2. Beta amiloid (A β)

A β , 1984 yılında Glenner ve Wong tarafından transmembran amiloid prekürsör proteininin ~ 40 amino asit uzunluğundaki peptid bölünme ürününün bir ailesi olarak tanımlanmıştır (Selkoe 1991; Hardy and Higgins 1992; Koudinov and Berezov 2004). Bir başka ifade ile A β , AH'de ve Down sendromunda, senil plakların ve serebrovasküler kalıntıların ana bileşeni olan 39-43 amino asit uzunluğundaki polipeptitler olarak ifade edilmektedir (Balley *et al.* 2011).

AH ve Down Sendromlu hastaların beyinde, beyin ve serebrovasküler yapıdaki amiloid birikimlerinin ana bileşeni olarak izole edilen A β , nevrin oluşumunda, nöronal protein trafik işlemlerinde, sinyal iletiminde, kalsiyum metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. A β , tip I transmembran protein olan APP'nin proteolitik bölünmesi ile üretilmektedir (Murphy and Le Vine 2010; Butterfield *et al.* 2013). APP'nin kendi fonksiyonu tam olarak belirlenmemiş olmasına rağmen, A β peptidinin nasıl üretildiği, beyinde bozunması veya çevreye taşınması konularında yapılan kapsamlı araştırmalar sonucu APP fonksiyonuna dair pek çok bilgiye ulaşılmıştır (Murphy and Le Vine 2010).

A β molekülü plazma ve beyin-omurilik sıvısının normal bir bileşeni olarak tüm insanlarda üretilmektedir; ancak belirli koşullar altında bu molekül bir araya toplanarak bazı hastalıkların oluşmasına ve ilerlemesine neden olmaktadır. A β 'nin normal kişilerde

üertildiğinde ne gibi fonksiyonlara sahip olduğu tam olarak anlaşılamamıştır (Seubert *et al.* 1992; Busciglio *et al.* 1993; Eteghad *et al.* 2015).

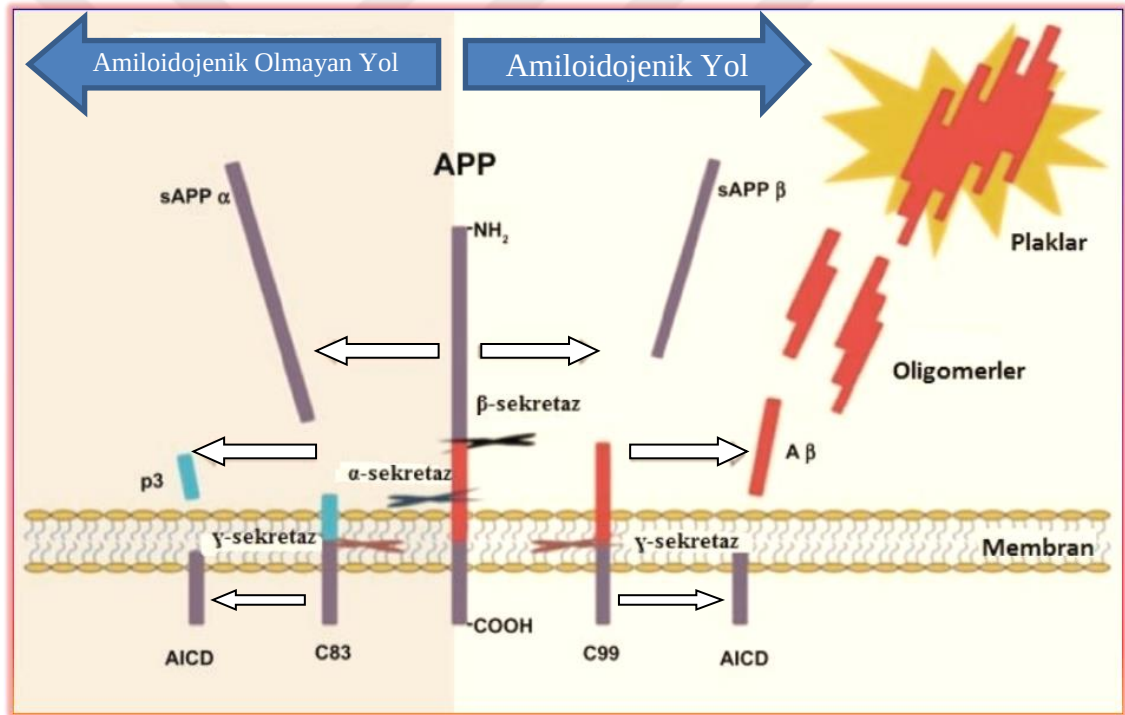
Ancak çeşitli çalışmalar sonucunda A β 'nin;

- İyon kanalı oluşumu,
 - Kinaz aktivasyonu,
 - Kolesterol nakil düzenlemesi,
 - Metal kaynaklı oksidatif hasara karşı koruma içermesi,
 - AH ile ilişkili genlerin düzenleyici bölgesi ile bir transkripsiyon faktörü olması,
 - Ligand olarak görev yapması,
 - Çeşitli çevresel stres faktörleri ve pro-inflamatuar aktivitelerini indükleyebilmesi
- gibi çeşitli patolojik olmayan fonksiyonlara sahip olduğu tespit edilmiştir (Paris *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002; Balley *et al.* 2011).

Hastalık evrelerindeki değişiklikler, hastalığın ortaya çıkma yaşına ve hastalık süresine katkıda bulunmaktadır. APP'nin A β metabolizmasından sorumlu olan enzimatik süreçler oldukça iyi anlaşılmıştır. İlk olarak kromozom 21 üzerinde klonlanan APP, iki membrana bağlı endoproteaz aktivitesi olan β - ve γ -sekretaz ile bölünmektedir. Bu sürece amiloidojenik yol adı verilmektedir. β -sekretaz, ilk önce salgılanmış bir türev olan sAPP β 'yi serbest bırakmak için APP'yi parçalamaktadır. 99 amino asidin bir parçası zara bağlı kalmaktadır. Daha sonra APP, 38-43 amino asit aralığındaki peptitleri salmak ve A β üretmek için γ -sekretaz olarak bilinen bir enzim ile parçalanır. γ -sekretazla bölünerek elde edilen peptit popülasyonu bir C-terminal heterojenitesine neden olmaktadır. Bu nedenle çok sayıda farklı A β türü bulunmaktadır (Selkoe 2001).

γ bölünme, üretilen A β miktarını ve A β 'nin daha toksik 42 amino asit formunun nispi miktarını düzenlemektedir. β -sekretaz aktivitesinin, amiloidojenik yolda hız sınırlayıcı adım olduğu ve toplam hücresel APP'nin ~%10'unu işlediği düşünülmektedir. Geriye kalan ~%90 APP, çözülebilir APP ve 83 amino asitlik C-terminal fragmanı- α (CTF- α) üreten α -sekretaz ile yapısal olarak parçalanmaktadır. Membrana bağlı CTF'nin γ -

Sekretaz ile bölünmesi sonucu sinyal iletiminde rol oynayan bir sitosolik eleman olan APP intraselüler domain (AICD) üretilmektedir (Cao and Sudhof 2001; Gao and Pimplikar 2001; Kimberly *et al.* 2001; Hardly and Selkoe 2002; Murphy and LeVine 2010). Daha sonra üretilen AICD hücre içine girerek, transkripsiyonel aktivatör olarak görev yaparak, diğer sinyal iletim mekanizmalarını etkilemektedir. Bu sürece amiloidojenik olmayan yol adı verilmektedir. Bu iki yoldaki bölünmeler neticesinde γ -sekretaz kaynaklı devam eden süreçte sırasıyla büyük oranda $A\beta$ (1-40), daha az oranda da toksik form olan $A\beta$ (1-42) elemanları meydana gelmektedir (Murphy and LeVine 2010; Bayraktar 2012).



Şekil 1.13. Amiloid prekürsör protein (APP) proteolizi ve iki alternatif yol (Thinakaran and Koo 2008).

$A\beta$ molekülleri, fibrilojeniktir ve *in vivo* olarak birçok formda bulunmaktadır (Teplow 1998). Amiloid birikimlerinde bulunan formlar arasında, 40 ve 42 kalıntı uzunluktaki türler önemlidir (Walsh *et al.* 1999). $A\beta$ 40, beyindeki en bol (~%80-90) $A\beta$ şeklini temsil ederken, $A\beta$ 42 (~%5-10), bazı hastalıklarda önemli bir artış göstermektedir. $A\beta$ 42, $A\beta$ 40'la karşılaştırıldığında iki ekstra hidrofobik amino aside sahiptir. Ayrıca $A\beta$ 42

fazlaca hidrofobik ve fibrilojenik olduğundan daha büyük birikim oluşumunu teşvik ettiği için daha toksik olduğu kabul edilmektedir (Naslund *et al.* 1994; Walsh *et al.* 1999; Butterfield *et al.* 2013).

Çok düşük miktarda A β 'nin, sinirsel gelişimde ve kolinerjik sinir iletiminin düzenlenmesinde rol oynayabileceğine işaret edilmektedir (Harkany *et al.* 2000; Sadigh-Eteghand 2014). Bir nanomolar konsantrasyonda A β 'nin plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Konusha *et al.* 2001). Ayrıca, oksidatif koşullara yanıt olarak nöronlar oksidatif stres sonuçlarını zayıflatmak için A β 'yi aşırı ifade etmektedir. A β 'nin antioksidan aktivitesinin *in vitro* değerlendirmeleri, nöronları nörotoksiteden konsantrasyona bağlı olarak koruyabildiğini göstermiştir (Nunomura *et al.* 2006). Serebral kan damarları boyunca biriken A β serebral amiloid anjiyopati olarak bilinmektedir. Bu, AH vakalarında sıklıkla görülür ve AH'nin histopatolojik özelliklerinden birini temsil etmektedir (Attems *et al.* 2010). Vazokonstriksiyona ve vasküler tonusun düzenlenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla, nörotoksite yanında yüksek konsantrasyonlarda A β 'nin serebral yapı içindeki kan akışını bozduğu ve nöronal disfonksiyonu hızlandırdığı görülmektedir (Eteghad *et al.* 2015).

A β birikimleri uzunluk, moleküler ağırlık ve mikroskopik boyutlara göre aşağıdaki gibi üç farklı gruba ayrılmıştır (Kirkitaдзе and Kowalska 2005):

1. Çok kısa oligomerler,
2. A β türevi yayılabilir ligandlar,
3. Protofibriller.

A β 'nin çok kısa oligomerleri, A β 'nin dimer ve heksamer formları olarak adlandırılmaktadır. A β -türevi yayılabilir ligandlar küçük oligomerlerdir ve molekül ağırlıkları 17 ila 42 kDa arasındadır (Kirkitaдзе and Kowalska 2005). Son olarak, protofibriller, olgun amiloid fibrillerin oluşumundan önce ortaya çıkan ve prefibriler yapılar olarak adlandırılan geçici yapılardır. Toplanan formlarında, bu peptidler

nörotoksisiteye neden olmaktadır. Bu özellik, yeni yapıların ortaya çıkışı ile birlikte sinaptik fonksiyonları bozmaktadır (Shankar and Walsh 2009; Eteghad *et al.* 2015).

Bazı çalışmalar, A β 'nin çözünür formlarının hayvan modellerinde uzun süreli potensifikasyonu ve birikmeyi azaltabileceğini göstermiştir (Shankar *et al.* 2008). Dahası, yeni proteinlerin üretimi ve hafıza işlevlerinde rol alan dendritik omurga oluşumu gibi bazı biyolojik olaylar A β 'nin çözünür biçimi tarafından etkilenmektedir (Balducci *et al.* 2010). Bu nedenle, AH'deki nörodejenerasyon kısmen A β 'nin çözünür biçimleri yoluyla aracılık edilmektedir. A β 'nin bu formunun, AH hastalarının beyinde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca A β 'nin çözünür formu beyin omurilik sıvısında (BOS) ve plazmada saptanmaktadır (Shen *et al.* 1994; Barry *et al.* 2011). Bazı çalışmalar, AH'den etkilenen bireylerde çözünür A β konsantrasyonunun bilişsel düşüş ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Hardy and Selkoe 2002). Dolayısıyla, AH'nin güvenilir bir belirtici olarak düşünülmektedir. Bu fikir, A β düzeylerinin çözünür formlarının, AH'nin transgenik fare modelinde AH ilerlemesi ile korelasyon gösterdiği, ancak plak sayılarının veya çözünmeyen A β seviyelerinin, AH'nin şiddeti ile anlamlı bir ilişkisi olmadığı hayvan çalışmalarıyla da desteklenmektedir (Jine *et al.* 2011; Kittelberger *et al.* 2012). Bu bulgulara dayanarak, bazı yeni çalışmalarda, insan beyninden izole edilen A β dimerleri, peptitin en toksik türü olarak kabul edilmektedir (Townsend *et al.* 2006; Jin *et al.* 2011).

1.9. Sitotoksiste Testleri

Sitotoksisite terimi; hücresel, işlevsel ve yapısal hasara neden olan moleküler olayların basamaklarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Sitotoksisiteyi karakterize etmek, hücrenin bozulmasını tetikleyen çok sayıda etken olmasından dolayı zor bir süreç olarak kabul edilmektedir. Bu karmaşıklık hücre sağ kalımına yardım etmek için hücresel proteinlerin kabiliyetleri, hücre ölümünün belirli modellerini aktive etmek için hücrelerin genetik yerleşimiyle dengelenmesi sonucu giderilmektedir (Martins and Earnshaw 1997; Murray *et al.* 2007).

Sitotoksisite tarama testleri, materyallerin veya ekstraktların neden olduğu hücre ölümü ölçümünü sağlamaktadır. Farklı sitotoksisite tarama yöntemlerinin uygulanmasının, aynı materyal için bir biyouyumluluk değerlendirme spektrumu ürettiği gösterilmiştir (Murray *et al.* 2007). Sitotoksisite testlerinin sürekli geliştirilmesiyle, morfolojik değişikliklerle hücre hasarının saptanması, hücre büyümesinin ve metabolik özelliklerin ölçülmesi gibi birçok yöntem ortaya çıkmıştır (Lı *et al.* 2008; Damas *et al.* 2011; Kasper *et al.* 2011; Uboldi *et al.* 2012).

Bir ajanın vücutta nasıl tepki vereceğini anlamaya yönelik ilk adım genellikle hücre kültür çalışmalarını içermektedir (Lewinski *et al.* 2008). Hücre bazlı tahliller, test moleküllerinin hücre çoğalması üzerine etkilerinin olup olmadığını belirlemek veya hücre ölümüne yol açan doğrudan sitotoksik etkileri gösterecek olan bileşiklerin koleksiyonlarını taramak için kullanılmaktadır. Kullanılan hücre bazlı tahlil tipine bakılmaksızın, deneyin sonunda kaç canlı hücrenin kaldığını bilmek önemlidir. Yaşayan ökaryotik hücrelerin sayısını tahmin etmek için kullanılabilecek çeşitli test yöntemleri vardır. Bunlar;

- tetrazolyum indirgeme,
- resazurin redüksiyonu,
- proteaz işaretleyicileri,
- ATP algılamadır.

Tetrazolyum indirgeme, resazurin indirgeme ve proteaz aktivite testleri, genel metabolizmanın bazı yönlerini veya canlı hücrenin bir işareti olarak enzimatik aktiviteyi ölçmektedir. Bu deneylerin tümü, substratın plaka okuyucu ile tespit edilebilen renkli veya floresan bir ürüne dönüştürülmesi için canlı hücre popülasyonu ile reaktifin inkübe edilmesini gerektirmektedir. Çoğu standart kültür koşullarında substratın canlı hücrelerle inkübe edilmesi, mevcut hücrelerin sayısı ile orantılı bir sinyal üretmeye neden olmaktadır. Hücreler ölünce, substratı ürüne dönüştürme yeteneği hızla kaybolmaktadır. Bu fark, yaygın olarak kullanılan hücre yaşayabilirlik testlerinin çoğunun temelini oluşturmaktadır. Ayrıca tetrazolyum indirgeme testlerinde yaşayan

hücrelerin saptanması için çeşitli tetrazolyum bileşikler kullanılmaktadır. En sık kullanılan bileşikler; 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), 3-(4,5-dimetil-tiyazolil-2-yl)-5-(3-karboksimetofenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanlid (XTT) ve 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzudur (WST-1) (Riss *et al.* 2013).

Hayvan çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, hücresel testlerin, kontrol edilmesi ve çoğaltılması daha kolay olup, ekonomiktirler. Sitotoksosite halinde, hücre kültürlerinin potansiyel olarak test edilen toksik ajan konsantrasyonuna ek olarak, sıcaklık, pH, besin maddesi ve atık konsantrasyonlarındaki dalgalanmalar gibi çevrelerindeki çeşitli değişikliklere duyarlı oldukları da bilinmektedir. Bu nedenle, deneysel koşulların kontrolü çok önemlidir (Lewinski *et al.* 2008).

Sitotoksosite tahlilleri *in vitro* toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. LDH salınım testi, nötr kırmızı ve MTT testi, toksik maddelere maruz kaldıktan sonra sitotoksosite veya hücre yaşayabilirliğinin tespiti için en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Fotakis and Timbrell 2006).

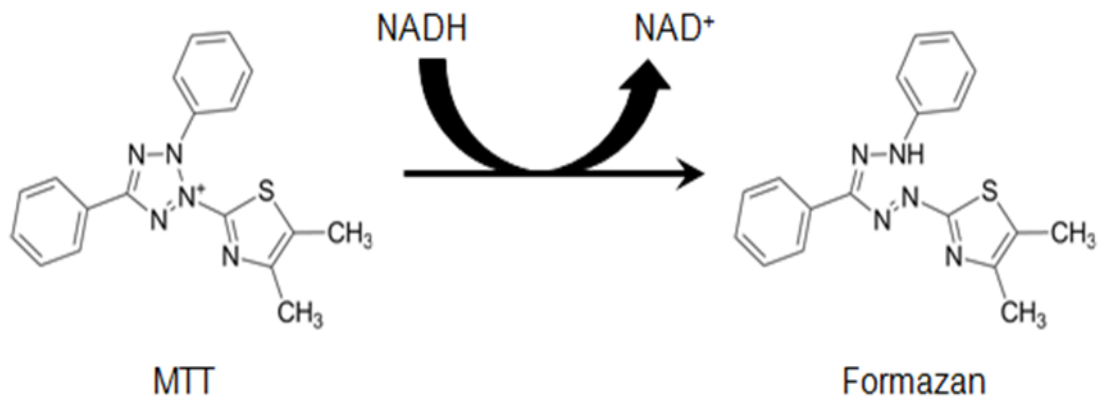
1.9.1. MTT testi

1983 yılında Mosmann tarafından hazırlanmış ve ilk kez tanımlanmış olan MTT testi, yüksek verimli tarama için uygun olan 96 oyuklu plakalar için geliştirilen ve toksik maddelere maruz kaldıktan sonra sitotoksitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan ilk homojen hücre canlılığı testidir (Mosmann 1983; Fotakis and Timbrell 2006; Sliwka *et al.* 2016). Mitokondriyal dehidrojenaz performans ölçümü olarak da bilinen MTT tahlili, hücre proliferasyonunun hızlı bir değerlendirmesine olanak sağlayan kolorimetrik bir yöntemdir (Li *et al.* 2015).

Mitokondriyal aktivite tetrazolyum tuzları kullanılarak test edilmektedir. Çünkü mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tetrazolyum halkasını parçalamaktadır. Yalnızca

aktif mitokondri bu enzimleri içerdüğinden reaksiyon sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir (Lewinski *et al.* 2008).

En yaygın kullanılan MTT canlılık testinin ana prensibi şöyledir: Sitokrom b ve c canlı hücre hatlarındaki mitokondriyal dehidrojenaz tetrazol halkasını parçalayabilen, sarı renkli, suda çözülebilen bir tetrazolyum tuz olan MTT, tetrazolyum halkasının mitokondriyum içinde sukinat dehidrojenaz ile bölünmesiyle mor kristal formazan üretmek üzere indirgenmektedir (Fotakis and Timbrell 2006; Li *et al.* 2015). Formazan ürünü, hücre membranlarında geçirimsiz olduğundan dolayı sağlıklı hücrelerde birikmektedir. Bu madde dimetil sülfoksit ve diğer organik çözücüler içinde çözünürken, suda çözünmemektedir. Oluşan kristallerin miktarı, hücre sayısına ve aktivitelerine göre pozitif bir korelasyon göstermektedir. Bu da absorbans kolorimetrik değerinin ölçülmesi, hayatta kalan hücrelerin sayısını ve metabolik aktiviteyi yansıtmaktadır. Bir başka ifade ile, hücreler ölünce MTT'yi formazan haline dönüştürme yeteneği kaybolmakta; bu da renk oluşumunun yalnızca canlı hücrelerde meydana geldiğini göstermektedir (Fotakis and Timbrell 2006). Şekil 1.14'te MTT ve renkli formazan ürününün yapıları gösterilmektedir.



Şekil 1.14. MTT ve renkli formazan ürününün yapıları (Riss *et al.* 2016)

MTT tahlili şu anda hücre büyüme oranını ve kültürün toksisitesini test etmek için en sık kullanılan yöntemdir. MTT tahlili diğer saptama yöntemlerine göre avantajlı olsa da bazı dezavantajlara da sahiptir. MTT tetrazolyum test teknolojisi, yaygın olarak kabul

edilmiştir; yayınlanmış binlerce makalenin gösterdiği gibi akademik laboratuvarlarda popüler olmaya devam etmektedir (Marshall 1995; Fotakis and Timbrell 2006; Li *et al.* 2015).

1.9.2. LDH salınım testi

LDH tüm hücrelerde bulunan, plazma zarının hasar görmesi durumunda hücre dışı boşluğa salınabilen, çözünür bir sitoplazmik enzimdir. LDH tahlili, LDH enzim konsantrasyonunu ölçerek hücrelerin membran bütünlüğünü değerlendirmemize olanak sağlayan kolorimetrik bir sitotoksisite testidir (Chan *et al.* 2013).

LDH salınım testi, 96-kuyu formatında yüksek verimli analiz için kullanılmaktadır. Bu test doğru yorumlanırsa gerçekleştirilmesi kolay ve hızlıdır. LDH tahlili, hücre ortamındaki enzim aktivitesinin nicelleştirilmesi üzerine kurulmuştur ve çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. İlk olarak, tahlil, bir ilaç/parçacık veya efektör hücrelere maruz bırakılan ölü veya ciddi hasar görmüş hücrelerden LDH'nın salınımını ölçerek sitotoksisiteyi doğrudan değerlendirmek için kullanılmaktadır. İkincisi, tahlil, toplam hücrelerin sayısını saymak veya ölü hücrelerin çıkarılmasından sonra hayatta kalan hücrelerin miktarını belirlemek için kullanılmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan LDH salınım testinin temel prensibi: LDH'nın büyüme ortamına salınmasıyla laktatın piruvata dönüşümü katalizlemekte ve NAD^+ 'yi NADH 'ye çevirmektedir. NADH , diyaforaz varlığında sarı tetrazolyumu kırmızı formazana dönüştürmektedir. Renk değişikliği seviyesi, salınan LDH miktarı ile orantılıdır ve dolayısıyla hücre ölümü ve membran hasarının derecesini göstermektedir. Bu renk değişikliği 490-520 nm'lik absorbans bant genişliğinde ölçülmektedir (Parhamifar *et al.* 2013).

1.10. Apoptoz

19. yüzyıldan beri birçok çalışmada hücre çoğalmasının çok hücreli organizmaların fizyolojik süreçlerinde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (Gluecksmann 1951; Lockshin and Zakeri 2001). Hücre ölümü de hücre çoğalması gibi normal gelişimin vazgeçilmez bir parçası olarak kabul edilmektedir. Bütün organizmanın işlevselliğini sağlamak için milyarlarca hücre ölmektedir. Böylelikle vücut boyutu, hücre bölünmesi hücre ölümü ile dengelediği için aynı kalmaktadır (Sharma *et al.* 2014). 1964 yılında programlanmış hücre ölümü terimi, gelişimin devam ettiği süreçte hücre ölümünün tesadüfi olmadığı, belirli amaç ve hedefleri gerçekleştirmek amacıyla oluşan kontrollü adımların bir dizisini taklit etme yeteneği olarak tanımlanmıştır (Lockshin and Williams 1964). Başka bir ifadeyle, programlanmış hücre ölümü, gelişmekte olan organizmalarda, kontrollü hücre tüketimine yol açan olayların eşgüdümlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu tanıma sayesinde, fizyolojik hücre ölümü terimi, programlanmış hücre ölümü kavramıyla ilişkilendirilmektedir (Sharma *et al.* 2014). Daha sonraki yıllarda programlanmış hücre ölümünün ayrı bir biçimi olan apoptosis terimi ortaya çıkmıştır.

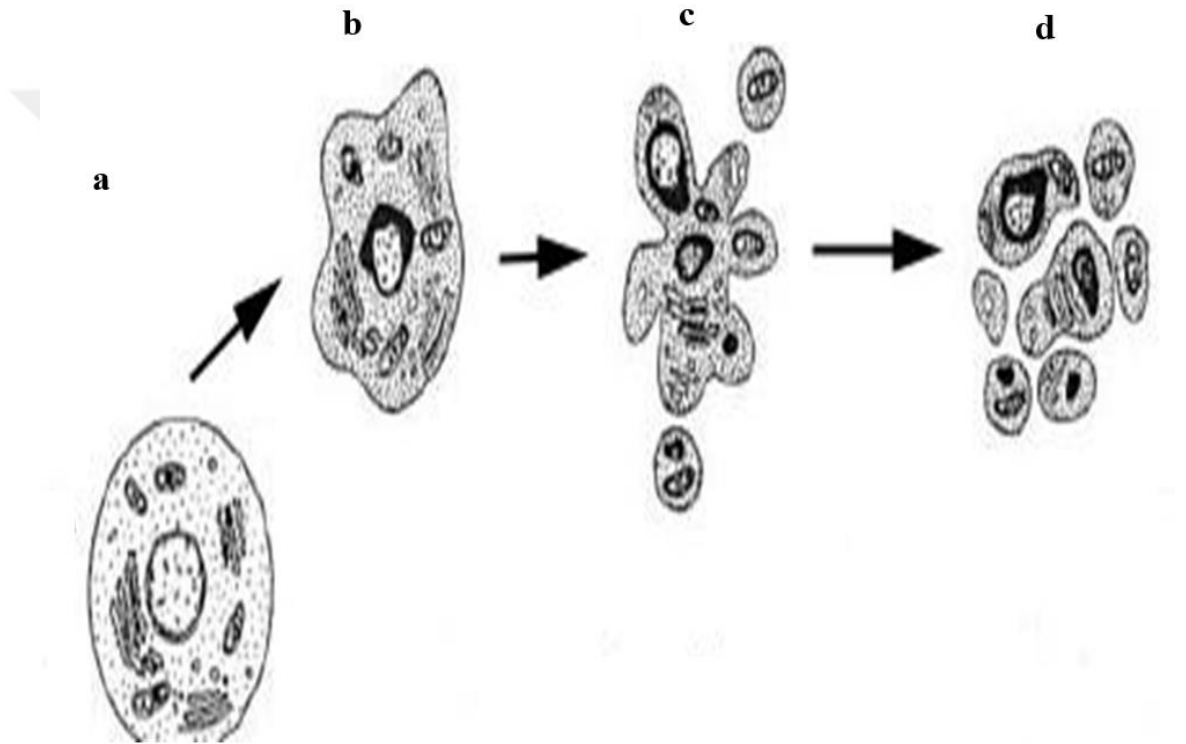
Apoptosis terimi 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından bir gazetede, hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir şeklini tanımlamak için kullanılmıştır (Elmore 2007). Yunanca “düşme” kelimesinden türetilen Apoptoz terimi, doğal hayatta iklime bağlı olarak düşen ağaç veya çiçek yapraklarına benzetilmektedir. Bu benzetme, canlı maddenin ölümünün organizmaların yaşam döngüsünün ayrılmaz ve gerekli bir parçası olduğunu vurgulamaktadır (Sharma *et al.* 2014). Apoptotik hücreler, komşu hücreler tarafından tıkanarak parçalanmaktadır. Hücrenin homeostazını korumak için, hücre popülasyon sayısındaki artış ve azalma arasındaki denge düzgün bir şekilde kurulmalıdır. Apoptozun mitozdan 20 kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Yetişkin bir insanda yaklaşık 50 - 70 milyar hücre, 8 ila 14 yaşındaki bir çocuk için yaklaşık 20 - 30 milyar hücre apoptoz nedeniyle her gün ölmektedir (Jose 2009). Hücre ölümünün apoptotik modu, çok hücreli organizmaların gelişiminde, fizyolojik ve patolojik koşullar altında dokulardaki hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde, korunmasında önemli bir

rol oynayan aktif ve tanımlanmış bir süreç olarak ifade edilmektedir (Leist and Jaattela 2001; Sharma *et al.* 2014). Son yıllarda apoptoz ile ilgili yayınların sayısının artmasının temel sebebi, birçok hastalığın oluşumunda gereğinden az veya fazla apoptozun neden olduğunun farkına varılmasıdır.

Çok hücreli biyolojik sistemlerin geliştirilmesi ve bakımı, organizmayı oluşturan hücreler arasındaki karmaşık bir etkileşime bağlıdır. Öyle ki organizmanın yaşamını sürdürebilmesi ve işlevlerini yerine getirebilmesi için bazı hücrelerin fedakar bir davranış içinde olduğu anlaşılmaktadır (Meier *et al.* 2000). Bu hücrel fedakarlıklara örneklerden bir tanesi, apoptoz, reaktif olmayan veya kendiliğinden reaktif hücreleri elimine ederek bağışıklık sisteminin T ve B hücre elemanlarının oluşumunu sağlamaktadır. Bir diğer örnek hücre popülasyonlarının korunmasında mitozun tersine bir rol oynar. Bir yetişkin insanda doku homeostazını sağlamak için, günde on tane hücre ölür ve tipik bir yıl içerisinde bir kişinin hücre ölümüyle kaybettiği hücrelerinin kütlelerinin neredeyse tüm vücut ağırlığına eşit olduğu tahmin edilmektedir (Wu *et al.* 2001). Dolayısıyla bu ölüm, muhtemelen dokuyu yeniden biçimlendirme ve strese tepkiler gibi dinamik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır.

Işık ve elektron mikroskopileri, apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri tespit etmektedir (Hacker 2000). Apoptoz morfolojik olarak, hücre küçülmesi, sıkıştırılmış sitoplazma, sitoplazma zarındaki vakuoller, nükleer kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile karakterize edilmektedir. Apoptozun başlangıç aşamasında, hücre büzülerek hücre boyutu küçülmektedir. Daha sonra nükleer membranın çevresinde, kromatin yoğunlaşmaya başlayarak halka şeklinde bir yapı oluşturmaktadır. Bu aşama, apoptozun en karakterisik özelliği olarak bilinmektedir. Daha sonra çekirdek giderek yoğunlaşarak parçalanmaktadır. Hücre çevresindeki dokudan ayrılarak kıvrık formda uzantılar oluşturmaktadır (Sharma *et al.* 2014). Hücre, sitoplazma, yoğunlaştırılmış kromatin ve organelleri içeren "apoptotik cisimler" olarak adlandırılan iyice sıkıştırılmış membranla kaplı yapılara parçalanmaktadır (Saraste and Pulkki 2000). Apoptotik cisimler, makrofajlar ve parenkimal hücreler de dahil olmak üzere komşu hücrelere hızla

fagositize edilmektedir. Apoptotik cisimler bu hücreler içinde tanınmaktadırlar (Sharma *et al.* 2014). Apoptotik cisimler, makrofajlar tarafından sarılmakta ve böylece iltihaplanma tepkisine neden olmaksızın dokudan çıkarılmaktadır. Bu morfolojik değişiklikler, bir apoptotik hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların bir sonucudur (Saraste and Pulkki 2000). Şekil 1.15'te apoptotik hücrelerin özellikleri gösterilmektedir (Sharma *et al.* 2014).



