

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖK HÜCRELERDE OLASI DNA HASARI  
VE ONARIMININ İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz.Tuğbagül ÇAL**

**Farmasötik Toksikoloji Programı**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ankara**

**2016**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖK HÜCRELERDE OLASI DNA HASARI  
VE ONARIMININ İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz.Tuğbagül ÇAL**

**Farmasötik Toksikoloji Programı**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof.Dr.Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

**Ankara**  
**2016**

**Kök Hücrelerde Olası DNA Hasarı ve Onarımının İn Vitro Değerlendirilmesi****Ecz. Tuğbagül ÇAL**

Bu çalışma 19.12.2016 tarihinde, jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



Üye: Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



Üye: Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ  
*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*



Üye: Doç. Dr. Sevtap AYDIN  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

**ONAY**

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Diclehan ORHAN  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

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

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

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

o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

26 /12/2016



Ecz. Tuğbağül ÇAL

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Ünvanı, Adı SOYADI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Tuğbagül ÇAL



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecinde yol gösterici tecrübe, bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her anlamda yardımcı olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecinde ve çalışmalarımnda bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan değerli hocam Doç. Dr. Sevtap AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecindeki emekleri nedeniyle anabilim dalımızdaki değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Samimiyeti, nadide dostluğu ve her konudaki desteğini daima hissettiğim sevgili araştırma görevlisi arkadaşım Uzm. Ecz. Ünzile SUR'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Dostlukları ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan anabilim dalımızdaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini daim hissettiğim, her zaman yanımda olan, yaşadığım zorluklara katlanmamı sağlayan ve başarılarımın mimarı sevgili anne ve babam Münevver - Erol ÇAL'a, kardeşlerim M. Furkan - Fatih ÇAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Çal, T. Kök hücrelerde olası DNA hasarı ve onarımının *in vitro* değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016.** Kök hücreler, ksenobiyotiklerin hücre canlılığına, farklılaşma sürecine ve hücre fonksiyonları üzerine etkilerinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* yöntemlere uygun bir alternatiftirler. Kemik iliği kök hücrelerinden CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör kök hücreleri, olası sitotoksik ve genotoksik etkilerin değerlendirilmesi, bu hücrelerin kan hücrelerine farklılaşması ve kemik iliği hastalıklarının teşhis, tedavi süreçlerine katkı sağlanması açısından önemlidir. Bu tezde, olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, yaygın olarak kullanılan fakat biyouyumluluğu hakkında yeterli bilgi bulunmayan boron nitrit nanotüpleri ve antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral özellikleri nedeniyle tedavide sıklıkla kullanılan fenolik bileşik kurkumin seçilmiştir. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin HeLa (insan serviks adenokarsinoma) hücrelerindeki olası sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle, CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör kök hücrelerindeki genotoksik etkileri ise COMET yöntemiyle değerlendirilmiştir. Boron nitrit nanotüplerinin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkisinin olmadığı ve 50-100 µg/ml ile 400-600 µg/ml doz aralıklarında hücre canlılığını artırdığı, kurkuminin ise artan doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Birlikte uygulandıklarında ise hücre için en uygun doz aralığının 50-100 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör kök hücrelerindeki genotoksik etkileri incelendiğinde ise boron nitrit nanotüplerinin hücrelerde meydana getirdiği DNA hasarı ile uygulanan doz arasında bir korelasyon saptanmamış, fakat kurkuminin artan dozuna bağlı olarak hücrelerde meydana getirdiği DNA hasarının 30 dakika inkübasyonda azalırken, 24 saat inkübasyon sonunda arttığı tespit edilmiştir. Birlikte uygulandıklarında ise, tek başına uygulamalarına göre DNA hasarının genel olarak daha az olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik iliği CD34<sup>+</sup> kök hücresi, boron nitrit, kurkumin, comet yöntemi, oksidatif DNA hasarı, oksidatif DNA hasar onarımı.

## ABSTRACT

**Çal,T. In vitro assessment of DNA damage and reparation in stem cells. Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2016.** Stem cells provide an opportunity to analyse the effects of xenobiotic on cell viability, differentiation and cell functions. For this reason, it is suitable alternative for *in vitro* and *in vivo* methods. Evaluation of the possible cytotoxic and genotoxic effects on bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor stem cells is important for differentiation property of these cells into blood cells, and also for the diagnostic and the treatment processes of bone marrow diseases. In this thesis, boron nitride nanotubes which are commonly used but there is not enough information about its biocompatibility and curcumin which is being used frequently in treatment processes for antioxidant, antimicrobial, antiviral properties for a long time are selected to evaluate cytotoxic and genotoxic effects. The possible cytotoxic and genotoxic effects of boron nitride nanotubes and curcumin on bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor stem cells were evaluated by MTT assay and COMET assay, respectively. Boron nitride nanotubes showed no significant cytotoxic effects on HeLa (human cervix adenocarcinoma) cells at the concentrations of 10-600 µg/ml and increased cell viability at 50-100 µg/ml and 400-600 µg/ml. Curcumin decreased cell viability proportionally with concentration. When they were used together, 50-100 µg/ml concentrations were suitable for cell viability. When the genotoxic effects of boron nitride nanotubes and curcumin were investigated, it is found that boron nitride nanotubes showed no correlation for concentration and DNA damage. Curcumin decreased DNA damage at high concentrations after 30 minutes of incubation and increased the damage after 24 hours of incubation. When they both took place in action, the DNA damage was lower than the single dosage groups of boron nitride nanotubes and curcumin.

**Key Words:** Bone marrow CD34<sup>+</sup> stem cell, boron nitride, curcumin, comet method, oxidative DNA damage, oxidative DNA damage reparation.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                          |       |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| ONAY SAYFASI                                                             | iii   |
| YAYIMLAMA VE FİKİR MÜLKİYET HAKLARI BEYANI                               | iv    |
| ETİK BEYAN SAYFASI                                                       | v     |
| TEŞEKKÜR                                                                 | vi    |
| ÖZET                                                                     | vii   |
| ABSTRACT                                                                 | viii  |
| İÇİNDEKİLER                                                              | ix    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                                                  | xiii  |
| ŞEKİLLER                                                                 | xvii  |
| TABLolar                                                                 | xviii |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                          | 1     |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                                 | 3     |
| 2.1. Kök Hücre Tanımı ve Sınıflandırması                                 | 3     |
| 2.2. Bölünme, Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması   | 3     |
| 2.3. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Sınıflandırması                         | 4     |
| 2.4. Kemik İliği Yapısı ve Kemik İliği Kök Hücreleri                     | 5     |
| 2.5. Hematopoetik Kök Hücre                                              | 5     |
| 2.5.1. Osteoblastik Niş                                                  | 6     |
| 2.5.2. Vasküler Niş                                                      | 7     |
| 2.6. Mezenkimal Kök Hücre                                                | 7     |
| 2.7. Genotoksik Etki Tanımı ve Kemik İliği Kök Hücreleri Açısından Önemi | 8     |
| 2.8. Hematopoetik Kök Hücrelerdeki Genotoksisite Çalışmaları             | 9     |
| 2.9. Mezenkimal Kök Hücrelerdeki Genotoksisite Çalışmaları               | 10    |
| 2.10. Nanopartikül Tanımı                                                | 12    |
| 2.10.1. Boron Nitrit Nanotüpleri                                         | 12    |
| 2.10.2. Boron Nitrit Nanotüplerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri     | 15    |
| 2.10.3. Boron Nitritin Kullanım Alanları                                 | 17    |
| 2.10.4. Boron Nitrit Nanotüplerinin Toksisitesi                          | 19    |
| 2.11. Fenolik Bileşikler                                                 | 21    |
| 2.12. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması                             | 21    |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.12.1. Fenolik Asitler                                                                                                                    | 21 |
| 2.12.2. Stilbenler                                                                                                                         | 22 |
| 2.12.3. Flavonoidler                                                                                                                       | 22 |
| 2.12.4. Diğerleri                                                                                                                          | 22 |
| 2.13. Fenolik Bileşik Kurkuminin Kaynağı ve Kullanımı                                                                                      | 23 |
| 2.14. Kurkuminin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri                                                                                          | 24 |
| 2.15. Kurkuminin Farmakokinetik Özellikleri                                                                                                | 25 |
| 2.16. Kurkumin Toksisitesi                                                                                                                 | 26 |
| 2.17. Kurkuminin Farmakolojik Etkileri                                                                                                     | 28 |
| 2.17.1. Antioksidan Etkileri                                                                                                               | 28 |
| 2.17.2. Antiinflamatuvar Etkileri                                                                                                          | 29 |
| 2.17.3. Antikanser Etkileri                                                                                                                | 30 |
| 2.17.4. Hepatoprotektif Etkileri                                                                                                           | 30 |
| 2.17.5. Antimikrobiyal, Antiviral ve Antibakteriyel Etkileri                                                                               | 31 |
| 2.18. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi                                                              | 32 |
| 2.19. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi                                                                                           | 32 |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                                                                  | 34 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler                                                                                                          | 34 |
| 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler                                                                                                           | 35 |
| 3.3. Kullanılan Çözeltiler                                                                                                                 | 37 |
| 3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Boron Nitrit Nanotüp Çözeltileri                                                                     | 37 |
| 3.3.2. Yapılan Analizlerde Kullanılan Kurkumin Çözeltileri                                                                                 | 37 |
| 3.3.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler | 38 |
| 3.3.4. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler                                        | 38 |
| 3.4. Yöntemler                                                                                                                             | 40 |
| 3.4.1. HeLa Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi         | 40 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2. İnsan Kemik İliği CD34 <sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi                                                                                                                                   | 42 |
| 3.4.3. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34 <sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerindeki DNA Hasarına Etkilerinin Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi ile İncelenmesi                                                                                   | 43 |
| 3.5. İstatistiksel Yöntemler                                                                                                                                                                                                                                                                   | 45 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             | 46 |
| 4.1. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular                                                                                                                                                                            | 46 |
| 4.1.1. Boron Nitrit Nanotüplerinin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular                                                                                                                                                                        | 46 |
| 4.1.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular                                                                                                                                                                                         | 48 |
| 4.1.3. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular                                                                                                                                                             | 50 |
| 4.2. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin Genotoksisitesinin COMET Yöntemi ile Belirlenmesi                                                                                                                                                                                                  | 52 |
| 4.2.1. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34 <sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde 30 Dakikalık İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi | 52 |
| 4.2.2. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34 <sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde 24 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi   | 56 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             | 60 |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                    | 67 |

**7. KAYNAKLAR**

68

**8. ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| <b>3T3-L1</b>          | Fibroblast hücreleri                      |
| <b>μM</b>              | Mikromolar                                |
| <b>A549</b>            | Akciğer epitel hücresi                    |
| <b>ADI</b>             | <i>Acceptable Daily Intake</i>            |
| <b>ANOVA</b>           | Tek yönlü varyans analizi                 |
| <b>AP-1</b>            | β-katenin, aktif protein-1                |
| <b>ATP</b>             | Adenozin trifosfat                        |
| <b>Au</b>              | Altın                                     |
| <b>B</b>               | Bor                                       |
| <b>Bcl-2</b>           | Apoptoz düzenleyici                       |
| <b>BHA</b>             | Bütilhidroksianisol                       |
| <b>BN</b>              | Boron nitrit nanotüpleri                  |
| <b>BNNT</b>            | Boron nitrit nanotüpleri                  |
| <b>Brca2</b>           | Tümör baskılayıcı gen                     |
| <b>C</b>               | Karbon                                    |
| <b>C2C12</b>           | Fare miyoblast hücresi                    |
| <b>CD</b>              | <i>Cluster of Differentiation</i>         |
| <b>Chk1</b>            | <i>Checkpoint Kinase 1</i>                |
| <b>Co</b>              | Kobalt                                    |
| <b>Cur</b>             | Kurkumin                                  |
| <b>CXCR4</b>           | Kemokin reseptör tip 4                    |
| <b>cm</b>              | Santimetre                                |
| <b>c-myc</b>           | Onkoprotein                               |
| <b>COX</b>             | Siklooksijenaz                            |
| <b>Comet</b>           | Tek hücre jel elektroforez yöntemi        |
| <b><sup>51</sup>Cr</b> | Krom                                      |
| <b>CYP3A4</b>          | Sitokrom P540 3A4                         |
| <b>Cx43</b>            | Konneksin 43                              |
| <b>DMEM</b>            | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| <b>DMSO</b>            | Dimetil sülfoksit                         |

|                                   |                                                             |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>DNA</b>                        | Deoksiribonükleik asit                                      |
| <b>DNA-PKcs</b>                   | DNA bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi              |
| <b>eV</b>                         | Elektronvolt                                                |
| <b>EDTA</b>                       | Etilen diamin tetraasetik asit, disodyum tuzu               |
| <b>EtBr</b>                       | Etidyum Bromür                                              |
| <b>FBS</b>                        | Yenidoğan Sığır Serumı                                      |
| <b>Fe</b>                         | Demir                                                       |
| <b>FHV</b>                        | <i>Feline herpesvirus</i>                                   |
| <b>FIPV</b>                       | <i>Feline infectious peritonitis virus</i>                  |
| <b>Flk-1</b>                      | <i>Fetal Liver kinase</i>                                   |
| <b>g</b>                          | Gram                                                        |
| <b>GRAS</b>                       | <i>Generally recognized as safe</i>                         |
| <b>H</b>                          | Hidrojen                                                    |
| <b>H-60</b>                       | İnsan promiyelositik lösemi                                 |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen peroksit                                           |
| <b>h-BNNT</b>                     | Hidroksillenmiş boron nitrit nanotüpleri                    |
| <b>HCl</b>                        | Hidroklorik asit                                            |
| <b>HDF</b>                        | İnsan dermal fibroblast                                     |
| <b>HEK293</b>                     | Embriyonik böbrek hücresi                                   |
| <b>HeLa</b>                       | İnsan serviks adenokarsinoma hücresi                        |
| <b>HepG2</b>                      | İnsan hepatosellüler karsinoma hücresi                      |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b>   | <i>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i>        |
| <b>HLA-DR</b>                     | İnsan lökosit antijen                                       |
| <b>Hus1</b>                       | <i>Checkpoint protein</i>                                   |
| <b>HUVEC</b>                      | İnsan umbilikal damar endotel hücresi                       |
| <b>HSV</b>                        | <i>Herpes simplex</i> virüs                                 |
| <b>IC50</b>                       | Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon         |
| <b>IL-6</b>                       | İnterlökin-6                                                |
| <b>IMDM</b>                       | <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>                  |
| <b>iNOS</b>                       | Nitrik oksit sentaz                                         |
| <b>JECFA</b>                      | <i>The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> |
| <b>JNK</b>                        | c-Jun NH(2)-terminal kinaz                                  |

|                           |                                                                      |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>kg</b>                 | Kilogram                                                             |
| <b>LD<sub>50</sub></b>    | Popölasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz                      |
| <b>LDH</b>                | Laktat dehidrojenaz                                                  |
| <b>LMPA</b>               | Düşük erime noktalı agar                                             |
| <b>LNCaP</b>              | Prostat kanser hücresi                                               |
| <b>LOX</b>                | Lipoksijenaz                                                         |
| <b>MCF-7</b>              | İnsan göğüs kanser hücresi                                           |
| <b>MRC-5</b>              | İnsan akciğer fibroblast hücresi                                     |
| <b>ml</b>                 | Mililitre                                                            |
| <b>m-BNNT</b>             | Karbohidrat bağı boron nitrit nanotüpleri                            |
| <b>miR-155-5p</b>         | Mikro ribonükleik asit                                               |
| <b>mRNA</b>               | Mesajcı ribonükleik asit                                             |
| <b>MTT</b>                | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür             |
| <b>MyoD</b>               | Miyojenik farklılaşma                                                |
| <b>N</b>                  | Azot                                                                 |
| <b>Na<sub>2</sub>EDTA</b> | Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu                        |
| <b>NaCl</b>               | Sodyum klorür                                                        |
| <b>NaOH</b>               | Sodyum Hidroksit                                                     |
| <b>NF-kB</b>              | Nükleer faktör kB                                                    |
| <b>NIH/3T3</b>            | Fare embriyo fibroblast hücresi                                      |
| <b>NK hücre</b>           | Doğal öldürücü hücre                                                 |
| <b>nm</b>                 | Nanometre                                                            |
| <b>NPMA</b>               | Normal erime noktalı agar                                            |
| <b>NOAEL</b>              | Yan etki gözlenmeyen doz ( <i>No observed adverse effect level</i> ) |
| <b>PBS</b>                | Fosfat tamponlu serum fizyolojik                                     |
| <b>PC12</b>               | Sıçan feokromatisoma hücresi                                         |
| <b>PIV-3</b>              | Human parainfluenza virüs tip 3                                      |
| <b>PPAR-γ</b>             | Peroksizom proliferetör aktive reseptör-γ                            |
| <b>RSV</b>                | Respiratuvar sinsitiyal virüs                                        |
| <b>p21</b>                | Siklin bağımlı kinaz inhibitörü-1                                    |
| <b>p53</b>                | Tümör protein 53                                                     |
| <b>Rad51</b>              | Rekombinaz                                                           |

|                                    |                                                                              |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RAW 264.7</b>                   | Fare makrofaj hücresi                                                        |
| <b>ROS</b>                         | Reaktif oksijen türleri                                                      |
| <b>rpm</b>                         | Dakikadaki devir sayısı                                                      |
| <b>SCF</b>                         | Kök Hücre Faktörü                                                            |
| <b>SDF-1</b>                       | <i>Stromal cell-derived factor-1</i>                                         |
| <b>SH-SY5Y</b>                     | İnsan nöroblastoma hücreleri                                                 |
| <b>SiO<sub>2</sub></b>             | Silisyum dioksit                                                             |
| <b>STAT3</b>                       | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>                    |
| <b>Stro-1</b>                      | <i>Stromal cell line antibody-1</i>                                          |
| <b><sup>99m</sup>Tc</b>            | Technetium                                                                   |
| <b>Thy-1</b>                       | Hücre yüzey antijeni                                                         |
| <b>Tie2</b>                        | Tirozin-protein kinaz reseptör                                               |
| <b>Ti<sub>2</sub>O</b>             | Titanyum dioksit                                                             |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>     | Tümör nekroz edici faktör alfa                                               |
| <b>T98</b>                         | İnsan glioblastoma hücresi                                                   |
| <b>U87</b>                         | İnsan glioblastoma hücresi                                                   |
| <b>U87MG</b>                       | İnsan glioblastoma hücresi                                                   |
| <b>UDP</b>                         | Üridin difosfat                                                              |
| <b>UV</b>                          | Ultraviyole                                                                  |
| <b>V<sub>7</sub>O<sub>16</sub></b> | Vanadyum oksit                                                               |
| <b>V79</b>                         | Çin hamster akciğer fibroblast hücresi                                       |
| <b>VSV</b>                         | <i>Vesicular stomatitis</i> Indiana virüs                                    |
| <b>WST-1</b>                       | <i>2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum</i> |
| <b>Xpa</b>                         | <i>Xeroderma Pigmentosum A</i>                                               |
| <b>Xpc</b>                         | <i>Xeroderma Pigmentosum C</i>                                               |
| <b>Xrcc2</b>                       | <i>X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 2</i>                            |
| <b><math>\mu</math>m</b>           | Mikrometre                                                                   |