Şekil 1.15. Apoptotik hücrenin morfolojik özellikleri

a) hücrenin daralma, b) kromatin yoğunlaşma ve marjinalleşme, c) membrana bağlı apoptotik cisimlerin oluşumu, d) sitozol ve nükleer fragmanlamalar (Sharma *et al.* 2014)

Apoptozun önemi

Apoptoz, bazı durumlarda belirli bir dizi sinyal kaskatı ile düzenli bir şekilde oluşan hücre ölümü tipidir. Büyüme, gelişme ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde, organizmalardaki gereksiz veya anormal hücrelerin temizlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda, organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan sabit miktardaki hücreyi korumak amacıyla kullanılan önemli bir yoldur.

Apoptozun başlatılması ve uygulanması sırasında sinyal molekülleri, reseptörler, enzimler ve gen düzenleyici proteinler de dahil bir dizi molekülün işbirliği gerekmektedir (Sharma *et al.* 2014).

Apoptotik işlemler yaygın biyolojik önem taşımaktadır. Bu nedenle, apoptotik programın işlev bozukluğu, düzensizliği ya da miktarı çeşitli patolojik koşullarla ilişkilendirilmektedir. Aşırı hücre ölümü; edinilmiş bağışıklık yetmezlik sendromu (AIDS), Alzheimer ve Parkinson sendromları gibi nörodejeneratif hastalıklara ve miyokard enfarktüsü gibi iskemik hasara neden olmaktadır. Çok az hücre ölümü, kansere, sürekli viral enfeksiyona veya otoimmün bozukluklara neden olmaktadır. Apoptoz, bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynamaktadır. Fizyolojik koşullar altında, otoantijenlere bağlanan olgunlaşmamış lenfositler apoptoz ile yok edilmektedir. Bu lenfositlerin yok edilmesiyle oluşan hasarlar otoimmüniteye yatkınlık oluşturmaktadır. Timosit hücrelerindeki apoptoz, timustaki antijenler ile olan etkileşimlerini takiben gelişmekte olan T hücrelerinin kendiliğinden tepki veren klonlarının ortadan kaldırılmasına neden olmaktadır. Fas ve Fas ligandı, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait hücre yüzeyi molekülleri, bağışıklık reaksiyonunun ve aynı zamanda T hücrel sitotoksitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Fas sisteminin arızalanması, lenfoproliferatif bozukluklara ve otoimmün hastalığa neden olmaktadır (Wu *et al.* 2001).

1.11. Nekroz

Nekroz pasif, katabolik, patolojik, enerjiye ihtiyaç duymayan bir hücre ölüm süreci olarak tanımlanmaktadır. Nekroz genellikle flame, iskemik veya toksik yaralanma gibi dış toksik faktörlere yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca nekroz fizyolojik koşullar altında gerçekleşmeyen geniş hücre alanlarını etkileyen önemli bir süreçtir (Sharma *et al.* 2014). Nekroz, ATP tükenmesinden kaynaklanan biyoenererjik bir felaketin temel sonucu olarak bilinmektedir. Uzun süre nekroz, hücre ölümünün tesadüfi, kontrolsüz bir formu olarak düşünülmüştür ancak, nekrotik hücre ölümünün uygulanmasının, bir dizi

sinial iletim yolu ve yürütme mekanizması tarafından gerçekleştiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Festjens *et al.* 2006).

Nekrotik hücre ölümü, hücre hasarına neden olan hipoksi, iskemioglifemi, aşırı sıcaklık değişiklikleri, toksinlere maruz kalma ve besin yoksunluğu gibi fiziko-kimyasal strese yanıt olarak ortaya çıkmaktadır (Vanlangenakker *et al.* 2008). Ayrıca nekroz, çok uzun süre çıplak gözle görülebilen ve dolayısıyla hücre ölümünden sonra ortaya çıkan belirgin doku değişiklikleri anlamına gelmektedir (Majno and Joris 1995). Ancak nekroz, hücre ölümünden sonra oluşan bozunum süreçlerine atıfta bulunduğu için, hücre ölümü mekanizmasını tanımlaması uygun olmayan bir terim olarak düşünülmektedir. Nekrotik hücre hasarına iki ana mekanizma aracılık eder: Hücrenin enerji kaynağına müdahale edilmesi ve hücre zarlarına doğrudan zarar verilmesidir (Elmore 2007).

Nekrozda ortaya çıkan morfolojik değişiklikler;

- Hücre şişmesi,
- Sitoplazmik vakuollerin oluşumu,
- Disturbasyonlu endoplazmik retikulum,
- Yoğunlaşmış, şişmiş veya kopmuş mitokondri,
- Ribozomların parçalanması ve ayrılması,
- Plazma membranının erken kopması,
- Dağınık kromatin,
- Organel membranların parçalanması,
- Şişmiş ve rüptüre olmuş lizozomlar (Kerr *et al.* 1972; Majno and Joris 1995; Trump *et al.* 1997).

Hücre zarı bütünlüğünün kaybı, çevresel dokuya sitoplazmik içeriklerin salınmasıyla sonuçlanmakta ve nihai olarak, iltihaplı hücrelerin nüksetmesi ile kemotatik sinyaller gönderilmesine neden olmaktadır. Apoptoz ve nekrozun mekanizmaları ve morfolojileri farklı olmasına rağmen, bu iki süreç arasında örtüşme vardır. Kanıtlar, nekroz ve

apoptozun "apoptoz-nekroz sürekliliği" olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini ortaya koymaktadır (Zeiss 2003; Elmore 2007).

Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklılıklar

Apoptoz ve nekrozun nihai sonuçları aynı olsa da iki süreç önemli derecede farklılık göstermektedir. Apoptozda, etkilenen hücreler, hücre ölümüne neden olan bir dizi biyokimyasal reaksiyonu aktive ederek, aktif olarak iş görmektedir. Bundan dolayı apoptoz “hücre intiharı” olarak adlandırılmaktadır. Nekrozda ise hücre ölümleri olumsuz koşullar veya hücre ortamındaki değişiklikler nedeniyle oluşmaktadır. Böylece, nekroz "masum bir kurbanın" ölümüne yol açan "biyolojik kazanın" sonucu olarak görülmektedir. Karakteristik farklılıklar, apoptoz veya nekroza maruz kalmış hücrelerin yapısında ve metabolik süreçlerinde de görülmektedir. Bir hücre apoptozise uğradığında, çekirdek de dahil olmak üzere tüm hücre birçok parçaya ayrılmaktadır. Hücrenin parçalanması sırasında hücre protein ve adenosin trifosfat (ATP) üretmeye devam etmektedir. Sonuç olarak, bir hücre zarı ile çevrili olan her apoptotik cisim bozulmamış işlevsel hücre bileşenleri içermektedir (Rosser and Gores 1995) Buna karşın, nekrotik hücre ölümü ise metabolik fonksiyonların kaybı ve hücre zarı bütünlüğüyle karakterizedir. Bundan dolayı nekroz geçiren hücreler, protein ve ATP üretimlerini durdurmaktadır. Yapısal olarak hücrelerin organelleri şişmekte ve nekrozun başlangıç aşamalarında işlev görmektedir. Buna ek olarak, hücre zarı, kabarcık benzeri projeksiyonlar oluşturmaktadır. Organel içermeyen bu kanüllerin boyutları büyümektedir. Sonunda, hücre zarının koparak hücre bileşenlerinin çevresindeki dokuya salınmasına neden olmaktadır. Bu hücre eritme sürecine sitoliz denir. Salınan hücresel içerik, bundan sonra, etkilenen dokuda bir inflamatuvar tepki uyandırmaktadır. Bu tepkinin üç bileşeni vardır. Bunlar;

1. Bağımsızlık sisteminin karaciğere çeken bazı hücreleri,
2. Hücre iletişimde yer alan sitokinler denilen küçük moleküller,
3. Reaktif oksijen türleridir.

Sıklıkla nekrozun ayrılmaz bir parçası olarak görülen bu enflamatuvar tepki, karaciğer dokusuna daha da zarar vermektedir (Nanji and Sturmhöfel 1997).

Yukarıda verilen literatür bulguları dikkate alınarak şunlar söylenebilir:

-Yeni endüstriyel devrim olarak kabul edilen nanoteknoloji toplum, yaşam ve ekonomi üzerinde çok büyük etkilere sebep olarak birçok alanda devrim niteliğinde fırsatlar sunmaktadır.

-Nanopartiküllerin çok farklı özelliklere sahip olması ve bu özelliklerinden dolayı biyoloji, fizik, kimya, tıp ve daha birçok alanda çok yaygın olarak kullanılması, bu malzemelerin bilim dünyasında ilgi odağı olmasına sebep olmaktadır.

-Nanopartiküllerin yaygın kullanımına rağmen biyolojik etkileri tam olarak bilinmemektedir.

-Nano boyuttaki partiküller, makro boyuttaki partiküllerden farklı özelliklere sahip olduklarından dolayı farklı biyolojik etkilere neden olmaktadır.

-Nanobilim uygulamalarının tıp alanında çok sayıda yarar sağladığı ve insanlık için potansiyel olarak değerlendirildiği bilinmektedir.

-Bor nanopartikülleri ilgi çeken özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılan bir nanomalzemedir.

-Bor nanopartiküllerinin biyolojik etkileri hakkında literatürde sınırlı düzeyde bilgi mevcuttur.

-AH'nin demansın en yaygın biçimi olması ve gün geçtikçe bu hastalığa yakalanan insan sayısının artması ve kesin bir tedavisinin olmaması, AH'ye olan ilginin artmasına neden olmaktadır.

-AH'ye neden olan A β 'nin normal şartlarda ne gibi fonksiyonlara sahip olduğu tam bilinmediğinden ve belirli koşullar altında bir araya toplanarak AH'ye neden olmasından dolayı A β , araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

-A β birikimlerine nelerin neden olduğunun bulunması, bu birikimlerin önüne geçilmesiyle AH'nin kesin tedavisinin bulunacağı düşünülmektedir.

Bu nedenlerle mevcut tez çalışması kapsamında; hBN nanopartikülünün AH’de büyük rolü olduğu bilinen A β proteini üzerindeki nöroprotektif etkileri; hücre canlılığı (MTT ve LDH testleri) analizleri, biyokimyasal parametreler (toplam antioksidan kapasitesi ve toplam oksidan durumu), moleküler genetik parametreler (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ve apoptoz-nekroz (Hoechst 33258 Floresan Boyama, Akış Sitometri) analizleri ve A β protein miktarının belirlenmesi için Western Blot yöntemi kullanılarak ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Metal iyonlarının birikmesinin yaşlanma ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. AH'nin beyinde çinko, bakır ve demir birikimi, Parkinson hastalığının da demir birikimi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Özellikle, A β 'nin parankimal birikimi ve bunun metal iyonları ile etkileşiminin, AH'nin ilerlemesinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Dolayısıyla, beyindeki metal iyonlarını azaltma ve şelatörlerin uygulanmasıyla A β ve metal iyonlarının etkileşimini hedefleme stratejilerinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Cui *et al.* (2005) nanoparçacıklara konjuge edilmiş şelatlayıcıların, metal iyonu ile indüklenen protein çökeltmesini tersine çevirerek etki gösterip göstermediğini araştırmışlardır. Mevcut çalışmada, Cu (I) şelatörü d-penisilamin, bir disülfid bağı veya bir tiyoeter bağı vasıtasıyla nanopartiküllere kovalent olarak konjuge edilmiştir. Daha sonra nanopartikül-şelatör konjugatları 4°C'de saklanarak, konjugatların sulu süspansiyonda pH 6-8 arasında stabil olduğu belirlenmiştir. D-penisilaminin nano-taneciklerden salınması, ditiotritol gibi indirgeyici ajanlar kullanılarak elde edilmiştir. Sadece konjuge d-penisilamini serbest bırakan indirgeyici koşullar altında muamele edilen nanopartiküllerin, bakır-A β (1-42) agregalarını etkili bir şekilde çözdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar nanopartiküllerin, A β (1-42) birikiminin önlenmesi için beyine d-penisilamin verme potansiyeline ve diğer merkezi sinir sistemi hastalıklarında metal iyon birikimini azaltma potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir.

A β protein fibrillerinin oluşumu, AH'nin patolojisinde önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. A β birikimini inhibe etmek, AH tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Ikeda *et al.* (2006) bu çalışmada, A β (1-42) fibrillerinin belirgin amiloidojenik aktivite ve sitotoksikite ile oluşumunu engellemek için, yapay şaperon olarak, hidrofobik kolesterol kısımları olan bir polisakarit pullulandan (CHP) oluşan, biyo-uyumlu nanojelleri kullanmayı amaçlamıştır. CHP nanojellerin, partikül başına 6-8 A β (1-42) molekülü içerdiği ve A β 'nin konformasyonunda rastgele bir sarmalda, α -sarmalın veya β -levhasının zengin bir yapıya dönüşmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu yapının, 37 °C'de 24 saatlik bir inkübasyondan sonra stabil olduğu ve

A β (1-42)'nin birikmesini bastırıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca, metil- β -siklodekstrin eklenmesinden kaynaklanan nanojellerin ayrışmasının monomerik A β moleküllerinin serbest kalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Fizyolojik koşullar altında, pozitif yüklerle amino grubu modifiye edilmiş CHP'den (CHPNH₂) oluşan nanojellerin, CHP nanojellerinden daha büyük, inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. CHPNH₂ ve A β arasındaki elektrostatik etkileşimlerin fibril oluşumunu önemli derecede inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, CHPNH₂ nanojellerin PC12 hücrelerini A β toksisitesinden koruduğu belirtilmiştir.

Liu *et al.* (2009) prototip nanoparçacık-şelatör konjugatını (Nano-N2PY) sentezlemişlerdir. Daha sonra sentezledikleri Nano-N2PY'nin amiloid toksisitesi üzerine etkilerine bakmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, Nano-N2PY'nin insan kortikal nöronlarını amiloidle bağlantılı olan oksidatif toksisiteden koruduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca, Nano-N2PY'nin amiloid-agregat oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Birçok çalışma, C60 fulleren türevli nanomalzemelerin nöroprotektif etkilerine odaklanmıştır. Molekül başına çoklu radikal ekleyebilen C60 fullerenin kendine özgü yapısının, hücre içi oksidatif stresin neden olduğu sitotoksik etkileri azaltarak etkili bir antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Lee *et al.* (2010) bu çalışmada, poli (etilen glikol) içeren bir C60 fulleren türevi olan PEG-C60-3 ve bunun pentoksifilin içeren hibrid (PTX-C60-2) yapılarının Neuro-2A hücrelerinde A β (25-35) kaynaklı toksisiteye karşı etkileri araştırılmıştır. PEG-C60-3 ve PTX-C60-2, reaktif oksijen türlerinin azaltılması ve mitokondriyal membran potansiyelinin korunması gibi benzer aktivitelerle A β (25-35) kaynaklı sitotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. PEG-C60-3 ve PTX-C60-2'nin sitokorumasının, antioksidan aktivitelerin, hücreleri A β hasarından koruduğunu gösteren bir otofaji inhibitörü tarafından kısmen azaldığı kaydedilmiştir.

Mulik *et al.* (2010) fotostabilite ve hedefleme ile arttırılmış hücre alımını sağlamak amacıyla kurkumin içeren apolipoprotein E3 aracılı poli (bütil) siyanoakrilat

nanopartikülleri (ApoE3-C-PBCA) hazırlamışlardır. Hazırlanan nanopartiküller, partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, tutma etkinliği ve *in vitro* ilaç salımı ile karakterize edilmiştir. *In vitro* hücre kültürü çalışmasında, ApoE3-C-PBCA'nın, düz kurkumin çözeltisine kıyasla SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde A β kaynaklı sitotoksositeye karşı artan terapötik etkinlik gösterdiği kaydedilmiştir. A β 'nin nöronal hücrelerde apoptoziyi tetiklediği bilinmektedir. Bu nedenle akış sitometri deneyleri kullanılarak, kurkuminin antiapoptotik aktivitesi çalışılmıştır. Tüm deneyler sonucunda, kurkumin aktivitesinin arttırılmış hücre alım ve sürekli bir ilaç salım etkisi gösteren düz kurkumin çözeltisine kıyasla ApoE3-C-PBCA ile güçlendirildiği tespit edilmiştir. ApoE3'ün kurkumin ile birlikte A β kaynaklı sitotoksositeye karşı aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Saraiva *et al.* (2010) A β , AH mekanizmasında merkezi bir rol oynamaktadır. A β oluşumu ve birikimi, β bakımından zenginleştirilmiş ikincil bir yapıya geçişe bağlı bir değişimden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu çalışmada, A β toplanmasını engellemek için A β konformasyonunun adsorpsiyon yoluyla nanoparçacıklara yeniden dönüşümünü içeren bir strateji geliştirmeyi amaçlanmıştır. NP'ler, mikrojeller ve latekslere yol açan polistirenin sülfonasyonu ile sentezlenmiştir. Her iki polimerik nanoyapının, A β indüklenmeyen bir duruma neden olan konformasyonu etkilediği rapor edilmiştir. Ayrıca, oligomerizasyonun geciktiği ve sitotoksitenin azaldığı tespit edilmiştir. Hidrofilik kısımlar ve hidrofobik zincirler arasındaki uygun dengenin etkili NP'lerin temel bir özelliği olduğu belirtilmiştir.

Chonpathompikunlerta *et al.* (2011) insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde, antioksidan etki ve nitroksit radikal içeren nanopartiküllerin (RNP'ler), piperin (PI) ile birleştirilen potansiyel mekanizmasını araştırmışlardır. RNP/PI'nin SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkileri, hücre canlılığı için WST, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi için nitromavi tetrazolyum ve deoksiriboz, reaktif oksijen türlerinin ürünleri ve apoptotik hücre ölümü için ELISA, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesi için biyokimyasal teknikler kullanılarak belirlenmiştir. RNP/PI'nın, yalnızca RNP'lerle tedavi edilen hücrelere kıyasla reaktif oksijen türlerinin seviyesini ve reaktif oksijen

türlerinin ürünlerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, RNP/PI kombinasyonunun, *in vitro* Alzheimer modelinde artan bir antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu kombinasyon tedavisinin koruyucu etkisinin mekanizmasının, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltma ve apoptozu önleme kabiliyeti ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Aşırı A β birikimi, Alzheimer hastalığının patogeneğinde önemli bir olay olarak görülmektedir. A β kaynaklı nöronal sitotoksitenin altında yatan olası mekanizmalar arasında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ve apoptozun olduğu bilinmektedir. Temelde nitroksil radikale sahip olan ve kimyasal olarak ROS'u temizleyen yeni nanopartiküller tasarlanmıştır. Chonpathompikunlert *et al.*(2011) bu çalışmada, insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde nitroksil radikal içeren nanopartiküllerin (RNP), A β ile indüklenen sitotoksiste üzerindeki potansiyel nöroprotektif rolünü belirlemeyi amaçlamışlardır. Hücre canlılığı, apoptotik oran, süperoksit anyon radikalleri ve hidroksil radikalleri içeren ROS seviyeleri, lipid peroksidasyonunu içeren ROS üretimi, protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonu ölçülerek tespit edilmiştir. RNP ile önceden inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin, A β kaynaklı hasardan korunduğu belirlenmiştir. Kantitatif analizler sonucu, RNP'lerin hücre içi oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. Ayrıca RNP'nin, okside olmuş lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın miktarını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir.

Nitrozatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun AH'nin patogeneğinde rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. A β ve peroksinit mitokondriyal bölünmeyi düzenleyen dinaminle ilişkili protein 1'in (DRP1) anormal aktivasyonu ile mitokondriyal parçalanma ve nöronal hücre ölümünün indüklediği bilinmektedir. AH'de mitokondriyal parçalanma ve DRP1'in aşırı aktivasyonunun tam mekanizmaları bilinmemektedir. Ayrıca peroksinitritten kaynaklanan nitrozatif stresin AH'daki rolü açık olmasına rağmen etkili antioksidan tedavilerin eksik olduğu görülmektedir. Dowding *et al.* (2014) yaptıkları bir çalışmada, serum oksit nanoparçacıklarının, süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve peroksinitleri temizleyerek nörodejenerasyona karşı koruma sağladığını tespit etmişlerdir. Burada serum oksit nanoparçacıklarının nöronlar

tarafından içselleştirilerek, mitokondri ve plazma zarlarında biriktiği rapor edilmiştir. Ayrıca, seryum oksit nanoparçacıklarının, peroksinitrite maruz kalan nöronlardaki reaktif azot türlerini, protein tirozin nitrasyon seviyelerini, A β kaynaklı mitokondriyal parçalanmayı ve nöronal hücre ölümünü azalttığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu AH'nin karmaşık patogenezinin, kapsamlı bir tedavi gerektirdiğini ve AH'ye karşı çok işlevli ilaçların daha fazla istendiği rapor edilmiştir. Gao *et al.* (2014) bu çalışmada, altın nanoparçacıklı polioksometalat peptidlerin (AuNP'ler@POMD-pep) yeni çok işlevli bir A β inhibitörü olarak tasarlanarak etkilerinin araştırılmasını amaçlamışlardır. AuNP@POMD-pep'in A β agregasyonunun inhibe edilmesinde, A β fibrillerinin ayrıştırılmasında, A β kaynaklı peroksidaz aktivitesinin ve sitotoksitenin azaltılmasında sinerjik etkiler gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca, AuNPs@POMD-pep'in kan beyin bariyerini geçerek küçük moleküllü anti - AH ilaçlarının sakıncalarını giderebildiği tespit edilmiştir.

Önceden yapılan çalışmalar, epiglo-katechin-3-gallatin (EGCG), A β birikmesini önleyerek hücreleri A β aracılı nörotoksisiteden kısmen koruyabildiğini göstermişlerdir. Zhang *et al.* (2014), Tet-1 peptidi ile kaplanmış EGCG'yi selenyum nanopartiküllerinin (Tet-1-EGCG@Se) yüzeyine bağlayarak, A β agregasyonunun, amiloid fibril ayrıştırma işleminin anlaşılmasını ve EGCG'nin yüksek dozlarda sitotoksitesini azaltmasını amaçlamışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, Tet-1-EGCG@Se'nin A β fibrilasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebildiğini ve önceden oluşturulmuş A β fibrillerini toksik olmayan agregatlara ayırdığını tespit etmişlerdir. Ek olarak, EGCG@Se'nin A β fibrillerini yüksek bir afinite ile etiketlediği kaydedilmiştir.

Wang *et al.* (2015), nöronal hücrelerin yüzeyindeki glikozaminoglikanların, hücre yüzeyinde plak oluşumunu sağlamak için çekirdeklenme bölgeleri olarak görev yaptıklarını rapor etmişlerdir. Bu işlemi taklit eden, heparin ile kaplı manyetik nanopartiküller sentezlenerek enzimle bağlı immünosorbent deneyi, jel elektroforezi ve tiyoflavin T deneyi içeren çeşitli tekniklerle A β ile bağlandığı gösterilmiştir. Nanopartiküllerin, nöronal hücrelere karşı çok az toksisite sergilediği ortaya konmuştur.

Ayrıca, heparin ile kaplı nanopartiküllerin, nöronal hücreleri A β kaynaklı sitotoksiteden etkili bir şekilde koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, heparin nanoparçacıklarının A β çalışmaları için çok faydalı bir araç olabileceğini göstermektedir.

Gregori *et al.* (2017) retro-inverso peptidi RI-OR2-TAT ile süslenmiş nanolipozomların A β 'nin toplanması ve toksisitesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Bu peptid inhibitör nanoparçacıkların (PINP) konsantrasyonlarının, 1:2000 molar oranında lipozom bağlı RI-OR2-TAT ile A β 'nin %50 inhibisyonuna neden olmuştur. *In vitro* A β oligomerlerinin ve fibrillerinin oluşumunu inhibe etmek için oldukça düşük konsantrasyonlara ihtiyaç olduğu belirlenmiştir. Ayrıca PINP'lerin yüksek afiniteye sahip olan A β 'ye bağlanarak SHSY-5Y hücrelerini A β 'nin toksik etkisinden kurtardığını tespit etmişlerdir.

Guan *et al.* (2016), rasyonel olarak hem proteolitik hem de süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ile Seria / Polioksometalat hibridlerle (CeONP@POM') yapay bir nanozim tasarlayarak A β agregasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre CeONP@POM'lerin A β agregalarını önemli oranda bozduğu ve hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROT) azalttığı görülmüştür. Ayrıca, CeONP@POMD'nin kan beyin bariyerini (BBB) geçtiği belirlenmiştir. Nanozim olarak CeONP@POMD'nin, biyolojik dağılımları, vücut ağırlık değişimi, *in vivo* toksikolojilerine bakılarak, iyi bir biyo-uygunluğa sahip olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak, A β nörotoksitesinin tedavisi için çok işlevli yapay nanozimlerin tasarlanmasının yolunun açıldığı düşünülmektedir.

Kim *et al.* (2016), Au nanopartiküllerin (AuNP) büyüklüğünün, şeklinin ve yüzey yükünün, A β -AuNP birikme işlemini kolaylaştıran sıvı bir platformda beyindeki A β birikmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda, büyük AuNP'lerin beyinde büyük ve amorf agregatlarını, küçük AuNP'lerin ise protofibriller A β yapılarını indüklediği bulunmuştur. Pozitif yüklü AuNP'lerin, A β 'ye negatif yüklü AuNP'lerden daha güçlü şekilde çekildiği rapor edilmiştir. Nanoparçacık şeklinin

beyinde A β toplaması üzerindeki etkisini incelemek için küresel AuNP'leri, altın nanoçubukları ve altın nanoküpleri de karşılaştırmışlardır. Karşılaştırma sonucunda A β 'nin, altın nanoçubukların uzun eksenine bağlanarak daha az fibril oluşturduğu görülürken, nanoküplerin ise fibril ağı üretmek için tüm eksenleriyle A β ile etkileşime geçtiği tespit edilmiştir. Son olarak, farklı nanoyapıların nöroblastoma hücrelerinde farklı sitotoksositeye neden olduğu ve küçük A β birikimlerinin daha yüksek sitotoksosite indüklediği rapor edilmiştir.

Liu *et al.* (2017) iminodiasetik asit konjuge nanopartikülleri (IDA-NP) tasarlayarak, bu nanopartiküllerin A β 42 agregasyonu ve Zn⁺² tarafından hızlandırılan sitotoksosite üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, A β 42 fibrilasyonuna karşı IDA-NP'nin yüksek metal şelat kapasitesi ve güçlü inhibisyon kabiliyeti sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca, IDA-NP'nin özel yüzey karakter özelliği göstererek A β 42 fibrilasyonunu inhibe etti tespit edilmiştir. IDA-NP, SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılığını %80 arttırarak Zn⁺² ve A β 42 türlerinin neden olduğu sitotoksiteden hücreleri koruduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, IDA-NP'nin Zn⁺² aracılı A β birikimine ve sitotoksitesine karşı önleyici bir bifonksiyonel nano-modülatör olduğu kanıtlanmıştır.

Biriken A β , AH'nin patolojik bir işareti olarak bilinmektedir. Terapötik bir strateji, A β birikimini durdurarak, bu birikintileri ortadan kaldırmaktadır. Çeşitli birikme inhibitörleri araştırılmış olsa da, sadece nanoparçacıkların (NP) düşük oranlarda ümit vaat ettiği bilinmektedir. Ayarlanabilir büyüklük, şekil ve yüzey özelliklerine sahip NP'ler, rasyonel tasarımlı A β birikme inhibitörleri için ideal bir platform olarak karşımıza çıkmaktadır. Moore *et al.* (2017) bu çalışmada, farklı yüzey kaplamaları ve çapları sergileyen altın nanokürelerin inhibe edici özelliklerini tanımlamışlardır. NP'lerin elektrik yükü, agrega morfolojisini etkilerken, hem NP çapının hem de yüzey kimyasının birikme derecesini önemli oranda değiştirdiği tespit edilmiştir. Özellikle, 8 nm ve 18 nm poli (akrilik asit) kaplı NP'lerin, 1: 2.000.000'lik oranda A β agregasyonunu engellediği rapor edilmiştir. Teorik hesaplamalar, bu düşük stokiyometrinin NP yüzeyine yakın çözelti koşullarından kaynaklandığını göstermiştir.

Bu bulgular, yüzey kaplamalı altın nanokürelerin, A β agregasyonunun inhibisyonu için ayarlanabilir terapötik ajanlar olarak hizmet etme potansiyeli gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Xiong *et al.* (2017), iki peptid inhibitörü VVIA ve LPFFD'yi tek sekanslarda birleştirerek, peptid inhibitörlerinin moleküler melezlerini tasarlamayı ve bunların A β 42 agregasyonu ve sitotoksitesi üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. Hibrit peptitlerin, iki öncüsü ile karşılaştırıldığında, orta derecede fakat artan bir inhibe edici aktivite sergiledikleri görülmüştür. Bununla birlikte, peptidlerin altın nanoparçacıklara (AuNP'ler) konjuge edilmesine karşılık gelen peptid @ AuNP'lerin, A β 42 toplanmasını ve sitotoksiteyi inhibe etme aktivitesinin büyük ölçüde geliştiği görülmüştür. Bunlar arasında, en etkili olan VVIACLPFFD (VCD10) AUNP'nin, çok düşük dozajda hücre canlılığını %48'den %82'ye yükselttiği tespit edilmiştir. VCD10 @ AuNP'lerin yapısal özelliklerinin, AuNP yüzeyindeki A β ile sinerjik etkileşimleri destekleyerek, A β oligomerizasyonu ve fibrilasyonunun güçlü inhibisyonlarına neden olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

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

Çizelge 3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan kimyasallar

Malzemenin Adı	Temin Edildikleri Firmalar
Asetilkolinesteraz Kit	Abcam® (ABD)
Borik asit (H_3BO_3)	Eti-Maden® (Türkiye)
DMEM F:12 medyum	Gibco® (ABD)
DMSO	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Fetal Bovine serum (100 ml)	Sigma®
Fosfat tamponlu salin (PBS)	MP Biomedicals® , Almanya
Hidrazin Hidrat ($N_2H_4.H_2O$)	Sigma-Aldrich® (Almanya)
LDH sitotoksosite deney kiti	Cell Biolabs®, USA
MTT hücre çoğalması deney kiti	Milipore®, Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich®
Hidroklorik (HCl) asit	Sigma-Aldrich®
Sodyum Azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich®
Total antioksidan kapasite (TAK) kiti	Rel Assay Diagnostics®, Türkiye
Total oksidan durum (TOD) kiti	Rel Assay Diagnostics®
Penisilin-streptomisin (100 ml)	Sigma® , USA
Trypan Blue Solüsyonu	Sigma-Aldrich®

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

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

Çizelge 3.2. Araştırmalar süresince kullanılan aletler ve cihazlar

Aletin Adı	Modeli
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ ’lı İnkübatör	ESCO Celculture
Derin dondurucu – 86, büyük boy l	Esco, uus-439b
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Hassas Terazı	Unibloc, Shimadzu
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Işık Mikroskobu	Zeiss,
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Masaüstü pH Metre	Adwa , AD1000
Mikroplaka Okuyucu	Epoch bio-tek
Otoklav	JSR, JSAC-60
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
UV-Visible Spektrofotometre	Mecasys, Optizen uv/vis
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
X-Işını Difraktometresi	Rigaku SmartLAB

3.3. hBN Nanopartikülünün Sentezi

Hekzagonal bor nitrürün (hBN) sentezinde, bor ve azot kaynakları olarak borik asit (H_3BO_3), sodyum azid (NaN_3) ve hidrazin hidrat ($\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) kimyasalları kullanılmıştır. İlk olarak, 2,5 g H_3BO_3 ve 8 g NaN_3 kimyasalları 300 ml deiyonize suda çözündürülüp, magnetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çözeltiye 2,3 ml $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ eklendikten sonra çözelti 30 dakika daha karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra azotlu gaz ortamında otoklava yerleştirilen çözelti, otoklav kül fırınında 16 saat boyunca 300°C sıcaklıkta bekletilmiştir. 16 saat sonunda otoklavdan çıkarılan ürün bol su ile yıkanmıştır. Ardından ürün deiyonize su ile 100°C sıcaklıkta 2-3 saat boyunca vakumlu ortamda kurutma işlemine tabi tutularak hBN nanopartikülleri sentezlenmiştir.

3.4. hBN Nanopartikülünün Karakterizasyonu

Sentez edilen hBN nanopartikülün büyüklüğünü, morfolojisini tayin etmek için XRD, SEM ve TEM analizleri yapılmıştır.

XRD, kristal malzemelerin faz tanımlaması, karakterizasyonu için kullanılan güçlü ve zararsız bir tekniktir. Ortalama tane büyüklüğü, kristal yapı, şekil değiştirme, kristal kusurlar, atom aralıkları hakkında bilgi sağlamaktadır. XRD pikleri, bir örnekteki her kafes düzlemi kümesinden belirli açılarda saçılan monokromatik bir x ışını demetinin ve kristal toz numunenin yapıcı etkileşim ilkesine dayanarak üretilmektedir. Ayrıca oluşan XRD modeli, belirli bir malzemedeki periyodik atomik düzenlemelerin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Li *et al.* 2008).

SEM numune yüzeyini tarayarak bilgi elde etmeyi amaçlayan, odaklanmış elektron ışınlarını kullanan güçlü bir büyütme aracıdır (Deepika 2014; Choudhary and Choudhary 2017). SEM numunenin yüzey topografyası, morfolojisi, kimyasal bileşimi, kristal yapısı ve elektriksel davranışları hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca SEM katı numunelerin yüzey verileri hakkında ayrıntılı bilgi sunmaktadır (Parry 2000; Choudhary

and Choudhary 2017). SEM'lerin büyük, pahalı ekipman parçaları olmasına rağmen, ürettikleri yüksek çözünürlüklü, üç boyutlu, ayrıntılı görüntülerden dolayı, geniş uygulama ve yetenekleri nedeniyle, araştırmacılar arasında popüler olmaya devam etmektedir (Choudhary and Choudhary 2017).

TEM, görüntü oluşturmak amacıyla örnekten bir elektron ışının iletildiği, iki boyutlu, yüksek çözünürlüklü bir mikroskopi tekniğidir. TEM, malzemelerin partikül büyüklüğü, şekli, yüzey özellikleri, kristal ve element yapısı hakkında güvenilir bilgi vermektedir (Williams 1996; Powers *et al.* 2012; Yang 2017). Her yıl değişik TEM tekniklerinin kapsamı, bilgi genişliği ve gücü genişletilerek çok hızlı gelişme gösteren bir alan olarak bilinmektedir. Modern bir TEM, birkaç metre küp nanometrelik hacimlerden kırınım desenlerini toplayabilen ve atom ölçeğine kadar örnekleme numuneleri alabilen, karmaşık bir karakterizasyon tesisi oluşturmaktadır (Guzzinati *et al.* 2018).

Bu tez çalışmasında, hBN mikro-nanopartikül XRD analizlerinde Rigaku SmartLAB X ışın difraktometresi kullanılmıştır. Örneklerin SEM görüntüleri Jeo Jsm-6610 marka SEM cihazıyla, TEM görüntüleri Philips CM30T marka TEM cihazıyla elde edilmiştir.

3.5. Hücre Hattının Temini

Çalışmada kullanılan İnsan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC®) bankasından satın alınmıştır.

3.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Hücre kültüründe kullanılan çözeltilerin tümü steril ortamda hazırlanmıştır. Çözeltilerdeki saf su, otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır. Hücre besiyeri ve PBS (1X), +4°C'de muhafaza edilerek kullanılmıştır. Fetal bovin serum (FBS) çözeltisi, inkübasyon sonucu inaktif hale getirilerek kullanılmıştır.

Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler aşağıda ifade edilen oranlara göre hazırlanmıştır;

-PBS çözeltisi (1X):

PBS çözeltisi (10X) 10 mL

Steril su 90 mL

-Tripsin - EDTA çözeltisi (%0,1 - %0,04):

Tripsin 0,1 g

EDTA 0,04 g

PBS çözeltisi (1X) 100 mL

-Antibiyotik çözeltisi:

Penisilin/streptomisin (10000U/10000 µg/mL) 1 mL

Steril su 9 mL

-SH-SY5Y hücreleri için besiyeri (%10):

FBS çözeltisi 5 mL

Antibiyotik çözeltisi 0,5 mL

DMEM F-12 besiyeri 44,5 mL

3.7. Hücre Hattının Açılması, Pasajlanması ve Kültüre Edilmesi

-80°C’de soğuga dayanıklı vial içinde saklanan SH-SY5Y hücreleri 3-4 dakika 37°C’lik su banyosunda ısıtılmıştır. 15 mL’lik falkona alınan hücreler 5 mL %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 glutamin içeren Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM: F12) besiyeri eklenerek pipetajlama ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de (dakikadaki devir sayısı) 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Hücre hat stoklarındaki DMSO’nun uzaklaştırılması amacıyla yapılan bu işlem iki defa tekrar edilmiştir. Elde edilen hücre pelletine, 1 mL DMEM: F12 besiyeri ilave edilerek yavaşça pipetajlama yapılmıştır. Daha sonra hücre

süspansiyonu 25 cm²'lik flasklarda 5 mL serumlu medyum içerisinde ekilerek 37°C'de, %5 karbondioksit (CO₂) ve %90 bağıl nem içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda tutunmamış olan hücreler, süpernatantın atılması ile ortamdan uzaklaştırılmıştır ve ortama yeni DMEM: F12 besiyeri ilave edilmiştir. Faz-kontrast, invert mikroskop ile kontrol edilerek hücre yoğunluğunun %70 konfluense ulaştığı tespit edilince, hücreler haftada 2-3 kez pasajlanarak çoğaltılmıştır. Daha sonra çoğaltılan hücreler mikroskopta sayılmıştır. Sayılan hücreler 10⁴ hücre/cm²'lik bir hücre yoğunluğunda yeni kültür ortamlarına aktarılmıştır. Bu ortama DMEM: F12 besiyeri eklenerek 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültürlenmiştir.

3.8. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ilk olarak 75cm²'lik flasklara ekilmiştir. Daha sonra SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, hücrelerin bulunduğu besiyeri inaktif %1 FBS ve 15 µM retinoik asit (RA) içeren DMEM:F12 besiyeri ile değiştirilerek farklılaşma süreci başlatılmıştır. Kültür ortamı her 2 günde bir değiştirilmiştir. Bu işlem 15 gün boyunca devam ettirilmiştir. Bu süre zarfında hücrelerin morfolojisi ve farklılaşma süreci ışık mikroskopuyla kontrol edilmiştir.

Farklılaşan hücre kültürü, farklı hBN nanopartikül (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L) konsantrasyonlarında 48 saat süresince beta amiloid (Aβ) peptid ile inkübe edilmiştir.

3.9. MTT Testi

Mitokondriyal dehidrojenaz performans ölçümü olarak da bilinen MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium bromide) tahlili, hücre proliferasyonunun hızlı bir değerlendirmesine olanak sağlayan, kolorimetrik bir yöntemdir (Li *et al.* 2015). Mitokondriyal aktivite, mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tetrazolyum halkasını

parçaladığı için tetrazolyum tuzları kullanılarak test edilmektedir. Yalnızca aktif mitokondri bu enzimleri içerdiğinden, reaksiyon sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir (Lewinski *et al.*2008). Bu deneyde, hücre canlılığı ve bileşiğin sitotoksik etkileri, Cayman Chemical şirketi tarafından üretilen MTT kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Hücreler 96'lık plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL kültür medyumunu içerisinde 10^5 hücre bulunacak şekilde, test bileşiği ile birlikte ve test bileşiği olmadan ekilmiştir. Hücrelerin 37°C'de, %5'lik CO₂'li etüvde 48 saat süre ile kültürü yapılmıştır. 48 saatin sonunda, plakanın her bir kuyucuğu 100 µl PBS ile yıkanmıştır. Pozitif kontrole ait kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa pipet yardımıyla 10 µl Triton-X eklenerek, etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa tampon tableti, MTT reaktifi ve kristal çözücü solüsyonuyla hazırlanmış olan MTT çözeltisinden 20 µl ilave edilerek, hücreler etüvde (37°C, %5 CO₂) 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra meydana gelen formazan, kuyucukların dibinde siyah kristaller halinde görülmüştür. Daha sonra formazan kristalleri 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (SigmaAldrich®) içinde çözülmüştür. Numunelerin absorbansı mikropłaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okunmuştur.

3.10. LDH Salınım Testi

Kolorimetrik bir sitotoksisite tayin yöntemi olan LDH analizi, laktat dehidrojenaz enzim miktarını ölçmektedir. Hücre sitotoksisitesinin değerlendirilmesi için, hücre tabanlı çalışma odaklı, laboratuvarında kullanılan bir yöntemdir (Moharamzadeh *et al.* 2009). Plazma zarının hasarlanması sonucu hücre kültürü süpernatant içine hızlı bir şekilde LDH salınarak, LDH sitotoksisite maddesiyle belirlenmektedir (Korzeniewski and Callerwaert 1983). Bu deneyde LDH aktivitesini değerlendirmek için, Cell Biolabs®, USA şirketi tarafından üretilen LDH kiti kullanılmıştır. Kullanılan LDH kitinin bileşenleri:

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

Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda test bileşiklerine maruz bırakılmıştır. Maruziyetten sonra, pozitif kontrolün bulunduğu kuyucuğa 10 µl Triton-X eklenerek, 37°C’de %5’lik CO₂’li etüvde karanlık ortamda 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kuyucuklardan 90 µl alınarak yeni 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Daha sonra 96 kuyucuğun her birine LDH reaktifinden 10 µl aktarılmıştır ve 30 dakika boyunca 37°C’de %5’lik CO₂’li etüvde karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra, numunelerin absorbensı mikroparka okuyucu kullanılarak 450 nm’de okunmuştur. Bu okuma sonucunda elde edilen absorbens değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

3.11. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)

TAK bir ortamda bulunan antioksidan aktivitesinin faydalı bir tahmini olup, bir kişinin genel antioksidan durumu hakkında bilgi vermeye yönelik bir yöntemdir (Cumurcu *et al.* 2009). TAK’ı belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan kolorimetrik yöntemler, 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-tiyazolin-6-sülfonik asit) ABTS+ temelli yöntemlerdir (Erel 2004).

TAK seviyeleri, antioksidanlar tarafından daha kararlı 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal katyonunun karakteristik renginin ağartılmasını temel alan Erel’in TAK ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar mmol Trolox equiv./L cinsinden ifade edilmiştir (Ayçiçek and Erel 2007).

Kit Bileşenleri:

- Reaktif 1 solüsyonu = 300 µl
- Reaktif 2 solüsyonu = 45 µl
- Standard 1 Solüsyonu: 18 µl
- Standard 2 Solüsyonu: 18 µl

18 µl test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 96'lık plakanın her kuyucuğuna 300 µl Reaktif 1 solüsyonu eklenerek mikrolaka okuyucuda 660 nm'de ilk absorbansı okunmuştur. İlk okumadan sonra aynı kuyucuklara Reaktif 2 solüsyonundan 45 µl ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakika sonunda mikrolaka okuyucuda 660 nm'de ikinci kez absorbansı okunmuştur. Bu iki okuma sonucunda elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir.

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

3.12. Toplam Oksidan Durumu (TOD)

TOD, asidik ortamda çeşitli oksidatif türlerin varlığında, ferrik iyonun ferroz iyonla oksidasyonuna ve ksilenol orange ile demir iyonu ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde oksidanlar, demir-0-dianisidin kompleksini ferrik iyonla okside etmektedir. Üretilen demir iyonu, renkli bir ksilenol orange-ferrik iyon kompleksi oluşturmaktadır. Renk yoğunluğu, numunenin oksidan miktarı ile ilişkili olup, hidrojen peroksit ile kalibre edilen otomatik bir analizöre uygulanarak değerlendirilmektedir. Sonuçlar, µmol H₂O₂ / L cinsinden ifade edilmektedir (Herken *et al.* 2009).

TOD konsantrasyonları, Erel'in geliştirmiş olduğu ticari kitler kullanılarak belirlenmiştir. Erel'in TAK ve TOD yöntemleri kolorimetrik ve otomatiktir ve bu tahlilin hassaslığı mükemmeldir (Ayçiçek and Erel 2007).

Kit Bileşenleri:

- Reaktif 1 Solüsyonu: 300 µl
- Reaktif 2 Solüsyonu: 15 µl
- Standard 1 Solüsyonu: 45 µl
- Standard 2 Solüsyonu: 45 µl

45 µl test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 96'lık plakanın her kuyucuğuna 300 µl Reaktif 1 solüsyonundan eklenerek, mikrolaka okuyucuda 530 nm'de ilk absorbansı okunmuştur. Sonra aynı kuyucuklara Reaktif 2 solüsyonundan 15 µl ilave edilerek, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakikanın sonunda, 530 nm'de ikinci kez absorbansı okunmuştur. Bu iki okuma sonucunda elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir.

$$\text{TOD } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}) = (\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}) \times (\text{Standart 2 değeri})$$

3.13. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti (Invitrogen™) kullanılmıştır ve üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak örnekler, oda sıcaklığında 13.500xg'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. RNA içeren sıvı fazın tamamı yeni bir ependorf tüpe alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek 2-3 dk vortekslenmiştir. Daha sonra örneklerden 600 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarılmıştır ve örnekler oda sıcaklığında 13.500xg'de 10 saniye (sn) santrifüj edilmiştir. Kalan örneklerde kolonlara aktarılacak şekilde santrifüj edilerek, kolondan geçmeleri sağlanmıştır. Örneklerin tamamı kolondan geçtikten sonra kit içindeki Wash I ve Wash II yıkama solüsyonları kullanılmıştır. Kolondaki örneklerle 700 µl Wash I eklenerek, 13.500xg'de 10 sn santrifüj edilmiştir. Daha sonra örneklerle 500 µl Wash II eklenerek, 13.500xg'de 10 sn santrifüj edilmiştir ve bu işlem bir kere daha tekrarlanmıştır. Tüpün altında biriken sıvı boşaltılmıştır. Boş olan tüp, 13.500xg'de 2 dk

santrifüj edilmiştir. Kolon çıkarılarak yeni ependorf tüplere takılmıştır ve üzerine 30 µl RNase içermeyen su ilave edilerek, oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13.500xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra kolonun altında bulunan RNA örnekleri ependorf tüpe aktarılmıştır. RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklanmıştır.

İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı, Epoch cihazı ile tespit edilmiştir. RNA miktarı µg/ml cinsinden ölçülmüştür. cDNA sentezlemek amacıyla RNA miktarlarının eşit olması için tespit edilen en küçük RNA değeri standart olarak kabul edilmiştir.

3.14. c DNA Sentezi

cDNA sentezi için “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems™) kullanılmıştır ve üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan bileşikler ve miktarları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. c DNA reaksiyonu

Bileşiğin Adı	Miktarı
10X RT Tamponu	2,0 µl
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8 µl
10XRT Random Primer	2,0 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2 µl
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1,0 µl
TOPLAM	10 µl

Bu bileşilere ve miktarlara göre hazırlanmış örnekler termal döngü cihazına yerleştirilerek uygun PZR programında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA

sentezi için kullanılan PZR programı Çizelge 3.4'te gösterilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. PZR programı

PZR	Sıcaklık	Zaman
1.Adım	25°C	10 dk
2.Adım	37°C	120 dk
3.Adım	85°C	5 dk
4.Adım	4°C	∞

3.15. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Belirlenen genlere ait mRNA seviyelerinin tespit edilmesi için revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan genlere ait primer dizileri çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. RT-PZR'de kullanılan primerler

Gen Adı	Forward	Reverse
ADAM	AGGTGAAGAATGTGATTGTGG	GCACTGTTTCCCAGGTTTC
APH1A	CCTTTTGGGGAGTTGTGTTC	CTCATACCAGGGGTTTCAGGA
APOE	GGTCGCTTTTGGGATTACCT	TTCCTCCAGTTCCGATTTGT
APP	AGTTTGTGTGTTGCCCCACTG	CGTCATCATCGGCTTCTTCT
BACE1	ACTGTGCGTGCCAACATT	CGTGGGTCTGCTTTACCA
BDNF	GCCTCCTCTTCTCTTTCTGCT	TTTGTCTGCCGCCGTTAC
EGFR	CCTGCTCAACTGGTGTGTG	ATGCTGCGGTGTTTTAC
MAPT	CCAAGACCAAGAGGGTGACA	AGCATCAGAGGTTTCAGAGC
NCSTN	CTGCTCAACGCCACTCATC	GGTAAAATGCTTGCTCTCCAG
PSENEN	CTTCTGGTTCTTCCGAGAGG	AGGAGAGGTAGTCCCCAAGG
TNF-α	CTCCTCACCCACACCATCA	GGAAGACCCCTCCAGATAG

Real Time-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™) kullanılmıştır. Real Time-PZR için kullanılan bileşikler ve miktarları Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-PZR için kullanılan bileşikler ve miktarları

Bileşiğin Adı	Miktarı
cDNA	2,0 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2,0 µl
Sybr Green Mix	5,0 µl
TOPLAM	10 µl

Bu bileşiklere ve miktarlara göre hazırlanmış karışım ilk olarak vortekslenmiştir daha sonra, Mini spin cihazında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Hazırlanan örnekler, Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PZR cihazına yerleştirilmiştir. Uygulanan PZR programı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. PZR programı

PZR	Sıcaklık	Zaman
1.Adım	50°C	2 dk
2.Adım	95°C	10 dk
3.Adım	95°C	15 sn
4.Adım	59°C	1 dk

Çalışmada Actb kontrol gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır. RT-PZR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır.

3.16. Hoechst 33258 Floresan Boyama

Hoechst 33258, bisbenzimid DNA birleştiricisi olup, UV emilim yöntemlerine duyarlı bir florometrik görüntüleme tekniğidir. Bu teknik DNA, hücresel yapıları, spesifik proteinleri ve apoptotik çekirdekleri aynı anda görselleştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyama tekniği ile ortamdaki tüm hücreler boyanarak, floresan mikroskop aracılığıyla ölü veya canlı hücrelerin ayırımına olanak sağlamaktadır (Bainbridge and Macey 1983).

Pleytlere test bileşiği ile birlikte ekilen hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler fosfat tamponlu salin içerisinde 400 µl %4 gluteraldehit ilave edilerek 4°C'de 30 dk bekletilmiştir. 30 dk sonunda hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 200 µl Hoechst 33258 floresan boyası ilave edilerek, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler floresan mikroskopu (Leica® DM IL LED) altında görüntülenmiştir.

3.17. Akış Sitometrisi

Akış sitometri, sıvı bir ortamda süspansiyondaki mikroskobik parçacıkların akmakta olan bir akışkanın içinde optik-elektronik bir tutma cihazı kullanılarak fiziksel ve kimyasal özelliklerini analiz edebilen bir tekniktir. Bu yöntemle elde edilen veriler parçacıkların biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküler yönleri hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. (Errantel *et al.* 2015; Adan *et al.* 2017). Akış sitometrisi, bulaşıcı ve neoplazik hastalıkların, hücresel fenotipleme, hücresel döngü çalışmaları, normal veya anormal DNA içeriği, kromozom analizi, organ nakli, immün yetmezlik çalışmaları, hayvan ve bitkisel fizyoloji ve farmakoloji tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Errantel *et al.* 2015; Adan *et al.* 2017).

BioVision Annexin V-FITC® apoptoz kiti kullanılmıştır ve üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre ilk olarak, pleytlere test bileşiği ile birlikte ekilen hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücreler, 1200 rpm’de 3 dk süresince santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda toplanan hücrelere 500 µl 1X bağlama tamponu eklenerek tekrardan süspanse edilmiştir. Daha sonra kültürle, 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl propidyum iyodür eklenerek, kültürler karanlıkta 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra fosfat tamponlu salin içerisinde hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları, akış sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Almanya) ile belirlenmiştir.

3.18. Protein İzolasyonu

Toplam proteinleri SHSY5Y hücrelerinden izole etmek için, 25 cm²’lik kültür kabında konfluent olan hücreler 48 saat süresince test bileşiklerine maruz bırakılmıştır. 48 saat sonra kültür kaplarında ekili hücreler, Tripsin/EDTA ile kaldırılarak ependorflara alınmıştır. Ependorflara alınan hücreler, 9000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür ve süpernatant atılmıştır. Peletin üzerine SDS eklenerek 2-3 dk vortekslenmiştir ve ardından 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ilk olarak 2-3 dk vortekslenmiştir daha sonra da 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant başka ependorflara aktarılmıştır. Her bir ependorfa 500 µ lizis solüsyonu eklenmiştir ve 15 saniye sonikasyona konularak homojenizasyon sağlanmıştır. Örnekler hemen kullanılmayacaksa -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.19. Bradford Yöntemi

Western blot analizinde kullanılacak olan protein özütü elde edildikten sonra, jeldeki kuyulara yükleme yapmak için, özüt içerisindeki protein konsantrasyonu kantitatif olarak belirlenmiştir. Bir numunedeki toplam protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri Bradford yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan malzemeler:

- Sığır Serum Albümin (BSA)
- Coomassie Parlak Mavi Q 250 Boyası
- Metanol
- Fosforik Asit
- Bradford Reaktifi

Bilinmeyen protein örnekleri, 96 oyuklu bir plaka içerisine 30 µl pipetlenmiştir. Daha sonra protein numunelerine 200 µl Brodford Reaktifi eklenmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda BSA konularak 2-3 dk vortekslenmiştir. Seyreltilmiş her BSA ve bilinmeyen protein örnekleri için, örnekler üç kopya halinde pipetlenmiştir. Plaka, spektrofotometreye yerleştirilmiştir. Plaka 30 saniye çalkalanmıştır, daha sonra oda sıcaklığında 10 dk süreyle makinede inkübe edilmiştir. Absorbans, 595 nm dalga boyunda ölçülerek sonuçlar bir excel dosyasına kaydedilmiştir.

Standart eğri grafiğini hesaplamak için, anlamsız tekrarlar için 595 nm ölçümünün ortalaması, tüm standartların ve bilinmeyen numunelerin 595 nm ölçümlerinden çıkarılmıştır. Standart eğri, çıkartılan değerler kullanılarak, protein konsantrasyonunu µg/mL cinsinden hesaplamak için çizilmiştir. Böylece protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.20. Western Blot Yöntemi

Western blot, hücre ve moleküler biyolojide proteinleri ayırmak ve tanımlamak için sıklıkla kullanılan önemli bir tekniktir. Araştırmacılar western blot kullanarak, hücrelerden elde edilen karmaşık bir protein karışımından spesifik proteinleri saptamayı, apoptoza özgü proteinlerin eksprese olup olmadıklarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Teknik, bu görevi başarmak için üç unsur kullanır:

- (1) boyuta göre ayırma,
- (2) sağlam bir desteğe aktarma,

(3) hedef proteini görselleştirmek için uygun birincil ve ikincil antikor kullanarak işaretlemidir (Mahmood and Yang 2012).

3.20.1. Western Blot yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

%10'luk SDS çözeltisi;

10 gr SDS, 100 ml'lik balon jode saf su ile çözölüp, 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%10'luk Amonyum persölfat (APS) çözeltisi;

0,5 mg APS, 5 ml saf su ile çözölerek elde edilmiştir.

Tris Çözeltisi;

12,15 gr Tris-Baz, 80 ml saf suda çözölerek pH=8,8'e ayarlandı. Çözeltiye HCl asit eklenerek hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Akrilamid;

14,5 gr Akrilamid 50 ml'lik falkonda çözölüp, filtre yapılmıştır.

Biakrilamid;

3,5 gr Biakrilamid 50 ml'lik falkonda çözölüp, filtre yapılmıştır.

Running Buffer;

100 ml running buffer, 900 ml distile suda çözölerek elde edilmiştir.

Bromfenol Mavisi;

100 mg bromfenol mavisi, 3 ml 0,05 N NaOH çözeltisi ve 5 ml %95'lik etil alkolde ısıtılarak çözülmüştür. Çözöldükten sonra 50 ml %95'lik alkol ilave edilmiştir. Su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Laemmli Tamponu;

41,75 µl 1,5 M tris çözeltisi, 5,75 µl saf su, 100 µl gliserol, 100 µl %40'luk SDS, 100µl β-merkaptoetanol, 2,5 µl %0,1'lik brom fenol mavisi karıştırılarak yapılmıştır.

Süt Tozu Çözeltisi (%5, 150ml);

50 ml PBST çözeltisinde 2,5 gr yağsız süt tozu çözölüp, vortekslenerek elde edilmiştir.

3.20.2. Western Blot yönteminde kullanılan jeller ve hazırlanışı

Western blot yönteminde kullanılan jellerin hazırlanması için gerekli olan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.8 ve 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. 2X Resolving Jel

Malzemenin Adı	Miktarı
Akrilamid- Biakrilamid	2,64 µl
Tris HCL	3 µl
SDS	40 µl
TEMED	3,2 µl
APS	80 µl
dH ₂ O	2,24 µl

%10'luk resolving jel hazırlanırken ilk önce H₂O, akrilamid ve SDS Çizelge 3.8'de belirtilen hacimlerde konulmuştur. APS ve TEMED katalizör görevi görüp, jelin donmasını sağlayacak maddeler olduğu için, yukarıda belirtilen miktarlarda jel karışımına en son eklenerek resolving jel elde edilmiştir.

Çizelge 3.9. 2X Stacking Jel

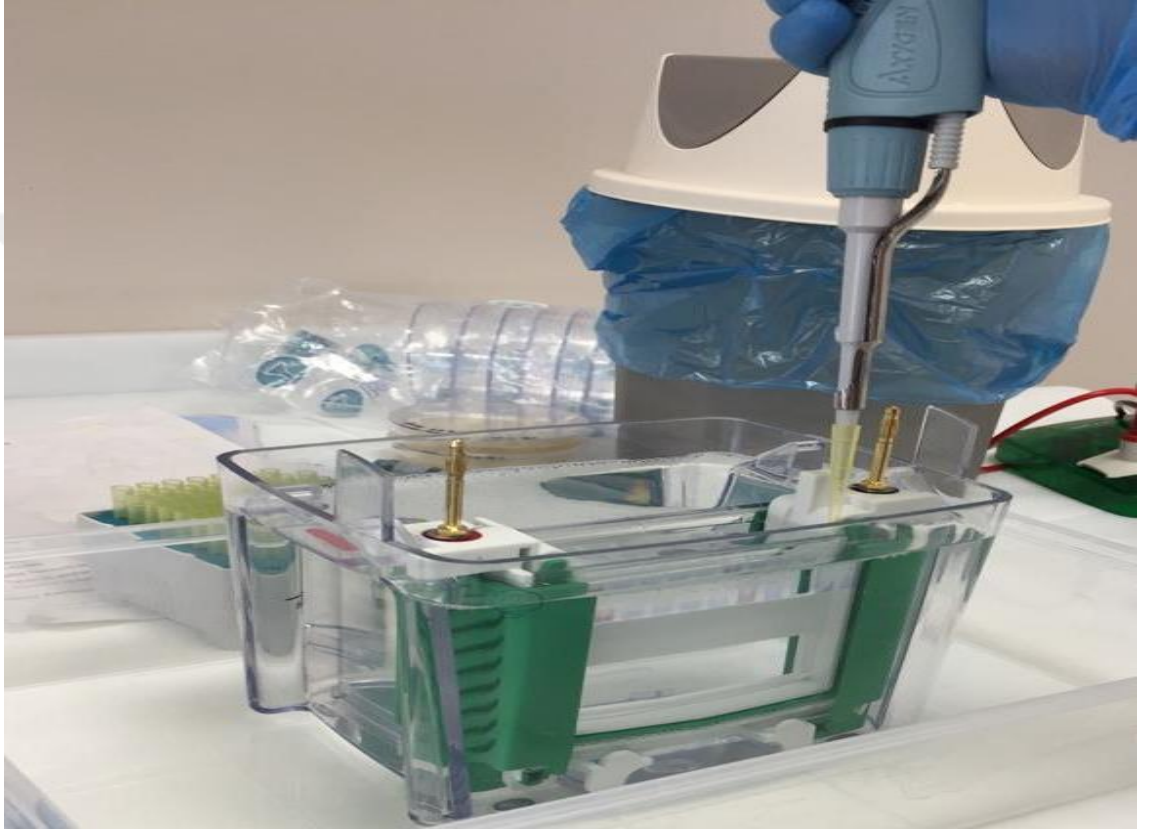
Malzemenin Adı	Miktarı
Akrilamid- Biakrilamid	795 µl
Tris HCL	750 µl
SDS	30 µl
TEMED	15 µl
APS	60 µl
dH ₂ O	4,35 µl

%4'lük stacking jel hazırlanırken, H₂O, akrilamid ve SDS Çizelge 3.9'da belirtilen hacimlerde 15ml'lik falkon tüpüne konulmuştur. APS ve TEMED aynı anda jel karışımına eklenerek stacking jel elde edilmiştir.