## ŞEKİLLER

| Şekil                                                                                                                                                                                                                           | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. Çok duvarlı karbon nanotüplerinin yapısı.                                                                                                                                                                                  | 13    |
| 2.2. Tek duvarlı nanotüpler (a) koltuk tipi nanotüp, (b) zikzak yapan nanotüp, (c) kiral nanotüp.                                                                                                                               | 14    |
| 2.3. Grafen levhanın örgü vektörleri $a_1$ ve $a_2$ , nanotübün yuvarlanma eksenini ise $C_h$ ile gösterilen kiral eksenidir.                                                                                                   | 14    |
| 2.4. İçi dolu daireler bor atomunu, içi boş daireler azot atomunu temsil etmek üzere hegzagonal boron nitrit yapısında; O-A doğrusu B-B' doğrusuna gelecek şekilde sarıldığında boron nitrit nanotüpleri elde edilebilmektedir. | 16    |
| 2.5. Tek duvarlı boron nitrit nanotüplerinin zikzak, koltuk ve kiral modelleri.                                                                                                                                                 | 16    |
| 2.6. <i>Curcuma longa</i> Linn. bitkisi.                                                                                                                                                                                        | 23    |
| 2.7. Kurkumin bileşiğinin bis-keto ve enol formları.                                                                                                                                                                            | 24    |
| 2.8. Kurkuminin biyotransformasyon ürünleri.                                                                                                                                                                                    | 26    |
| 4.1. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüplerinin etkisi.                                                                                                                                   | 46    |
| 4.2. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde kurkuminin etkisi.                                                                                                                                                    | 48    |
| 4.3. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin etkisi.                                                                                                                        | 50    |
| 4.4. Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği $CD34^+$ hematopoetik progenitör hücrelerinde 30 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisi.                                            | 55    |
| 4.5. Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği $CD34^+$ hematopoetik progenitör hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisi.                                              | 59    |

## TABLOLAR

| Tablo                                                                                                                                                                                                            | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.1. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerine boron nitrit nanotüplerinin etkisi.                                                                                                                     | 47    |
| 4.2. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerine kurkuminin etkisi.                                                                                                                                      | 49    |
| 4.3. İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin etkisi.                                                                                                         | 51    |
| 4.4. Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34 <sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde 30 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisine ilişkin bulgular. | 54    |
| 4.5. Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34 <sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisine ilişkin bulgular.   | 58    |

## 1. GİRİŞ

Kök hücrelerin; uzun süre bölünebilme, kendilerini yenileme ve nöron, kardiyomiyosit, hepatosit gibi hücrelere farklılaşma özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda, yenileyici tedavide ve toksisite testlerinde önemli bir yeri vardır (1,2). Kök hücre temeline dayanan toksisite analizleri, ksenobiyotiklerin hücre canlılığına, farklılaşma sürecine ve hücre fonksiyonları üzerine etkilerinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. İn vivo ve in vitro toksisite test yöntemlerinde elde edilen bilgilerin insana uyarlanmasıdaki zorluklar, araştırmacıları kök hücre ve 3D kültür sistemlerinin kullanımına yönlendirmiştir (3).

Kemik iliği kök hücrelerindeki çalışmalar tıp alanındaki kullanımları sebebiyle 20. yy'da hız kazanmıştır. Kemik iliğindeki mikroçevre ve kök hücre çeşitliliği, mikroanalizler ve transgenik fare modelleri kullanılarak hücre yüzey antijenlerinin tanımlanmasıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır (4). Hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler bu çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kan hücrelerine kaynaklık eden hematopoetik kök hücrelerin ve osteosit, kondrosit, adiposit gibi hücrelere farklılaşan mezenkimal kök hücrelerin toksisite çalışmalarında kullanılmaları test materyalinin farklılaşma sürecine etkilerinin belirlenmesi açısından önemlidir (3). Özellikle, kemik iliğindeki uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler aracılığıyla kalıcı olabilecek genotoksik etkilerin incelenmesi anemi, kanser gibi hastalıkların tedavi edilmesi ve önlenmesi için gereklidir (5).

Nanomateryaller, boyutlarının küçük (1-100 nm) ve yüzey-hacim oranlarının büyük olmasına bağlı olarak reaktif, elektronik ve katalitik özellikleri nedeniyle tıp, tekstil, elektronik, tarım gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (6,7). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre farklı, çok sayıda nanomateryalden biri olan boron nitrit nanotüpleri de yüksek Young modülü, oksidasyona dayanıklılık, termal iletkenlik gibi üstünlükleriyle geniş kullanım alanına sahiptir (8,9). Biyolojik inert olmaları nanovektör olarak klinik ve biyomedikal uygulamalarda kullanımlarına olanak sağlayabilir. Ancak, boron nitrit nanotüplerinin biyolojik sıvılardaki çözünürlük problemi nanotüplerin polimer kaplama, kimyasal modifikasyonlar uygulama gibi işlemlere tabi tutulmasını gerektirmektedir (10).

Antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkileri nedeniyle Hint ve Çin geleneksel tıp uygulamalarında kullanımı bulunan fenolik bileşik kurkuminin biyoyararlanımını artırmak amacıyla kurkumin içeren nanopartikül formülasyonları kullanılmaktadır (11,12). Boron nitrit nanotüplerinin, kurkuminin biyolojik etkilerinden faydalanılmasında uygun bir formülasyon maddesi olma potansiyeli mevcuttur.

Toksisite testlerinin vazgeçilmez bir parçası halindeki hayvan deneylerine uygun bir alternatif olabilecek kök hücrelerin sitotoksisite ve genotoksisite mekanizmalarının anlaşılması, boron nitrit nanotüpleri ile kurkuminin biyolojik sıvılardaki çözünürlüklerini artırmak amacıyla uygun formülasyonun geliştirilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, boron nitrit nanotüplerinin biyoyumluluğunun değerlendirilmesi ve kurkumin bileşiği ile kombine uygulanması durumunda kemik iliği kök hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin MTT ve COMET yöntemleriyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücre Tanımı ve Sınıflandırması

Kök hücreler; aktif telomeraz enzim aktivitesi sayesinde uzun süre bölünebilen hücrelerdir. Diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan, en az bir benzer hücre oluşturabilme (self renewal) yeteneğindedirler. Uygun sinyaller aldıklarında bir veya birden fazla hücre serisine farklılaşabilir (multi-lineage differentiation) ve işlevsel olarak bir dokuyu yeniden yapılandırabilirler (13-16).

Kök hücreler; bölünme, farklılaşma özellikleri ve kaynaklarına göre olmak üzere temel olarak iki farklı şekilde sınıflandırılabilir.

### 2.2. Bölünme, Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

Bölünme, farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş grup altında toplanabilir.

Totipotent kök hücreler; embriyo, embriyo sonrası bütün doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları oluşturan, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir (17). Zigot ve erken embriyo döneminde 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotent özelliktedir (14,18). Memelilerde bir totipotent kök hücre yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren karmaşık bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir (19).

Pluripotent kök hücreler; fertilizasyonun 5. gününde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan ve blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir (13). Bu hücreler işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar; fakat gerekli ortam sağlandığında ektoderm, mezoderm ve endodermden köken alan farklı hücre çeşitlerine farklılaşabilirler (13,20).

Multipotent kök hücreler; embriyonik gelişmenin ilerleyen evrelerine ait hücrelerdir. Özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve yer aldıkları dokunun hücre tipini üreten erişkin kök hücrelerine dönüşürler (13,20). Kas, kemik, kıkırdak, yağ, bağ ve destek dokularını oluşturabilme kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücreler özellikli multipotent kök hücre tipidir (19).

Oligopotent kök hücreler ise bir doku içindeki iki ya da daha fazla hücre dizisini oluşturabilen kök hücrelerdir. Beyindeki bir nöron alt dizisini oluşturabilen nöral kök hücreler veya miyeloid kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir (18,21).

Unipotent kök hücreler; sadece bir seriye ait hücreleri oluşturabilen kök hücrelerdir ve kas kök hücreleri ile hematopoetik kök hücreler tipik örnekleridir (18,22).

### **2.3. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Sınıflandırması**

Kaynaklarına göre kök hücre sınıflandırması temel olarak embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler (yetişkin kök hücresi) şeklinde iki grup altında toplanmaktadır (23).

Embriyonik kök hücreler, blastosist evresindeki 5-6 günlük memeli embriyosunun iç hücre kitlesinden elde edilen ve embriyodaki tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip, pluripotent özellikteki hücrelerdir (23-27). Blastosist; trofoektoderm denilen ve sonrasında plasenta ile destek dokuları meydana getiren dış hücre tabakasını, fetal yapıyı oluşturan iç hücre kitlesini içerir (14,28). Teratokarsinomlardan elde edilen embriyonik karsinoma ile primordiyal germ hücrelerinden elde edilen embriyonik germ hücreleri bu hücre grubunda yer alır (29,30).

Embriyonik olmayan ya da yetişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücrelerin çevresinde bulunan, kendini yenileme ve köken aldıkları dokunun çeşitli hücrelerine farklılaşma yeteneğindeki multipotent veya unipotent özellikteki hücrelerdir (31). Bazı çalışmalarda yetişkin kök hücrelerinin pluripotent özelliğe de sahip olabilecekleri görülmüştür (32,33). En çok bilinen örnekleri hematopoetik kök hücreler olmakla birlikte karaciğer, gastrointestinal sistem, deri, kan damarları gibi bölgelerde bulundukları belirlenmiş (34,35) olan bu hücreler hasarlı dokunun onarımından ve doku homeostazının sürdürülmesinden sorumludur (36).

### **2.4. Kemik İliği Yapısı ve Kemik İliği Kök Hücreleri**

Kemik iliği, uzun ve aksiyal kemiklerin merkezindeki boşluklarda yer alır ve trabeküler kemikteki vasküler sinüslerin çevrelediği adipoz hücreleri ile hematopoetik

doku adalarını içerir (37). Kemik iliği mikroçevresinde makrofaj, adiposit, fibroblast, retiküler endotelyal hücreler ve osteojenik prekürsör hücreler bulunmaktadır (38).

Kemik iliği kök hücreleri; miyokard, kalp kapakçığı, damar, hasarlı kemik, tendon, kıkırdak, menisküs ve deri gibi dokuların onarım ve yenilenmesine katkıda bulunur. Bu hücreler hematopoetik ve mezenkimal kök hücreleri olmak üzere iki grup kök hücre içermektedir (39). Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler stromal hücrelerle çevrili halde ve trabeküler bölgede bulunur, olgunlaştıklarında vasküler sisteme geçer; mezenkimal kök hücreler de kemik boşluğunda yer alır ve kondrosit, osteoblast, fibroblast, adiposit gibi stromal hücreleri meydana getirir (40-42).

## 2.5. Hematopoetik Kök Hücre

Hematopoez organizmanın embriyonik ve yetişkin düzeyde kan hücresi oluşturmasını tanımlar ve hematopoetik kök hücrenin gelişim, kendini yenileme, farklılaşma süreçlerini kapsar (43). Yetişkin kök hücre tiplerinden biri olan hematopoetik kök hücreler tüm kan hücrelerine kaynaklık etmektedir (44). Kök hücreler, progenitör ve farklılaşmış hücrelerden oluşan hematopoetik sistem, günde  $2 \times 10^{11}$  ve ortalama bir insan ömrü boyunca  $5 \times 10^{15}$  'den fazla eritrosit üretmektedir (45). Hematopoetik kök hücrelerin kan hücreleri dışında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kardiyak miyositler ve hepatositler gibi hücrelere de farklılaşabileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (46,47), ancak daha sonra yapılan bazı çalışmalarda ise hematopoetik kök hücrelerdeki değişimin sadece hücre füzyonundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (48,49).

Hematopoetik kök hücreler gelişimsel olarak aorta-gonad-mezonefroz bölgesinden köken alır ve fetus karaciğerine göç eder. Kemik boşlukları oluştuğunda kemik iliğini oluşturmak üzere endosteuma göç etmeye başlar ve bireyin geri kalan yaşamında özelleşmiş nişlerde yer alırlar (50). Kök hücrelerin kendini yenilemesi, farklılaşması gibi süreçler niş adı verilen mikroçevrelerde gerçekleşir (51). Nişlerde kemik iliğine özgül hücreler, stromal hücreler ve hücre-dışı matriks bileşenleri ile hematopoetik kök hücreler arasındaki bazı moleküller, faktörler ve sinyaller aracılığıyla gerçekleşen yüksek düzey etkileşimler hücre fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyerek yetişkin hematopoezinin dengede kalmasını sağlar (43). Bu süreçteki mekanizmalardan biri asimetric ve simetric hücre bölünmesi

arasındaki dengenin sağlanmasıdır. Simetrik hücre bölünmesi, kök hücrenin benzer iki hücreye bölünmesi ve bu hücrelerin nişte kalması, asimetrik hücre bölünmesi ise kök hücre bölünmesiyle meydana gelen hücrelerden birinin nişte kalırken, diğerinin yeni hücreler oluşturmak üzere nişi terk etmesidir (52,53).

Kemik iliğinde osteoblastik (endotel) niş ve vasküler (endotelial) niş olmak üzere iki farklı niş bulunmaktadır (40,43). Hematopoetik kök hücreler farklı koşullar altında, fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp bağlantılı olan bu iki nişten birini kullanırlar. Vasküler nişteki hematopoetik kök hücreler ve hematopoetik progenitör hücreler daha olgun, çoğalabilen, farklılaşmaya yatkın hücreler iken osteoblastik nişteki hematopoetik kök hücreler siklusun G<sub>0</sub> evresinde olan, kendini yenileme yeteneğinde hücrelerdir ve sayıları vasküler niş kök hücrelerinden daha azdır (43).

### **2.5.1. Osteoblastik Niş**

Uzun kemiklerin trabeküler alanında kemik ve kemik iliğini birbirinden ayıran endosteum, kemiğin medüller kavitesine bakan kısım üzerinde osteojenik özellikteki tek sıralı hücreleri içerir. Hematopoetik kök hücreler, kemik oluşumunda rol alan osteoblastlar ve kemik rezorpsiyonunu sağlayan osteoklastlar bu bölgede yer alır (43). Hücre siklusu yavaş şekilde devam eden, uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler ve aktif hücre döngüsüne sahip kısa ömürlü hematopoetik kök hücreler olmak üzere iki çeşit hematopoetik kök hücre bulunmaktadır. Uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler aylarca hematopoeze katkıda bulunurken, kısa ömürlü hematopoetik kök hücreler için bu süre birkaç hafta ile sınırlıdır (54,55).

Osteoblastik nişin hematopoetik kök hücre devamlılığındaki rolü konusunda Visnjic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; alfa-1 kollajenin kontrolü altındaki herpesvirüs timidin kinaz (TK) genini ekprese eden transgenik farelerde gansiklovir uygulamasına bağlı olarak kemik iliğindeki lenfoid, eritroid ve myeloid hücrelerinde, takiben hematopoetik kök hücrelerinde azalma görülmüş; gansiklovir uygulamasının kesilmesiyle yeniden oluşan osteoblastlarla birlikte hematopoezin de yeterli düzeye ulaşması sağlanmıştır (56).

Transgenik farelerle yapılmış çalışmalarda osteoblastların kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin düzenlenmesindeki fonksiyonel önemi ve endosteumda kök hücre ile osteoblastların etkileşim içinde olduğu görülmüş; fakat hematopoezin

devam ettiği karaciğer, dalak gibi osteoblastın bulunmadığı ekstramedüller bölgelerin varlığı nedeniyle tüm hematopoetik kök hücrelerin osteoblastlarla ilişkili olmayabileceği belirlenmiştir (42).

### 2.5.2. Vasküler Niş

Vasküler niş, kemik iliği sinüzoidleri bölgesinde yer alan ve içerdiği sinüzoidal endotelial hücrelerce hematopoetik kök hücre çoğalma, farklılaşma ve devamlılığının sağlandığı mikroçevredir. Hemanjioblastlardan köken alan hematopoetik ve endotelial hücreler yolk sak, aorta-gonad-mezonefroz ve plasenta aşamalarından itibaren kemik iliğinde devam eden bir yakın ilişki içindedir (57). Osteoblastik nişte pasif durumda bulunan hematopoetik kök hücreler vasküler nişteki endotelial hücrelere penetre olarak çeşitli kan hücrelerine farklılaşırlar (58). Hematopoetik kök hücre ve endotelial hücrelerde CD31, CD34, CD133, Flk-1 ve Tie2 ekspresyonunun hücreler arasındaki ligand–reseptör etkileşmesinin göstergeleri olduğu düşünülmektedir ve SDF-1, CXCR4 ve adezyon moleküllerinin hematopoetik kök ve progenitor hücrelerin kemik iliği mikroçevresindeki yerleşimi için yüksek düzeyde bulunmaları gerektiği bir çok çalışmada gösterilmiştir (59,60).

Endotelial hücrelerin hematopoezin düzenlenmesindeki fonksiyonunu belirlemek üzere BALB/c fareleri total vücut radyasyonuna maruz bırakılmış ve allojeneik endotelial progenitor hücre infüzyonu yapılan farelerde kontrol grubuna göre nötrofil, platelet ve periferik beyaz kan hücrelerinde, kemik iliği mikrovasküler iyileşmede artış görülmüştür (61).

## 2.6. Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliği stromal hücreleri olarak da bilinen mezenkimal kök hücreleri (62) yağ, kas, kıkırdak ve kemik dokularına farklılaşabilen progenitor özellikte, adherent, fibroblast benzeri heterojen hücre topluluğudur (63-65). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, kordon kanı, trabeküler kemik ve adipöz dokulardan izole edilebilir (57-59).

In vitro ortamda adiposit, osteoblast ve kondroblastlara farklılaşma özellikleri bulunmaktadır (66). Mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesinde farklılaşma potansiyellerinin yanında; CD29, CD44, CD90 (Thy-1), CD49a-f, CD51, CD73 (SH3), CD105 (SH2), CD106, CD166, CD13, Stro-1 yüzey moleküllerinin varlığı ve

CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR yüzey moleküllerinin bulunmamasından yararlanılmaktadır (67,68).

Mezenkimal kök hücreler, salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleriyle hematopoetik kök hücreler için gerekli olan mikroçevre devamlılığının sağlanmasında, kan damarı oluşumu ve damar fonksiyonunun kazanılmasında önemlidir (69,70).

## **2.7. Genotoksik Etki Tanımı ve Kemik İliği Kök Hücreleri Açısından Önemi**

Genotoksik etki (genotoksisite), ksenobiyotikler, radyasyon gibi eksojen ve serbest radikaller gibi endojen etmenlerin DNA molekülünde yaptığı kalıcı nitelikteki değişikliklerdir. Somatik hücrelerde, germ hücrelerinde ve kök hücrelerde oluşan genetik değişiklikler önemli sağlık sorunlarına yol açabilir. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, proto-onkogenlerde, tümör süpresör genlerde ve/veya DNA hasarından sorumlu genlerde oluşmuşlarsa kanser gelişimine neden olabilir. Somatik hücrelerde DNA hasarı birikimi, yaşlanmanın hızlanmasında, immün bozuklukların, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar ise düşük sayısında artışa, kısırılık ve yavruya ya da daha sonraki nesillere aktarılabilen kusurlara neden olabilir (71).

Kök hücrelerin genotoksik etmenlerle karşılaşması durumunda da hücre sağlığı bozulmaktadır. Endojen ve eksojen genotoksik maddelere maruziyet kemik iliği hücreleri üzerinde hücresel yaşlanma, kanser (lösemi, lenfoma), anemi gibi sonuçlara yol açabilmektedir. Progenitör ve olgun kan hücrelerinde genotoksikanların etkisi apoptoz ve hücre ölümü ile sonuçlanırken; uzun ömürlü ve durgun fazdaki hematopoetik kök hücrelerde devam eden genotoksik stresin kemik iliği yetmezliğine yol açabileceği belirlenmiştir (5,72).

Dokuda bulunan kök hücreler doku gelişimi ve onarımından, doku homeostazının sürdürülmesinden sorumlu oldukları için kök hücrelerin organizma yaşamı boyunca korunması önemlidir. Kök hücrelerin sınırsız bölünme kabiliyeti ve farklılaşma özelliği bu hücreleri tümör oluşumu için potansiyel kaynak haline getirmekte; bu nedenle genotoksik stresin ve genetik onarım mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir (73). Bu amaçla tedavide kullanımları açısından da önemli

olan mezenkimal ve hematopoetik kemik iliği kök hücrelerinde yapılmış genotoksisite çalışmaları hücre çeşidine göre gruplandırılmıştır.

## **2.8. Hematopoetik Kök Hücrelerdeki Genotoksisite Çalışmaları**

Hematopoetik kök hücrelerdeki nükleotid eksizyon onarımı, telomer devamlılığı gibi genomik yapının korunmasındaki yolaklarda meydana gelen hasarlar kök hücrelerin çoğalma, kendini yenileme gibi işlevlerinin kaybına neden olur. Sonuçta, kök hücre yaşlanır ve doku homeostazı olumsuz etkilenir (74).

Benzenin indüklediği kemik iliği toksisitesinin fare hematopoetik progenitör hücrelerinde incelendiği bir çalışmada hematopoetik hücre proliferasyonun baskılandığı, DNA hasarı ve apoptoz belirteci genlerin ekspresyonlarında artış olduğu; Recio ve diğ. tarafından yapılan çalışmalarda da benzen detoksikasyonunda görev alan kinon oksidoredüktaz-1 ve mikrozomal epoksit redüktaz enzimlerinin hematotoksisite ve genotoksisite oluşumunda belirleyici oldukları görülmüştür (75,76). İnhalasyon yolu ile benzene maruz bırakılan farelerdeki hematopoetik kök hücre ve kemik iliği incelemesinde ise benzenin kemik iliği hücrelerinde p21 mRNA indüksiyonu yaparken hematopoetik kök hücrelerde değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (77). Fankoni anemisindeki DNA hasar mekanizmasında da p53/p21 hiperaktivasyonunun sorumlu olduğu belirlenmiştir (78). Zhang ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada DNA bağımlı protein kinaz katalitik alt biriminin (DNA-PKcs) fosforilasyonunun fare hematopoetik kök hücrelerindeki DNA hasar onarım yollarının aktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (79).

Kadın ve erkek donörlerden alınan insan CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde benzenin kemik iliği bozuklukları ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, 1,4- benzokinonun sitotoksik, genotoksik etkileri ve hücrelerin DNA hasar cevapları belirlenmiştir. Uygulanan 1,4- benzokinon konsantrasyonuyla orantılı olarak, kontrol grubuna göre sitotoksisitede, mikronükleus taşıyan CD34<sup>+</sup> hücrelerinde ve p21 mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Benzenin indüklediği DNA hasar onarımında p53 yolağının görev aldığı sonucuna varılmıştır, bu sonuç Yoon ve diğ. tarafından fare hematopoetik kök hücrelerinde yapılmış bir başka çalışmada da elde edilmiştir (80,81).

Buschfort-Papewalis ve diğ. tarafından insan kemik iliği ve kordon kanı hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise etil nitroz üre uygulamasının ardından CD34<sup>+</sup> hücrelerinde CD34<sup>-</sup> hücrelerine kıyasla DNA tek zincir kırıklarının iki kat fazla olduğu görülmüş, melfalan ve sisplatin uygulamalarında da DNA tek zincir kırıklarının onarım mekanizmalarında azalma belirlenmiştir (82). İnsan CD34<sup>+</sup> hücrelerinde UV radyasyonun indüklediği tek zincir kırıklarında ise nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının CD34<sup>-</sup> hücrelere göre daha fazla aktive olduğu tespit edilmiştir (83).

## 2.9. Mezenkimal Kök Hücrelerdeki Genotoksisite Çalışmaları

Nikitina ve arkadaşlarının, fare kemik iliği hücreleri ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasarını COMET yöntemi ile değerlendirdikleri bir çalışmada, farklı kültür dönemlerindeki (pasaj 3-11) hücreler karşılaştırılmış; DNA hasar düzeyinin kültür süresince kemik iliği hücreleri ve mezenkimal hücrelerde değişmediği görülmüştür. Kemik iliği hücrelerinde gözlenen %10-28 oranındaki atipik hücreler ve mezenkimal hücrelerde geç dönem pasajlarında artan apoptoz, DNA bütünlüğünün korunmasında kültür koşullarının önemini göstermiştir. Mezenkimal kök hücrelerin uzun dönem kültürlerinde (5-106 hafta) da hücrelerin morfolojik ve fenotipik özelliklerinde değişiklikler, çoğalma yeteneğinde artış ve malign hücrelere farklılaşma görülmüştür (84,85).

Fare mezenkimal kök hücrelerinde formaldehitin çeşitli dozlarda uygulamasının yapıldığı in vitro bir çalışmada 125 µM ve üzeri dozlarda DNA-protein çapraz bağlanmaları zincir kırıkları ve DNA hasar cevabında rol alan Brca2, Rad51, Xrcc2, Xpa, Xpc, Chek1 ve Hus1 düzeylerinde artma görülmüştür (86).

Tümör oluşumunun kök hücrelerdeki spontan mutasyonlardan kaynaklandığı hipotezinin araştırıldığı bir çalışmada fare kemik iliği mezenkimal kök hücreleri in vitro kültür ile çok sayıda pasajı yapılarak malign hücrelere dönüşüm aşamasında farelere enjekte edilmiş ve fibrosarkom oluşumu gözlenmiştir. Mezenkimal hücrelerin malign hücrelere dönüşümünün kromozom anormallikleri, artan telomeraz aktivitesi ve c-myc ekspresyonuna bağlı olarak gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (87).

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerindeki çalışmalarda sıçan hücrelerinin doğru bir model olmayabileceği kültür koşullarından bağımsız olarak anöplid

özellikte olmalarının ve kromozomal instabilitenin belirlenmesiyle anlaşılmıştır (88). Diğer taraftan, Gallina ve diğ. tarafından sıçan modeli kullanılarak yapılmış bir çalışma ile rejeneratif tedavide kontrast madde olarak kullanılan SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin mezenkimal kök hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermediği belirlenmiş, kobalt çinko ferrit nanopartiküllerinin ise yüksek dozda uygulanmasında DNA zincir kırıkları ve oksitlenmiş DNA bazlarına neden olduğu tespit edilmiştir (89,90).

Bir çevresel kirleticisi olan p-nonil fenolün sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada hücre canlılığındaki azalmanın membran bütünlüğünün bozulması, çekirdek ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı kromatin hasarı ile reseptör genlerindeki mutasyonla ilişkili olabileceği belirlenmiş, benzer bir çalışma kadmiyum ve sodyum arsenik ile de yapılarak uygulanan maddelerin mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasarına yol açtığı görülmüştür (91-94). Statik manyetik alan etkisinin sıçan mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasar cevabı olan G<sub>2</sub>/M fazındaki hücre sayısını artırdığı görülmüştür (95).

Ueyama ve diğ. tarafından insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, kültür koşullarındaki oksijen miktarının hücre stabilitesinde önemli olduğu, hipoksik koşulların (%5 oksijen) normoksik koşullara göre (%20 oksijen) hücre çoğalmasını hızlandırdığı ve erken dönem pasajlarında kromozomal anormalliklerin ortaya çıkmasına sebep olduğu belirlenmiştir (96). Benzer bir çalışma daha sonra Lee ve diğ. tarafından da yapılmış ve hipoksik (%1 oksijen), normoksik (%21 oksijen) koşulların hücre kültüründeki etkileri incelendiğinde mezenkimal kök hücrelerin hipoksik koşullarda çoğalma potansiyellerinin ve koloni oluşturma etkinliklerinin azaldığı, hücrenin hipoksik koşullara adaptasyonunda görevli HIF-1 $\alpha$ 'nın azalmasına yol açan miR-155-5p'nin arttığı görülmüştür (97).

Arsenik trioksitin de insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi ve kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağın aracı olduğu apoptotik hücre ölümlerine, DNA hasarına neden olduğu King ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışma ile belirlenmiştir (98).

Demir oksit nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalardaki güvenliğinin incelendiği insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise

oksidatif hasara bağılı lipit, protein ve DNA hasarı görülmüş, gümüş nanopartiküllerinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise DNA tek ve çift zincir kırıkları belirlenmiştir (99,100).

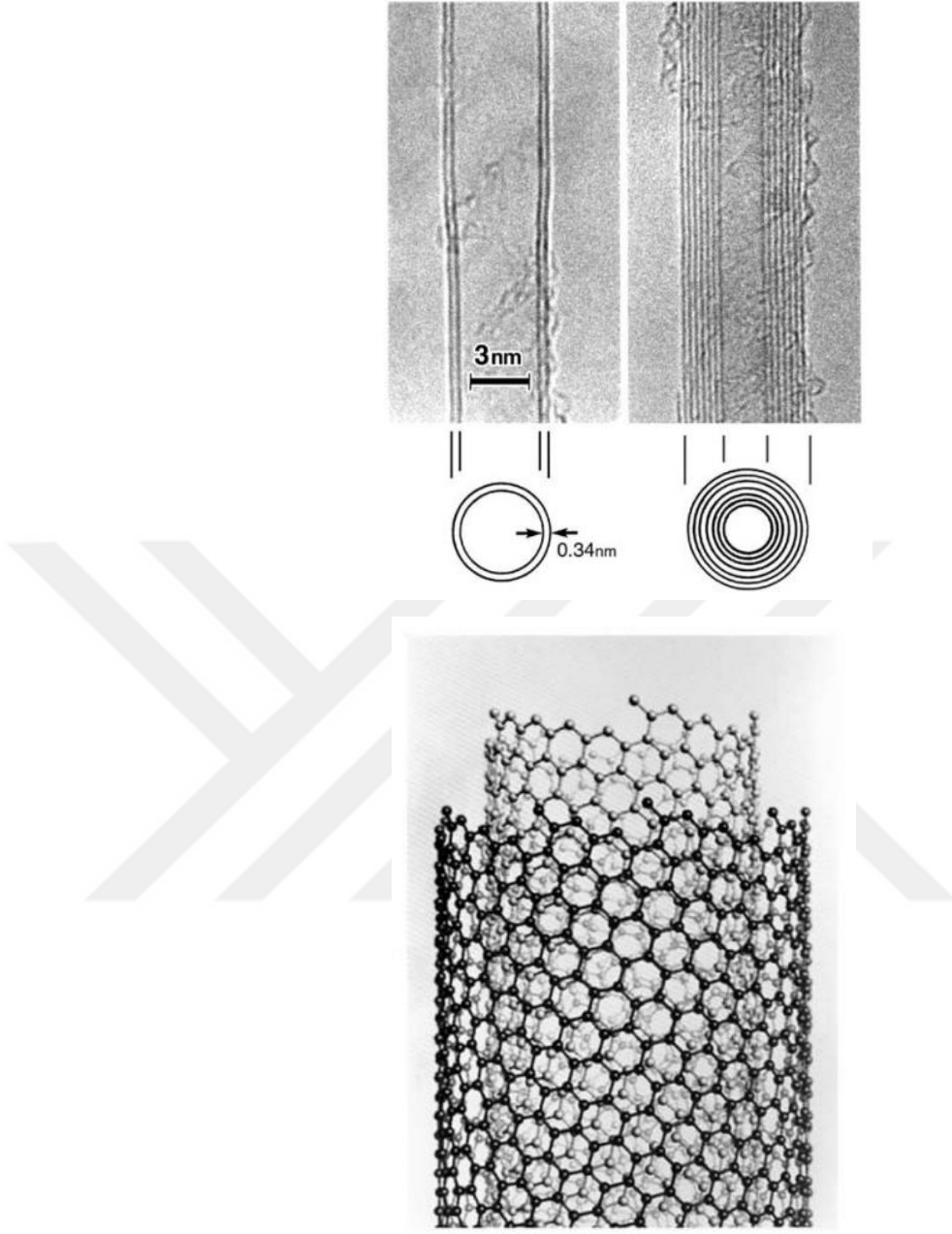
## **2.10. Nanopartikül Tanımı**

Nanopartiküller, 1-100 nm boyutlarında partiküllerdir (101). Hacim-yüzey oranlarının büyük, kimyasal yüzey karakterlerinin farklı olması sayesinde nanopartiküller ile formülasyon geliştirmek kolaydır. Suda çözünürlüklerine bağılı olarak biyoyararlanımlarının iyi olması, vücutta kalma sürelerinin uzun olması ve vücudun belli bölgelerine hedeflenebilme özellikleri nedeniyle ilaç geliştirme, hücre görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (102-106). Özellikle görüntülemeye kontrast madde olarak, biyosensörlerde, aşılarda üretiminde, antikanser ve antiinflamatuvar ilaçlarda, nükleik asit, gen, peptit ve proteinler için taşıyıcı sistemler olarak nanopartiküller kullanılmaktadır (107,108).