3.20.3. Western Blot yönteminin yapılışı

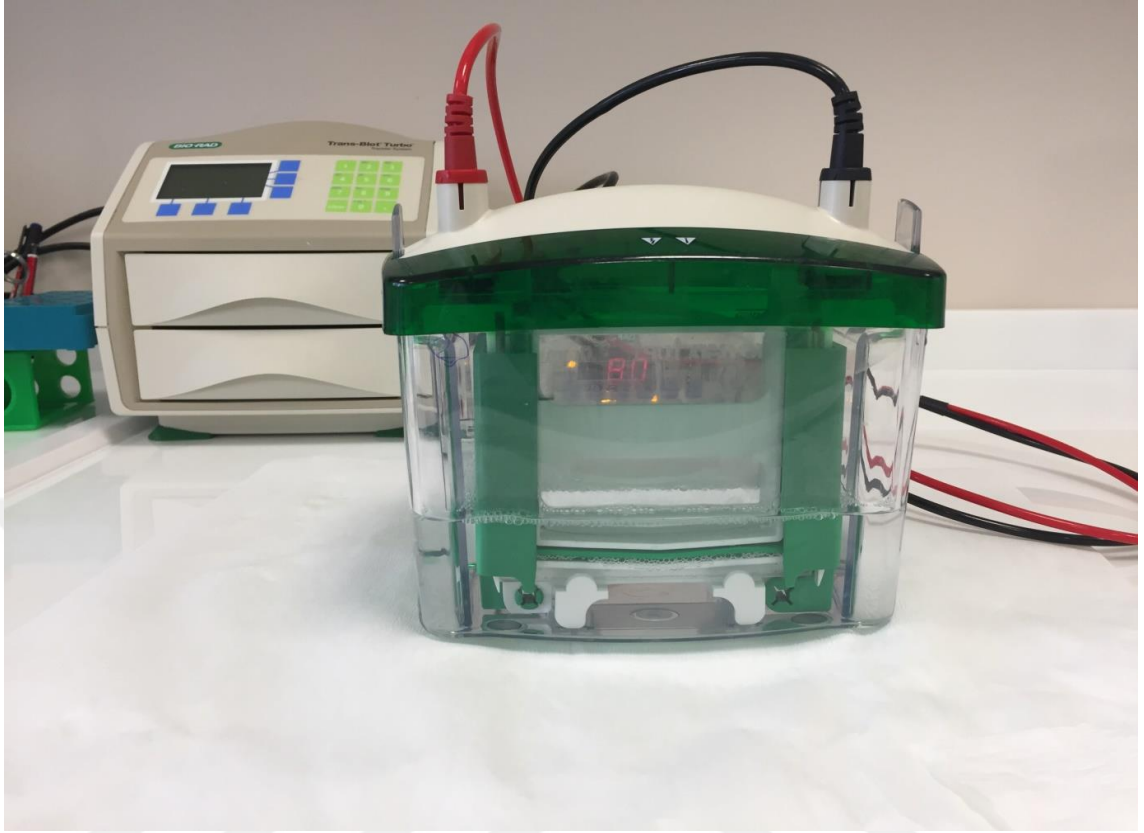
Jel hazırlama camları, saf suyla yıkanarak kurutulmuştur. Kurutulan camlar jel kasetine yerleştirilerek, jel dökme tabakasına takılmıştır. Cam plakalar arasında hava kabarcığı oluşmadığına ve sızdırmanın olmadığına emin olmak için ilk deneme su ile yapılmıştır. Daha sonra hazırlamış olduğumuz Resolving jel, seri bir şekilde dökülmüştür. Dökülen jelin düz bir görünüme sahip olması için 2-propanol eklenerek jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra kurutma kağıdı ile propanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra Stacking jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel, Resolving jelinin üzerine cam plakaların üstüne gelecek şekilde eklenerek, cam plakaların arasına tarak

yerleştirilmiştir. Tarak 30 dk bekletildikten sonra, jel kaseti tanka yerleştirilmiştir. Running buffer hazırlanarak tarağın üstüne gelecek şekilde tanka dökülmüştür. Tankta Running buffer biraz bekledikten sonra dikkatli bir şekilde tarak çıkartılmıştır. Daha sonra Laemmli yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler yüklenmiştir.



Şekil 3.1. Western blot yönteminde yükleme aşaması

Elektroforez tankının kapağı anot ve katot bağlantıları kontrol edilerek kapatılmıştır. Elektroforez güç kaynağına bağlandıktan sonra jel markerlar ayrılana kadar 80 volt'ta daha sonra da 120 volt'ta 90 dk boyunca yürütülmüştür.



Şekil 3.2. Elektroforezde yürütme işlemi

Yürütme işlemi bittikten sonra, altta PVDF membran kalacak şekilde, jeller dikkatlice çıkartılmıştır. 7 dk boyunca yarı kuru emdirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra membranlar boş kutulara alınarak üzerine Ponceu S konulmuştur. Ponceu S ile muamele edilen membranların üzerine PBST eklenerek 48'den kesilmiştir. Kesilen membranlar 1 saat boyunca Blocking reagent ile bloklama işlemine maruz bırakılmıştır. Bu işlemden sonra 5 dk süre ile üç kez PBST ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kutu içerisine hazırladığımız primer antibodyler konularak kapakları kapatılmıştır. Yatay çalkalayıcıda +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Çalkalama işlemi bittiğinde 5 dk süre ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi tamamlandığında, hazırlamış olduğumuz sekonder antibodyler membrana verilerek, 1 saat bekletilmiştir. Bu işlem sonunda tekrar 5 dk süre ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra membran görüntüleme cihazına yerleştirilerek görüntü alınmıştır.

3.21. İstatistiksel Analizler

Çalışmalardan elde edilen bulguların istatistiksel yönden analizi SPSS® 20.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler varyans analizi kullanılarak yapılmıştır. Varyans analizi için tek yönlü varyans (ANOVA) testlerinden Duncan testi kullanılmıştır. Elde edilen veriler $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır.

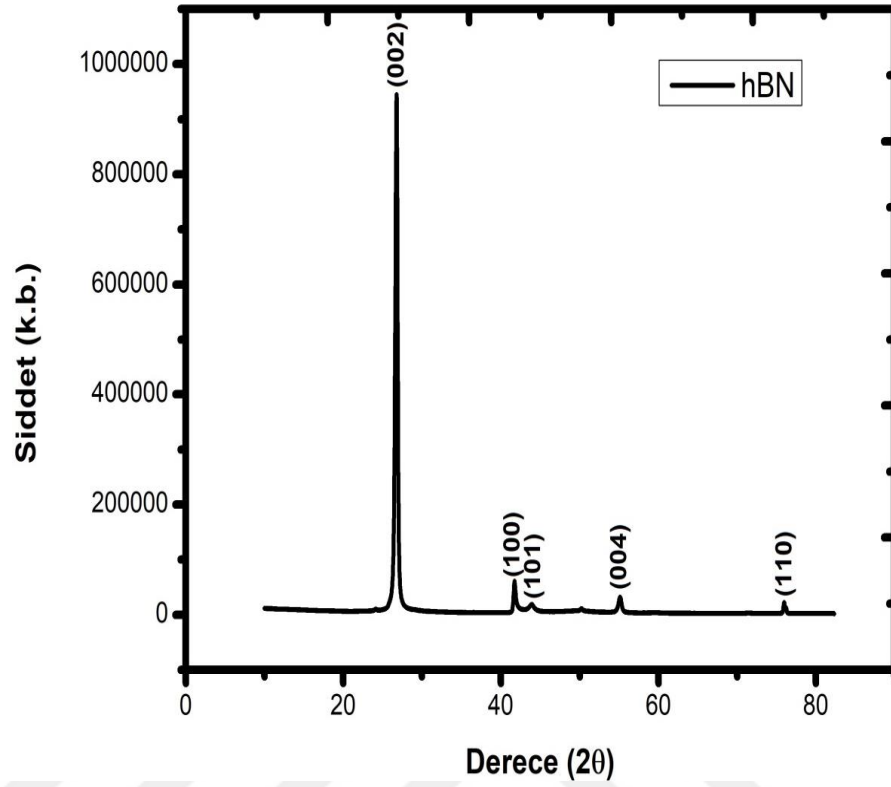


4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. hBN Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.1.1. X Işını Kırınım Deseni (XRD)

Sentezlenmiş hBN nanopartiküllerinin kristal yapısı XRD ölçümleriyle karakterize edilmiştir. hBN nanopartiküllerinin XRD sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. hBN nanopartiküllerinin XRD grafiğinde beş tane baskın pik gözlenmiştir. hBN nanopartiküllerinin XRD analiziyle elde edilen ana pik Bragg açısında $2\theta=26,76^\circ$ ’ye denk gelirken, diğer pikler $2\theta=41,70^\circ$, $43,91^\circ$, $55,12^\circ$, $75,97^\circ$ ’lere denk gelmiştir. Bu piklerin Müller indisindeki düzlemsel değerleri, 002, 100, 101, 004 ve 110 karşılık geldiği görülmüştür. Yarı yükseklik ortalama değerlerinin değişmesi, elde edilen hBN’nin altıgen yapı içinde küçük kristal boyutuyla kristalleştiğini ve yapı düzeninde dikkate değer bir düşüş sergilediğini göstermiştir. XRD grafiğinde gözlenen keskin ve iyi tanımlanmış piklerin tamamı, hBN’ye (JCPDS dosyası 89-7102) karşılık gelerek BN altıgen yapısını kanıtlamıştır. Elde edilen hBN nanopartiküllerinin boyutu Debye-Scherrer formülüyle (Patterson 1939) hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda en baskın 002 düzlemi için partikül boyutu ortalama 220 nm olarak bulunmuştur.

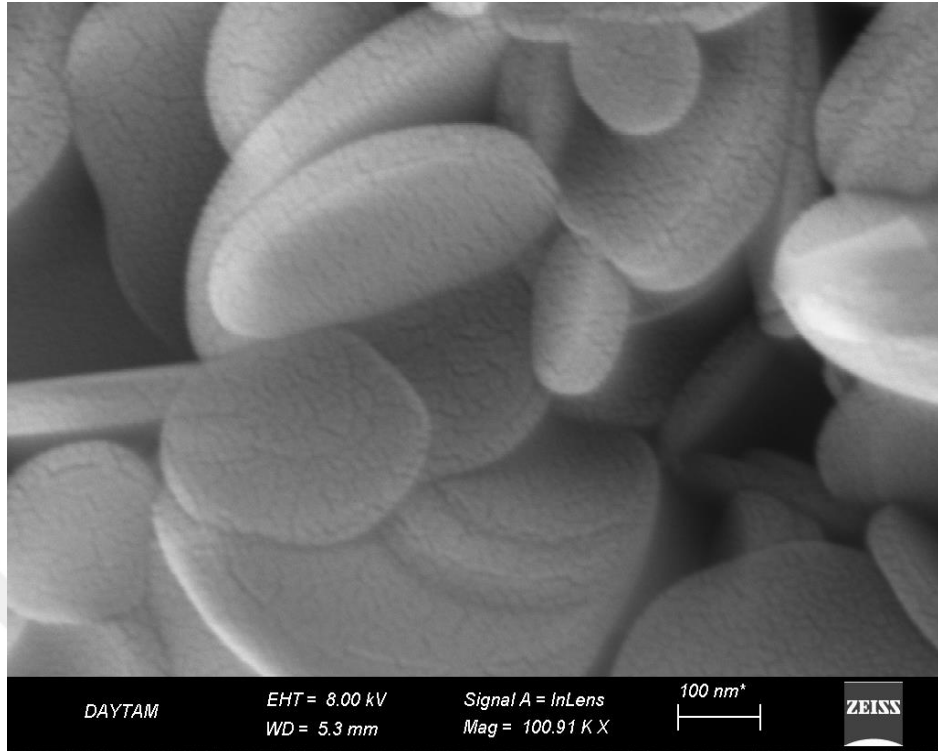


Şekil 4.1. hBN nanopartiküllerinin XRD deseni

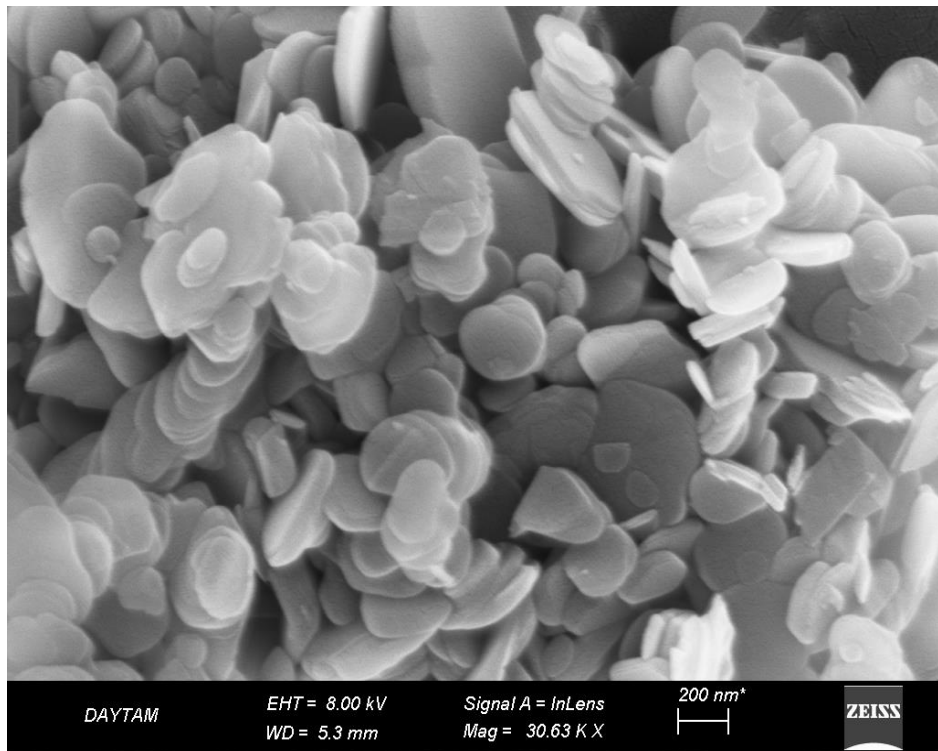
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Sentezlenmiş hBN nanopartikülünün partikül şekli, boyut dağılımı ve elementel kompozisyonu, görüntüleme teknikleri olan SEM ve TEM mikroskopları kullanılarak değerlendirilmiştir.

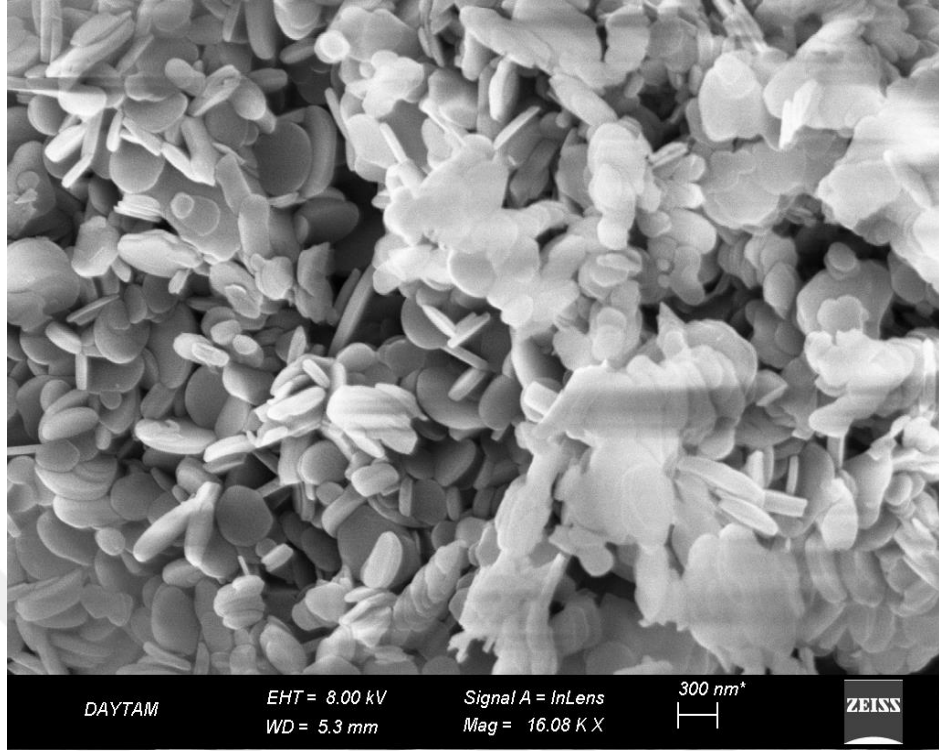
hBN nanopartikülleri SEM mikroskobu kullanılarak farklı ölçeklerde görüntülenmiştir. Görüntülenen hBN nanopartiküller için SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.2. hBN nanopartiküllerinin 100 nm ölçekteki SEM görüntüleri



Şekil 4.3. hBN nanopartiküllerinin 200 nm ölçekteki SEM görüntüleri

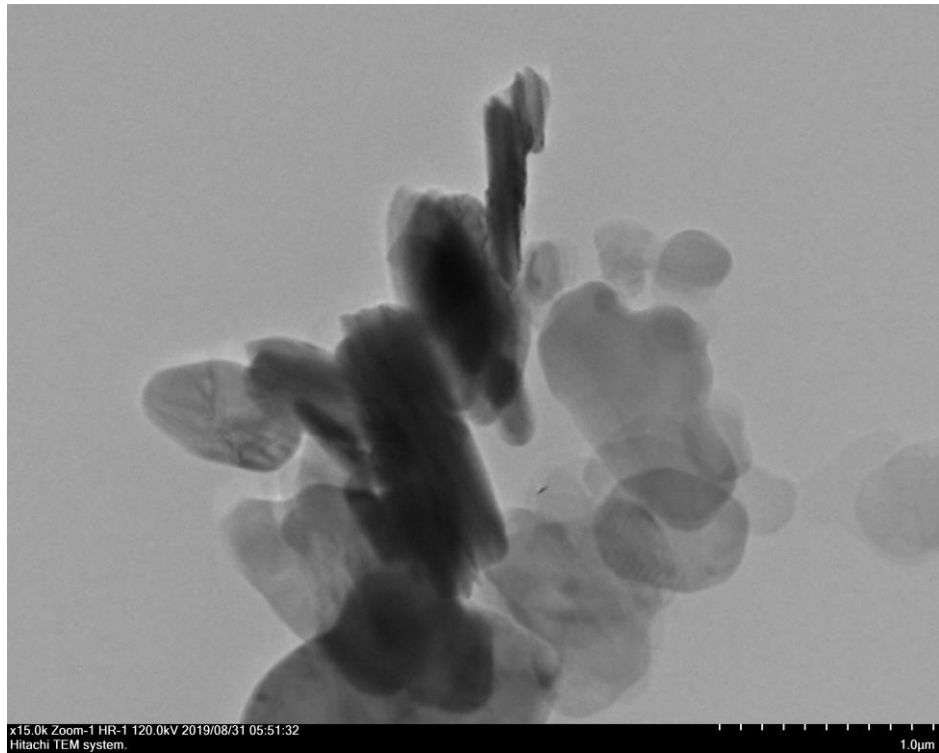


Şekil 4.4. hBN nanopartiküllerinin 300 nm ölçekteki SEM görüntüleri

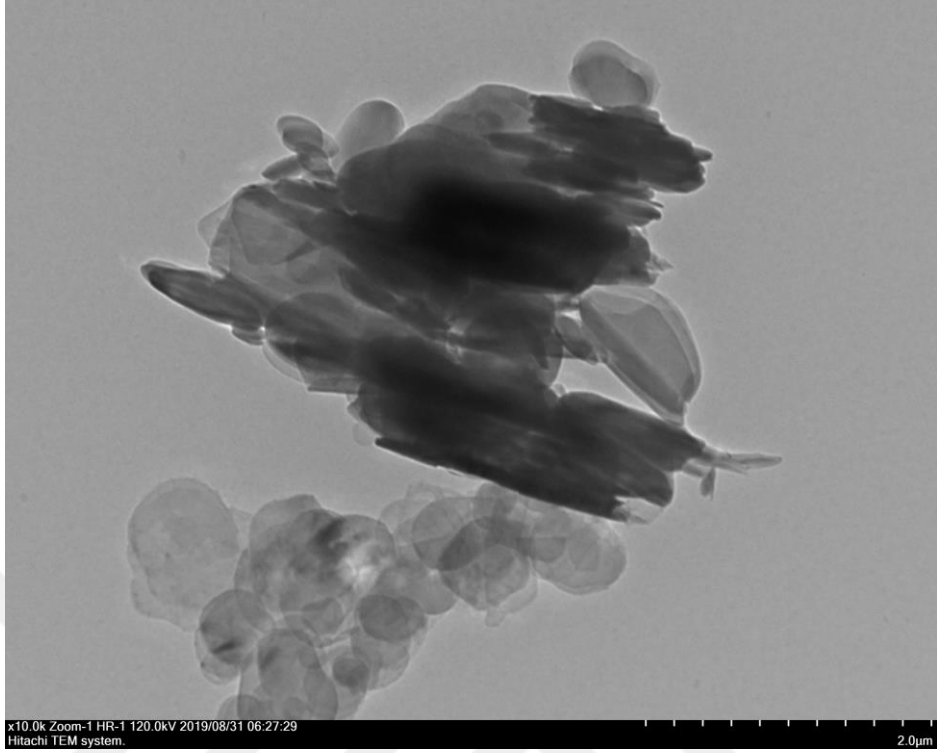
hBN nanopartikülleri TEM mikroskobu kullanılarak farklı ölçeklerde görüntülenmiştir. Görüntülenen hBN nanopartiküller için TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.5. hBN nanopartiküllerinin 200 nm ölçekteki TEM görüntüleri



Şekil 4.6. hBN nanopartiküllerinin 1.0 µm ölçekteki TEM görüntüleri



Şekil 4.7. hBN nanopartiküllerinin 2.0 µm ölçekteki TEM görüntüleri

SEM ve TEM görüntü analizleriyle hBN nanopartiküllerinin morfolojisine bakıldığında, nanopartiküllerin trombosit benzeri yarı küresel veya uzun bir şekle sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca hBN nanopartikül yüzeylerinin homojen özellik gösterdiği gözlenmiştir. Sentezlenen hBN nanopartiküllerinin 100 ile 300 nm arasında değişen boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir.

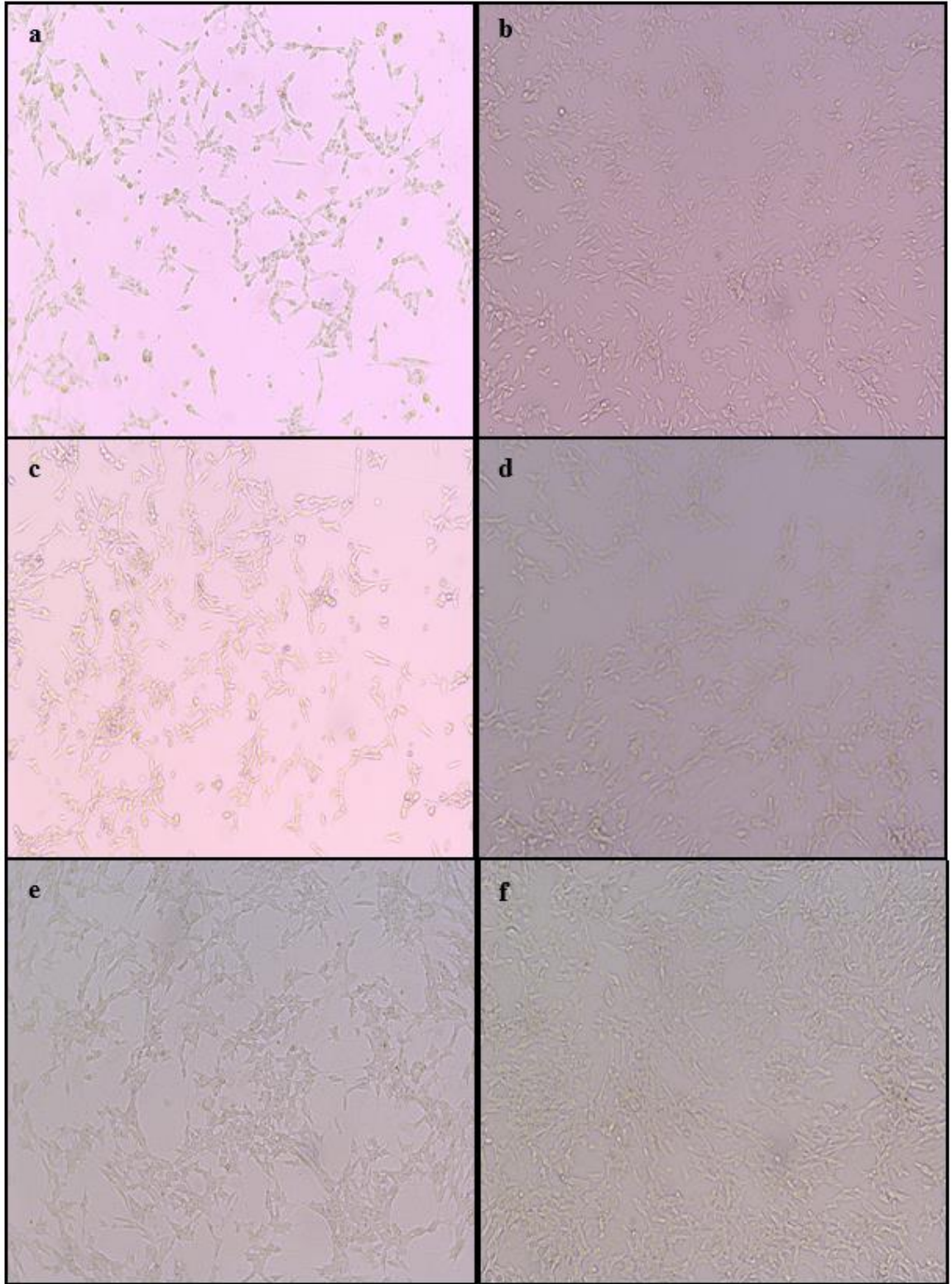
4.2. Retinoik Asit Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

İnsan nöroblastom SH-SY5Y, nörotoksisite ve nörotoksin deneyleri için *in vitro* model olarak kullanılan olgun nöronlardan farklı özellikler gösteren bir nöronal hücre hattıdır. (Guarneri *et al.* 2000; Hashemiet *et al.* 2003). Nöroblastomdan türetilmiş olan SH-SY5Y hücreleri, nöron benzeri özellikler elde etmek amacıyla, retinoik asit (RA) tarafından farklılaşmaya teşvik edilmektedir. RA'nın nöronların tepkilerini taklit etmede, farklı hücre tiplerinde hayatta kalma sinyalini aktive etmede (Paillaud *et al.* 2002; Lee *et al.* 2006), hücrenin nörotoksinlere duyarlılığını azaltmada, hücre

siklusunun durmasında ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Cavanaugh *et al.* 2006; Fernandez-Gomez *et al.* 2006). Bu nedenlerden dolayı, RA aracılı farklılaşmanın nörotoksisite çalışmasına karşı hücre duyarlılığını etkilediği bilinmektedir (Cheung *et al.* 2009).

Bu araştırmada, hBN nanopartiküllerinin nöron koruyucu etkisi, farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında araştırılarak değerlendirilmiştir. İlk olarak T25 flaska ekilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri konfluense ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yapılan ön çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri doğrultusunda, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerine uygulanacak RA miktarı belirlenerek, nöron benzeri hücre farklılaşmasını gerçekleştirmek için gün aşırı toplamda 15 gün olacak şekilde RA verilmiştir (Andrews *et al.* 1984). Bu süre içerisinde hücreler mikroskopla incelenerek, hücrelerdeki morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. 15 gün sonunda hücreler mikroskopla incelendiğinde, hücrelerin düzleştiği, dendrit ve aksonların uzadığı, bunun sonucunda da hücreler arasında iletişimin arttığı belirlenmiştir. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik yapıları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığına karşı oluşturulan potansiyel uygulamalar için en ideal A β konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla, farklı dozlardaki A β , 48 saat boyunca farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır. Hücrelerin % canlılık oranları MTT testi ile belirlenmiştir. MTT test sonuçları, 48 saat boyunca konsantrasyona bağlı A β toksisitesini göstermiştir. Bu sonuçlara göre, 50 μ M A β uygulamasının, toplam hücre canlılığının %50,5’ini öldürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.8. (a) Farklılaşmamış SH-SY5Y Hücreleri, RA Kullanılarak Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri (b) 3.gün, (c) 6.gün, (d) 9.gün, (e) 12.gün ve (f) 15.gün

Elde edilen sonuçlar, A β 'nin kontrol grubuna kıyasla, hücre canlılık oranlarında önemli ölçüde azalmalara neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuca paralel olarak, Xu *et al.* (2009) 24 saat boyunca 10 μ M A β 'ye maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinin canlılık oranını %57'ye düşürdüğünü, 20 μ M A β 'ye maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinin canlılık oranını ise %44'e düşürdüğünü göstermiştir. Başka bir çalışma, 72 saat boyunca 20 μ M A β (25-35)'ye maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinin canlılığının %84 oranında azaldığını bulmuştur (Adewusi *et al.* 2013). Ayrıca Andrea *et al.* 2008'de SH-SY5Y hücreleriyle yapmış oldukları çalışmalarında, Siyanidin 3-O-glikopiranosid metabolitiyle geliştirdikleri tedavinin, A β (1-42)'nin neden olduğu önemli ölçüdeki hücre ölümü üzerine pozitif etkilerinin olduğunu göstermiştir (Xu *et al.* 2009). Yüksek seviyede salınarak biriken A β tarafından meydana gelen nörotoksisitenin oluşmasında rol oynayan mekanizmalar arasında DNA ve RNA oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, oksidatif protein modifikasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, GSH, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerinin seviyelerinin düşerek etkilerinin azalması yer almaktadır (Varadarajan *et al.* 2000; Lauderback *et al.* 2001; Boyd-Kimball *et al.* 2005; Butterfield *et al.* 2007; Shi *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2012).

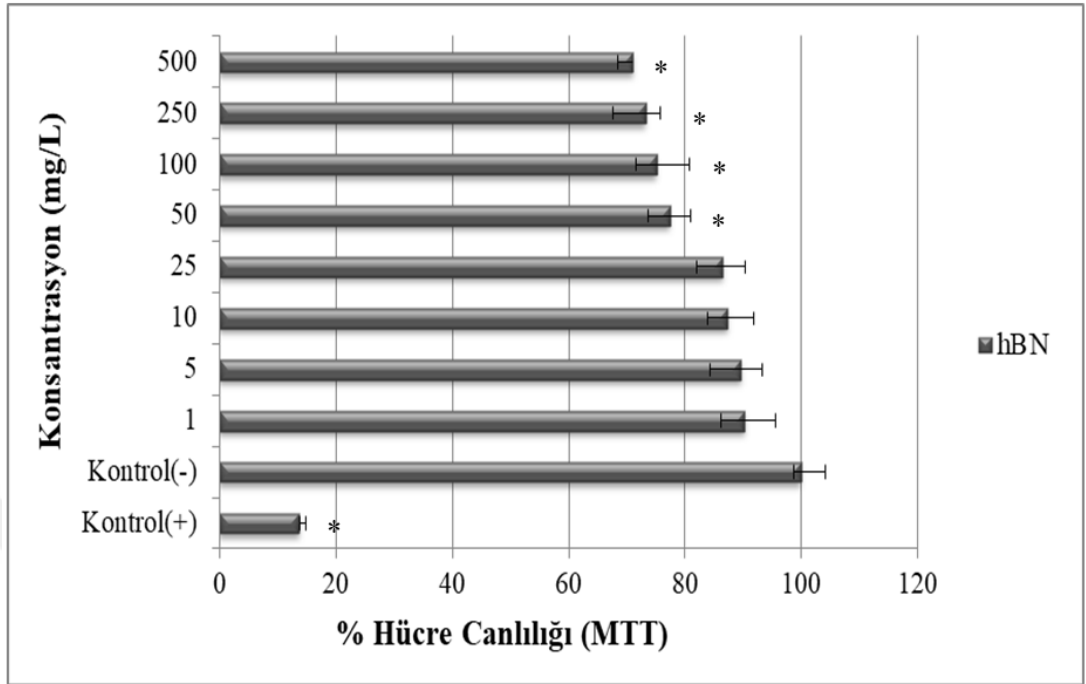
4.3. *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinin A β İle İndüklenen Sitotoksisitesinde hBN Nanopartiküllerinin Nöroprotektif Etkileri

Nanomalzemeleri insan vücudu gibi canlı organizmalarda güvenle kullanmak için malzemelerin toksisitesi/biyouyumluluğunun uygun şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Genellikle hücresel alım sonrası nanomateriyal davranışın değerlendirilmesi, hücre kültür çalışmalarını içermektedir. Hücre kültür çalışmaları hayvan çalışmasına kıyasla kontrol edilebilme, daha az belirsizlik gösterebilme ve tekrarlanabilme gibi nitelikler taşımaktadır. Hücre kültür analizlerinin biyokimyasal ortama son derece duyarlı olduğu görülmektedir. Kuluçka sıcaklığı, kültür ortamının pH seviyesi, orta içerik ve atık konsantrasyonu, hücresel davranışı büyük ölçüde etkileyen etmenler olarak bilinmektedir. Bu nedenle, doğru test sonuçlarına ulaşmak için, kontrollü deney koşulları çok iyi oluşturulmalıdır (Sabbioni 2005). Nanomalzemelerin

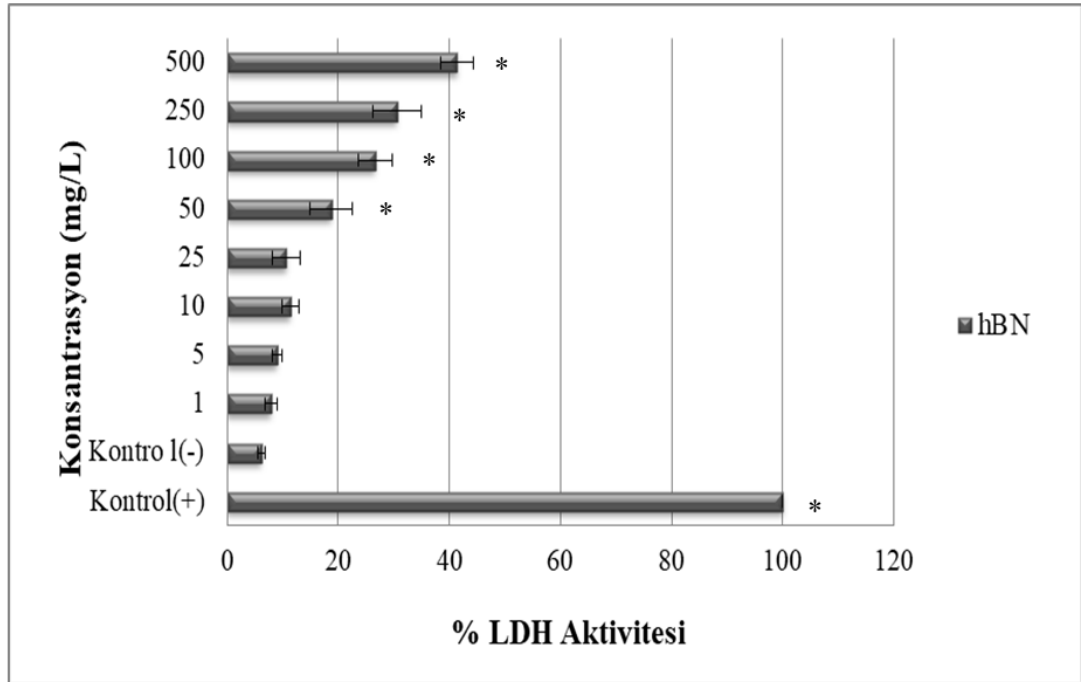
hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek için MTT tahlili, hücre zarına verdiği hasarı incelemek için LDH tahlili etkili bir araçtır ve her iki yöntem de farklı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sayes *et al.* 2004; Uo *et al.* 2005).