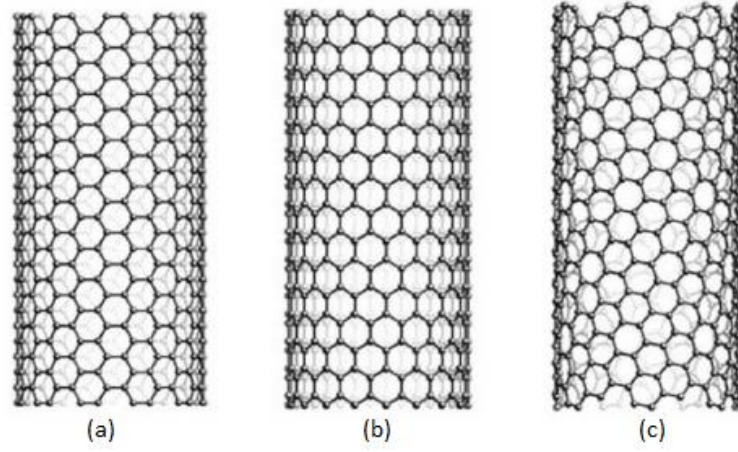
### **2.10.1. Boron Nitrit Nanotüpleri**

Son yıllarda, geniş kullanım alanları nedeniyle nanoyapılar üzerindeki araştırmalar dikkat çekmektedir (106,109). Karbon nanotüplerinin 1991 yılında Iijima ve diğ. tarafından keşfedilmesinin ardından, nanotüpler üstün elektronik, mekanik, termal ve optik özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar için fonksiyonel modifikasyona elverişli olmaları nedeniyle ilgi gören bir çalışma alanı haline gelmiştir (110,111). Bu çalışmalarla; inorganik nanotüpler ( $Ti_2O$ ,  $V_7O_{16}$ , Au) (112-114) ve polimerik nanotüpler (poliakronitril, polianilin) (115,116) gibi çeşitli nanotüpler elde edilmiştir.

Nanotüpler, örülü bir yapı olan grafen levhanın silindirik şeklinde sarılması ve uçlarının silindirik kapağı ile kapatılmasıyla meydana gelirler (117,118). Temelde tek duvarlı (single-walled) ve çok duvarlı (multi-walled) nanotüpler (Şekil 2.1) olarak sınıflandırılmakla birlikte koltuk tipi nanotüp, zikzak yapan nanotüp ve kiral nanotüp (Şekil 2.2) şeklinde de sınıflandırılabilirler (117,119).

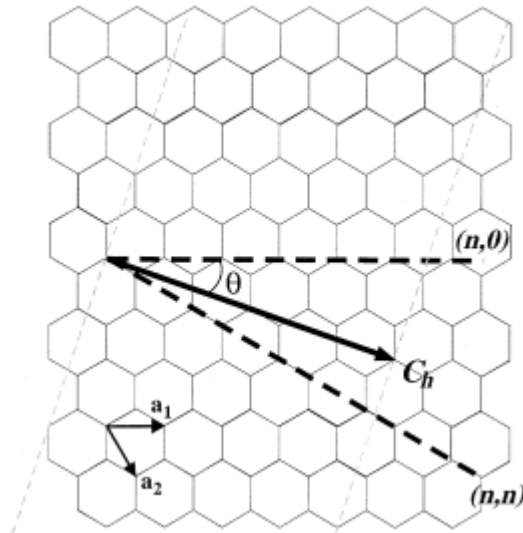


Şekil 2.1. Çok duvarlı karbon nanotüplerinin yapısı (120).



**Şekil 2.2.** Tek duvarlı nanotüpler (a) koltuk tipi nanotüp, (b) zikzak yapan nanotüp, (c) kiral nanotüp (120).

Tek duvarlı nanotüpler bir grafen levhanın tüp oluşturmak üzere bir eksen etrafında yuvarlanmasıyla meydana gelir (121). Uzunlukları mikrometre düzeyinde iken çapları 0,4 nm ile 2-3 nm arasında değişmektedir (120). İç içe geçmiş tek duvarlı nanotüpler olarak da düşünülebilecek olan çok duvarlı karbon nanotüpleri ise birçok grafen levhanın aynı eksen etrafında yuvarlanmasıyla meydana gelmektedir ve bu levhalar arasındaki uzaklık 0,34 nm'dir (122,123). Çapları yaklaşık 1 nm olan çok duvarlı nanotüpler büyük uzunluk/çap oranına sahiptirler (118).



**Şekil 2.3.** Grafen levhanın örgü vektörleri  $a_1$  ve  $a_2$ , nanotüpün yuvarlanma eksenini ise  $C_h$  ile gösterilen kiral eksenidir (121).

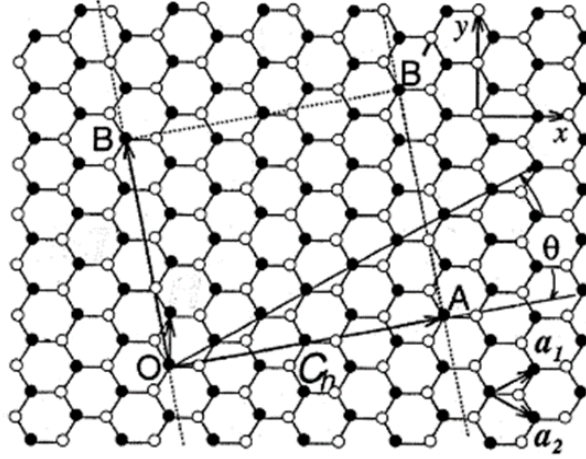
Tek duvarlı nanotüpün oluşturulmasında yer alan grafen levha parçasında (Şekil 2.3)  $a_1$  ve  $a_2$  örgü vektörleri,  $n$  ve  $m$  tam sayılar olmak üzere kiral eksen;  $C_h = na_1 + ma_2$  olarak ifade edilir. Nanotüpler  $n$ ,  $m$  veya  $R = C_h/2\pi$  ve  $C_h$  ile en yakın zikzak C-C bağı arasındaki açı olan  $\Theta$  ile belirtilir. Akiral özellikteki zikzak nanotüpler için  $(n,0)$  ve  $(\Theta=0^\circ)$  iken koltuk tipi nanotüplerde  $(n,n)$  ve  $(\Theta=30^\circ)$ ' dir. Kiral nanotüplerin kiral açısı ise  $\Theta=0^\circ$  ve  $\Theta=30^\circ$  arasında değişmektedir (118).

Tek duvarlı karbon nanotüp sarmal yapılarının, tüp çapı ve kiralitelerine bağlı olarak metalik veya yarı iletken olabildiği görülmüş; fakat istenilen saflık ve sarmal yapıda karbon nanotüplerinin sentezi sağlanamadığı için alternatif bulma çalışmaları benzer yapıda olan tek boyutlu boron nitrit nanotüplerini akla getirmiştir (110,111,124-129).

Karbon nanotüplerinin yapısal analogu olan boron nitrit nanotüpleri ilk kez saf halde 1995 yılında, ark boşaltma ve lazer aşındırma yöntemi ile sentezlenmiştir (9,130-132). Ark boşaltma yönteminde hekzagonal boron nitrit içeren tungsten çubuk anot olarak, bakır levha ise katot olarak kullanılmış ve gri boron nitrit nanotüpleri bakır levha üzerinde toplanmıştır (124). Boron nitrit nanotüplerinin yanında boron nitrit nanolevhaları ve boron nitrit nanokurdeleleri gibi çeşitli boron nitrit nanoyapıları da bulunmaktadır.

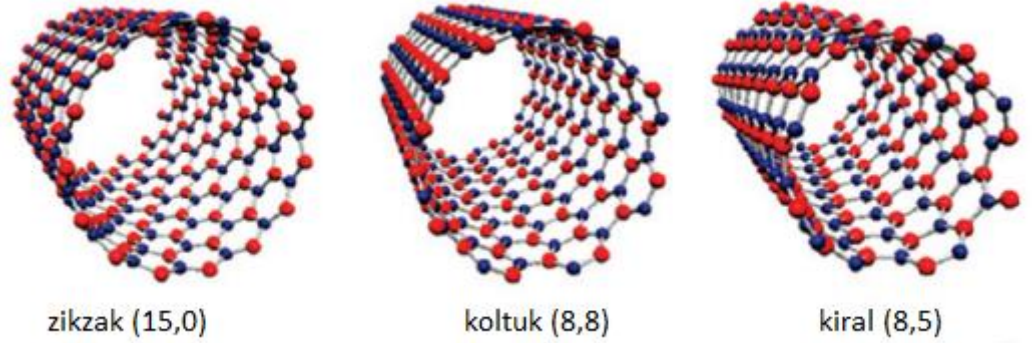
### 2.10.2. Boron Nitrit Nanotüplerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kübik boron nitrit, hekzagonal boron nitrit, vürtzit boron nitrit gibi farklı kristal yapıda boron nitrit bileşikleri bulunmaktadır (133). Hekzagonal boron nitritin silindir şeklinde sarılması olarak düşünülebilecek olan boron nitrit nanotüpleri temel olarak karbon nanotüplerindeki C atomlarının B ve N atomlarıyla yer değiştirmesi sonucu meydana gelmekte ve sarılma doğrultusuna göre zikzak, koltuk ve kiral boron nitrit olmak üzere çeşitleri bulunmaktadır. Boron nitrit nanotüplerinin uzunlukları 1 mikrometreden fazla ve çapları nanometre boyutundadır. Radyal kesitleri incelendiğinde bulunan tabaka sayısına göre tek duvarlı boron nitrit nanotüpleri (tek boyutlu) ve çok duvarlı boron nitrit nanotüpleri (2 boyutlu) olarak adlandırılırlar (134).



**Şekil 2.4.** İçi dolu daireler bor atomunu, içi boş daireler azot atomunu temsil etmek üzere hekzagonal boron nitrit yapısında; O-A doğrusu B-B' doğrusuna gelecek şekilde sarıldığında boron nitrit nanotüpleri elde edilebilmektedir (134).

Kiral vektör  $C_h$ , OA vektörü olarak ifade edilmekte,  $a_1$  ve  $a_2$  vektör bileşenlerinden meydana gelmek üzere  $C_h = na_1 + ma_2$  formülünde  $n$  ve  $m$  tamsayılar,  $n \geq m \geq 0$ ,  $(n, m)$  çifti boron nitrit kiralitesidir.  $(n, 0)$  ve  $(n, n)$  zikzak ve koltuk boron nitrit,  $n > m > 0$  olması durumunda ise kiral nanotüp olarak adlandırılır (134).



**Şekil 2.5.** Tek duvarlı boron nitrit nanotüplerinin zikzak, koltuk ve kiral modelleri (135).

Karbon nanotüplerinin bant aralığı 2 eV civarında ve elektriksel özellikleri tüp çapları ile kiralitelerine bağlı olarak iletken ya da yarı iletken şeklinde değişiklik gösterir, boron nitrit nanotüplerinin bant aralığı ise 5,5 eV civarındadır. B ve N

atomlarından oluşan boron nitrit nanotüpleri içerdiği atomların elektro negatiflik farkına bağlı olarak kısmen iyonik karaktere sahiptir. B-N bağlarının iyonik karakterde olmasına bağlı valans ve iletkenlik bandı arasında boşluk içermekte, geniş bant aralıklı yarı iletken özelliği göstermektedir (135). Tüp çapı, kiralite ve tüp duvar sayısından bağımsız olarak termal iletken ve elektriksel yalıtkan özellik göstermektedirler (125,132,136,137).

Boron nitrit nanotüpleri yaklaşık 800 °C sıcaklıkta ve istenmeyen koşullarda karbon nanotüplerine göre daha dayanıklıdır (30,34-36). Ayrıca kimyasal stabiliteleri, oksidasyon dirençleri gerilim dayanıklılıkları, radyasyon koruyuculukları gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerinin iyi olması nedeniyle geniş kullanım alanları bulunmaktadır (125,134).

### **2.10.3. Boron Nitritin Kullanım Alanları**

Boron nitrit nanotüpleri; piroelektrik, piezoelektrik ve optik uygulamalarda; polimer, seramik, cam gibi maddelerle birlikte kompozitlerin yapısında, kimyasal ve nem sensörlerinde, ısıya dirençli yarı iletkenlerin üretiminde (138,139), hidrofobik özellikleri nedeniyle süper hidrofobik yüzeylerin hazırlanmasında (140), hidrojen depolama aracı olarak (141) kullanılabilmekte ve bu özellikleriyle medikal ve biyomedikal uygulamalar için potansiyel bir aday haline gelmektedir.

Zhi ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada boron nitrit nanotüp/polistiren kompozit yapısında %1 oranında kullanılan boron nitrit nanotüplerinin %21 oranında elastik modül artışı sağladığı, polimetilmetakrilat ile yapılan çalışmada ise elastik modül ve dayanıklılıkta sırasıyla %22 ve %11 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir (142,143).

Kang ve diğ.'nin yaptığı bir çalışmada ise boron nitrit/poliimid kompozitinde yer alan %2 boron nitritin %460 oranında elektroaktivite artışı sağladığı görülmüş ve nötron radyasyonuna karşı koruyucu olması özelliğiyle uzay koşullarında uygun bir materyal olabileceği düşünülmüştür (144).

Boron nitritin ilaç taşıyıcı sistemlerde ve biyomateryal üretimindeki kullanımıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Boron nitrit nanotüplerinin nanotaşıyıcı olarak kullanımına yönelik Ciofani ve diğ. tarafından yapılmış bir

çalışmada, polietilenimin kaplı boron nitrit nanotüpleri Fe katalizörlüğünde manyetik özellik kazandırılarak kuantum taneciklerle işaretlenmiş ve “süperiletken kuantum girişim cihazı” ile manyetik özellikleri incelenmiştir. Boron nitrit nanotüplerinin nanovektör olarak ilaç taşıyıcı sistemler için ideal olduğu sonucuna varılmıştır (145).

Boron nitritin mezoporöz silika hibriti, LNCaP prostat kanser hücrelerinin doksorubisin ile tedavisinde nanotaşıyıcı olarak incelenmiş ve boron nitritin mezoporöz silika hibriti ile taşınan doksorubisinin serbest doksorubisine kıyasla kanser hücreleriyle 3-4 kat daha fazla etkileştiği, hücre toksisitesinin ve kanser tedavi edici etkinin buna bağlı olarak arttığı görülmüştür (146).

Raffa ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada, elektroporasyon tekniğinde poli (l-lizin) kaplı boron nitrit nanotüplerinin kullanımı incelenmiş; insan nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y) boron nitrit aracılı, düşük seviyede statik elektrik alan uygulamasının, hücre membran permeabilitesi artışında yeterli olduğu belirlenmiştir. Elektroporasyon tekniğindeki boron nitrit kullanımının, solid kanserin elektrokemoterapisi, aşı üretimi ve gen tedavisi alanlarında önemli bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür (147).

Zhi ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada, boron nitrit nanotüplerinin proteinlere doğal afinitelerinin olmasının ve yapısındaki nano boyutlu kanalların enkapsüle protein eldesinde katkısının olabileceği belirlenmiştir (148).

Al katkılı boron nitrit nanotüplerinin antikanser ilaçları olan nedaplatin ve sisplatine sırasıyla karbonil grubunun oksijen atomundan ve klor atomundan bağlandığı Shakerzadeh ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada gösterilmiştir. Al katkılı boron nitrit nanotüplerinin saf haldeki, zikzak ve koltuk boron nitrite göre nedaplatin ve sisplatin için etkili bir taşıyıcı olduğu görülmüştür (149).

Boron nitrit nanotüplerinin biyodağılımının incelendiği bir çalışmada glikol kitosan kaplı boron nitrit nanotüpleri  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş ve farelere enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 30 dakika sonra boron nitrit nanotüplerinin sistemik dolaşıma katılarak dalak, karaciğer ve bağırsak dokularına ulaştığı, 1. ve 4. saatlerde idrar kesesinde toplandığı görülmüştür. Uygulamadan 24 saat sonra radyasyon

düzeyinde azalma saptanmış ve glikol kitosan kaplı boron nitrit nanotüplerinin radyoizotoplar için uygun bir nanotaşıyıcı olabileceği belirlenmiştir (150).

Lahiri ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada kemik ve kırıkta doku yenilenmesi amaçlı ortopedik uygulamalarda kullanılan polilaktit-polikaprolakton kopolimerine %5 oranında boron nitrit nanotüp ilavesinin polimerin elastik modülü, esnekliği ve kopma dayanımında belli oranlarda iyileşme sağladığı görülmüştür (151).

Lahiri ve diğ. tarafından yapılmış bir başka çalışmada ise ortopedik implantlarda kullanılan hidroksiapatitin %4 oranında boron nitrit nanotüplerinin ilavesiyle elastik modül, kopma dayanımı ve sertliğinde sırasıyla %120, 86 ve 129 artış gözlenmiştir. Ayrıca, boron nitrit nanotüpleri ilave edilen hidroksiapatitin kemik oluşumunda önemli olan osteoblastların canlılığı ve çoğalması üzerinde olumsuz etkileri bulunmadığı belirlenmiştir (152).

#### **2.10.4. Boron Nitrit Nanotüplerinin Toksisitesi**

Boron nitritin biyomedikal uygulamalardaki güvenliği hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte bu alanda yapılmış çalışmalara Ciofani ve diğ. öncülük etmektedir.

Ciofani ve diğ. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada polietilenimin kaplı boron nitrit nanotüplerinin insan nöroblastoma hücre hattı üzerinde sitotoksitesisi incelenmiş, 5 µg/ml dozunda nöroblastoma hücrelerine uygulanan polietilenimin kaplı boron nitritin hücre çoğalması ve metabolizması üzerinde olumsuz etki göstermediği belirlenmiştir (153). Glikol-kitosan kaplı boron nitrit nanotüpleriyle yine insan nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise 0-100 µg/ml dozlarında hücre canlılığının ve DNA konsantrasyonunun olumsuz etkilenmediği ve reaktif oksijen türlerinin oluşmadığı görülmüştür (102). Glikol-kitosan kaplı boron nitrit nanotüplerininin kullanıldığı bir başka çalışmada ise nanotüplerin 0-100 µg/ml doz aralığında insan damar endotel hücrelerine etkileri; hücre canlılığı ve DNA hasar oluşumu bakımından değerlendirilmiş, kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (154).

Ciofani ve diğ. tarafından yapılan başka bir çalışmada poli-l-lisin kaplı boron nitrit nanotüplerinin kas hücrelerinin modeli olarak C2C12 miyoblast hücrelerindeki

miyojenik farklılaşmaya etkileri (MyoD ve Cx43 gen ve protein düzeyi), nanotüplerin hücre içine alımı, hücredeki çift zincirli DNA ve protein miktarı değerlendirilmiştir. Uygulanan 0-15 µg/ml doz aralığından 15 µg/ml dozunda birkaç ölü hücre gözlenmiş, 0-10 µg/ml dozuna kadar ve 72 saat süresince hücre farklılaşması, metabolik aktivite ve miyojenik farklılaşmanın olumsuz etkilenmediği belirlenmiştir (155).

Ciofani ve diğ. tarafından in vitro çalışmaların devamı olarak tavşanlarda yapılan ilk in vivo pilot çalışmada 1 mg/kg dozunda glikol kitosan kaplı boron nitrit nanotüplerinin enjeksiyonu sonrası 0, 2, 24 ve 72. saatlerde alınan renal ve hepatik kan örneklerinde biyokimyasal parametreler (kreatinin, üre, alkalen fosfataz, aspartat transferaz, alanin amino transferaz, γ- glutamil transferaz) ölçülmüştür. Ölçülen parametrelerde değişiklik gözlenmemiş, boron nitrit nanotüplerinin karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (156). Bu pilot çalışmanın devamı olarak 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise boron nitrit nanotüpleri 5 ve 10 mg/kg dozlarında tek doz, 5 mg/kg dozunda tekrarlı olarak enjekte edilmiş ve hematolojik parametreler 7 gün süreyle izlenmiştir. 1, 3 ve 7. günlerde alınan kan örneklerindeki kan değerleri (platelet, alyuvar, akyuvar), biyokimyasal parametreler, hepatik ve renal fonksiyonlarda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (157).

Ferreira ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada saf boron nitrit nanopartiküllerinin malign U87, T98 glioblastoma, MCF-7 adenokarsinom meme bezi ve MRC-5 akciğer fibroblast hücrelerindeki sitotoksik ve hemolitik etkileri incelenmiştir. Kullanılan 15-125 µg/ml doz aralığında hemolitik etki gözlenmezken, MTT testinde uygulanan 0,1-200 µg/ml doz aralığından 200 µg/ml dozundaki boron nitrit nanotüplerinin tüm hücre hatlarında sitotoksik olduğu belirlenmiştir (110). Farklı hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada ise, akciğer epitel hücreleri (A549), fibroblast hücreleri (3T3-L1), embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) ve alveoler makrofaj (RAW 264.7) hücrelerinde boron nitrit nanotüplerinin sitotoksik etkileri araştırıldığında hücre büyümesi ve metabolik aktivite açısından A549 ve 3T3-L1 hücrelerinin HEK293 hücrelerine kıyasla daha fazla olumsuz etkilendiği, en çok toksik etkinin ise RAW 264.7 hücrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada düşük konsantrasyonda (2 µg/ml) toksik etkiler görülmesi kullanılan dispersiyon ajanına bağlanmıştır (158).

Lahiri ve diğ. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada osteoblast hücrelerinde boron nitrit ilaveli polilaktit-polikaprolakton kopolimerinin canlı hücre/ölü hücre oranını %30 artırdığı görülmüştür (151). Danti ve diğ. tarafından insan osteoblast hücrelerinde yapılmış bir çalışmada ise, hücrelerin poli-L-lisin kaplı boron nitrit nanotüpleriyle maruziyeti sonrası kemik tedavisinde kullanılan düşük frekanslı ultrasonik ses dalgaları uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Boron nitrit nanotüplerinin ultrasonik ses dalgalarıyla birlikte uygulandığında osteoblast hücrelerinin fonksiyonlarını artırdığı ve kemik tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (159).

### **2.11. Fenolik Bileşikler**

Fenolik ya da polifenol adıyla bilinen bileşikler; bitkilerin kök, yaprak ve kabuk kısımlarında yer alan, gallik asit, vanilin gibi basit molekülleri, flavonoidler gibi polifenolleri içeren ve fenilpropanoid, pentoz fosfat ve şikimat yollarından köken alan sekonder metabolitlerdir (160-162). Hidroksil grupları taşıyan bir veya daha fazla fenolik halka ile karakterize 8000'in üzerinde bitkisel fenolik bileşik tanımlanmıştır (163). Sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan bu bileşikler günlük insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (160). Fenolik bileşiklerin günlük tüketimi ortalama 1 g/gün'dür (164).

Bitkilerin yapısal fonksiyonları, patojen ve parazitlere karşı savunma mekanizmaları, sebze ve meyvelerin tat, koku ve renk özelliklerinden sorumlu olan fenolik bileşikler insanlarda antioksidan, antialerjik, antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiaterojenik etkiler göstermektedir (160,165-167).

### **2.12. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması**

Fenolik bileşikler yapılarındaki karbon atomu sayısına, köken aldıkları kimyasal sentez ve doğal biyosentetik yollara göre fenolik asitler, stilbenler, flavonoidler ve diğerleri olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır (165,166,168).

#### **2.12.1. Fenolik Asitler**

Fenolik asitler, yedi karbon atomu taşıyan benzoik asitler ( $C_6-C_1$ ) ve dokuz karbon atomu taşıyan sinamik asitler ( $C_6-C_3$ ) olmak üzere (hidroksillenmiş formda bulundukları için hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olarak da gruplandırılabilir) iki grupta incelenmektedir (168). Fenilmetan yapısında olan

benzoikasitlere gallik asit, vanilik asit gibi asitler örnek olarak verilebilir. Fenilpropan yapısındaki sinnamik asitler ise kafeik asit, o-kumarik asit gibi asitlerdir (167). Bitkilerde çoğunlukla tartarik asit, kinik asit ve şikimik asit esterleri halinde bulunurlar (169).

#### **2.12.2. Stilbenler**

Stilbenler, iki fenolik halkanın eten köprüsüyle birbirine bağlandığı ( $C_6-C_2-C_6$ ) fenilpropanoit türevi bileşiklerdir ve en çok bilinen örneği üzümde fazla miktarda bulunan resveratroidir (168,170).

#### **2.12.3. Flavonoidler**

Flavonoidlerin temel kimyasal yapısını 15 karbon ve 3 halkadan ( $C_6-C_3-C_6$ ) meydana gelen flavan çekirdeği oluşturmaktadır (171). Çoğunlukla glikoz, galaktoz, arabinopiranoz gibi şekerlere bağlı olarak  $\beta$ -glikozitler halinde, 5000'in üzerinde tanımlanmış flavonoid bileşiği bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (164,170). Kimyasal yapılarına göre antosiyanidinler, flavononlar, proantosiyanidinler, flavonlar ve flavonoller, kateşinler ve lökoantosiyanidinler olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadırlar (167).

#### **2.12.4. Diğerleri**

Kumarinler, tanenler ve lignanlar bu grupta yer almaktadır (168). Kumarinler,  $C_3$  ünitesine bağlı oksijen heterosiklik halkası taşıyan  $C_3-C_6$  iskelet yapısına sahiptir (169). Basit kumarinler, piranokumarinler, furanokumarinler ve piron halkasında süstitüent taşıyan kumarinler olmak üzere 4 alt gruba ayrılan kumarinlere umbelliferon, herniarin gibi bileşikler örnek olarak verilebilir (172,173).

Tanenler; kondanse tanenler, hidroliz olabilen tanenler ve kompleks tanenler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Kondanse tanenler flavan-3-ol iskeletinden meydana gelen oligomer veya polimer yapısındaki bileşiklerdir ve asitli ortamda hidrolizleri antosiyanidinleri meydana getirir. Hidroliz olabilen tanenler, polihidroksi iskeletinin gallik asit ve hekza hidroksi difenik asit esterlerinden meydana gelen gallotanenler ve elajitanenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (169,174). Kompleks tanenler ise kateşin ünitelerinin gallotanen veya elajitanen ünitelerine glikozidik bağlarla bağlanmalarıyla meydana gelen karmaşık yapıları tanenlerdir (169).

### 2.13. Fenolik Bileşik Kurkuminin Kaynağı ve Kullanımı

Hindistan ve Çin'in geleneksel tıp uygulamalarında uzun yıllardır yer alan zerdeçal, Zingiberaceae familyasına ait *Curcuma longa* Linn. bitkisinin rizomlarından elde edilmektedir. Asya'da 2. yy'dan itibaren tıp, kozmetik, dokuma ve gıda alanlarında kullanılan zerdeçal 14. yy'da Avrupalı kaşifler tarafından batıya tanıtılmıştır (175-177).

Hint geleneksel tedavi sistemlerinde sönmüş kireçle hazırlanan zerdeçal preparatlarının enflamasyon, tümör ve yaraların iyileşmesini sağlamak amacıyla topikal kullanımı günümüzde de devam etmektedir. Ayrıca, zerdeçalın çocuklarda antidizanterik olarak ve solunum yolu hastalıklarında kullanımı, dispepsi, ülser gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarında, psikotropik ilaçların halüsinojenik etkisini hafifletmek amacıyla, hepatik rahatsızlıklar ve romatizmada kullanımı da bilinmektedir. Tedavide kullanımının yansira zerdeçalın gıda koruyucusu, renk ve tat verici madde olarak gıdalardaki yeri de önemlidir (175,177,178).



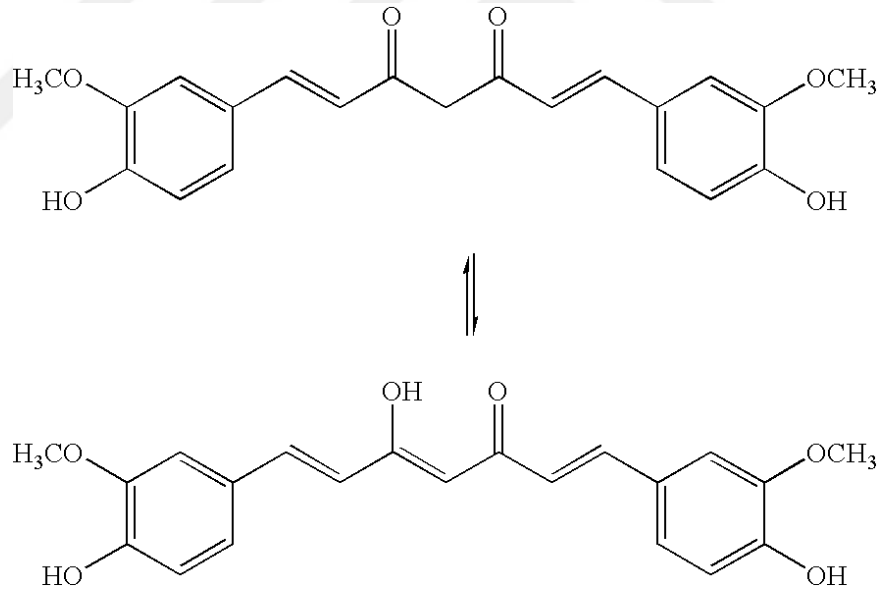
Şekil 2.6. *Curcuma longa* Linn. bitkisi.

Zerdeçalın renk maddesi olan kurkumin, 19. yy'da *Curcuma longa* Linn. bitkisinin rizomlarından ekstre edilmiş ve *Curcuma* türlerinde yer alan kurkuminoidlerden biridir (178-180). Bitkideki majör kurkuminoidler; kurkumin

(%77), demetoksikurkumin (%17), bis-demetoksikurkumin (%3) ve sonradan tanımlanmış siklokurkumindir (181).

#### 2.14. Kurkuminin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Kurkumin ilk kez 1815 yılında izole edilmiş ve 1870 yılında kristal formunda elde edildikten sonra kimyasal yapısı 1973 yılında Roughley ve Whiting tarafından belirlenmiştir (178). Kurkuminin kimyasal yapısını alifatik bir ana zincir ve fonksiyonel grupların bağlanabildiği aril grupları oluşturmaktadır (178). Kimyasal olarak; 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-(1E,6E) veya diferuloilmetan yapısında olan kurkumin asidik ve nötral koşullarda keto formda, bazik koşullarda enol formunda bulunmaktadır (176). Keto ve enol formları asidik pH'da stabil özellikte iken bazik ve nötral pH'da ferulik asit ve feruloilmetana dönüşmektedir (181). Kurkumin, pH 3-7 arasında keto formunda bulunmasına bağlı olarak taşıdığı zayıf C-H bağları sebebiyle H atomu donörü olma potansiyeline sahiptir, pH 8 olduğunda ise elektron donörü görevi yapar (177).



**Şekil 2.7.** Kurkumin bileşiğinin bis-keto ve enol formları.

Kurkuminin molekül ağırlığı 367,37 g/mol ve erime noktası 187 °C'dir. Suda çözünürlüğü iyi değildir; fakat dimetilsülfoksit, asetik asit, kloroform, metanol gibi çözücülerdeki çözünürlükleri iyidir. Kurkuminin metanol içindeki çözeltisi 430 nm'de

ve aseton içindeki çözeltisi 415-420 nm aralığında maksimum absorbens değerlerine sahiptir (181).