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine, 10 μ M konsantrasyonunda A β uygulanarak meydana getirilen *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde, farklı konsantrasyonlarda hBN nanopartiküllerinin nöroprotektif etkileri, MTT ve LDH metodları ile kolorimetrik olarak belirlenmiştir. MTT tetrazolyum ve LDH salınım test teknolojilerinin, mitokondriyal aktivitenin, membran hasarının tespitinde yaygın olarak kabul edildiği ve binlerce yayınlanmış makalenin gösterdiği gibi akademik laboratuvarlarda popüler olmaya devam ettiği görülmüştür (Fotakis and Timbrell 2006; Li *et al.* 2015).

In vitro koşullarda MTT ve LDH analiz değeri için farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde, A β ve hBN nanopartiküllerinin bulunmadığı hücreler negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak ise kültür ortamına Triton-X eklenmiştir. Farklı hBN nanopartikül konsantrasyonları (1-500 mg/L), tek başına farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerine uygulanarak, kontrol gruba göre hücre canlılığı oranları ve LDH salınım düzeyleri değerlendirilmiştir. Farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde, 1, 5, 10 ve 25 mg/L konsantrasyonlarındaki hBN nanopartikülünün hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarındaki hBN nanopartikülünün, hücre canlılık oranını kontrole göre önemli düzeyde azalttığı gözlenmiştir. 1, 5, 10 ve 25 mg/L konsantrasyonlarındaki hBN nanopartiküllerinin farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde LDH salınım düzeyini değiştirmediği, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında ise LDH salınım düzeyini, kontrole oranla önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. LDH salınım testi ile elde edilen sonuçların MTT testini destekleyici yönde olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, belirli dozlardaki hBN nanopartiküllerinin farklılaşmış hücreler üzerinde toksik etki göstermedikleri belirlenmiştir. hBN nanopartikülünün farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan MTT ve LDH salınım analiz değerleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

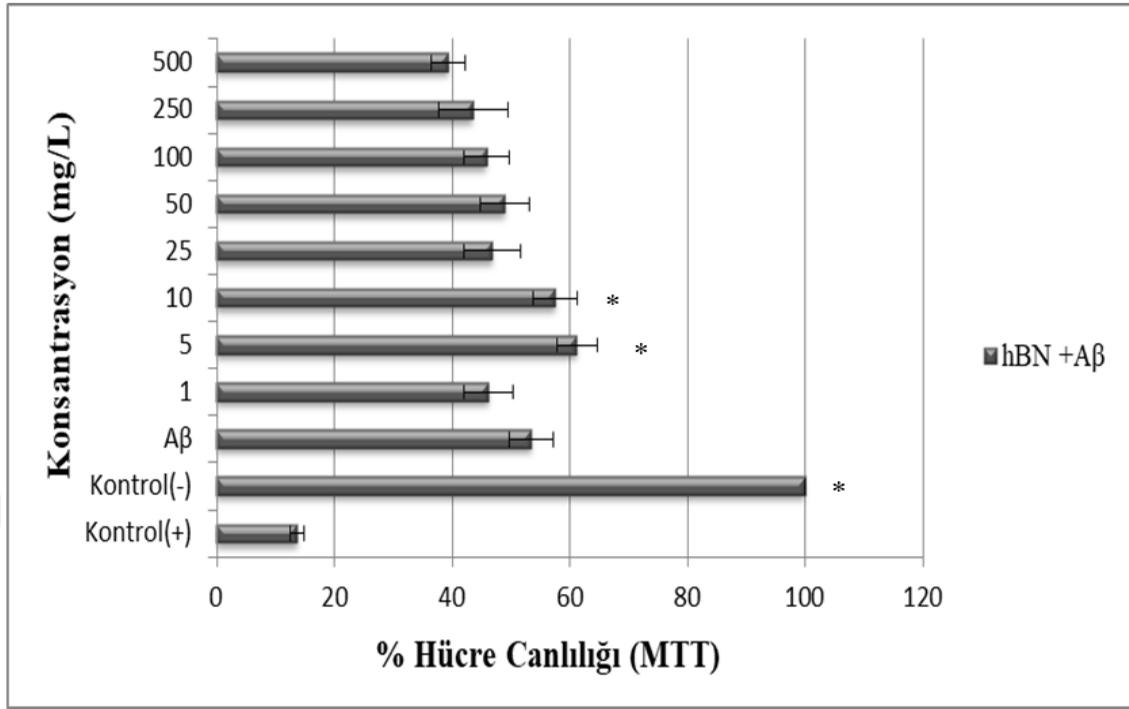


Şekil 4.9. hBN nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri (*) sembolü negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$, dunnett's comparison testi).



Şekil 4.10. hBN nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen LDH aktivitesi (*) sembolü negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$, dunnett's comparison testi).

hBN nanopartiküllerinin nöroprotektif etkilerinin belirlenmesi amacıyla A β ile birlikte verilerek canlılık değerlendirmesi yapılmıştır. MTT testi, yaşayan hücreleri ölçmek amacıyla ayrıntılı hücre sayımının gerçekleştirildiği deneysel bir yöntemdir. MTT testi temel olarak, canlı hücrelerin sayısındaki değişim sonucu, mitokondriyal aktivite kapasitesindeki değişiklikleri ele almaktadır (Lewinski *et al.* 2008; Li *et al.* 2015). SH-SY5Y hücreleri 48 saat boyunca 10 μ M konsantrasyonunda A β ile inkübe edilerek, hücrelerin nörotoksosite potansiyeli MTT testi ile değerlendirilmiştir. A β muamelesi kontrole göre hücre canlılığında önemli oranda azalmaya neden olmuştur. 48 saat boyunca 10 μ M A β ile beraber 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hBN nanopartikülleriyle muamele edilen farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarda A β 'nin neden olduğu sitotoksositeye karşı koruyucu etki gösterdiği, çeşitli seviyelerde koruma sağladığı tespit edilmiştir. 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarda A β maruziyeti sonucu oluşan hücre ölümünü baskılayarak hücre canlılığında önemli artışa neden olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hücre canlılık oranının A β 'ye göre önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir. hBN nanopartikülleri ve A β muamelesinin farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan *in vitro* nörotoksosite değerleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

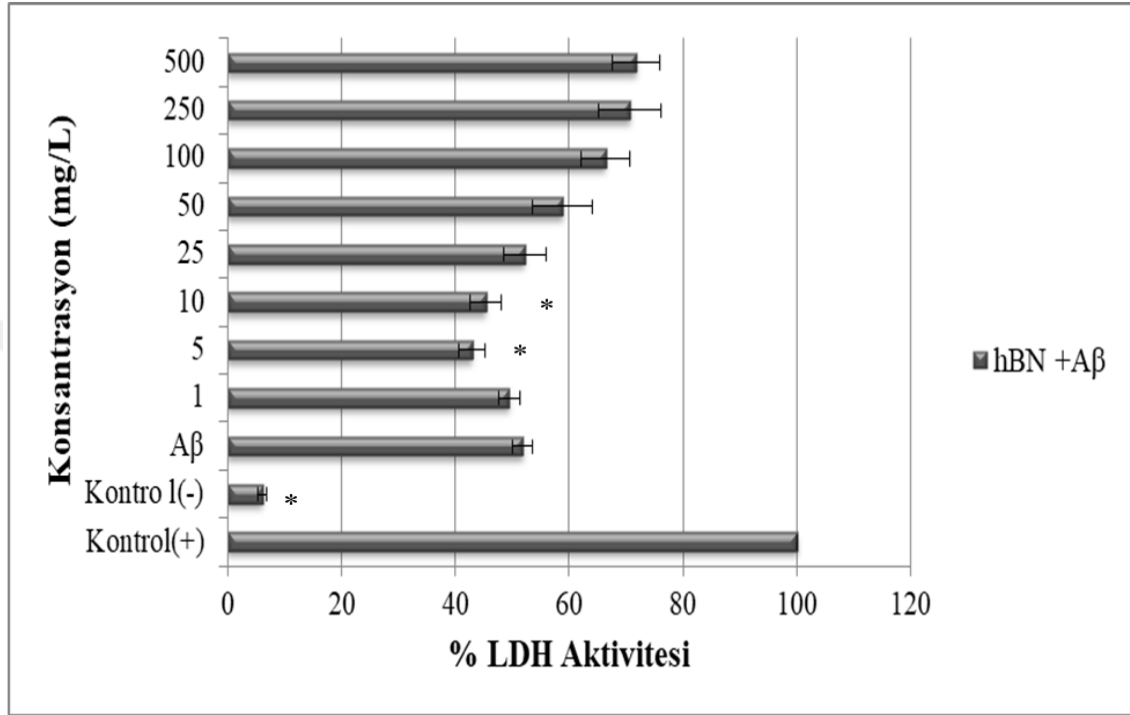


Şekil 4.11. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde A β toksisitesine karşı hBN nanopartiküllerinin etkisi

(*) sembolü A β 'ye karşı karşılaştırma sonucu hücre canlılığındaki önemli düzeydeki artışı ifade etmektedir ($p < 0.05$, dunnett's comparison test).

LDH testi, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzim olan LDH'nin miktarının ölçülmesi sonucu membrandaki hasarları değerlendirmemize olanak sağlamaktadır (Chan *et al.* 2013). A β kaynaklı membran bütünlüğündeki hasar LDH testi ile değerlendirilmiştir. 48 saat boyunca 10 μ M A β ile beraber 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hBN nanopartikülleriyle muamele edilen farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında doza bağlı olarak LDH salınım düzeyinin A β 'ye oranla önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, A β ile beraber çeşitli konsantrasyonlarda hBN nanopartikülleriyle muamele edilen farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında 5 ve 10 mg/L konsantrasyonların koruyucu etkiye sahip olduğu ve A β maruziyeti sonucu oluşan hücre ölümünü baskılayarak, hücre canlılığında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hBN nanopartiküllerinin muamelesinin SH-SY5Y hücre membranı A β 'nin neden olduğu nörotoksositeye karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir. hBN nanopartikülleri ve A β muamelesinin farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde

konsantrasyonlara bağılı olarak oluşan *in vitro* nörotoksisite değerleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde Aβ toksisitesine karşı hBN nanopartiküllerinin LDH aktivitesi üzerine etkisi

(*) sembolü Aβ’ye karşı karşılaştırma sonucu hücre ölümündeki önemli düzeydeki azalışı ifade etmektedir ($p < 0.05$, dunnett's comparison test).

Nanometre boyutlarda yapılar inşa etmek için kullanılan atomların ve moleküllerin manipülasyonu olarak tanımlanan nanoteknoloji (Moghimi *et al.* 2005; Albanes *et al.* 2012) baş döndürücü bir hızla ilerlemekte ve özellikle tıp alanında büyük umutlar vaat etmektedir. Nanoteknolojinin, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, tanısında, izlenmesinde ve kontrolünde devrim yapma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda eşsiz fiziksel, kimyasal, elektronik, optik, manyetik ve mekanik özellikler gösteren nanopartiküller yaygın olarak kullanılmaktadır (Khawaja 2011).

Üstün özelliklerinden dolayı ilgi odağı olan ve geniş potansiyel dizisine sahip bor ve türevi nanomalzemelerin, toksik etkilerini araştıran az sayıda çalışma olduğu

görülmüştür (Ferreira *et al.* 2011; Thareja *et al.* 2017). Ciofani *et al.* BN nanotüplerinin toksisitesini araştırmış ve ileri biyomedikal kullanımlar için potansiyel bir biyomateryal olduğunu bulmuştur. Ayrıca başka çalışmalarında da, BN nanotüplerinin diğer geleneksel nanomalzemelere (karbon nanotüpler, altın nanoparçacıklar vs.) kıyasla, sito-uyumlu ve çok daha güvenli olduğu belirtilmiştir (Ciofani *et al.* 2008; Ciofani *et al.* 2010). Chen *et al.* 2009 BN nanotüplerin, insan embriyonik böbrek hücrelerine (HEK-293) karşı sitotoksik olmadığını göstermiştir ve BN nanotüplerin 4 gün sonra bile hücre proliferasyonunu inhibe etmediğini bildirmiştir.

Nanopartiküllerin büyüklüğü, şekli ve yüzey yükünün, beyinde A β toplanmasını ve fibrilleşmesini nasıl etkilediği, nanopartikül-A β agregalarının, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksitesi üzerine yapılan çalışmada, sıvı zar platformundaki nanopartiküllerin, A β toksisitesini önemli düzeyde azalttığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmayla, Alzheimer hastalığının teşhis ve tedavisi için gerekli olan araçların geliştirilmesinde nanoyapıların kullanılmasının kolaylık sağlayacağı kararına varılmıştır (Kim *et al.* 2016). hBN nanoplakaların, HEK-293T ve CHO hücre kültürleri üzerindeki 48 saatlik sitotoksite sonuçlarına göre, hBN konsantrasyonlarının tümünde hücre canlılığında anlamlı artış veya azalış olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar apoptoz çalışmalarla desteklenerek, hBN nanoplakaların, canlı sistemlere daha fazla uygulanmalarını teşvik eden uygun konsantrasyonlarda biyo uyumlu olduğunu gösteren karara varılmıştır (Lu *et al.* 2016). BN nanopartiküllerinin toksisitesini incelemek için, osteoblast hücreleri üzerinde MTT tahlili yapılmıştır. BN nanopartiküllerinin, hücreleri, zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde etkilediği gözlenmiştir. Yüksek BN nanopartikül konsantrasyonları (50, 200 μ g/ml) hariç, farklı inkübasyon sürelerinde, BN nanopartikülleri olan hücreler arasında, istatistiksel olarak önemsiz farklılıklar görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda, hücrelerin normal çalıştığı gözlemlenmiştir. ROT tahlili sonucuna göre, ROT üretiminde nanomalzeme konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hiçbir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Rasel 2017).

Bir çalışmada, bor içeren bazı bileşiklerin yaşlanma ve AH'de bilişsel gelişmeyi etkilediği bilinen inflamasyonla ilişkili sitokin salınımına karşı inhibe edici aktivite

gösterdiği bulunmuştur (Heckman *et al.* 2015). Başka bir çalışmada, bor içerikli bileşiklerin kendi kendine indüklenmiş A β birikimine sebep olduğu ve iyi antioksidan aktiviteye doğru, en yüksek inhibe edici güç oluşturduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar, bor içeren bileşiklerin, AH tedavisi için yeni yapısal etmenler olabileceğini göstermiştir (Lub *et al.* 2018). İnsan epitel hücre hattında yara iyileşmesi ve DNA hasarı üzerindeki borik asitlerin koruyucu etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, borik asitin, çeşitli ajanların neden olduğu DNA hasarını azalttığı ve de iyileştirici etki gösterdiği bulunmuştur (Tepedelen *et al.* 2016). hBN'lerin ve borik asitin, nörotoksin olan doksorubisin gibi sağlıklı hücelere veya dokulara zarar verebilecek ilaçların zararlı etkilerini azaltabileceklerini belirlemek için hipokampal hücreler kullanılmış ve inkübasyon süresi arttıkça, hBN'ler ve borik asit konsantrasyonlarının, kontrol grubuna göre hücre canlılığının anlamlı şekilde artmasına neden olduğu görülmüştür. Bu, özellikle kanser önleyici tedavilerden sonra, uzun süreli toksik etkileri olan doksorubisin gibi antikanser ilaçlara maruz kalmadan önce veya sonrasında, maruz kalınacak terapötik materyaller olarak, hBN ve borik asitin kullanılabileceği anlamına gelmektedir. Ayrıca hBN'lerin yavaş yavaş bozulması ve kontrollü salınım gibi özellikleri, onların nörolojik hastalıkların tedavisinde de kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Çulha 2018).

Yapılan bir çalışmada, BN nanotüplerin, potansiyel farmakolojik uygulamalar için yeterli konsantrasyonlarda, iyi bir biyouyumluluk sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, bu nanomalzemenin, biyolojik uygulamalar, hücre tedavisi, ilaç verme sistemi için nanovektörler olarak ve radyoizotoplar vasıtasıyla kanser tedavisine yardımcı olmak için kullanılabileceğini göstermiştir (Ferreira *et al.* 2011). BN nanoyapılarla yapılan başka bir çalışmada, düşük dozlarda, hücresel morfolojide kayda değer bir değişiklik olmadığı, ancak artan dozla birlikte, hücrenin strese maruz kaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, düşük dozda BN nanoyapılarının, biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir (Singh *et al.* 2016). Jimenez ve meslektaşlarının yaptığı çalışmada, boranik asit ve boronat bileşiklerinin, nörolojik bozukluklarda sinir hücresi işlev bozukluğundan sorumlu olan malondialdehit (MDA) ve kaspaz 3 seviyelerini düşürdüğüne, ROT nöroproteksiyonda önemli bir rol oynayan GSH

seviyesini arttırdığına dair kanıtlar bulmuşlardır. Bu bileşiklerin ROT oluşumuna karşı güçlü aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre AH'nin tedavisinde, bor bazlı bileşiklerin uygulanmasının önemli gelişmelere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Jimenez *et al.* 2013).

4.4. *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinin A β İle İndüklenen Sitotoksitesinde hBN Nanopartiküllerinin TAK ve TOD Değerleri

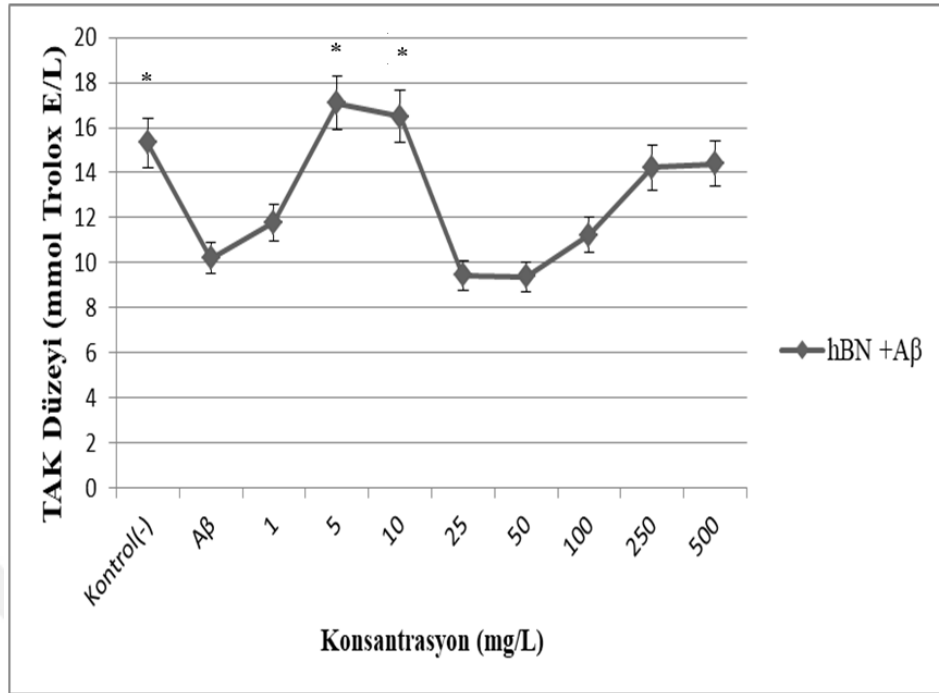
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine, 10 μ M konsantrasyonunda A β uygulanarak meydana getirilen *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde, farklı konsantrasyonlarda hBN nanopartiküllerinin biyokimyasal etkileri, TAK ve TOD metodları ile belirlenmiştir. Sonuçlar, 48 saat boyunca 10 μ M A β ile beraber 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hBN nanopartikülleriyle muamele edilen farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında, A β 'nin neden olduğu toksisite üzerine hBN nanopartiküllerinin 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarda TAK düzeyinde A β 'ye göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu, TOD düzeyinde ise önemli oranda azalma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, hBN nanopartiküllerinin 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında TAK düzeyinde A β 'ye göre istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu, TOD düzeyinde ise önemli oranda artış olduğu gözlenmiştir. A β toksisitesiyle, hBN nanopartikülünün farklı konsantrasyonları için gözlenen TAK ve TOD düzeyleri şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir.

Oksidatif stres, hücre ve dokulardaki bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan serbest radikallerin üretimi ve birikmesi ile biyolojik sistemlerin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme kabiliyetleri arasındaki dengesizliğinden kaynaklanan bir olgu olarak tanımlanmıştır. Serbest radikaller, ROT ve reaktif azot türlerini (RAT) içermektedir (Sies 1997). Serbest radikal türevli ROT, canlı dokuların çoğunda sürekli olarak üretilir ve DNA, protein ve lipidlere zarar vermektedir (Dröge 2003). ROT/RAT fizyolojik seviyelerinin, hücre farklılaşması, hücre büyümesi, hücre apoptozu ve zararlı mikroorganizmalara karşı bağışıklıkta önemli rol oynadığı bilinmektedir (Heyland *et al.* 2005; Barrera *et al.* 2008). Oksidatif stresin, iskemi, kanser, diyabet, kafa travması,

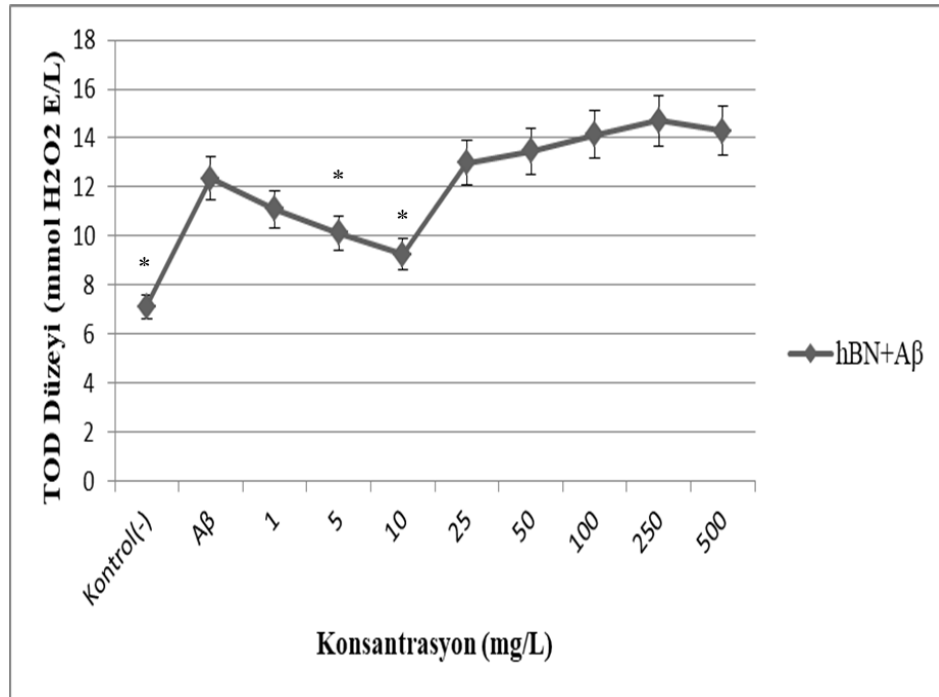
Parkinson hastalığı, amiotrofik lateral skleroz, sıtma, Down sendromu, Huntington hastalığı ve AH gibi bir takım hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Varadarajan *et al.* 2000; Butterfield *et al.* 2007).

Tüm vücut organları arasında, küçük bir organ olan beyin, yüksek ATP talebi, aşırı miktarda oksijen kullanımı, yüksek, çoklu doymamış yağ asit seviyeleri, bol miktarda lipid içeriği, yüksek seviyelerde redoks geçiş metal iyonları, düşük antioksidan seviyeleri gibi özelliklere sahiptir (Varadarajan *et al.* 2000; Butterfield *et al.* 2007). Bu özelliklerden dolayı, beyindeki nöronların diğer organlara kıyasla, önemli ölçüde ROT bulunduğu bir ortama maruz kaldığı ve bunun sonucunda da yaşlanma ve nörolojik hastalıklarda, nöronal hasara katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Markesbery 1997; Butterfield *et al.* 2007). Birçok araştırmacı, oksidatif stresin, Alzheimer hastalığı gibi ileri yaşla ilgili bazı hastalıkların yanı sıra yaşlanma sürecinde de rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca çok sayıda çalışma, yaşlanmayı doğrudan oksidatif strese bağlamıştır (Dasgupta and Klein 2014). Yaşlanma sürecinin ROT üretimindeki bir artışla ve ROT'a karşı savunma kabiliyetindeki eşzamanlı azalmayla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Butterfield *et al.* 2007; Su *et al.* 2008).

Bir dizi çalışma, Alzheimer hastalığına sahip hastaların, serbest radikal oluşumu, protein, DNA ve RNA oksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin çokluğu, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve az miktardaki antioksidan enzimleri ile karakterize, yüksek seviyede oksidatif stres gösterdikleri bulunmuştur (Markesbery 1997; Zhao *et al.* 2012). AH patogeneindeki en erken olaylardan biri olan oksidatif stresin, β -sekretaz aktivasyonu ile A β peptidlerinin aşırı üretilmesine, tau hiperfosforilasyonuna, nöronların dejenerasyonuna ve ölümüne neden olarak, AH'nin ilerlemesinde etkili olduğu, yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Su *et al.* 2008; Jo *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2012).



Şekil 4.13. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde hBN nanopartikül+Aβ muamelesinin TAK düzeyleri üzerine etkileri
(*) sembolü Aβ'ye kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.14. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde hBN nanopartikül+Aβ muamelesinin TOD düzeyleri üzerine etkileri
(*) sembolü Aβ'ye kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir

Elde edilen sonuçlar, hBN nanopartiküllerinin pro-oksidatif değişikliklere neden olmadığı ve farklı düzeylerde antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hBN nanopartikülleri ile yapılan muamelenin, A β ile muamele edilen gruba kıyasla TAK seviyesini arttırdığı, TOD seviyesini azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, hBN nanopartiküllerinin, AH oluşmasında ve ilerlemesinde etkili olan oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir.

4.5. *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturulan Farklılaşmış SH-SY5Y Hücre Hattında Moleküler Genetik Yanıtlar

hBN nanopartiküllerinin *in vitro* olarak A β tarafından indüklenen nörotoksositeye karşı nöroprotektif etki gösterip göstermediğini belirlemek ve eğer nöroprotektif etki varsa, bunun altında yatan etkenleri bulabilmek için seçilen 12 adet genin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu nedenle, farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinden RNA izole edilerek, ters transkripsiyon ile cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri belirlenen genlere özgü primerlerin varlığında kantitatif PZR ile çoğaltılmıştır. Gen ekspresyonu seviyelerindeki farklar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

A β ile oluşturulan farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattında kontrol grup ile kıyaslandığında *APOE*, *BACE 1*, *BDNF*, *MAPT*, *NCTSN* ve *TNF- α* genlerinde ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken; *ADAM 10*, *APH1A*, *PSEN 1* ve *PSENEN* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1. Gruplar arasındaki gen ekspresyon değişiklikleri

Gen	A β	hBN	hBN +A β
<i>ADAM10</i>	-2,56	-1,34	-0,78
<i>APH1A</i>	-2,95	-1,54	1,89
<i>APOE</i>	7,01	0,43	1,34
<i>APP</i>	0,99	1,12	0,95
<i>BACE1</i>	9,89	1,56	5,43
<i>BDNF</i>	1,78	-0,98	1,89
<i>EGFR</i>	0,64	0,67	0,68
<i>MAPT</i>	2,67	1,09	1,78
<i>NCSTN</i>	11,42	1,29	2,09
<i>PSEN1</i>	-1,43	1,23	0,54
<i>PSENEN</i>	-2,13	1,21	-1,67
<i>TNF-α</i>	3,90	1,11	2,45

Amiloid plakların oluşmasında temel etken olan A β , 21. kromozomda klonlanan APP'nin, β - ve γ -sekretazlar tarafından bölünmesiyle oluşmaktadır. Bu aşama, amiloidojenik yol olarak bilinmektedir (Castorina *et al.* 2010). β -sekretaz bölünmesiyle, amiloid prekürsör protein beta (APPs β) ve C terminal fragman beta (b-CTF), γ -sekretazla bölünme sonucu, APP intraselüler domain (AICD) ve A β peptidi oluşmaktadır. γ bölünme, üretilen A β miktarını ve A β 'nin daha toksik 42 amino asit formunun nispi miktarını düzenlerken, β -sekretaz aktivitesinin ise amiloidojenik yolda hız sınırlayıcı adım olduğu ve toplam hücresel APP'nin ~%10'unu işlediği düşünülmektedir. Ayrıca β -sekretaz enzim miktarının, amiloidojenik yolun seçilmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Amiloidojenik olmayan yolda, APP'nin α -sekretazlar ile bölünmesiyle, sAPPa ve C83 oluşmaktadır. Oluşan bu ürünler, A β oluşumunu engellemektedir. Her iki enzim de, A β oluşumu üzerinde farklı etki göstermektedir. Bu enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesi, A β seviyesini etkilemektedir.

ADAM, çeşitli hücre yüzeyi reseptörlerinin ve sinyal moleküllerinin ektodomainlerinin hücre yapışması ve proteolitik işleyişindeki fonksiyonlara sahip 750 aminoasit uzunluğunda salgılanan transmembran protein ailesinin bir üyesidir (Huovila *et al.* 2005). *ADAM10*, birikimesi AH'de nöronal dejenerasyona yol açan, A β peptid oluşumunu inhibe eden, amiloidojenik olmayan yoldaki *APP*'yi parçalayan ana α -sekretazdır. *ADAM10* aktivitesinin artması, beyni AH'de, A β birikiminden koruduğu için, bu stratejinin AH de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Marcello *et al.* 2017; Peron *et al.* 2018).

BACE 1, 501 aminoasit dizisinden oluşan, tip 1 transmembran aspartik asit proteazdır. *BACE1* pepsin ve retroviral aspartik proteaz aileleriyle ilişkili olup, β -sekretazın bütün fonksiyonel özelliklerini göstererek, β -sekretaz olarak çalışmaktadır. Amiloidojenik yolu seçmede önemli rol oynamaktadır (Sathya *et al.* 2012).

Her iki yolda önemli role sahip olan γ -sekretaz; Presenilin (*PSEN1*), presenilin artefaktörü-2 (*PSEN-2*), nicastrin (*NCTSN*) ve anterior farinks defekt-1 (*APH-1*) olmak üzere dört temel alt ünitelerden oluşan, yüksek molekül ağırlıklı hidrofobik protein kompleksidir (Zhang *et al.* 2014). Presenilin, çeşitli tip 1 transmembran proteinlerini parçalayan, intramembranöz bir proteaz olan γ -sekretazın, katalitik alt birimi olarak işlev görmektedir. Presenilin-1'i (PS1) kodlayan 14. Kromozomdaki *PSEN1* genindeki mutasyonlar, ailesel Alzheimer hastalığının en yaygın nedeni olarak bilinmektedir (Kelleher and Shen 2017). *PSEN2*, 448 aminoasit içeren, kararsız bir transmembran holoproteindir. *PSEN 2*, *PSEN 1*'in homoloğu olup, γ -sekretazın en küçük alt birimidir. *PSEN2* mutasyonu, γ -sekretaz aktivitesini artırarak, AH'nin beyinde önemli bir özellik olan A β 42 üretiminin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle presenilin mutasyonları, AH için önemli bir risk faktörüdür (De Strooper *et al.* 1997; Cai and Kim 2015). Nicastrin, kromozom 1'de bulunan, bir gende yüksek oranda korunmuş bir sekans tarafından kodlanan, büyük bir transmembran glikoproteindir. *NCTSN*, γ -sekretaz substratları için uygun yer ve γ -sekretaz bileşenlerinin olgunlaşmasına olanak sağlamaktadır (Foncin *et al.* 1985; Confalonia *et al.* 2003). *APH-1*, yedi transmembran bölgeye sahip bir proteindir. γ -sekretaz aktivitesinde anahtar bir faktör olan *APH-1*,

nicastrin ile stabil bir alt kompleks oluşturmakta ve γ -sekretaz kompleksinin stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, *APH-1* gen dizisindeki değişiklikler, γ -sekretaz aktivitesini değiştirerek, AH riskini artırmaktadır (Çinleti *et al.* 2015).

Apolipoprotein E (*ApoE*), lipoproteinlerin metabolizmasında ve kolesterolün yeniden dağıtılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Beyinde astrositler tarafından üretilen *ApoE*, nöronal bakım ve onarımda kritik bir rol oynamaktadır. İnsanlarda üç ana *ApoE* izoformu vardır: E2, E3 ve E4 (Mahley and Rall 2000; Eichner *et al.* 2002; Pendse *et al.* 2009). E3, insanlarda ifade edilen ana izoformdur. E2 ve E4'ün etkileri, göreceli riski belirlemek için tipik olarak E3 ile karşılaştırılmaktadır. *ApoE*, geç başlangıçlı AH için, en güçlü genetik risk faktörü olarak kabul edilmektedir. E2 alleli E4'e göre daha düşük AH patolojisi göstermektedir (Farrer *et al.* 1997; Raber *et al.* 1997; Garatachea *et al.* 2014; Phillips 2014; Brandor *et al.* 2018).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (*BDNF*), bazal ön beyinde sentezlenen ve merkezi sinir sisteminde önemli bir rol oynayan nörotrofik faktör ailesinin bir üyesidir (Maisonpierre *et al.* 1991; Fahnstock *et al.* 2002). *BDNF*, sinaptik plastisite, nöronal sağkalım, hafıza oluşumu ve uzun süreli hafızanın korunmasında görevlidir. Azalmış *BDNF* ekspresyonunun, nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğu ve AH'nin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Doi *et al.* 2013; Li *et al.* 2017).

Mikrotübülle ilişkili protein tau (*MAPT*) geni, Parkinson hastalığı ve AH de dahil olmak üzere, birçok nörodejeneratif hastalıkla ilgili olan tau proteinini kodlar. *MAPT* geninde, tau proteininin toplanmasına neden olan bir dizi mutasyon tanımlanmıştır (Allen *et al.* 2014).

TNF- α , merkezi sinir sisteminde sayısız fizyolojik süreci kontrol eden, beyinde mikrogliya, nöron ve astrositler tarafından sentezlenen, monomerik (17 kDa) glikosile edilmemiş tip 2 transmembran proteindir. *TNF- α* , bir enflamatuar yanıtın başlatılması

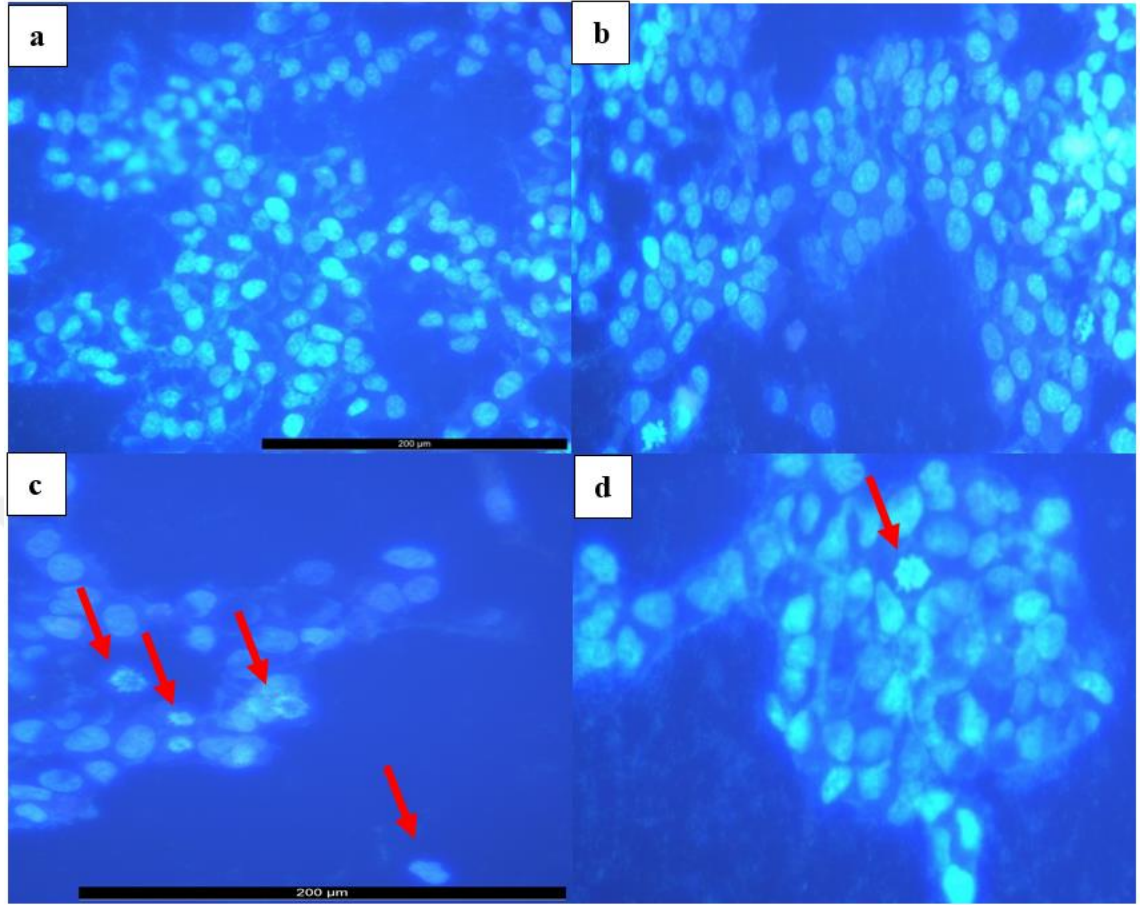
oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, geç başlangıçlı AH oluşumunda önemli etkiye sahip bir glikoprotein olan *APOE* geninin, hBN nanopartikül muamelesi sonucu, A β 'ye göre önemli düzeyde azalmış olduğu gözlenmiştir. Beyinde öğrenme, hafıza bozukluklarıyla ilişkili patogeneze sebep olan *TNF- α* geninin azalmış olduğu, nöronların, sinapsların ve hafızanın korunmasında önemli bir rolü olan *BDNF* geninin ise artmış olduğu tespit edilmiştir.

hBN nanopartikül uygulamasının, A β 'ye göre *ADAM 10* ve *BDNF* genlerinde artmaya, *APOE*, *BACE 1*, *NCSTN*, *PSEN 1* ve *TNF- α* genlerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle hBN nanopartiküllerinin, A β toksisitesinde koruyucu etkiye neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçların önceki çalışmalarla paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

4.6. *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinde A β İle İndüklenen hBN Nanopartiküllerinin Hoechst 33258 Floresan Boyama ve Akış Sitometri Analiz Değerleri

Bis-benzimidazol türevi olan Hoechst 33258 DNA'nın boyanması ve nükleik asitlerin miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan, mavi floresan boyalardır. Hoechst 33258 boyasının, çift sarmallı DNA'da, özellikle Adenin-Timin bakımından zengin dizilimler için yüksek afiniteye sahip oldukları bilinmektedir. Hoechst boyaları, membran geçirgendir ve canlı hücrelerin boyanmasına izin vermektedir. Hoechst boyaları, floresan mikroskopta ve akışkan sitometrisinde hücresel yapıları, spesifik proteinleri aynı anda görselleştirmek için kullanılmaktadır. Ayrıca Hoechst 33258 boyaması, apoptotik hücrelerde meydana gelen nükleer kromatindeki önemli morfolojik değişiklikleri göstermektedir (Guan *et al.* 2006; Bucevicius *et al.* 2018).

hBN nanopartikülleri, A β ve hBN nanopartikülü+A β 'ye maruz bırakılan farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin kromozom bütünlüğünü analiz etmek için Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kullanılarak hücrelerdeki değişimler gözlenmiştir. Hoechst 33258 floresan boyama analiz sonuçları Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



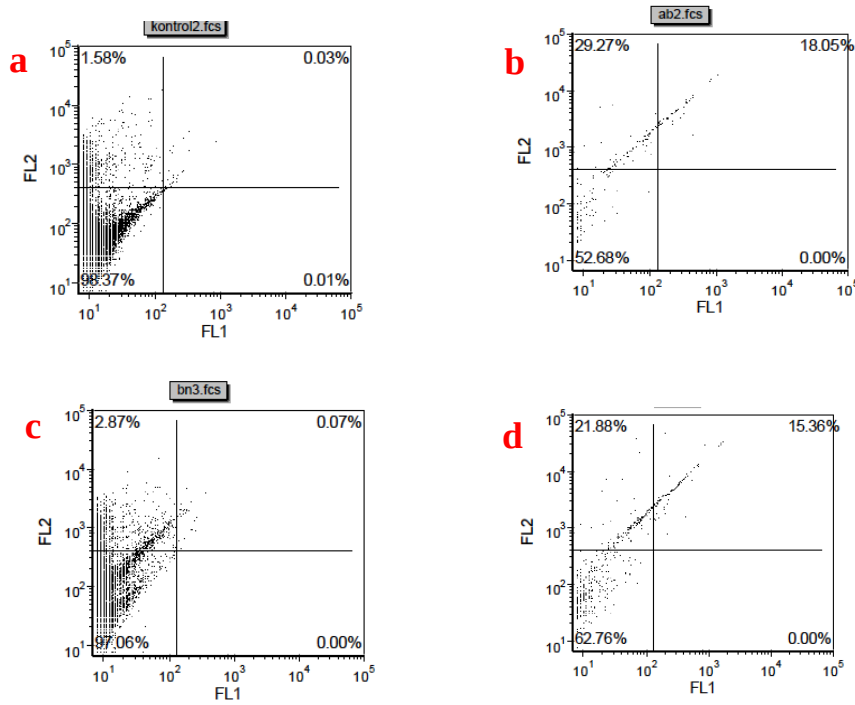
Şekil 4.16. Hoechst 33258 boyası ile hücre çekirdeklerinin boyanması **a-** sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** hBN nanopartikülleri, **c-** sadece A β içeren hücre kültürü **d-** hBN nanopartikülleri+A β (Oklar apoptotik cisimcikleri göstermektedir).

Mikroskopik analiz sonucu, hücre çekirdeklerinde önemli bir apoptoz belirteci olan kromozomal bozukluklar tespit edilmiştir. Kontrole göre, hBN nanopartikül uygulamasının, hücrelerin çekirdeğinde ve sağlıklı hücrelerin sayısında önemli bir değişiklik yapmadığı, A β uygulamasının ise hücrelerin çekirdeğini bozduğu ve sağlıklı hücrelerin sayısını önemli düzeyde azalttığı gözlenmiştir. Diğer yandan, hBN nanopartikül+A β uygulamasının, 48 saat sonunda A β toksik etkisini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, hBN nanopartiküllerinin A β toksisitesine karşı koruyucu etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Akış sitometrisi, sıvı bir ortamda, süspansiyondaki mikroskobik parçacıkların, fiziksel ve kimyasal özelliklerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.

(Waller *et al.* 2001). Bu teknik genellikle, yaşam ve biyomedikal bilimlerin araştırılmasında kullanıldığı bilinmektedir. Akış sitometrisi, hücre yüzeyi ve hücre içi moleküllerin ekspresyonunu analiz etmek, heterojen bir hücre popülasyonundaki farklı hücre tiplerini karakterize etmek, izole edilmiş alt popülasyonların saflığını değerlendirmek, hücre boyutu ve hacmini analiz etmek için kullanılmaktadır (Errante *et al.* 2015).

Hücre ölüm türünü belirlemek amacıyla Annexin-V/PI akış sitometrisi (CyFlow® Cube 6, Sysmex, Almanya) analizi yapılmıştır. Akış sitometri analiz sonuçları Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Hücre akış sitometrisi analizi **a-** sadece SH-SY5Y hücreleri, **b-** sadece A β içeren hücre kültürü, **c-** hBN nanopartikülleri, **d-** hBN nanopartikülleri+A β

Akış sitometri analizine göre, farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerini, apoptoza göre nekroz yoluyla daha fazla öldürdüğü bulunmuştur. Analiz sonucuna göre, A β uygulamasının canlılık oranını %52.68’e düşürdüğü, apoptoz oranını %18.05, nekroz oranını ise %29.27 yaptığı, hBN nanopartikül uygulamasının ise canlılık oranında önemli düzeyde

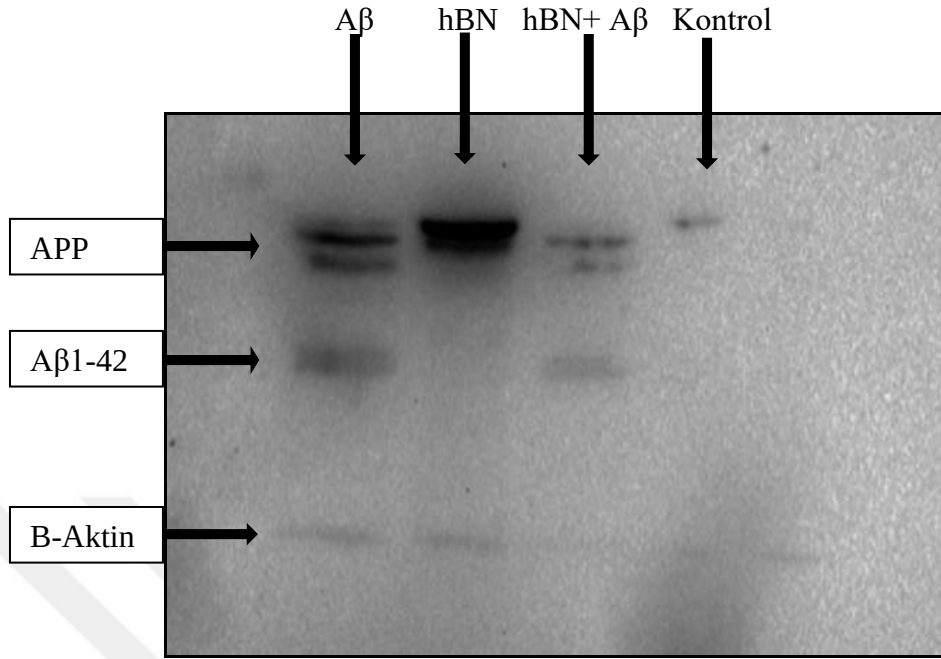
bir etki yapmadığı belirlenmiştir. hBN nanopartikül+A β uygulamasında, canlılık oranının %62.76, apoptoz oranının %15.36, nekroz oranının ise %21.88 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, hBN nanopartikül uygulamasının, %52,68 ile %62,76 A β ilavesine karşı hücre yaşayabilirliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca vermiş olduğumuz hBN nanopartiküllerinin, A β maruziyetinden kaynaklanan nekroz seviyelerini önemli ölçüde azaltarak, A β toksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiği görülmüştür.

Apoptoz, normal gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma görevi üstlenerek, istenmeyen hücrelerin sistematik olarak ortadan kaldırılmasını sağlayan temel bir biyolojik olay olarak tanımlanmaktadır (Norbury and Hickson 2001; Rager 2015). Başka bir ifade ile programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş bir şekilde elimine edilmesini içeren, farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilen, hücre ölümünün önemli bir süreci olarak bilinmektedir. (Formigli *et al.* 2000; Sperandio *et al.* 2000; Debnath *et al.* 2005). Ayrıca apoptoz, normal hücre devri, immün sistemin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. (Elmore 2007). Apoptozun deregülasyonu, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Örneğin, sağlıklı hücrelerin tahrip olmasına yol açan aşırı hücre ölümü, nörodejeneratif bozukluklara neden olmaktadır (Rager 2015). Ayrıca A β 'nin, oksidatif strese neden olarak veya nöronlarda ve gliada artmış Fas ligand ekspresyonlarını tetikleyerek, apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Ayrıca TNF- α salgılanmasına ve TNF-R1'in aktivasyonuna neden olacak şekilde mikroglia aktive edebilir, bunun da apoptoza yol açtığı bilinmektedir (Ethell and Buhler 2003). Az hücre ölümünün ise, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasından ve oto-immün hücrelerin, artrit, multipl skleroz ve lupus eritematosus gibi hastalıklara katkıda bulunan dolaşımdan çıkarılmamasından kısmen sorumlu olduğu bilinmektedir (Rager 2015).

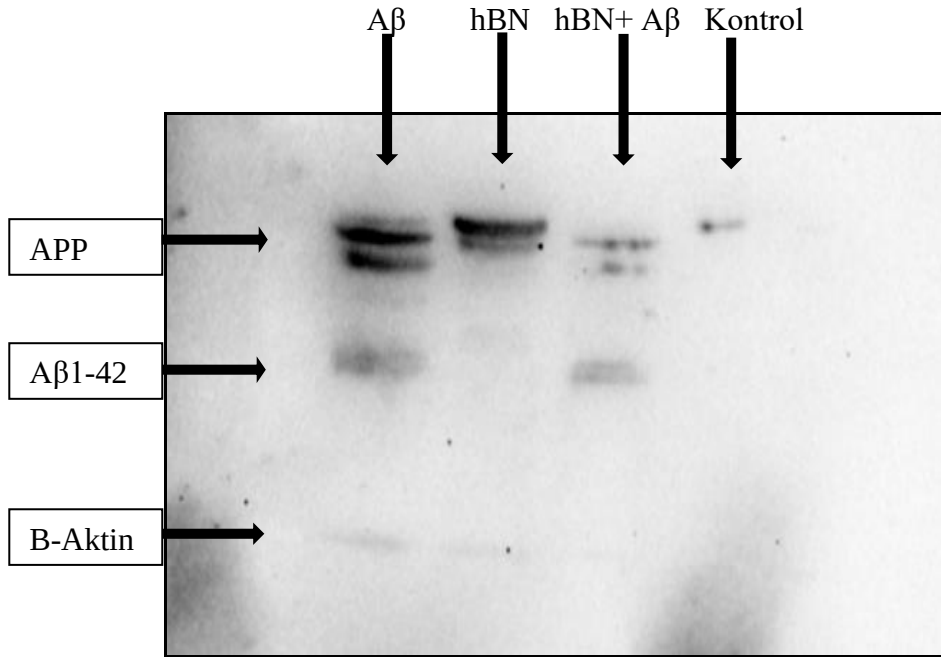
Nekroz, apoptotik sinyal iletim yolu gibi yüksek düzeyde düzenlenmiş bir hücre içi programı izlemeyen, programlanmamış hücrelerin ve canlı dokuların ölümü olarak tanımlanmaktadır. Nekroz tipik olarak, hücre zarı bütünlüğünün kaybı ve hücre ölümü ürünlerinin kontrolsüz bir şekilde hücre dışı boşluğa salınması ile sonuçlanarak enflamatuar bir yanıtı başlatmaktadır. Apoptoz ve nekroz, bir sürekliliğin iki ucunu temsil etmektedir (Niemann and Rohrbach 2016). Apoptoz ve nekrozun mekanizmaları ve morfolojileri farklı olsa da, bu iki işlem arasında benzerliklerin olduğu kanıtlanmıştır. Bu kanıtlar, nekroz ve apoptozun “apoptoz-nekroz sürekliliği” olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini göstermektedir (Zeiss 2003). Bir hücrenin nekroz veya apoptozla ölüp ölmemesinin, kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku tipine, dokunun gelişim aşamasına ve fizyolojik ortama bağlı olduğu belirtilmiştir (Fiers *et al.* 1999; Zeiss 2003). Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir işlem iken; apoptozis kontrol edilen, enerjiye bağlı olup bireysel veya hücre kümelerini etkileyen bir işlemdir. Hücre ölümü düzenlenmesindeki anormalliklerin, kanser, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, AIDS, iskemi, Parkinson hastalığı, AH, Huntington hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörojen üretici hastalıklar gibi hastalıkların önemli bir bileşeni olduğu bilinmektedir (Elmore 2007).

4.7. *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturulan Hücresel AH Modelinde A β İle İndüklenen hBN Nanopartiküllerinin Western Blot Analiz Değerleri

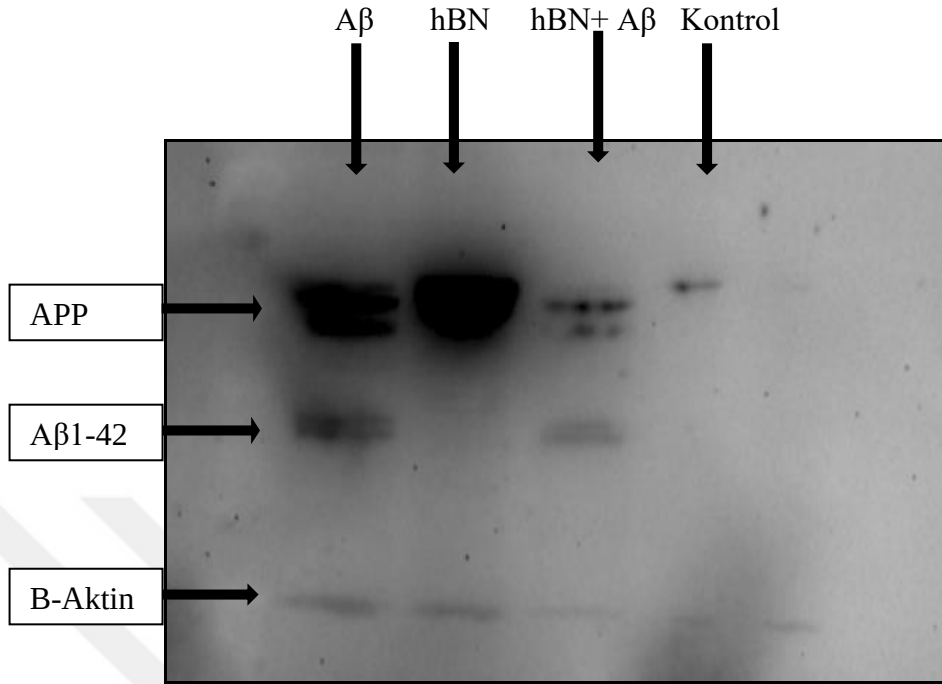
Western blot, doğal veya denatüre proteinlerin, jel elektroforez ile ayrılmasını, ayrılan proteinlerin bir protein bağlama membranına aktarılarak, hedef proteine spesifik bir antikorun bağlanıp, proteinin saptanmasını ve protein miktarının belirlenmesi için yaygın kullanılan laboratuvar tekniklerinden birisidir (Gomes *et al.* 2009; Ghosh *et al.* 2014). Western blot, göreceli protein seviyelerini doğru bir şekilde ölçmek amacıyla kullanılan güçlü bir bilimsel teknik olmasına rağmen, uygun deneysel teknik ve stratejilerin kullanılması gerekmektedir (Ghosh *et al.* 2014). Western blot, enerji metabolizmasını, protein dönüşümünü ve kronik fizyolojik adaptasyonları destekleyen düzenleyici moleküler olayları araştırmak için çeşitli uygulamalara sahiptir. Örneğin,



Şekil 4.18. hBN nanopartiküllerinin A β protein düzeyine etkisinin Western blot ile 30.sn. elde edilen görüntüsü



Şekil 4.19. hBN nanopartiküllerinin A β protein düzeyine etkisinin Western blot ile 150.sn. elde edilen görüntüsü



Şekil 4.20. hBN nanopartiküllerinin Aβ protein düzeyine etkisinin Western blot ile 300.sn. elde edilen görüntüsü

AH'de, Aβ protein seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışla birlikte, Aβ'lere hBN nanopartikülleri verilerek, Aβ seviyeleri western blot yöntemi ile görüntülenmeye çalışılmıştır. Görüntüleme sonucunda, image j programı kullanılarak bant kalınlıkları hesaplanmıştır. Bant kalınlıklarına göre, hBN nanopartikül uygulamasının, Aβ protein seviyesini önemli düzeyde düşürdüğü görülmüştür. Bu sonuçlara göre, Aβ protein miktarının, hBN nanopartikül uygulanması sonucu indüklendiği ve bu sonuçların diğer deneylerimizi desteklemekte olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu araştırma ile SH-SY5Y hücrelerinde A β ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı hBN nanopartiküllerinin koruyucu rolü ilk defa tespit edilmiştir. Farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültüründe, uygulama dozundaki hBN nanopartiküllerinin nöroprotektif potansiyellerinin yanı sıra sitotoksik ve genotoksik etkilerinin bulunmadığı da ilk kez rapor edilmiştir. Tez çalışmaları bulguları ışığında, hBN nanopartiküllerinin uygulama dozundaki antioksidan kapasiteyi artırdığı ve A β ile indüklenen nekrozu önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir. Böylece uygulama dozundaki hBN nanopartiküllerinin, yüksek anti-Alzheimer potansiyeline sahip olduğu ilk kez önerilmektedir. Ayrıca mevcut çalışmanın, Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik yeni çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y, Nalbant A., 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176.
- Addemir, O., 2002. “Bor Ürünlerinin Teknolojileri ve Türkiye'nin Durumu”, 1. Uluslar Arası Bor Sempozyumu, Kütahya.
- Adewusi, E.A., Fouche G., Steenkamp V., 2013. Effect of four medicinal plants on amyloid- β induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *African Journal Tradition, Complementary, and Alternative Medicine*, 10(4), 6-11.
- Agati, G., Azzarello E., Pollastri S., and Tattini M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196(3), 67–76.
- Ai, J., Biazar E., Jafapour M., Montazeri M., Majdi A., Aminifard S., Zafari M., Akbari H.R., Rad H.G., 2011. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*, 6(2), 1117-1127.
- Albanese, A., Tang P.S., Chan W.C., 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, 1-16.
- Allemann, E., Gurny R., Doekler E., 1993. Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutical*, 39, 173-191.
- Allen, M., Kachadoorian M., Quicksall Z., Zou F., Chai H.S., Younkin C., Crook J.E., Pankratz V.S., Carrasquillo M.M., Krishnan S., Nguyen T., Ma L., Malphrus K., Lincoln S., Bisceglia G., Kolbert C.P., Jen J., Mukherjee S., Kauwe J.K., Crane P.K., Haines J.L., Mayeux R., Pericak-Vance M.A., Farrer L.A., Schellenberg G.D., Parisi J.E., Petersen R.C., Graff-Radford N.R., Dickson D.W., Younkin S.G., Ertekin T., 2014. Association of MAPT haplotypes with Alzheimer's disease risk and MAPT brain gene expression levels. *Alzheimers Research Therapy*, 6(4), 39.
- Altman, J., 2004. Military Uses of Nanotechnology: Perspectives and Concerns. *Security Dialogue*, 35(1), 61-79.
- Altman, J., and Gubrud M.A., 2004. Military, arms control, and security aspects of nanotechnology. D. Baird, A. Nordmann & J. Schummer (eds.), *Discovering the Nanoscale and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount*. *Toxicology*, 260(1), 142–149.
- Alves, L., Correia A.S., Miguel R., Alegria P., Bugalho P., 2012. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. *Frontiers in Neurology*, 3, 63.
- Andrea, T., Adriana M., Fabiana M., Francesca F., Giorgio C.F., Gabriella T., Mirella F., Patrizia M., 2008. Cyanidin 3-O-glucopyranoside protects and rescues SH-SY5Y cells against amyloid-beta peptide-induced toxicity. *NeuroReport*, 19 (15), 1483-1486.

- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., Føgh, J., 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*.
- Angın, M.H., ve Aydın, S., 2003. Bor Nitrür Ön Fizibilite Etüdü. 2003, <http://www.etimaden.gov.tr>
- Anita, H., Sharma P., Jain P and Amit P., 2014. Apoptosis (Programmed cell death)- a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(4), 1854-1872.
- Anonymous, 2019. https://www.alz.org/braintour/images/alzheimer_brain.jpg (25.09.2019).
- Asharani, P.V., Wu Y.L., Gong Z., Valiyaveetil S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19, 255102-255110.
- Atasoy, A.R., 2009. Determination of genotoxic pollution of some hospital wastewater with genotoxicity test method. Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Attems, J., Yamaguchi H., Saido T.C., 2010. Capillary CAA and perivascular A β -deposition: two distinct features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of Neurology Science*, 299, 155–162.
- Aycicek, A., Erel O., 2007. Total oxidant/antioxidant status in jaundiced newborns before and after phototherapy. *Journal de Pediatria*, 83(4), 319-322.
- Aydın E., 2013. Sağlıklı nöron ve N2A nöroblastoma hücre kültürleri üzerine karvakrol, timol, karvon, alfa-pinen ve terpinlen monoterpenlerinin sitolojik, biyokimyasal ve genetik etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bachmann, G., 1994. Nanotechnology, technology analysis. *Technologiezentrum Physicalische Technologien*, 5 (1), 65-78.
- Bae, S., Kim H., Lee Y., Xu X., Park J.S., Zheng Y., Iijima, S., 2010. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. *Nature Nanotechnology*, 5(8), 574–578.
- Bahçeci, Z., 2005. Genetik. Öğrenci Kitabevi, Kırşehir.
- Bainbridge, D.R. and Macey M., 1983. Hoechst 33258: a fluorescent nuclear counterstain suitable for double-labelling immunofluorescence. *Journal Immunological Methods*, 62(2); 193-195.
- Balducci, C., Beeg M., Stravalaci M., 2010. Synthetic amyloid- β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 107, 2295– 2300.
- Balley, J. A., Maloney B., Ge Y. and Lahiri D.K., 2011. Functional Activity of the novel Alzheimer's Amyloid β - peptide interacting domain in the APP AND BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Genetic*, 488(1-2), 13–22.
- Balmain, W.H., 2011. XLVI. Observations on the formation of compounds of boron and silicon with nitrogen and certain metals . *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. <https://doi.org/10.1080/14786444208621545>
- Barrera, G., Pizzimenti S., Dianzani M.U., 2008. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Molecular Aspects Medicine*, 29(1-2), 1-8.