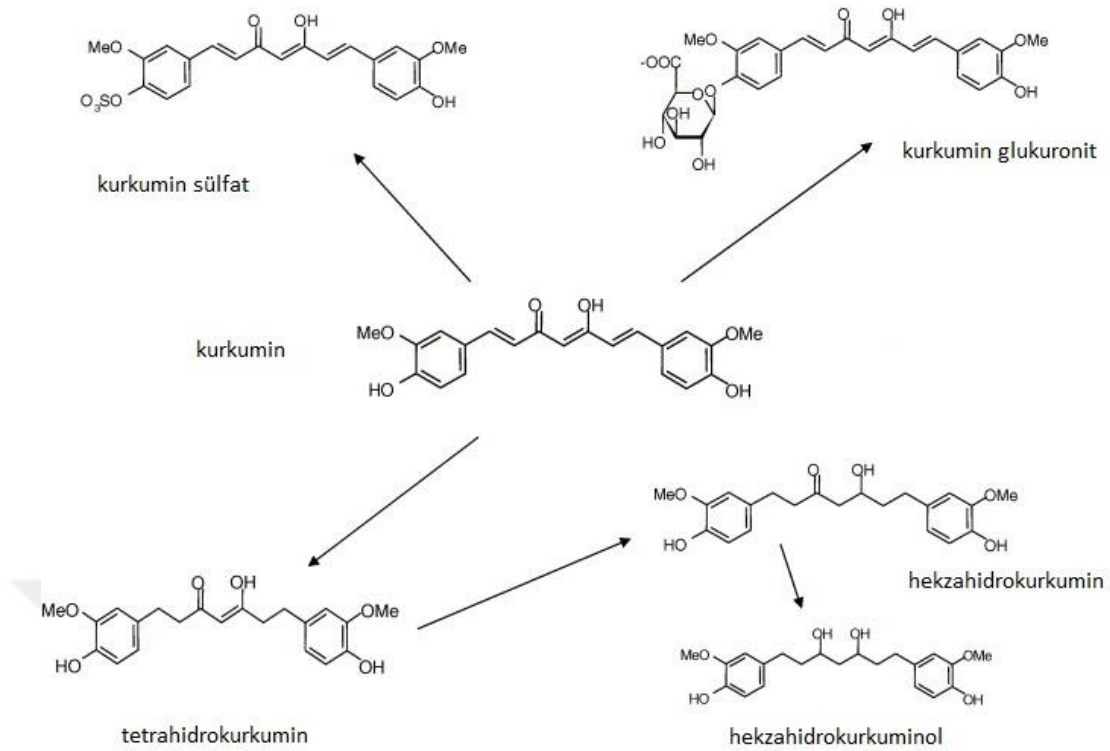
### 2.15. Kurkuminin Farmakokinetik Özellikleri

Kurkuminin farmakokinetik özelliklerinin incelendiği çalışmalarda oral yoldan uygulanan kurkuminin %40-85'inin değişikliğe uğramadan gastrointestinal sisteme geçtiği ve absorbe edilen flavonoidlerin intestinal mukoza ile karaciğerde metabolize edildiği belirlenmiştir (179). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada oral yoldan verilen kurkuminin %75'inin feçesle ve eser miktarının idrar yolu ile atıldığı bir başka çalışmada, uygulanan dozun %60'ının absorbe olduğu ve idrarda kurkuminin sülfat ve glukuronat konjugatlarının bulunduğu belirlenmiştir (182,183).

H işaretli kurkuminin intravenöz ve intraperitoneal uygulamalarında kurkumin ve metabolitlerinin (dihidrokurkumin ve tetrahidrokurkuminin heksahidrokurkumine indirgenmesini takiben) tetrahidrokurkumin ve heksahidrokurkumin monoglukuronit konjugatları halinde safrada bulunduğu ve enterohepatik döngüye katıldığı saptanmıştır (177,184,185).

Ireson ve diğ. tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada, kurkuminin intravenöz yoldan sıçanlara verilmesinden 1 saat sonra plazmada kurkumin saptanmamış, oral uygulama sonrasında ise plazmada kurkumin glukuronit ve sülfat konjugatları, az miktarda heksahidrokurkumin, heksahidrokurkumin glukuronit ve heksahidrokurkuminol belirlenmiştir (185).

Kurkumin biyoyararlanımının veriliş yoluyla ilişkisi incelendiğinde diyet ve gavaj uygulamaları arasındaki fark değerlendirilmiş, diyet yoluyla verilen kurkuminin (1,2 g/kg) kolon mukozasındaki konsantrasyonu 0,3-1,8 µmol/g ve plazma konsantrasyonu tespit limitinde iken gavaj yoluyla verilen kurkuminin plazma konsantrasyonlarının 3-6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (186).



**Şekil 2.8.** Kurkuminin biyotransformasyon ürünleri.

Shoba ve diğ. tarafından insan ve sıçanlarda kurkuminin plazma konsantrasyon düzeyleri üzerinde piperinin etkisi değerlendirilmiştir. Kurkumin ve piperinin birlikte uygulanması sonrası kurkuminin tek başına verilmesine göre plazma konsantrasyon değerlerinin hayvanlarda %154 ve insanlarda %2000 arttığı belirlenmiştir (187). Kolorektal kanser hastalarında yapılmış bir çalışmada ise günlük 3,6 g kurkuminin kolorektal dokularda farmakolojik olarak etkin doz düzeyine ulaştığı ve periferel dolaşımda kurkumine rastlanmadığı görülmüştür (188). Benzer bir başka çalışmada kolorektal kanserli hastalara karaciğer metastazı nedeniyle geçirecekleri ameliyat öncesinde, 7 gün süreyle günlük oral olarak 0,45-3,60 g kurkumin verilmiştir. Periferel kan, safra ve karaciğer dokularında nM düzeyinde glukuronit ve sülfat konjugatları saptanmış, uygulanan kurkumin dozunun karaciğerde farmakolojik etkinlik görülmesi için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır (189).

## 2.16. Kurkumin Toksisitesi

Gıdalarda renk ve tat verici ajan olarak kullanımı yaygın olan ve güvenilir olarak nitelendirilen kurkumin GRAS listesinde (2013) yer almaktadır. JECFA

tarafından ADI değeri 0-3 mg/kg/gün ve NOAEL değeri 250-320 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (190).

Sıçanlarda yapılmış bir çalışmada oral yolla verilen kurkuminin, 5 g/kg dozuna kadar toksik etki göstermediği görülmüştür (183). Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından 1993 yılında yayınlanan rapora göre fare ve sıçanların 13 hafta ile 2 yıl süreyle tükettikleri besinlere %79-85 oranında zerdeçal ekstresi ilave edilmiş ve toksik, karsinojenik etkileri değerlendirilmiştir. 13 hafta boyunca zerdeçal tüketen fare ve sıçanların karaciğer ağırlıklarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüş, hematolojik veya idrar analizlerinde değişiklik gözlenmemiştir. 2 yıl boyunca zerdeçal tüketen sıçanlarda ülser ve çekum hiperplazisinde artış, farelerde ise hepatoselüler tümör artışı tespit edilmiştir (191). Ayrıca, akciğer kanseri taşıyan farelerde kurkuminin kanser gelişimini artırabileceği de görülmüştür (192). Bu etki kurkuminin düşük dozlarda antioksidan etki gösterirken yüksek dozlarda pro-oksidan etki göstermesine bağlanmıştır (193).

Mendonça ve diğ. tarafından sıçan feokromatisoma (PC12) hücrelerinde kurkuminin genotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada 1-10 µg/ml konsantrasyon aralığındaki hücresel değişimler mikroçekirdek frekansı olarak değerlendirilmiştir. Kurkuminin düşük dozlarda belirgin bir genotoksik etki göstermediği, ancak 10 µg/ml konsantrasyonunda mikroçekirdek frekansını artırdığı görülmüştür (194). Benzer bir çalışma Cao ve diğ. tarafından insan hepatom hücrelerinde (HepG2) de yapılmıştır. Kurkuminin, 2 µg/ml konsantrasyonunda siklofosfamidin indüklediği mikroçekirdek frekansını azaltırken, 8 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarında mikroçekirdek frekansında artışa neden olduğu belirlenmiştir (195).

Kurkuminin UDP glukuronil transferaz, CYP3A4, sitokrom P450 gibi ilaç metabolizmasında önemli olan enzimleri inhibe etmesine bağlı olarak çeşitli ilaçların istenmeyen plazma konsantrasyonlarına ulaşabileceği bilinmektedir (196).

Kurkuminin kullanıldığı ilk faz I çalışması Cheng ve diğ. tarafından 2001 yılında 25 kişilik bir hasta grubunda yapılmış ve 8 mg/gün dozunda 3 ay süreyle hastalara verilen kurkuminin toksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir (197,198). Kolorektal kanserli 15 hastada yapılan bir başka çalışmada ise; 0,45-3,60 g/gün doz aralığında 4 ay boyunca kemoterapiye eklenen kurkumin kapsüllerinin herhangi bir

toksisite belirtisine yol açmadığı gözlenmiştir (199). Lao ve diğ. tarafından 24 kişilik bir grupta 0,5-12,0 g doz aralığında verilen kurkuminin 72. saatin sonundaki etkileri incelendiğinde grup üyelerinde baş ağrısı, diyare, ürtiker belirtileri görülmüştür (200).

Yapılmış klinik çalışmalara göre kurkuminin 4 ay boyunca ve 3,6-8,0 g/gün dozunda kullanılmasının gastrointestinal şikayetler dışında yan etkiye yol açmadığı belirlenmiş ve bu çalışmalarda maksimum tolere edilebilen doz düzeyine ulaşılmamıştır (201).

## **2.17. Kurkuminin Farmakolojik Etkileri**

Kurkumin pleiotropik özelliği nedeniyle farklı farmakolojik etkiler gösterebilmektedir (202).

### **2.17.1. Antioksidan Etkileri**

Oksidasyon ve oksijen kullanımı, ATP sentezinin temelini oluşturan elektron aktarım sisteminin bir parçasıdır. Ancak, hücre içi sinyalizasyonu, fagositoz gibi olumlu, hücre membran lipidleri, protein, karbohidrat ve DNA molekülerinin oksidasyonu gibi olumsuz mekanizmalarda rol oynayan serbest oksijen radikallerinin oluşumuna da aracılık etmektedir. Meydana gelen oksidatif hasar ise katarakt, kanser, bilişsel bozukluklar gibi rahatsızlıklara sebep olmaktadır (171). Bu rahatsızlıkların önlenmesi ya da geciktirilmesinde antioksidan özellikli maddeler önemlidir.

Kurkumin taşıdığı fenolik grup sayesinde H donörü görevi yaparak vitamin E ve C ile kıyaslanabilecek derecede kuvvetli antioksidan etki göstermektedir (179,203,204). Ak ve Gülçin tarafından yapılan bir çalışmada kurkuminin 15-45 µg/ml konsantrasyonlarındaki antioksidan etkisinin, 45 µg/ml konsantrasyonlarındaki BHA, α-tokoferol ve troloks antioksidan aktivitesinden daha fazla olduğu görülmüştür (205). Bir başka çalışmada ise nitrik oksitin indüklediği hemoglobin oksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (206).

Jayaprakasha ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada *Curcuma longa* 'nın içerdiği kurkuminoidlerden kurkumin I (kurkumin), kurkumin II (demetoksikurkumin) ve kurkumin III (bisdemetoksikurkumin) antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında kurkumin I'in antioksidan aktivitesinin en fazla olduğu tespit edilmiştir (207).

### 2.17.2. Antiinflamatuvar Etkileri

Kurkuminin; nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2), lipoksijenaz (LOX) indüksiyonu ve sitokinlerin üretiminin inhibisyonuna bağlı nonsteroidal, steroidal ilaçlara eşdeğer oranda antiinflamatuvar etkileri bulunmaktadır (203). Yapılan çalışmalarda kurkuminin antiinflamatuvar etkinliğinden, peroksizom proliferör aktive reseptör- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )’da aktivasyon artışı sağlaması ve NF- $\kappa$ B inhibisyonunda etkili olmasının sorumlu olduğu görülmüştür (208,209).

Siddiqui ve diğ. tarafından septik sıçanlara 3 gün süresince kurkumin tedavisi uygulandığında PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ve proinflamatuvar protein TNF- $\alpha$  plazma düzeyininin azalmasına bağlı antiinflamatuvar etki gösterdiği, sisplatinin indüklediği akut renal yetmezliği olan sıçanlarda kurkuminin TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığı ve renal fonksiyonu iyileştirdiği belirlenmiştir (210,211). Sıçanlarda yapılmış bir başka çalışmada ise; kurkumin, diasetil kurkumin, ferulik asit, sodyum kurkuminat, trietil kurkumin ve tetrahidro kurkumin bileşiklerinin antiinflamatuvar etkinlikleri değerlendirildiğinde en fazla etkinliği prostaglandin sentetaz inhibisyonu sonucunda sodyum kurkuminat göstermiştir (212).

Kurkumin I (kurkumin), kurkumin II (demetoksikurkumin) ve kurkumin III (bis-demetoksikurkumin) bileşiklerinin antiinflamatuvar etkileri kıyaslandığında; kurkumin II’nin COX-I inhibisyonu aktivitesi, kurkumin I’nin COX-II inhibisyon aktivitesi en fazla bulunmuştur (213).

Dcodhar ve diğ. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 2 hafta süreyle 18 romatoid artrit hastasına ve bir başka çalışmada ise 18 kronik anterior üveit hastasına kurkumin tedavisi uygulandığında hasta semptomlarında iyileşme gözlenmiştir (214,215).

### 2.17.3. Antikanser Etkileri

Kurkumin etkilerinin incelendiği malign kolon, böbrek, hepatoselüler, prostat hücre hatlarının kullanıldığı çalışmalarda, kurkuminin hücre çoğalmasını G<sub>2</sub>/M fazında durdurarak apoptozu indüklediği ve hücre çoğalmasını engellediği görülmüştür. Ayrıca, deri, duodenal ve mide kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ederek antikanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir (177,216).

Kurkuminin nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),  $\beta$ -katenin, aktif protein-1 (AP-1) gibi hücre çoğalması, gen ekspresyonu, inflamasyon, tümör oluşum mekanizmalarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini inhibe etmesinin de antikanser etkiden sorumlu olduğu bilinmektedir (216).

İnsan promiyelositik lösemi (H-60) hücrelerinde yapılan bir çalışmada 3,5  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki kurkuminin antiapoptotik protein Bcl-2 düzeyini %30 oranında azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği görülmüştür (217). Kurkuminin insan astrositom hücrelerindeki antikanser etkisinde, NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonuna bağlı hücre çoğalmasını inhibe etmesinin ve apoptozu indüklemesinin etkin rol oynadığı belirlenmiştir (218). Glioblastoma (U87MG) hücrelerinde ise Smac/Diablo sitozol düzeyinin artışı ve NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu ile apoptoz indüksiyonu sağlayarak antikanser aktivite göstermiştir (219).

Bharti ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada kurkuminin transkripsiyon-3 sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT3)'ün fosforilasyonunu inhibe ederek multipl myelom hücrelerinin canlı kalması ve çoğalmasında önemli olan interlökin-6 (IL-6) oluşumunu engellediği belirlenmiştir (220).

Akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücre kanseri, genitoüriner kanser, göğüs kanseri ve lenfoma gibi kanser türlerinde de etkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (221).

#### **2.17.4. Hepatoprotektif Etkileri**

Kurkumin; galaktozamin, asetaminofen, karbon tetraklorür, pentobarbital gibi maddelerin karaciğer toksisitesine karşı glutatyon-S-tranferaz aktivitesini artırarak karaciğer detoksifikasyonunu iyileştirmektedir. Hepatoprotektif etkinliğinden antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri de sorumludur (179,222).

Kurkuminin 5  $\mu$ M dozundaki hepatoprotektif etkilerinin incelendiği bir çalışmada karaciğer hücrelerinde etanolün indüklediği LDH salınımı ve lipid peroksidasyonu artışının kurkumin uygulamasıyla azaldığı görülmüştür (222). İn vivo bir çalışmada ise Swiss albino farelerde kurkumin, pikroliv ve elajik asitin 50 ve 100 mg/kg/gün dozlarında, 7 gün süreyle uygulandıktan sonra karbon tetraklorür ve

parasetamolün indüklediği karaciğer enzimlerini normal düzeylere getirdiği belirlenmiştir (223,224).

#### 2.17.5. Antimikrobiyal, Antiviral ve Antibakteriyel Etkileri

Kurkuminin, hastalık nedeni çeşitli patojenlere karşı etkili olduğu bilinmektedir (225). Menenjit, pnömoni gibi hastalıkların etkeni olarak bilinen *Staphylococcus aureus*'un metisiline dirençli suşu üzerinde kurkumin ve çeşitli antibiyotik (ampisilin, norfloksasin, siprofloksasin, oksasilin) kombinasyonlarının etkileri değerlendirilmiştir. Kurkumin-oksasilin kombinasyonunun 24 saatin sonunda bakteri miktarını belirgin derecede azalttığı belirlenmiştir (226). *Helicobacter pylori* enfekte farelerde yapılmış bir başka çalışmada ise kurkumin, 65 *Helicobacter pylori* suşuna karşı antibakteriyel etki göstermiştir (227).