- Barry, A.E., Klyubin I., Donald J.M.M., 2011. Alzheimer's disease brain-derived amyloid- β -mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *Journal Neuroscience*, 31(1), 7259–7263.
- Bass, J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., and Atherton P.J., 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4-25.
- Bayrakdar, S.E.T., 2012. Amiloid β -peptid (1-42) ile oluşturulan in vivo ve in vitro nörodejenerasyon deney modellerinde PARP-1 inhibitörlerinin nöroterapötik etkilerinin araştırılması; Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Doktora Tezi
- Bennett, L. L., Rojas S., and Seefeldt T., 2012. Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 4(4), 215–222.
- Bertram, L. and Tanzi R.E., 2001. Dancing in the dark? The status of late-onset Alzheimer's disease genetics. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17(2), 127–136.
- Betancor, L. and Luckarift H.R., 2008. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends Biotechnology*, 26(10), 566-572.
- Boustani, I., and Quandt A., 1997. Nanotubes of bare boron clusters: Ab initio and density functional study. *Europhysics Letters*, 39, 5.
- Boyd-Kimball, D., Sultana R., Poon H.F., Lynn B.C., Casamenti F., Pepeu G., Klein J.B., Butterfield D.A., 2005. Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease, *Neuroscience*, 132(2), 313-24.
- Brandon, J.A., Farmer B.C., Williams H.C., and Johnson L.A., 2018. APOE and Alzheimer's Disease: Neuroimaging of Metabolic and Cerebrovascular Dysfunction. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 180.
- Braydich-Stolle L., Hussain S.M., Schlager J., Hofmann M.C., 2005. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicology in Science*, 88(2), 412–419.
- Breitenbach, M., and Eckl P., 2015. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. *Biomolecules*, 5(2), 1169-1177.
- Bucevicius, J., Lukinavicius G., and Gerasimait R., 2018. The use of Hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors*, 6 (2), 18.
- Buentello, F.S., Persad D.L., Court E.B., Martin D.K., Daar A., Singer P., 2005. Nanotechnology and the developing world. *Policy Forum PLoS Medicine*, 2(5), 384-385.
- Busciglio, J., Gabuzda D. H., Matsudaira P., and Yankner B. A., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 90, 2092-2096
- Butterfield, D.A, Swomley A.M. and Sultana R., 2013. Amyloid b-peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer Disease. Importance in Disease Pathogenesis and Progression; Antioxidants and Redox Signaling, 19(8), 823-835.
- Butterfield, D.A., 2002. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radical Research*, 36, 1307–1313.

- Butterfield, D.A., Reed T., Newman S.F. and Sultane R., 2007. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's Disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 658–677.
- Buzea, C., Paccheco I., Robbie K., 2007. Nanomaterial and nanoparticle source and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), 26-65.
- Cai, Y., An S.S., and Kim S.Y., 2015. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 1163-1172.
- Canesi, L., Ciacci C., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A., Marcomini A., Poiana G., 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environmental International*, 34, 1114-1118.
- Cao, G., 2004. Nanostructures and nanomaterials, synthesis, properties and applications. London: Imperial College Press, London.
- Cao, X., Sudhof T.C., 2001. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293, 115–120.
- Carocho, M and Ferreira I. C. F. R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25.
- Castorina, A., Tiralongo A., Giunta S., Carnazza M.L., Scapagnini G., D'Agata V., 2010. Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of beta-amyloid toxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 26(4), 367-77.
- Catarina, P.R., Ronald J.N., Antonio J.R., 2006. Nano capsulation 1. Method of preparation of drug – loaded polymeric nanoparticles: *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(6), 18-21.
- Cavalcanti, A., Shirinzadeh B., Freitas Jr R.A. and Hogg T., 2008. Nanorobot architecture for medical target identification. *Nanotechnology*, 19, 015103-015118.
- Cavalli, R., Caputo, O., Gasco, M.R., 1993. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *International Journal of Pharmaceutics*. 89 (1), 9–12.
- Cavanagh, J.B., 1999. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Research Review*, 29, 265–295.
- Cavanaugh, J.E., Jaumotte J.D., Lakoski J.M., Zigmond M.J., 2006. Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 84(1), 1367–1375.
- Cevc, G., 1996. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13 (3–4), 257–388.
- Chad, A. M. and Andrew, T., 2000. Semiconductors meet biology. *Nature*, 405, 626–627.
- Chan, F.K., Moriwaki K., and Rosa M.J.D., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Molecular Biological*, 979, 65–70.

- Chen, B., Liu Y., Zhang Y., Li J., Cheng K., Cheng L., 2017. IL-21 Is positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with TNF- α through the JAK-STAT signaling pathway. *Inflammation*, 40(2), 612–622.
- Chen, X., Wu P., Rousseas M., Okawa D., Gartner Z., Zettl A., 2009. “Boron nitride nanotubes are noncytotoxic and can be functionalized for interaction with proteins and cells,”. *Journal of the American Chemical Society Communications*, 131, 890–891.
- Cheung, Y.T., Lau W.K.W., Yu M.S., Lai C.S., Yeung S., So K.F., Chang R.C., 2009. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma asin vitromodel in neurotoxicity research. *NeuroToxicology* 30 (1) 127–135.
- Chonpathompikunlert, P., Yoshitomi T., Han J., Isoda H., Nagasaki Y., 2011. The use of nitroxide radical-containing nanoparticles coupled with piperine to protect neuroblastoma SH-SY5Y cells from A β -induced oxidative stress. *Biomaterials*, 32(33):8605-12.
- Choudhary, O.P. and Choudhary P., 2017. Scanning electron microscopy: advantages and disadvantages in imaging component. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 1877-1882.
- Ciofani, G., Danti, S., D'Alessandro, D., Moscato, S., Mencias, A., 2010. Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: interference with the MTT assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(2), 405-411.
- Ciofani, G., Raffa, V., Mencias, A., Cuschieri A., 2008. Cytocompatibility, interactions, and uptake of polyethyleneimine-coated boron nitride nanotubes by living cells: Confirmation of their potential for biomedical applications. *Biotechnology and bioengineering*, 101(4), 850-858.
- Clift M.D, Rutishauser B.R., Brown D.M., 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol-Appl Pharmacology*, 232(3), 418–427.
- Confalonio A., Terrenib L., Piscopoa P., Crestinia A., Campeggia L.M., Frigeriob C.S., Blottaa I., Perric M., Natalec M., Malettac R., Marcond G., Franceschie M., Brunic A.C., Forlonib G., Cantafora A., 2003. Nicastrin gene in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 353 (1), 61–65.
- Cortie, M.B., 2004. The weird world of nanoscale gold. *Gold Bulletin*, 37(1), 12-19.
- Cortie, M.B., Lingen E., 2002. Catalytic gold nanoparticles. *Materials Forum*, 26, 1-14.
- Couvreux, P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vanthier C., 2002. Nanocapsule technology; a review. *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(2), 99-134.
- Cui, C., Shu W., and Li P., 2016. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in cell and development biology*, 4(89), 1-11
- Cui, Z., Lockman, P.R., Atwood C.S., Hsu C.H., Gupte A., Allen D.D., Mumper R.J., 2005. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eurpain Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutic*, 59(2), 263-272.
- Cumurcu, B.E., Demir S., Ozyurt H., Etikan İ. And Karlidag R, 2009. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 63, 639–645.

- Çinleti, B.A., Yardımcı N., Aytürk Z., İlhan A., Kaya G., Acar M., Koç E.R., Gündüz E., Gündüz M., 2015. The effects and interactions of APOE and APH-1A polymorphisms in Alzheimer disease. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45, 1098-1105.
- Çulha, İ., 2018. Investigation of the effect of hexagonal boron nitrides (hBNs) on Mouse hippocampal cell line. Master of science thesis. Institute of health science, Yeditepe University, Istanbul.
- Dagani, R., 2003. Nanomaterials: Safe or Unsafe? *Chemical and Engineer News* 30–33. <http://www.cenonline.org> or <http://pubs.acs.org>.
- Damas, B.A., Wheeler M.A., Bringas J.S. and Hoen M.M., 2011. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *Journal of Endod* 37(6), 372-375.
- Dasgupta, A., and Klein K., 2014. Chapter 10: Role of Oxidative stress in neurodegenerative diseases and other diseases related to aging, antioxidants in food, vitamins and supplements, 2014, 167-184.
- De Strooper, B., Beullens M., Contreras B., 1997. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3590–3598.
- DeAssis, D.N., Mosqueira V.C., Vilela J.M., Andrade M.S., Cardoso V.N., 2008. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99m Technetium – fluconazole nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutical*, 349(1-), 152 –160.
- Deaton, C. and Marlin D., 2003. Exercise-associate oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3), 278-291
- Debnath, J., Baehrecke E.H., Kroemer G., 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, 1, 66– 74.
- Decourt, B., Lahiri D.K., Sabbagh M.N., 2017. Targeting tumor necrosis factor alpha for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 14(4), 412-425.
- Deepika, M., 2014. Study and exploration on inorganic nanomaterials as additive in lubricant application. Deakin University, doctor thesis.
- Delong, R.K., Hurst M.N., Aryal S., Inchun N.K., 2016. Unique boron carbide nanoparticle nanobio interface: effects on protein-RNA interactions and 3-D spheroid metastatic phenotype. *Anticancer Research*, 36(5), 2097-3103.
- Diplock, A.T., 2000. Introduction: markers of oxidative damage and antioxidant modulation. *Free radical research*, 33, 21-26.
- Ditta, A., 2012. How helpful is nanotechnology in agriculture? *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(4), 2-3.
- Doi, Y., Takeuchi H., Horiuchi H., Hanyu T., Kawanokuchi J., Jin K., Parajuli B., Sonobe Y., Mizuno T., Suzumura A., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid β -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One*, 8(4), 61988.
- Domb, A.J., 1993. Liposphere parenteral delivery system. *Proceedings International Symposium Control. Rel Bioact Material*, 20, 346–347.
- Donaldson A., 2005. Ultrafine particles: Mechanisms of lung injury. *Philosophical transactions of the royal society a: mathematical. Physical and Engineering Sciences*, 358, 2741.

- Dowding JM, Song W, Bossy K, Karakoti A, Kumar A, Kim A, Bossy B, Seal S, Ellisman MH., 2014. Cerium oxide nanoparticles protect against A β -induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation*, 21 (10), 1622-32.
- Dröge, W., 2003. Oxidative stress and aging. Springer, Hypoxia book, 191-200.
- Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(3), 459–469.
- Dwivedi, C. and Paul S.D., 2013. Nanotechnology to nanotoxicology. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2 (2), 458-469.
- Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H., Vickers, C., 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, *Mutagenesis Advance Access*, 24(4), 341-349.
- Eichner, J. E., Dunn, S. T., Perveen, G., Thompson, D. M., Stewart, K. E., and Stroehla, B. C., 2002. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 155 (6), 487–495.
- Elias, P., 2007. The micronucleus test for aquatic toxicology. Nova Science Publishers, New York Chapter 7, Aquatic Toxicology Research Focus, Svensson, 145-146.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology*, 35(4), 495–516.
- Elnashaie, S.S; Danafar F.; Hashemipour H.; 2015. Nanotechnology for chemical engineers. Springer; 93-102.
- Emanet, M., Şen Ö., and Çulha M., 2017. Evaluation of boron nitride nanotubes and hexagonal boron nitrides as nanocarriers for cancer drugs. *Nanomedicine*, 12(7), 797-810.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112-119.
- Errante, P.R., Ebbing P.C., Rodrigues F.S.M., Ferraz R.N., Silva N.P., 2015. Flow cytometry: a literature review. *Revista de Ciencias Medicas e Biologicas*, 14(2), 211-224.
- Eteghad, S.S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J., 2015. Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's Disease. *Medical Principles and Practice*, 24, 1–10.
- Ethell, D.W., and Buhler L.A., 2003. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *Journal of Clinical Immunology*, 23(6), 439–446.
- Fahnestock, M., Garzon D., Holsinger R.M., Michalski B., 2002. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *Journal Neural Transmission Supplementum*, 62, 241-252.
- Fairbain, D.W., Olive P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Farfara, D., Lifshitz V., Frenkel D., 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 762-780.
- Farrer, L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Mayeux R., 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *JAMA* 278, 1349–1356.

- Fenech, M., 1993. The cytokinesis blocks micronucleus technique. A detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research*, 285, 35-44.
- Fernandez-Gomez, F.J., Pastor M.D., Garcia-Martinez E.M., Melero-Fernandez M., Gou-Fabregas M., Gomez-Lazaro M., 2006. Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione peroxidase expression. *Neurobiology Discussion*, 24(6), 296–307.
- Ferreira, T.H., Silva P.R.O., Santos R.G., Sousa E.M.B., 2011. A Novel synthesis route to produce boron nitride nanotubes for bioapplications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 426-434.
- Fessi, H., Puisieux F., Devissaguet J-P., Ammoury N., Benita S., 1989. Nano capsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutical*, 55(4), 1-4.
- Festjens, N., Vanden Berghe T., and Vandenabeele P., 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics*, 1757 (9-10), 1371-1387.
- Feynman, R.P., 1959. There's plenty of room at the bottom, an invitation to enter a new field of physics, Annual meeting of the American Physical Society, California Institute of Technology.
- Fiers, W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18(54), 7719–7730.
- Finney, L.A., O'Halloran T.V., 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, 300, 931–936.
- Foncin, I.F., Salmoa D., Supino-Viterbo V., Feldman R.G., Macchi G., Mariotti P., Scoppetta C., Caruso G., Bruni A.C., 1985. Alzheimer's presenile dementia transmitted in an extended kindred. *Review Neurology*, 141(3), 1194–2002.
- Formigli, L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S.Z., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncletic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cell Physiology*, 182(1), 41–49.
- Fotakis, G. and Timbrell J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2), 171-177.
- Freitas, C., Muller R.H., 1998. Spray-drying of Solid lipid nanoparticles (SLN TM). *Europaen Journal of Pharmaceutic Biopharmaceutic*, 46 (2), 145–151.
- Freitas, R.A., 1999. Nanomedicine. Basic Capabilities, Georgetown. TX: Landes Bioscience, 1(5), 345-347.
- Fubini, B., 1997. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environmental Health Perspective*, 105, 1013–1020.
- Gao, N., Sun H., Dong K., Ren J., Qu X., 2014. Gold-nanoparticle-based multifunctional amyloid- β inhibitor against Alzheimer's disease. *Chemistry*, 21(2), 829-835.
- Gao, Y., Pimplikar S.W., 2001. The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14979–14984.

- Garatachea, N., Emanuele E., Calero M., Fuku N., Arai Y., Abe Y., 2014. ApoE gene and exceptional longevity: insights from three independent cohorts. *Experiment of Gerontology*, 53,16–23.
- Ghosh, R., Gilda J.E., Gomes A.V., 2014. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Review of Proteomics*, 11(5), 549-560.
- Gleiter, H., 2000. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia*, 48(1), 1-29.
- Gleiter, H., Mater A., Skorokhod V., Ragulya A., Uvarova I., 2001. Physico-chemical kinetics in nanostructured systems. Kyiv: Academperiodica. *Material of Science Engineering*, 27, 180.
- Gluecksmann, A., 1951. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 26(1), 59-86.
- Goldberg M., Langer R., Jia X., 2007. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal Biomater Science Polymer*, 18(1), 241-268.
- Gomes, A.V., Young G.W., Wang Y., 2009. Contrasting proteome biology and functional heterogeneity of the 20 S proteasome complexes in mammalian tissues. *Molecular & cellular proteomics*, 8(2), 302–315.
- Goodman, M., Bostick R. M., Kucuk O., and Jones D. P., 2011. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1068–1084.
- Graf, B.A., Milbury P.E., and Blumberg J.B., 2005. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281–290.
- Grainger, D.W. and Castner, D.G., 2008. Nanobiomaterials and nanoanalysis: opportunities for improving the science to benefit biomedical Technologies. *Advanced Materials*, 20(5), 867–877.
- Gregori, M., Taylor M., Salvati E., Re F., Mancini S., Balducci C., Forloni G., Zambelli V., Sesana S., Michael M., Michail C., Tinker-Mill C., Kolosov O., Sherer M., Harris S., Fullwood N.J., Masserini M., Allsop D., 2017. Retro-inverso peptide inhibitor nanoparticles as potent inhibitors of aggregation of the Alzheimer's A β peptide. *Nanomedicine*, 13(2),723-732.
- Guan, Y., Li M., Dong K., Gao N., Ren J., Zheng Y., Qu X., 2016. Ceria/POMs hybrid nanoparticles as a mimicking metallopeptidase for treatment of neurotoxicity of amyloid- β peptide. *Biomaterials*, 98, 92-102.
- Guan, Y., Zhou W., Yao X., Zhao M., Li Y., 2006. Determination of nucleic acids based on the fluorescence quenching of Hoechst 33258 at pH4.5. *Analytica Chimica Acta*, 570 (1), 21-28.
- Guarneri, P., Cascio C., Piccoli T., Piccoli F., Guarneri R., 2000. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *Journal of Neuroscience Research*, 60, 656–665.
- Guerra-Araiza, C., Alvarez-Mej A. L., Sanchez-Torres S. *et al.*, 2013. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, 47(6-7), 451–462.
- Guo D., Xie G., and Luo J., 2014. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of Physics*. 47, 25.

- Guzzinati, G., Altantzis T., Batuk M., Backer A.D., Lumbeeck G., Samaee V., Batuk D., Idrissi H., Hadermann J., Aert S.V., Schryvers D., Verbeeck J., and Bals S., 2018. Recent advances in transmission electron microscopy for materials science at the EMAT lab of the university of antwerp. *Materials (Basel)*, 11(8), 1304.
- Hacker, G., 2003. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301(16), 5-17.
- Hagens, W.I., Oomen A.G., de Jong W.H., Cassee F.R., Sips A.J.A. M., 2007. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49 (3), 217-229.
- Han, S.H., Chang Y.J., Jung E.S., Kim J.W., Na D.L., Mook-Jung I., 2010. Effective screen for amyloid β aggregation inhibitor using amyloid β -conjugated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 1-12.
- Hardy, J., and Selkoe D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(9), 353-356.
- Hardy, J.A., and Higgins G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184-185.
- Hardy, J.A., Higgins G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid
- Harkany, T., Abraham I., Timmerman W., 2000. β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *European Journal Neuroscience*, 12, 2735-2745.
- Hashemi, S.H., Li J.Y., Ahlman H., Dahlstrom A., 2003. SSR2(a) receptor expression and adrenergic/cholinergic characteristics in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurochemical Research*, 28(3), 449-460.
- Heckman, P.R., Wouters C., Prickaerts J., 2015. Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease: a translational overview. *Current Pharmaceutical Design*, 21(3), 317-331.
- Helland, A., 2004. Nanoparticles: A Closer look at the risks to human health and the environment perceptions and precautionary measures of industry and regulatory bodies in Europe; Thesis for the fulfilment of the Master of Science in Environmental Management and Policy Lund, Sweden. The International Institute for Industrial Environmental Economics Internationella Institutet.
- Heng, H., Li, S., James, F., Yuhang, W. and Yurong, X., 2008. Computational issues in biomedical nanometrics and nano-materials', *Journal Nanotechnology Research*, 1, 50-58.
- Herken, E.N., Erel O., Güzel S., Çelik H., Imanoğlu S., 2009. Total antioxidant, phenolic compounds, and total oxidant status of certified and uncertified Turkey's honeys. *International Journal of Food Properties*, 12(3), 461-468
- Heyland, D., Dhaliwal R., Suchner U., and Berber M.M., 2005. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Medicine*, 31(3), 327-337.
- Hodge, P., 1993. Polymer science branches out. *Nature*, 362, 18-19.
- Hofmann, M., Rechenberg B., Hofmann H., 2009. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. In: *Nanostructured Materials for Biomedical Applications*. Transworld Research Network, Kerala, India, 119-149.
- Holister, P., Cristina, R.V., Fullerenes, H.T., 2003. Nanoparticles, Technology White papers nr. 3, Cientifica 1-12.

- Holsapple, M.P, Farland W.H, Landry T.D., 2005. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicology Science*, 88, 12–17.
- Horikoshi, S. and Serpone N., 2013. Introduction to nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. 1-24.
- Horoz, M., Bolukbas C., Bolukbas F., Kocyigit A., Aslan M., Koylu A.O., Gumus M., Celik H. ve Koksall M., 2006. Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection mutation. *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596 (1-2), 137-142.
- Huang, L., Wang H., Wang Z., Mitra A., Zhao D., Yan Y., 2002. Cuprite nanowires by electrodeposition from lyotropic reverse hexagonal liquid crystalline phase. *chemistry of materials*, 14(2), 876–880.
- Huovila, A.P.J., Turner A.J., Peltto-Huikko M., Karkkainen L., Ortiz R.M., 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30 (7), 413–422.
- Hussain, S., Boland S., Baeza-Squiban A., 2009. Oxidative stress
- Hyuk-Suh W., Suslick S.K., Stucky D., Hun S., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87(3), 133–170.
- Ikedo, K., Okada T., Sawada S., Akiyoshi K., Matsuzaki K., 2006. Inhibition of the formation of amyloid beta-protein fibrils using biocompatible nanogels as artificial chaperones. *FEBS Letters*, 580(28-29), 6587-6595.
- Irshad, M. and Chaudhuri P. S., 2002. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233–1239.
- Izyumskaya, N., Demchenko D.O., Das S., Özgür Ü., Avrutin V., Morkoç H., 2017. Recent development of boron nitride towards electronic applications. *Advanced Electronic Materials*, 3(5), 1600485.
- Jain, P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Accounts of Chemical Research*, 41(12), 1578-1586.
- Jain, S. K., Sahni Y. P., Rajput N., and Gautam V., 2011. Nanotoxicology : An Emerging Discipline; *Veterinary World*, 4 (1), 35-40.
- Jaiswal J., Gupta SK., Kreuter J., 2004. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification solvent evaporation process. *Journal Control Release*, 96(1), 1692-178.
- Janelins, M.C., Mastrangelo M.A., Oddo S., LaFerla F.M., Federoff H.J., Bowers W.J., 2005. Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 23.
- Janelins, M.C., Mastrangelo M.A., Park K.M., 2008. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *The American Journal of Pathology*, 173(6), 1768–1782.

- Jensen, B.H., 2014. Nanotechnology to provide cleaner diesel engines', RD Mag, <http://www.rdmag.com/news/2014/09/nanotechnology-providecleaner-diesel-engines>.
- Jha, A.N., Cheung, V.V., 200. Foulke,s M.E., Hill, S.J., Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. Depledge MH, Mutaion Research, 464 (2), 13-28.
- Jiang J., Biswas P., Oberdörster G., Elder A., Gelein R., 2008. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology*, 2(1): 33–42.
- Jimenez, K., Bermejo P., Martin S., Csaky A.G., 2013. Discovery of alkenylboronic acids as neuroprotective agents affecting multiple biological targets involved in Alzheimer's disease. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 23(2), 426–429.
- Jin, M., Shepardson N., Yang T., 2011. Soluble amyloid-beta protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108, 5819–5824.
- Jo, D.G., Arumugam T.V., Woo H.N., Park J.S., Tang S.C., Mughal M., Hyun D.H., Park J.H., Choi Y.H., Gwon A.R., 2010. Evidence that γ -secretase mediates oxidative stress-induced β -secretase expression in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging*, 31, 917–925.
- Jores, K., Mehnert W., Drecusler M., Bunyes H., Johan C., MAder K., 2004. Investigation on the stricter of solid lipid nanoparticles and oil-loaded solid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal Controlled Release*. 17(4), 217- 227.
- Jose, K.A., 2009. Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy. Netherlands, Springer, 5, 1-30.
- Jun, J.W., Seo J.W., Oh S.J., Cheon J., 2005. Recent advances in the shape control of inorganic nano-building blocks. *Coord Chemical Review*, 249, 1766-1775.
- Jung, T., Kamm W., Breitenbach A., Kaiserling E., Xiao J.K., Kissel T., 2000. Biodegradable nano particles for oral delivery of peptides: is there a role for polymer to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), :147-160.
- Kamel, S., 2007. Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites, a mini review. *eXPRESS Polymer Letters*, 1(9), 546–575.
- Kasper, J., Hermanns M.I., Bantz C., Maskos M., Stauber R., Pohl C., Unger R.E. and Kirkpatrick J.C., 2011. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicology*, 8(1), 6.
- Kazak Z., 2012. Amiloidozisli hastalarda AA tipi Amiloidozis sıklığı; Ondokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- Kelleher, J.L., and Shen J., 2017. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 114(4), 629-631.
- Kerr, J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal Cancer*, 26 (2), 39–57.
- Khawaja, A. M., 2011. The legacy of nanotechnology: Revolution and prospects in neurosurgery. *International Journal of Surgery*, 9(8), 608-614.

- Kim, K. S., 2009. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature* 457, 706–710.
- Kim, K. S., Zhao Y., Jang H., Lee S. Y., Kim J. M., Kim K. S., Hong B. H., 2009. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, 457(7230), 706–710.
- Kim, S., Lim Y.T., Soltesz E.G., De Grand A.M., Lee J. and Nakayama A., 2004. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *National of Biotechnology*, 22(6), 93–97.
- Kim, Y., Park J.H., Lee H., Nam J.M., 2016. How do the size, Charge and Shape of Nanoparticles Affect Amyloid β Aggregation on Brain Lipid Bilayer? *Scientific Reports*, 6(1), 19548.
- Kim, Y.T., Han J.H., Hong B.H., Kwon Y.U., 2010. Electrical synthesis of CdSe quantum dot arrayson a grapheme basal plane using mesoporous silica thin. *Advanced Materials*, 22, 515-516.
- Kimberly, W.T., Zheng J.B., Guenette S.Y., Selkoe D.J., 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *Journal of Biological Chemical*, 276, 40288–40292.
- Kirkitadze, M.D., Kowalska A., 2005. Molecular mechanisms initiating amyloid- β fibril formation in Alzheimer's disease. *Acta biochimica Polonica*, 52(2), 417–423.
- Kittelberger, K.A., Piazza F., Tesco G., 2012. Natural amyloid-beta oligomers acutely impair the formation of a contextual fear memory in mice. *PLoS One*, 7, 29940.
- Kontusha, A., Berndta C., Webera W., 2001. Amyloid- β is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic Biological Medical*, 30(1), 119–128.
- Korzeniewski, C., and Callewaert D. M., 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64(3), 313–320.
- Koudinov, A.R and Berezov T.T., 2004. Alzheimer's amyloid-beta ($A\beta$) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64, 71-79.
- Köken, D., 2016. Synthesis and optimization of boron nitride nanotubes for stable aqueous dispersions, yüksek lisans tezi, Sabancı Üniversitesi.
- Kuchibhatla, S.V.N.T., Karakoti A.S., Bera D., Seal S., 2007. One dimensional nanostructured materials. *Progress in Materials Science*; 52, 699-913.
- Lahiri, D.K., Maloney B., 2010b. The “LEARn” (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps. *Experimental Gerontology*, 45(3), 291–6.
- Lam, H., Poon K., Burd T., 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* 77(2), 126.
- Landete, J. M., 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(10), 936–948.
- Lando, C., Hagmar L. and Bonnassi S., 1998. Biomarkers of cytogenetic damage in human and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *La Medicina del lavoro*, 89, 124-131.

- Lanone, S., Rogerieux F., Geys F., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P., 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. Part Fibre Toxicology, 6, 14–25.
- Larson, D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., 2003. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. Science, 300, 1434-1436.
- Lauderback, C.M., Hackett J.M., Keller J.N., Varadarajan S., Szveda L., Kindy M., Markesbery W.R., Butterfield D.A., 2001. Vulnerability of synaptosomes from apoE knock-out mice to structural and oxidative modifications induced by A beta(1-40): implications for Alzheimer's disease. Biochemistry, 40(8), 2548-2554.
- Laval, J.M., Thomas, D. and Mazeran, P.E., 1999. Nanobiotechnology and its role in the development of new analytical devices', Analyst, 125(3), 29–33.
- Lee, C.M., Huang S.T., Huang S.H., Lin H.W., Tsai H.P., Wu J.Y., Lin C.M., Chen C.T., 2011. C60 fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the β -amyloid peptide. Nanomedicine, 7(1), 107-114.
- Lee, J.H., Shin S.Y., Kim S., Choo J., Lee Y.H., 2006. Suppression of PTEN expression during aggregation with retinoic acid in P19 mouse embryonal carcinoma cells. BiochemBiophys Research Community, 347(10), 715–722.
- Lee, M., You H.J., Cho S.H., Woo C.H., Yoo M.H., 2002. Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to bamyloid in C6 astrogloma cells. Biochemical of Journal, 366, 937–943.
- Lee, S. W., Yabuuchi N., Gallant B.M., Chen S., Kim B. S., Hammond P. T., Shao Y., 2010. High-power lithium batteries from functionalized carbon-nanotube electrodes. Nature Nanotechnology, 5(7), 531–537.
- Lee, W., Kang S.H., Kim J.Y., Kolekar G.B., Sung Y.E., Han S.H., 2009. TiO₂ nanotubes with a ZnO thin energy barrier for improved current efficiency of CdSe quantum-dot-sensitized solar cells. Nanotechnology, 20(33), 335706.
- Leist, M. and Jaattela, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2(8), 589-98.
- Leonhardt U., 2007. Optical Metamaterials: Invisibility Cup. Nature Photonics, 1(4), 207-208.
- Lewinski, N., Colvin V., Drezek R., 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. Small, 4 (1), 26-49.
- Li, D., and Xia, Y. (2006). Electrospinning: A simple and versatile technique for producing ceramic nanofibers and nanotubes. Journal of the American Ceramic Society, 89 (6), 1861–1869.
- Li, G.D., Bi R., Zhang D.F., Xu M., Luo R., Wang D., ADNI, Fang Y., Li T., Zhang C., Yao Y.G., 2017. Female-specific effect of the BDNF gene on Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 53, 192.
- Li, K., Lian G., Jiang H.H., Zhao X., Jing H.P., Cui D.L., Tao X.T., Wang Q.L., 2008. Effects of trimethylamine and ammonia on cBN content in the samples prepared by hydrothermal method. Diamond and Related Materials, 17(6), 989-992.
- Li, W., Zhou J. And Xu Y., 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). Biomedical Reports, 3, 617-620.

- Linkov, I., Satterstrom F.K., Corey L.M., 2008. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotech Biological and Medicine*, 4, 167–171.
- Lipp, A., Schwetz K.A., Hunold K., 1989. Hexagonal boron nitride: Properties, fabrication, and applications. *Journal of the European Ceramic Society*, 5(1), 3–9.
- Liu, G., Men P., Harris P.L., Rolston R.K., Perry G., Smith M.A., 2006. Nanoparticle iron chelators: a new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance. *Neuroscience Letters*, 406(3), 189–193.
- Liu, G., Men P., Kudo W., Perry G., Smith M.A., 2009. Nanoparticle-chelator conjugates as inhibitors of amyloid-beta aggregation and neurotoxicity: a novel therapeutic approach for Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*, 22, 455(3), 187–190.
- Liu, H., Dong X., Liu F., Zheng J., Sun Y., 2017. Iminodiacetic acid-conjugated nanoparticles as a bifunctional modulator against Zn^{2+} -mediated amyloid β -protein aggregation and cytotoxicity. *Journal of Colloid Interface Science*, 505(1), 973–982.
- Liu, X., Sun H., Chen Y., Lau R., Yang Y., 2008. Preparation of large particle MCM-41 and investigation on its fluidization behavior and application in single-walled carbon nanotube production in a fluidized-bed reactor. *Chemical Engineering Journal*, 142(3), 331–336.
- Liz-Marzan, L.M., Correa M.A., Pastoriza I., Mulvaney P., Ung T., Giersig M., Kotov N.A., 2001. Core-shell and assemblies thereof. In: Nalwa, H.S. (Ed.), *Hand Book of Surfaces and Interfaces of Materials*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 189–237.
- Lleo, A., Greenberg S.M., and Growdon J.H., 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual Reviews Medical*, 57(1), 513–33.
- Lockshin, R.A. and Williams, C.M., 1964. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal Insect Physiology*, 10 (4), 643–649.
- Lockshin, R.A. and Zakeri Z., 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Natural Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7), 545–550.
- Logothetidis, S., 2006. Nanotechnology in Medicine: The Medicine of tomorrow and nanomedicine. *Hippokratia*, 10(1), 7–21.
- Lota, G., Fic K., Frackowiak E., 2011. Carbon nanotubes and their composites in electrochemical applications. *Energy & Environmental Science*, 4(5), 1592–1605.
- Lu, T., Wang L., Jiang Y., Liu Q., Huang B.C., 2016. Hexagonal boron nitride nanoplates as emerging biological nanovectors and their potential applications in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 36.
- Lub, C.J., Hu J., Wang Z., Xie S., Pan T., Huang L., Lia X., 2018. Discovery of boron-containing compounds as A β aggregation inhibitors and antioxidants for the treatment of Alzheimer's disease. *MedChemComm*, 9(11), 1862–1870.

- Luo, J., Maye M.M., Kariuki N.N., Wang L., Njoki P., Lin Y., Schadt M., Naslund H.R., Zhong C.J., 2005. Electrocatalytic oxidation of methanol: carbon supported gold-platinum nanoparticles catalysts prepared by two-phase protocol. *Catalysis Today*, 99 (3-4), 291-297.
- Luther, W., 2006. International strategy and foresight report on nanoscience and nanotechnology. Technical Report. Universite Virtuelle de Tunis.
- Mahley, R. W., and Rall, S. C., 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, 507–537.
- Mahmood T. and Yang P.C., 2012. Western Blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medicine sciences*, 4(9), 429–434.
- Maisonpierre, P.C., Beau M.L., Espinosa R., Ipa N.Y., Belluscio L., Monte S.M., Squinto S., Furth M.E., Yancopoulos G.D., 1991. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*, 10(3), 558-568.
- Majno G. and Joris I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 146(1), 3-11.
- Maluszynska, J., Juchimiuk J. and Wolny E., 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 41 (2), 101-104.
- Marcello, E., Borroni B., Pelucchi S., Gardoni F., Di Luca M., 2017. ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: From developmental disorders to Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21 (11), 1017–1026.
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 134–147.
- Marshall, N.J., Goodwin C.J., Holt S.J., 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulatory*, 5(2), 69–84.
- Martinez, I.G., 2011. Synthesis and characterization of boron- and aluminium-based nanostructures; Masters Thesis; Technische Universität Dresden Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC)
- Martins, L.M., Earnshaw W.C., 1997. Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biology*, 7(2), 111-114.
- Maser, E., Oppermann U.C.T., 1997. The 11 β hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid mineralocorticoid action. The role of type-1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *European Journal Biochemical*, 249, 365-369.
- Medintz, I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H., 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nature Materials*, 4 (6), 435–446.
- Medvedeva, N.V., Ipatova, O.M., Ivanov, Y.D., Drozhzhin, A.I. and Archakov, A.I., 2007. Nanobiotechnology and nanomedicine', *Biochemistry (Moscow) Supports Ser B: Biomedical Chemical*, 1, 114–124.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407(6805), 796-801.

- Michalet, X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S., 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307 (5709), 538–544.
- Mirkarimi, P.B., McCarty K.F., Medlin D.L., 1997. Review of advances in cubic boron nitride film synthesis. *Materials Science and Engineering*, 21(2), 47–100.
- Mitchell, D.R., Brown Jr R.M., Spires T.L., Romanovicz D.K., Lagow R.J., 2001. The synthesis of megatubes: new dimensions in carbon materials. *Inorganic Chemical*, 40 (12), 2751–2755.
- Mittal, G., Carswell H., Brett R., Currie S., Kumar M.N., 2011. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology, 150(2), 220-228.
- Miyazaki K., Islam N., 2007. Nanotechnology systems of innovation – An analysis of industry and academia research activities. *Technovation*, 27(2), 661-671.
- Moghim, S. M., Hunter A. C., and Murray J. C., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, 19(3), 311–330.
- Mohammadi, F. and Cass R.B., 2009. Patent Application
- Moharamzadeh, K., Brook I.M., Noort R.V., 2009. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2, 514-548.
- Mokrov V.G., Fedorov Y.V., Velikovski L.E., Scherbakova M.Y., 2001. “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants nanotechnology. *Acta Nature*, 6(1), 35-44.
- Molpeceres J., Aberturas M.R., Guzman M., 2000. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *Journal of Microencapsulation*, 17(5), 599-614.
- Mondal, S., and Banthia, A. K., 2005. Low-temperature synthetic route for boron carbide. *Journal of the European Ceramic Society*, 25, 287–291.
- Moon, R. J., Frihart C. R., Wegner T. W., 2006. Nanotechnology applications in the forest products industry. *Forest Products Journal*, 56, 4–10.
- Moore, K.A., Pate K.M., Soto-Ortega D.D., Lohse S., van der Munnik N., Lim M., Jackson K.S., Lyles V.D., Jones L., Glassgow N., Napumeheno V.M., Mobley S., Uline M.J., Mahtab R, Murphy C.J., Moss M.A., 2017. Influence of gold nanoparticle surface chemistry and diameter upon Alzheimer's disease amyloid- β protein aggregation. *Journal of Biological Engineering*, 6, 11-15.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Method*. 65, 55–63.
- Mudshinge S., Deore A., Patil S., Bhalgat C.M., 2011. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal* 19, 129–141.
- Muhlen, A.Z., Muhlen E.Z., Niehus H., Mehnert W., 1996. Atomic forcemicroscopy studies of solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 13(2), 1411-1416.
- Mulik, R.S., Mönkkönen J., Juvonen R.O., Mahadik K.R., Paradkar A.R., 2010. ApoE3 mediated poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. *Molecular Pharmaceutics*, 7(3), 815-825.
- Murphy, M.P. and LeVine III H., 2010. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid peptide. *Journal Alzheimers Disease*, 19(1), 311. doi:10.3233/JAD-2010-1221.)

- Murray, P.E., Godoy G.C., Godoy F.G., 2007. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medical Oral Patological Oral Cir Bucal*, 12(4), 258-266.
- Mut-Salud N., Aránega A., Álvarez P.J., Garrido J.M., and Serrano F.R., Carrasco E., 2015. Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(2016),1-19.
- Nagarajan, R., 2008. Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- Nanji A.A, and Sturmhöfel S.,1997. Apoptosis and necrosis: Two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World*, 21(4), 325-330.
- Naslund, J., Schierhorn A., Hellman U., Lannfelt L., Roses A.D., Tjernberg L.O., Silberring J., Gandy S.E., Winblad B., Greengard P, 1994. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8378–8382.
- Niemann, B., and Rohrbach S., 2016. Chapter 3-Metabolically relevant cell biology – role of intracellular organelles for cardiac metabolism. *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*, 19-38.
- Nikalje A.P., 2015. Nanotechnology and its applications in medicine. *Medicinal Chemistry*, 5(2), 81-89.
- Norbury, C.J. and Hickson I.D., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367–401.
- Nunomura, A., Castellani R.J., Lee H., 2006. Neuropathology in Alzheimer's disease: awaking from a hundred-year-old dream. *Science Aging Knowledge Environment*, 8(3), 10.
- Oberdorster, G., Ferin J., Lehnert B.E., 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental Health Perspectives*, 112 (5), 173-179.
- Oberdorster, G., Gelein R.M., Ferin J. and Weiss B., 1995. Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? *Inhalation Toxicology*, 7(8), 111-124.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. and Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Nanotoxicology*, 113, 823–839.
- Oberdotster, G., 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of International Medical*, 267(3), 89–105.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi P.O., and Ngwuluka N.C., 2009. Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 265-274
- Ostling, O. and Johanson K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Packer, L., 1984. Oxygen radicals in biological systems, Academic Pres Inc., 0-12-18200-X, Orlando, Florida, USA

- Paillaud, E., Costa S., Fages C., Plassat J.L., Rochette-Egly C., Monville C., 2002. Retinoic acid increases proliferation rate of GL-15 glioma cells, involving activation of STAT-3 transcription factor. *Journal of Neuroscience Research*, 67, 670–679.
- Pal S.L., Jana U., Manna P., Mohanta G.P., Manavalan R., 2011. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization; *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6); 228-234.
- Pangi, Z., Beletsi A., Evangelatos K. 2003. PEG-ylated nanoparticles for biological and pharmaceutical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 403- 419.
- Paralı, F., 1994. Etidum Bromidin (EtBr) *In Vitro* İnsan Lenfositlerine Etkisinin SCE Yöntemiyle Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Parhamifar, L., Andersen H. and Moghimi S.M., 2013. Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. *Drug Delivery and Nanomedicine Researchgate*, 13-22.
- Paris, D., Town T., Parker T.A., Tan J., Humphrey J, 1999. Inhibition of Alzheimer's b-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp Neurology*, 157, 211–221.
- Park, J.M., Nalwa K.S., Leung W., Constant K., Chaudhary S., Ho K.M., 2010. Fabrication of metallic nanowires and nanoribbons using laser interference lithography and shadow lithography. *Nanotechnology*, 21(21), 215301.
- Parry, K.D.V., 2000. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, 13(4), 40-44.
- Patterson, A.L., 1939. The scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>.
- Pendse, A. A., Arbones-Mainar J. M., Johnson L. A., Altenburg M. K., and Maeda N., 2009. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *Journal of Lipids Research*, 50, 178–182.
- Péré-Brissaud A., Blanchet X., Delourme D., Pélissier P., Forestier L., Delavaud A., Duprat N., Picard B., Maftah A., Brémaud L., 2015. Expression of SERPINA3s in cattle: focus on bovSERPINA3-7 reveals specific involvement in skeletal muscle. *Open Biology*, 5(9), 150071.
- Perez-Rodriguez, L., Mougeot F., and Alonso-Alvarez C., 2010. Carotenoid-based coloration predicts resistance to oxidative damage during immune challenge. *Journal of Experimental Biology*, 213(10), 1685–1690.
- Peron, R., Vatanabe I.P., Manzine P.R., Camins A., and Cominetti M., 2018. Alpha-secretase ADAM10 regulation: Insights into Alzheimer's disease treatment. *Pharmaceuticals*, 11 (1), 2-19.
- Phillips, M. C., 2014. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*, 66(9), 616–623.
- Pokropivny, V.V., and Skorokhod V.V., 2007. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*, 27(5-8), 990-993.
- Polakovic, M., Gorner T., Gref R., Dellacherie E. 1999. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. Modelling of drug release. *Journal of Controlled Release*, 60(2-3), 169 -177.

- Poole, C.P., Jones F.J., Owens F.J., 2003. Introduction to nanotechnology. John Wiley and Sons Interscience, New York, United States, 388.
- Powers, K. W., Carpinone P.L., and Siebein K.N., 2012. "Characterization of nanomaterials for toxicological studies." *Methods in Molecular Biology*, 926, 13-32.
- Pradhan, D., and Leung K.T., 2008. Vertical growth of two-dimensional zinc oxide nanostructures on ITO-coated glass: Effects of deposition temperature and deposition time. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(5), 1357–1364.
- Qiao, S. Z., Liu, J., Lu, G. Q. M., 2011. Synthetic chemistry of nanomaterials in modern inorganic synthetic chemistry. Amsterdam: Elsevier.
- Quideau, S., Deffieux D., Douat-Casassus C., and Pouysegu L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie—International Edition*, 50(3), 586–621.
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann E., Fessi H., Doelker E., 1998. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12), 1113-1128.
- Raber, J., Wong D., Buttini M., Orth M., Bellosta S., Pitas R.E., Mahley R.W., Mucke L., 1998. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10914-9.
- Rager, J.E., 2015. Chapter 8- The role of apoptosis-associated pathways as responders to contaminants and in disease progression. *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*, 187-205.
- Ramakrishnan, V., Kumar S.G., and Govindaraju S., 2011. Cytogenetic analysis of micronuclei, sister chromatid Exchange and chromosomal aberrations in pan masala chewers. *International journal of pharma and bio sciences*, 2(3), 122-134.
- Rao, A. V. and Rao L. G., 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216.
- Rasel M. A. I., 2017. Experimental exploration of boron nitride nanoparticle interaction with living cells. PhD thesis, Queensland University of Technology.
- Redhead, H M., Davis SS. and Illum L. J.2001. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 353-363.
- Renn, O, Roco M.C., 2006. Nanotechnology and the need to risk governance. *Journal Nanoparticle Research*, 8, 153-191.
- Riss, T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L., 2013. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. Bethesda, MD, USA: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Robinson, S.R. and Bishop G.M., 2002. Abeta as a biofloculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging*, 23, 1051-1072.
- Roco M.C. 2003. Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. *Curr Opinion Biotechnology*, 14 (3), 337-346.
- Roco M.C., 2004. The US national nanotechnology initiative after 3 years (2000-2003). *Journal Nanoparticle Research*, 6(1), 1-10.

- Roco, M.C. and Bainbridge W.S. (eds), 2001. Societal implications of nanoscience and nanotechnology. Boston: Kluwer Academic Publ. Also available at <http://www.wtec.org/loyola/nano/NSET.Societal.Implications>.
- Roco, MC., Williams R. S., 2001. Societal implications of nanoscience and nanotechnology. Bainbridge National Science Foundation, Arlington, Virginia, USA.
- Roco, MC., Williams R. S., Alivisatos P., 2000. (Eds): Biological, medical and health applications. In Nanotechnology Research Directions, Boston: Kluwer Academic Publishers, USA.
- Ronning, C., Dreher E., Feldermann H., Gross M., 1997. Electrical properties and thermal stability of ion beam deposited BN thin films. *Diamond and Related Materials*, 6(9), 1129-1134.
- Rosser, B.G., AND Gores G.J., 1995. Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology*, 108(1), 252–275.
- Roszek, B., Jong W.H., Geertsma R.E., 2005. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. *National Institute for Public Health and Environment*, 65-72.
- Sabbioni, M., 2005. In vitro toxicology of nanoparticles. Paper presented at the Proceedings of the Workshop: Research Needs on Nanoparticles.
- Sadigh-Eteghad, S., Talebi M., Farhoudi M., 2014. β -Amyloid exhibits antagonistic effects on alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in orchestrated manner. *Journal of Medical Hypotheses Ideas* 8(1),49–52.
- Sagar, R., Deore A.B., Patil S., Bhalgat C.M., 2011. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19, 129–141.
- Sahoo, S.K., Parveen S., MS., Panda J.J., MS., 2007. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3 (1), 20–31.
- Salah, N., Habib S. S., Khan Z. H., Memic A., Azam A., Alarfaj E., Al-Hamedi S., 2011. High-energy ball milling technique for ZnO nanoparticles as antibacterial material. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 863.
- Salata, O., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(3), 1-6.
- Salles, V., Bernard S., Chiriac R., Miele P., 2011. Structural and thermal properties of boron nitride nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(2012), 1867-1871.
- Sano, N., Wang H., Chhowalla M., Alexandrou I., Amaratunga G.A.J., 2001. Synthesis of carbon ‘onions’ in water. *Nature*, 414 (6863), 506–507.
- Saraiva, A.M., Cardoso I., Saraiva M.J., Tauer K., Pereira M.C., Coelho M.A., Möhwald H., Brezesinski G., 2010. Randomization of amyloid- β -peptide(1-42) conformation by sulfonated and sulfated nanoparticles reduces aggregation and cytotoxicity. *Macromolecular Bioscience*, 10(10), 1152-63.
- Saraste, A., and Pulkki, K., 2000. "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537.
- Sathya, M., Premkumar P., Karthick C., Moorthi P., Jayachandran K.S., Anusuyadevi M., 2012. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 171–178.

- Sayes, C. M., Fortner J. D., Guo W., Lyon D., Boyd A. M., Ausman K. D., Hughes J. B., 2004. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters*, 4(10), 1881-1887.
- Schins, R.P., Duffin R., Hohr D., 2002. Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chemical Research Toxicology*, 15(3), 1166–1173.
- Schlesinger, R.B., 1995. Toxicological evidence for health effects from inhaled particulate pollution: does it support the human experience? *Inhal Toxicology*, 7, 99–109.
- Scholes, P.D., Coombes A.G., Illum L., Davis S.S., Wats J.F., Ustariz C., Vert M., Davies M.C. 1999. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *Journal of Controlled Release*, 59(3), 261 - 278.
- Schrand, A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F., 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Nanomedical of Nanobiotechnology*, 2(4), 544–568.
- Scott, N, and Chen H., 2013. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*, 9(1), 17-18.
- Scott, N.R., and Chen H., 2002. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. Roadmap Report of National Planning Workshop. Washington, DC.
- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Review*, 81, 741–766.
- Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M. G., Whaley J., Swindlehurst C., McCormack R., Wolfert R., Selkoe D. J., Lieberburg I. and Schenk D., 1992. *Nature*, 359, 325-327.
- Shah, S.U., 2012. Importance of genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2), 43-54.
- Shankar, G.M., Li S., Mehta T.H., 2008. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(5), 837–842.
- Shankar, G.M., Walsh D.M., 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Molecular Neurodegener*, 4(1), 48–61.
- Sharma, A.H.P, Jain P., and Amit P., 2014. Apoptosis (Programmed cell death)- a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (4), 1854-1872.
- Sharma, V.K., Yngard R.A., Lin Y., 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2), 83–96.
- Shaw, S.Y., Westly E.C., Pittet M.J., Subramanian A., Schreiber S.L., Weissleder R., 2008. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity. *Proceeding of the National Academy Science*, 105(5), 7387–7392.
- Shelton, D.C., Samuel A.W. and Gregory M.L., 2007. Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion. Biotechnology*, 18(1), 26–30.
- Shen, C.L., Fitzgerald M.C., Murphy R.M. 1994. Effect of acid predissolution on fibril size and fibril flexibility of synthetic β -amyloid peptide. *Biophysical Journal*, 67(3), 1238–1246.

- Shetti, A., Keluskar V., and Aggarwal A., 2009. Antioxidants: enhancing oral and general health. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 21(1), 1–6.
- Shi, H.G., Farber L., Michaels J.N., Dickey A., Thompson K.C., Shelukar S.D., Hurter P.N., Reynolds S.D., Kaufman M.J., 2003. Characterization of crystalline drug nanoparticles using atomic force microscopy and complementary techniques. *Pharmaceutical Research*, 20(5), 479–484.
- Shi, C., Zhao L., Zhu B., Li Q., Yew D.T., Yao Z., Xu J., 2009. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chemico-Biological Interactions*, 181(1), 115–123.
- Shin, W.G., Calder S., Ugurlu O., Girshick S., 2011. Production and characterization of boron nanoparticles synthesized with a thermal plasma system. *Journal Nanoparticles Research*, 13, 7187–7191.
- Shu, W., and Li P., 2016. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in cell and development biology*, 4(89), 1–11.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
- Sindhi, V., Gupta V., Sharma K., Bhatnagar S., Kumari R., and Dhaka N., 2013. Potential applications of antioxidants a review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(1), 828–835.
- Singh, B., Kaur G., Singh P., Singh K., Kumar B., Vij A., Kumar A., 2016. Nanostructured boron nitride with high water dispersibility for boron neutron capture therapy. *Scientific Reports*, 6(1).
- Singh, N.P., Danner D.E., Tice R.R., Brant L. and Schneider E.L., 1990. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology. *Mutation Research*, 37(1), 123.
- Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Singh, S., Shi T., Duffin R., 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(2), 141–151.
- Sipe J.D., and Cohen A., 2000. Review: History of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*, 130, 88–98.
- Skorokhod, V.V., Ragulya A., Uvarova I., 2001. *Physico-chemical kinetics in nanostructured systems*. Kyiv: Academperiodica, 180.
- Sliwka, L., Wiktorska K., Suchocki P., Milczarek M., Mielczarek S., Lubelska K., Cierpial T., Kielbasinski P., Jaromin A., Flis A., Lyzwa P., Chilmonczyk Z., 2016. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *Plos One*, 12(2), 1–17.
- Smith, A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X., 2006. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Review Molecular Diagnostics*, 6 (2), 231–244.

- Song, C.X., Labhasetwar V., Murphy H., Qu X., Humphrey W.R., Shebuski R.J., Levy R.J., 1997. Formulation and characterization of iodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal Control Release*, 43(1), 197- 212.
- Song, Q., Huang M., Yao L., Wang X., Gu X., Chen J., Chen J., Huang J., Hu Q., Kang T., Rong Z., Qi H., Zheng G., Chen H., Gao X., 2014. Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nanotechnology*, 8(3), 2345-59.
- Sperandio, S., Belle I., Bredesen D.E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *PNAS*, 97(26), 14376-14381.
- Su, B., Wang X., Nunomura A., Moreira P.I., Lee H., Perry G., Smith M.A., and Zhu X2008. Oxidative stress signaling in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 5(6), 525–532.
- Suh, W.H., Suslick S.K, Stucky D., Hun S., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87(3), 133–170.
- Suh, Y.H. and Checler F.R., 2002. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and β -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease, *Pharmacological Reviews*, 54, 469–525.
- Sukhorukova, I. , Zhitnyak I., Kovalskii A., Matveev A., Lebedev O., Li X., Gloushankova , and Shtansky D. 2015. Boron nitride nanoparticles with a petal-like surface as anticancer drug-delivery systems. *Applied Materials and Interfaces*, 7 (31), 17217–17225
- Sung, W. P., Tsai, T. T., Wu, M. J., Wang, H. J., Surampalli, R. Y., 2010. Removal of indoor airborne bacteria by nano-Ag/TiO₂ as photocatalyst: Feasibility study in museum and nursing institutions. *Journal of Environmental Engineering*, 137(3), 163–170.
- Takeuchi, H., Yamamoto Y., 2001. Mucoadhesive nanoparticulate system for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 39-54.
- Tang, P., Hung M.C., Klostergaard J., 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35, 8216–8225.
- Tanzi, R.E. and Bertram L., 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*, 32(2), 181–184.
- Taşcıoğlu, S., 1992. Bor ve Silisyum kimyası. Marmara Üniversitesi: Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Matbaa Birimi, 1, 181.
- Tayeb, H.O., Yang H.D., Price B.H., Tarazi, F.I., 2012. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(1), 8–25.
- Tejs, S., 2008. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 4(1), 7-14.
- Templeton, A.C., Wuelfing W.P., Murray R.W., 2000. Monolayerprotected cluster molecules. *Account of Chemical Research*, 33 (1), 27–36.
- Tepedelen, B. E., Soya E., Korkmaz M., 2016. Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological Trace Element Research*, 174(2), 309–318.
- Teplow, D. B., 1998. Amyloid. *International of Journal Experiment Clinical Investigation*, 5, 121-142.

- Thareja, S., Zhu M., Ji X., and Wang B., 2017. Boron-based small molecules in disease detection and treatment (2013–2016). *Heterocyclic Communications*, 23(3): 137–153.
- Thinakaran, G., Koo, E.H., 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biology and Chemical* 283, 29615–29619.
- Tian N., Zhou Z.Y., Sun S.G., Ding Y., Wang Z.L., 2007. Synthesis of tetrahedral platinum nanocrystals with high-index facets and high electro-oxidation activity. *Science*, 316, 732–735.
- Tice, T.R., Gilley R.M., 1985. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by solvent- evaporation process. *Journal of Controlled Release*, 2, 343–352.
- Tiwari J., Tiwari R., Kim K.S., 2012. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(2), 724–803.
- Tokyay, N., 1999. “*Helicobacter pylori*” enfeksiyonu ve uygulanan eradikasyon tedavisinin genotoksisite üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tomalia, D.A., Reyna, L.A., Svenson, S., 2007. Dendrimers as multi- purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. *Biochemical Society Transactions*, 35 (1), 61–67.
- Tomii, Y., 2002. Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 8(6), 467–474.
- Townsend, M., Shankar G.M., Mehta T., 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *The Journal of Physiology*, 572, 477–492.
- Trump, B.F., Berezsky I.K., Chang S.H., Phelps P.C., 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathology*, 25 (21), 82–88.
- Uboldi, C., Giudetti G., Broggi F., Gilliland D., Ponti J. and Rossi F., 2012. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat Research*, 745, 11–20.
- Uo, M., Tamura K., Sato Y., Yokoyama A., Watari F., Totsuka Y., Tohji K., 2005. The cytotoxicity of metal-encapsulating carbon nanocapsules. *Small*, 1(8-9), 816–819.
- Ustinov, V. M., Zhukov A. E., Kovsh A. R., Mikhrin S. S., Maleev N. A., Volovik B. V., Bimberg, D., 2000. Long-wavelength quantum dot lasers on GaAs substrates. *Nanotechnology*, 11(4), 397–400.
- Valko, M., Morris H, Mazur M, Rapt P., and Bilton R.F., 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the etiology of colon cancer? *Biochimica et Biophysica Acta* 1527(3), 161–166.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe T., Krysko D.V., Festjens N., and Vandenabeele P., 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine*, 8(3), 207–220.
- Varadarajan, S., Yatin S., Aksenova M., and Butterfield D.A., 2000. Review: Alzheimer ‘s amyloid β - peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *Journal of Structural Biology* 130 (2-3), 184–208.

- Vel, L., Demazeau G., Etourneau J. 1991. Cubic boron nitride: synthesis, physicochemical properties and applications. *Materials Science and Engineering*, 10(2), 149-164.
- Vemuri, S., Rhodes, C.T., 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70 (2), 95-111.
- Viswanathan, S. S., Han C., Kelvin W.K., 2010. Nanotechnology in biomedical applications: a review. *International Journal of Nano and Biomaterials*, 3(2), 119-125.
- Waller A., Pipkorn D., Sutton K. L., Linderman J. J., Omann G. M., 2001. Validation of flow cytometric competitive binding protocols and characterization of fluorescently labeled ligands. *Cytometry*, 45(2), 102–114.
- Walsh, D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J. and Teplow D.B., 1999. Amyloid β -protein fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (36), 25945-25952.
- Wang, C., Wang Z., 2015. Studying the relationship between cell cycle and Alzheimer's disease by gold nanoparticle probes. *Anal Biochemical*, 15, 489, 32-37.
- Wang, P., Kouyoumdjian H., Zhu D.C., Huang X., 2015. Heparin nanoparticles for β amyloid binding and mitigation of β amyloid associated cytotoxicity. *Carbonhydrate Research*, 20(405), 110-114.
- Wang, Z., Ruan J., Cui D., 2009. Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. *Nanoscale Research Letters*, 4(1), 593-605.
- Wegner T. H., Winandy J. E., Ritter M. A., 2005. Nanotechnology opportunities in residential and non-residential construction. in '2 nd International Symposium on Nanotechnology in Construction, Bilbao, Spain.
- Westermarck P., 2005. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides, *The FEBS Journal* 1, 272, 5942–5949.
- Westermarck, P., Benson M.D., Buxbaum S.N., 2005. Nomenclature committee of the international society of Amyloidosis. Amyloid : tomoral terminology clasification Report from the Nomenclature. Committee of the international Society of Amyloidosis, 12, 1-4.
- White, P.A.S., Oliveira R.C.M., Oliveira A.P., Serafini M.R., Araújo A.S., 2014. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: A systematic review. *Molecules*, 19, 14496-14527.
- Williams D., 2008. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials*, 29(12), 1737-1738.
- Williams, D.B., 1996. Transmission electron microscopy, a textbook for material science, plenum press. New York and London.
- Wood, S., Jones R., Geldart A., 2003. The Social and economic challenges of nanotechnology. The Economic and Social Research Council, Swindon, UK.
- Wu, M., Ding H.F., Fisher D., 2001. Apoptosis: Molecular mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Wu, D., and Cederbaum A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research Health*, 27(4), 277-284
- Xia, Y., Gates B., Yin Y., Lu Y., 2000. Monodispersed colloidal spheres: old materials with new applications. *Advanced Materials*, 12 (10), 693–713.

- Xing, M., 2012. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 19(1), 7–11.
- Xiong, C., and Tu W., 2014. Synthesis of water-dispersible boron nitride nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2014 (19), 3010-3015.
- Xiong, N., Zhao Y., Dong X., Zheng J., Sun Y., 2017. Design of a Molecular Hybrid of Dual Peptide Inhibitors Coupled on AuNPs for Enhanced Inhibition of Amyloid β -Protein Aggregation and Cytotoxicity. *Small*, 13(13), 1601666.
- Xu, S., Zhong M., Zhang L., Wang Y., Zhou Z., Hao Y., Zhang W., Yang X., Wei A., Pei L., Yu Z., 2009. Overexpression of Tfam protects mitochondria against β -amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *FEBS Journal*, 276(14), 3800–3809.
- Xu, T., Zhang N., Nichols H.L., Shi D. and Wen X., 2007. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering*, 27(3), 579–594.
- Yang, C.Y.T., 2017. Chapter 8 - transmission electron microscopy (TEM). *Membrane Characterization*, 145-159.
- Yin J., 2007. Chemical engineering and virology: challenges and opportunities at the interface. *Am Inst Chem Eng (AIChE) Journal*, 53 (9), 2202-2209
- Yoshikawa, T., and Naito Y., 2002. What Is Oxidative Stres. *Japan Medical Association Journal*, 45(7), 271–276.
- Zeiss, C.J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 40(5), 481–495.
- Zhang, J., Zhou X., Yu Q., Yang L., Sun D., Zhou Y., Liu J., 2014. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-stabilized selenium nanoparticles coated with Tet-1 peptide to reduce amyloid- β aggregation and cytotoxicity. *ACS Applied Materials Interfaces*, 6(11), 8475-8487.
- Zhang, L., Granick S., 2006. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). *Nano Letters*, 6 (4), 694–698.
- Zhang, Q.W., Kusaka Y., Sato K., Nakakuki K., Kohyama N., Donaldson K., 1998. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *Journal of Toxicology and Enviromental Health*, 53(2), 423–438.
- Zhang, R., Yang D., Zhou C., Cheng K., Liu Z., Chen L., Fang L., Xie P., 2012. β -actin as a loading control for plasma-based Western blot analysis of major depressive disorder patients. *Analytical Biochemistry*, 472(2), 116-120.
- Zhang, X., Li Y., Xu H., and Zhang Y., 2014. The γ - secretase complex: from structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 427.
- Zhao, L.N., Long H., Mu Y., Chew L.Y., 2012. The toxicity of amyloid β oligomers. *International Journal of Molecular Science*, 13(6), 7303-7327.
- Zong, R.L., Zhou J., Li B., Fu M., Shi S.K., Li L.T., 2005. Optical properties of transparent copper- nanorod and nanowire arrays embedded in anodic alumina oxide. *Journal of Physical Chemical*, 109(5), 24326-24330.

ÖZGEÇMİŞ

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