Kurkumin biyokonjugatlarının (di-O-pamitoil kurkumin, di-O-bis-( $\gamma,\gamma$ )folil kurkumin, di-O-dekanoil kurkumin, di-O-triptofanilfenilalanin kurkumin, C<sup>4</sup>-etil-O- $\gamma$ -folil kurkumin) çeşitli virüslere (HSV, RSV, PIV-3, FHV, FIPV, VSV) karşı antiviral aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu biyokonjugatlardan; di-O-triptofanilfenilalanin kurkumin ve di-O-dekanoil kurkuminin VSV, FIPV/FPV virüslerine karşı belirgin bir antiviral etkisinin olduğu görülmüştür (228).

Hatamie ve diğ. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; Co nanopartikülleri-kurkumin kompleksinin *Escherichia coli* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesinin, Co nanopartikülleri ve kurkuminin tek başına gösterdikleri aktiviteden daha fazla olduğu, bir başka çalışmada ise kurkumin-Cu<sup>+2</sup> kompleksinin vajinal viral enfeksiyon formülasyonlarında kullanılabileceği belirlenmiştir (229,230).

#### 2.18. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi

MTT yöntemi Mosmann tarafından, 1983 yılında, memeli hücrelerinin canlılık ve çoğalmasının tespitinde kullanılan, hızlı, kesin, kantitatif kolorimetrik bir yöntem olarak ifade edilmiştir (231).

Yöntemin temeli tetrazolyum tuzlarının indirgenme ürünü olarak renkli ve çözünmeyen formazan kristallerini oluşturmaya dayanır (232). Bir monotetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür) canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzim süksinat dehidrogenaz tarafından menekşe renkli,

suda çözünmeyen formazanlara dönüştürülür. Meydana gelen formazan miktarı spektrofotometrik yöntemle ölçüldüğünde elde edilen absorbans değerleri canlı hücre sayısı ile orantılı olarak değerlendirilir (232-235). MTT'nin formazan kristallerine redüksiyon mekanizmasında non-mitokondriyal enzimlerin, endozom ve lizozomların da yer aldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (236).

Yöntem uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir olması sebebiyle; parçalanmış hücrelerden  $^{51}\text{Cr}$  salınımının veya hücre DNA'sına [3H]-timidin katılımının gözlenmesi gibi yöntemlere iyi bir alternatiftir (234).

## 2.19. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi

Tek hücre jel elektroforez ya da COMET yöntemi; basit, duyarlı ve çok amaçlı bir in vivo/in vitro yöntem olarak ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını belirlemek amacıyla genotoksisite testleri, DNA hasar ve onarım mekanizmalarının incelenmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır (237-240).

Rydberg ve Johanson tarafından (1978) insan lenfositlerinin agaroz jel içinde hazırlanması ve akridin oranj ile değerlendirme yapılması yöntemine, Ostling ve Johanson tarafından (1984) elektroforez ve etidiyum bromür ile boyama aşamaları eklenerek yöntem geliştirilmiştir. Singh ve diğ. tarafından (1988) uygulanan alkali ortamda elektroforez tekniği ile DNA'nın agaroz jelde uygun şekilde hareket etmesi ve RNA degradasyonu sağlanmış, yöntem yapılan değişikliklerle günümüze kadar gelmiştir (241).

Tek hücre jel elektroforez yönteminde; agaroz jel içinde mikroskop lamına yayılan hücrelere süperkoil DNA moleküllerini içeren nükleoidleri oluşturmak üzere hücre membranını parçalayan lizis işlemi uygulanır (242,243). Süperkoil DNA moleküllerinin taşıdıkları zincir kırıkları alkali elektroforez sonrası DNA sarmalının gevşemesine ve serbest kalan DNA kırıklarının anoda doğru hareket ederek kuyruklu yıldız görünümünün (comet) oluşmasına neden olur (244). Elektroforez sonrası etidiyum bromür, propidyum iyodür gibi DNA ya özgü floresan bir boya kullanılarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapılır (242). Böylece, oksitlenmiş pirimidin ve pürinler, pirimidin dimerleri ve alkilenmiş bazların tespiti sağlanır (243). Baz oksidasyonlarının belirlenmesinde belli hasarları tanıyan ve bu hasarı COMET yönteminde değerlendirilebilecek DNA hasarı haline dönüştüren, bakteri kaynaklı

formamidopirimidin DNA glikozilaz (oksidlenmiş pürinler), endonükleaz III (oksidlenmiş pirimidinler) gibi DNA hasarına özgü enzimler kullanılmaktadır (245).

Elde edilen “comet” görüntüsünün değerlendirilmesinde görsel olarak; hücrelerin hiç kuyruk taşımayan (az hasarlı-0) gruptan DNA’nın yoğunlukla kuyruk kısmında yer aldığı (çok hasarlı-4) gruba kadar 0-4 arasında değişen bir derecelendirme yapılabilir (246). Günümüzde görsel değerlendirme yerine hücredeki DNA hasarını; kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti gibi parametrelerle tespit eden programlar kullanılmaktadır (244).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

|                                                                         |                                     |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Boron Nitrit Nanotüpleri                                                | Sigma-Aldrich                       |
| Deoksiribonükleaz I                                                     | Sigma                               |
| Dimetil Sülfoksit (DMSO)                                                | Sigma                               |
| Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)                                         | Boehringer<br>Mannheim              |
| Etidiyum Bromür (EtBr)                                                  | Sigma-Aldrich                       |
| Etil Alkol                                                              | Sigma-Aldrich                       |
| Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu<br>(Na <sub>2</sub> EDTA) | Merck                               |
| Fetal Sığır Serum (FBS)                                                 | Sigma                               |
| Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) tablet                           | Sigma                               |
| HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinoma) Hücre Hattı                         | Americal Type<br>Culture Collection |
| Hidrojen Peroksit (%30)                                                 | Merck                               |
| Hidroklorik Asit (%37)                                                  | Sigma                               |
| Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)                              | Lonza                               |
| İnsan kemik iliği CD34 <sup>+</sup> kök hücresi                         | Lonza                               |
| İnterlökin-3                                                            | Sigma                               |
| İnterlökin-6                                                            | Sigma                               |
| Kök Hücre Faktörü (SCF)                                                 | Sigma                               |
| Kurkumin                                                                | Sigma                               |
| MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum<br>bromür)       | Sigma                               |

|                                                  |                       |
|--------------------------------------------------|-----------------------|
| N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu                  | Sigma                 |
| Penisilin-Streptomisin                           | Biological Industries |
| Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)                 | Sigma                 |
| RPMI 1640 Vasatı                                 | Biological Industries |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)                          | Merck                 |
| Sodyum Klorür (NaCl)                             | Sigma                 |
| Tripan Mavisi                                    | Sigma                 |
| Tripsin-EDTA                                     | Sigma                 |
| Tris                                             | Sigma                 |
| Triton x-100                                     | Sigma                 |
| Yenidoğan Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum, FBS) | Sigma                 |

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

|                                        |                                                      |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Biyogüvenlik Kabini                    | Holten                                               |
| Buzdolabı                              | Hotpoint                                             |
| Cam pastör pipeti                      | Interlab                                             |
| Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi | Comet Analysis Software, version 3.0 Kinetic Imaging |
| Derin Dondurucu (-20°C)                | Ariston                                              |
| Derin Dondurucu (-80°C)                | Revco                                                |
| Distile Su Cihazı                      | MES ultrapure                                        |

|                                                                                                      |                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Elektroforez                                                                                         | Biometra Analitik                         |
| Elektroforez Güç Kaynağı                                                                             | Power Pack P 25                           |
| Etüv                                                                                                 | Dedeoğlu                                  |
| Floresan Mikroskop                                                                                   | Leica                                     |
| Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm <sup>2</sup> ), pipet (1- 25 ml),<br>santrifüj tüpü (15, 50 ml) | Corning                                   |
| Hücre Kültür Plağı (6/12/96-kuyucuklu)                                                               | Corning                                   |
| Isıtıcı                                                                                              | Multi-Blok, Lab-Line                      |
| Inverted Mikroskop                                                                                   | Leica                                     |
| İnkübatör (CO <sub>2</sub> 'li)                                                                      | Heraeus Instruments                       |
| Karıştırıcı-Isıtıcı                                                                                  | Jankel&Kunkel,<br>Ikamag                  |
| Kırık Buz Makinası                                                                                   | Scotsman AF100                            |
| Lam (26x76mm)                                                                                        | Marienfeld                                |
| Lamel (24x60mm)                                                                                      | Marienfeld                                |
| Laminar Flow                                                                                         | Heraeus                                   |
| Manyetik Karıştırıcı                                                                                 | Stuart Scientific                         |
| Membran Filtre (0,2 µm por çaplı)                                                                    | Brand                                     |
| Mikrodalga Fırın                                                                                     | Vestel                                    |
| Mikrofiltre                                                                                          | Millipore® Merck                          |
| Mikropipet (8 kanallı)                                                                               | Eppendorf, Capp                           |
| Mikropipetler<br>(0.5-1µl, 1-5µl, 5-10µl, 10-200µl, 200-1000µl, 1-5ml)                               | Finnpipette, Gilson,<br>Discovery Confort |
| Mikrosantrifüj                                                                                       | Hettich Micro 12-24                       |
| Mikrosantrifüj tüpü (1.5ml)                                                                          | Eppendorf                                 |

|                                           |                          |
|-------------------------------------------|--------------------------|
| Neubauer Camı (Hücre sayım camı)          | Marienfeld               |
| Otoklav                                   | Rodwell Monarch MP 24    |
| pH metre                                  | Cyberscan                |
| Pipet ucu, 0.5-10, 10-200, 100-1000µl'lik | Eppendorf                |
| Santrifüj                                 | Heraeus, Hettich         |
| Spektrofotometre                          | SpektraMax M2            |
| Steril enjektör (2 ml)                    | Beybi                    |
| Su Banyosu                                | Termal® Laboratory Tools |
| Terazi                                    | Schimadzu Libror         |
| Ultrasonik Banyo                          | Transsonic 460/H         |
| Ultrasonik Prob                           | Bandelin Sonoplus        |
| Vorteks                                   | Heidolph Reax 2000       |
| Yatay çalkalayıcı                         | Edmund Bühler            |

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Boron Nitrit Nanotüp Çözeltileri

10 mg Boron Nitrit nanotüpü 10 ml steril distile suda ve 2 mg Boron Nitrit nanotüpü 1 ml steril distile suda dağıtıldı. Homojen dağılımı sağlamak amacıyla ultrasonik prob ve ultrasonik banyo kullanılarak 1 mg/ml ile 2 mg/ml Boron Nitrit nanotüp ana stok çözeltileri hazırlandı. Elde edilen ana stok çözeltilerinden steril distile su ile seyreltilerek MTT yöntemi ve COMET yönteminde kullanılmak üzere 10, 20, 50, 100, 200, 400 ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı.

#### 3.3.2. Yapılan Analizlerde Kullanılan Kurkumin Çözeltileri

1 mg kurkumin 100 µl DMSO'da (son DMSO konsantrasyonu %1 olacak şekilde) çözüldükten sonra çözelti hacmi distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. 1.5 mg

kurkumin 100 µl DMSO'da çözüldükten sonra çözelti hacmi distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. Deney günü taze hazırlandı. (-20 °C'de alikotlanarak 1 aya kadar muhafaza edilebilir.) Elde edilen ana stok çözeltilerinden (1 mg/ml ve 1.5 mg/ml) MTT ve COMET yöntemlerinde kullanılmak üzere distile su ile 10, 20, 50, 100, 200, 400 ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı.

### **3.3.3. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Besi Ortamı**

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besi ortamı için; 500 ml RPMI 1640 (L-Glutamin içeren RPMI 1640 vasatı) üzerine 50 ml FBS (%10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (% 1) eklendi. +4°C'de saklandı.

#### **Çözme Çözeltisi**

Dimetil Sülfoksit

#### **3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi**

50 mg MTT 10 ml Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içersinde çözüldü. Hazırlanan çözelti membran filtreden ışık geçirmeyen, steril bir tüpe süzüldü. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak, 4°C'de saklandı (Uzun süre saklanması gerekiyorsa -20°C'de saklanabilir).

#### **20 µM Sisplatin Çözeltisi**

10 mg/20 ml konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sisplatin preparatından 600,6 µl alındı, son hacim kültür vasatı ile 1 ml'ye tamamlandı. Elde edilen 1 mM'lık çözeltiden 20 µl alındı, hücre kültür vasatı ile son hacim 1 ml'ye tamamlanarak 20 µM sisplatin çözeltisi hazırlandı.

### **3.3.4. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Besi Ortamı**

İnsan kemik iliği CD34<sup>+</sup> kök hücrelerinin kültürü için; 400 ml IMDM üzerine 60 ml (%15) FBS, 4 ml (%1) penisilin/streptomisin, 10 µg (25 ng/ml) SCF, 4 µg (10 ng/ml) In-6 ve 4 µg (10 ng/ml) In-3 ilave edildi. + 4 °C'de saklandı.

### **200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na<sub>2</sub>EDTA) Çözeltisi**

14.89 g Na<sub>2</sub>EDTA 200 ml distile suda çözüldü. pH 10'a ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

### **Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi**

312.5 mg LMPA sıcak su banyosu kullanılarak 25 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklandı.

### **Elektroforez Tampon Çözeltisi**

1705 ml soğuk distile su, 52.8 ml 10 N NaOH ve 8.8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı. Deney günü taze hazırlandı.

### **Etanol Çözeltisi (%50)**

%99.8'lik mutlak etanol çözeltisinden 150.3 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml'ye tamamlandı.

### **Etanol Çözeltisi (%75)**

%99.8'lik mutlak etanol çözeltisinden 225.5 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml'ye tamamlandı.

### **Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi**

10 mg EtBr 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden boyama sırasında 1 ml alınıp, distile suyla 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

### **Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)**

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü. 4 °C'de saklandı.

### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Çözeltisi**

%30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 11.3 µl alındı, 988,7 µl distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı. 1 hafta süresince 4°C'de saklanabilen çözeltiden deney günü 20 µl alınıp 1980 µl PBS ilave edilerek 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ve 50 µl 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 950 µl PBS ilave edilerek 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı.

## 10 N NaOH

200 g NaOH 500 ml distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

## Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi

625 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak 50 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C’de saklandı.

## Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48.5 mg Tris 750 ml distile suda çözülüp çözelti pH’sı 7.5’a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 750 ml’ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

## Stok Lizis Çözeltisi

146.1 g NaCl, 37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA, 1.2 g Tris 500 ml distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenip çözelti pH’sı 10’a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 890 ml’ye tamamlanıp maddeler çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

## Lizis Çözeltisi

178 ml stok lizis çözeltisi, 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlandı, kullanılacağı zamana kadar 4°C’de bekletildi ve deney sırasında soğuk çözelti kullanıldı.

## 3.4. Yöntemler

### 3.4.1. HeLa Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

1. %10 DMSO içeren besiyerinde ve -80°C’de saklanan HeLa hücreleri 37°C’lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Hücre kültürü süresince yapılan tüm işlemlerin hücre kültür kabini içerisinde ve steril koşullarda olmasına dikkat edildi.
2. Çözdürülen 1 ml hacmindeki hücreler steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 1200 rpm’de 5 dakika

santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atıldı. Böylece hücre dondurma karışımında yer alan DMSO uzaklaştırılmış oldu.

3. Tüpte kalan hücre pelleti, uygun hacimdeki besiyeri ile karıştırılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde uygun aralıklarla hücre besiyeri değiştirilerek yeterli doygunluğa ulaşmaları sağlandı.
5. Yeterli doygunluğa ulaşan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıklarında 2-3 kez 5 ml 37°C'lik PBS ile yıkandı.
6. Kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 3-5 dakika süreyle inkübatörde bekletildi. Hücrelerin tutundukları kültür kabının zemininden uzaklaşmaları sağlandıktan sonra ortama 4 ml besiyeri ilave edildi ve hücre süspansiyonu steril bir tüpe aktarıldı.
7. Hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 devir/dakika hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile süspand edildi.
8. Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak steril bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0.4) eklenerek süspand edildi.
9. Hücre süspansiyonu (10 µl) Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerinde ışık mikroskobu altında incelendi. Neubauer sayım lamını oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz olarak görülen hücreler (canlı hücreler) soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki Formül 3.1 kullanıldı:

$$ml' deki canlı hücre sayısı = \frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{4} \times 10.000 \times 10 \quad (3.1)$$

10. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, yeterli miktarda besiyeri ile seyreltilti.
11. Her bir kuyucukta 10000 hücre olacak şekilde 200 µl hacim içerisinde 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapıldı.

12. Hücrelerin 24 saat inkübasyon süresince kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları sağlandı.
13. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 0.5-600 µg/ml konsantrasyon aralığında boron nitrit nanotüpleri, kurkumin ve ikisini birarada içeren besiyeri içerisinde 24 saat inkübe edildi.
14. Negatif kontrol olarak, hücreler %1 DMSO içeren besiyeri ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin içeren besiyeri ile 24 saat inkübe edildi.
15. İnkübasyon süresi sonunda madde çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa 90 µl besi ortamı ve hazırlanan 5 mg/ml MTT çözeltisinden 10 µl eklendi ve 4 saat inkübe edildi.
16. İnkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 100 µl çözme çözeltisi (DMSO) eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 1-2 dakika süreyle çalkalandı.
17. Spektrofotometrede (570 nm) örneklerin absorbans değerleri ölçüldü.
18. Boya ışıktaki bozulduğu için, deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta yapıldı.
19. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin her bir konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.
20. Çalışmalar üç kez tekrarlandı ve sonuçlar bu çalışmaların ortalaması olarak hesaplandı.

#### **3.4.2. İnsan Kemik İliği CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi**

##### **İnsan Kemik İliği CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinin Çözülmesi**

1. İnsan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinin çözülmesinde gerekli olan vasat su banyosunda ısıtıldı. IMDM vasatı %10 FBS ve 20 U/ml DNase I içerecek şekilde hazırlandı. (50 ml vasat için; 5 ml FBS + 625 µg DNase I, 50 ml 'ye tamamlanır.)

2. Azot tankında donmuş halde bulunan hücreler 37 °C 'de su banyosunda çözüldü. Hücre viyalinin dış kısmı %70'lik etanol ile silindi.
3. Aseptik koşullarda 2 ml'lik hücre süspansiyonu 15 ml'lik konik tüpe aktarıldı.
4. Hücre viyalı 1 ml vasat ile yıkandı. Yıkama vasatında bulunan hücreler, damla damla ve hücrelerin bulunduğu tüp yavaşça döndürülerek yaklaşık 1 dakikayı geçmeyecek süre içinde tüpteki hücrelere ilave edildi.
5. Tüpteki toplam vasat hacmi 5 ml olana kadar damla damla vasat ilavesi, yaklaşık 3 dakikayı geçmeyecek süre içinde ve her birkaç damla ilaveden sonra tüp yavaşça döndürülerek karıştırma işlemiyle yapıldı.
6. Toplam vasat ilave süresi 5-10 dakikayı geçmeyecek şekilde, 1-2 ml vasat damla damla ilave edilerek ve her ilaveden sonra yavaşça döndürülerek toplam vasat hacmi 15 ml'ye tamamlandı.
7. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında, 200 g'de, 15 dakika santrifüj edildi.
8. Üst faz, hücre pelleti üzerinde birkaç ml vasat bırakacak şekilde başka bir tüpe aktarıldı. Hücre pelleti, üzerinde bırakılan vasatla yavaşça süspande edildi.
9. Toplam vasat hacmi, yavaşça 1-2 ml vasat ilavesi ve her ilaveden sonra tüp döndürülerek karıştırma sağlama işlemiyle 15 ml'ye tamamlandı.
10. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında, 200 g'de, 15 dakika santrifüj edildi.
11. Üst faz, hücre pelleti üzerinde 2 ml vasat bırakacak şekilde başka bir tüpe aktarıldı. Hücre pelleti, üzerinde kalan vasatla yavaşça süspande edildi. (Hücre sayısı beklenenin altında olduğunda ayrılan üst fazlar daha yüksek hızda santrifüj edilip sayıldı, tüpteki hücreler ile birleştirildi.)
12. Hücreler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında (inkübatörde) 1 saat bekletildi ve sayılarak kültüre ekilmek üzere hazır hale getirildi.

### **3.4.3. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerindeki DNA Hasarına Etkilerinin Tek Hücre Jel Elektrofrez (COMET) Yöntemi ile İncelenmesi**

1. İnsan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinin çözülmesi başlığı altında anlatıldığı şekilde elde edilen hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plağa 2500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 24 saat süreyle 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında kültür ortamına uyum sağlamaları için inkübasyona bırakıldı.

2. Plaktaki hücreler 200 g'de, 15 dakika santrifüj edilerek hücre üzerinde 50 µl vasat kalacak şekilde besi ortamı değişimi sağlandı. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkumin çözeltilerinden son konsantrasyonlar 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml olacak şekilde son hacim 200 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenerek CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinin DNA'sı üzerine etkileri incelendi.
3. Negatif kontrol olarak %1 DMSO, pozitif kontrol olarak 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.
4. Hücreler boron nitrit nanotüpleri ve kurkumin çözeltileri ile 37±0.5°C'de 30 dakika ve 24 saat bekletilerek inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda hücreler 200 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant 50 µl hücre hacmi kalacak şekilde atıldı.
6. Boron nitrit nanotüplerinin CD34<sup>+</sup> hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen DNA hasarına karşı etkilerinin incelenmesi için boron nitrit nanotüpleri ve kurkumin ile inkübe edilmiş hücrelere +4°C'de 950 µl PBS ve 50 µl 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltilisinden ilave edildi. Hücreler 5 dakika buz banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda hücre süspansiyonu +4°C'de 200 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant 50 µl hücre hacmi kalacak şekilde atıldı. +4°C ve 200 g'de 950 µl PBS ile 15 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant 50 µl hücre hacmi kalacak şekilde atıldı.
7. İnsan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücreleri her bir lamda 5.000 hücre olacak şekilde 37°C ± 0.5°C'de eritilmiş 100 µl % 1.25'lik LMPA, 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, önceden % 1.25'lik NMPA çözeltilisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı.
8. Lamlar buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agarın katılaşmasının ardından lam üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
9. Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltilisine daldırılıp en az 1 gün süreyle buzdolabında bekletildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplar ve normal doz grupları ayrı ayrı şalelerde 1 gün süreyle lizise bırakıldı.
10. Süre sonunda lam üzerindeki lameller alındı, lamlar tanka dizildi.
11. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltilisi ile dolduruldu.

12. Lizis işleminin ardından lamelleri alınmış lamalar aralık kalmayacak ve agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi.
13. Elektroforez küvetinin içerisinde lamalar akım uygulamadan 20 dakika bekletildi.
14. Ardından 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.
15. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamalar 5 dakika distile suda, takiben lamalar 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
16. 15 dakika sonunda lamalar sırasıyla 5'er dakika % 50'lik, % 75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde tutuldu ve okuma öncesinde kurumaları için en az 1 gün bekletildi.
17. Okuma sırasında lamaların üzerine 60 µl 20µg/ml etidiyum bromür çözeltisi ilave edildi.
18. Her lamda 100 hücre, floresan mikroskopunda bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentleri olarak değerlendirildi.
19. Tüm bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
20. Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

### 3.5. İstatistiksel Yöntemler

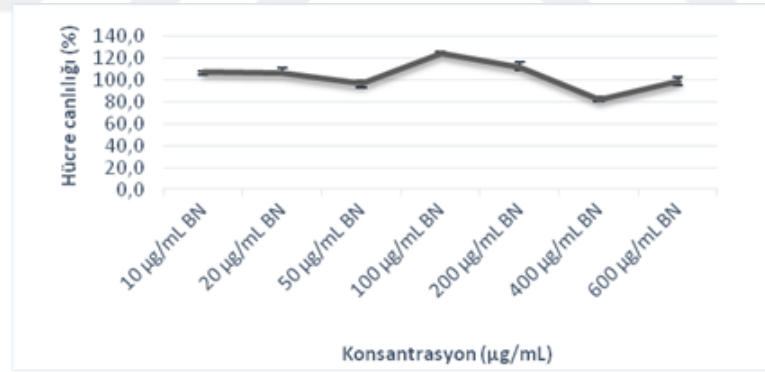
Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. SPSS 10.5 for Windows programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmorog-Smirnov testiyle değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü varyans alanizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi.  $p < 0.05$ , istatistiksel anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

###### 4.1.1. Boron Nitrit Nanotüplerinin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

HeLa hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda boron nitrit nanotüplerinin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında, negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandığında, HeLa hücrelerinin %50'sini öldürecek etki oluşturmadığı saptanmıştır. Boron nitrit nanotüplerinin 10-50 µg/ml konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığında hücre canlılığında artışa neden olduğu; ancak 100-400 µg/ml konsantrasyon aralığında hücre canlılığını %80 oranına düşürdüğü gözlenmiştir. Boron nitrit nanotüplerinin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında, HeLa hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası, MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüplerinin etkisi. \*

\*Üç bağımsız deneyden elde edilen sonuçlar hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole (Boron nitrit nanotüpleri uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır) göre değerlendirilmiştir. BN: Boron nitrit nanotüpleri. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol olarak % 1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulanmıştır.

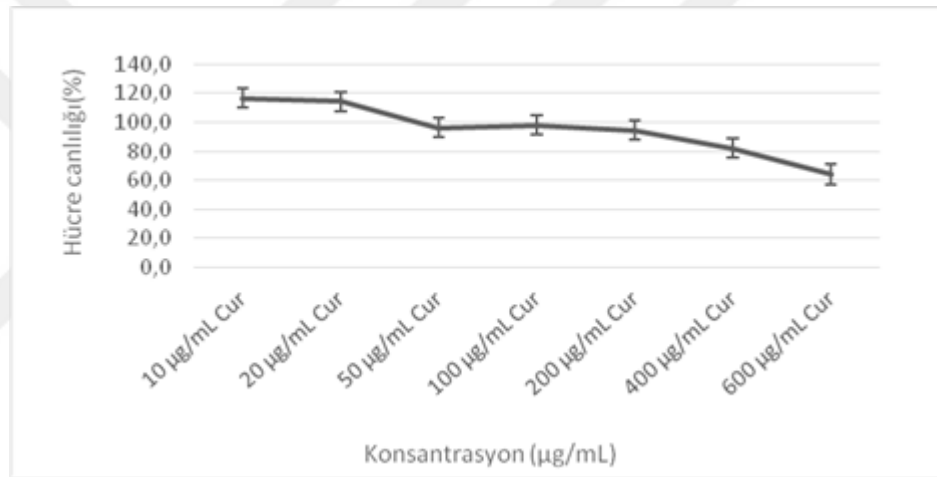
**Tablo 4.1.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerine boron nitrit nanotüplerinin etkisi. \*

|   |                                       | <b>Canlı Hücre Ortalama<br/>Absorbans Değerleri<br/>(±standart sapma)</b> | <b>Canlı Hücre<br/>Yüzdeleri (%)</b> |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | (-) Kontrol (%1 DMSO)                 | 1.709±0.009                                                               | 100.00                               |
| 2 | (+) Kontrol (20 µM<br>Sisplatin)      | 0.854±0.004 +++                                                           | 50.00                                |
| 3 | 10 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri  | 1.841±0.080 ****                                                          | 107.80                               |
| 4 | 20 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri  | 1.819±0.056 ****                                                          | 106.50                               |
| 5 | 50 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri  | 1,645±0.012 ****                                                          | 96.30                                |
| 6 | 100 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri | 2.131±0.076 +++, ****                                                     | 124.70                               |
| 7 | 200 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri | 1.909±0.040 +, ****                                                       | 111.70                               |
| 8 | 400 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri | 1.398±0.061 +++, ****                                                     | 81.80                                |
| 9 | 600 µg/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri | 1.685±0.032 ****                                                          | 98.60                                |

\*Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Boron nitrit nanotüpleri uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak %1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulanmıştır. (+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO (%1)] ile kıyaslanmıştır. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).

#### 4.1.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında kurkuminin HeLa hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda, negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandığında 10-20 µg/ml konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 20-50 µg/ml konsantrasyon aralığında belirgin bir sitotoksik etki gösterdiği, bu etkinin 50-600 µg/ml konsantrasyon aralığında da devam ettiği gözlenmiştir. Kurkuminin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile değerlendirilen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde kurkuminin etkisi. \*

\*Üç bağımsız deneyden elde edilen sonuçlar hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole (Kirkumin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır) göre değerlendirilmiştir. Cur: Kurkumin. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol olarak % 1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulanmıştır.

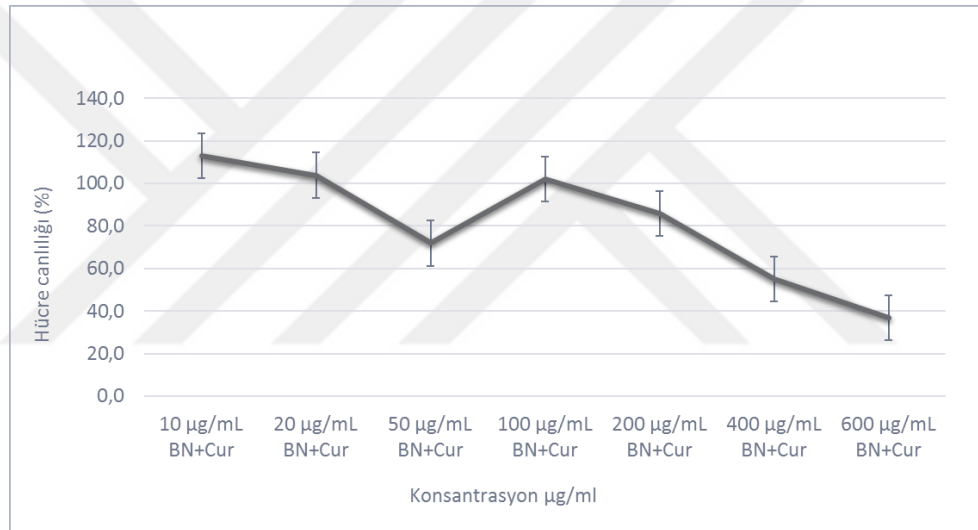
**Tablo 4.2.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerine kurkuminin etkisi. \*

|   |                                  | <b>Canlı Hücre Ortalama<br/>Absorbans Değerleri<br/>(±standart sapma)</b> | <b>Canlı Hücre<br/>Yüzdeleri<br/>(%)</b> |
|---|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1 | (-) Kontrol<br>(%1 DMSO)         | 1.709±0.009                                                               | 100.00                                   |
| 2 | (+) Kontrol<br>(20 µM Sisplatin) | 0.854±0.004      +++                                                      | 50.00                                    |
| 3 | 10 µg/ml Kurkumin                | 1.993±0.068      +++,***                                                  | 116.70                                   |
| 4 | 20 µg/ml Kurkumin                | 1.955±0.187      ++,***                                                   | 114.40                                   |
| 5 | 50 µg/ml Kurkumin                | 1,647±0.025      ***                                                      | 96.40                                    |
| 6 | 100 µg/ml Kurkumin               | 1.676±0.086      ***                                                      | 98.10                                    |
| 7 | 200 µg/ml Kurkumin               | 1.616±0.104      ***                                                      | 94.60                                    |
| 8 | 400 µg/ml Kurkumin               | 1.405±0.093      +++,***                                                  | 82.20                                    |
| 9 | 600 µg/ml Kurkumin               | 1.097±0.049      +++,**                                                   | 64.20                                    |

\*Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Kurkumin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulanmıştır. (+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.)

#### 4.1.3. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında birlikte uygulanması ile HeLa hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucu, negatif kontrol (%1 DMSO) ile kıyaslandığında, bu uygulamanın 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinin canlılığında artışa neden olduğu, ancak 10-50 µg/ml ve 100-600 µg/ml konsantrasyon aralığında belirgin bir sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. HeLa hücrelerinde, 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında boron nitrit + kurkuminin 24 saat inkübasyonu sonrası MTT yöntemi ile değerlendirilen hücre canlılığı üzerine etkiler Tablo 4.3 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin etkisi. \*

\*Üç bağımsız deneyden elde edilen sonuçlar hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole (Kurkumin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alındı) göre değerlendirilmiştir. BN: Boron nitrit nanotüpleri. Cur: Kurkumin. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol olarak % 1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulanmıştır.

**Tablo 4.3.** İnsan serviks kanser (HeLa) hücre canlılığı üzerinde boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin etkisi. \*

|   |                                                      | <b>Canlı Hücre Ortalama<br/>Absorbans Değerleri<br/>(<math>\pm</math>standart sapma)</b> | <b>Canlı Hücre<br/>Yüzdeleri<br/>(%)</b> |
|---|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1 | (-) Kontrol (%1 DMSO)                                | 1.709 $\pm$ 0.009                                                                        | 100.00                                   |
| 2 | (+) Kontrol                                          | 0.854 $\pm$ 0.004 +++                                                                    | 50.00                                    |
| 3 | 10 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin  | 1.931 $\pm$ 0.135 +,***                                                                  | 113.00                                   |
| 4 | 20 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin  | 1.774 $\pm$ 0.209 ***                                                                    | 103.80                                   |
| 5 | 50 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin  | 1,228 $\pm$ 0.050 +++,***                                                                | 71.90                                    |
| 6 | 100 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin | 1.744 $\pm$ 0.099 ***                                                                    | 102.00                                   |
| 7 | 200 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin | 1.466 $\pm$ 0.084 ++,***                                                                 | 85.80                                    |
| 8 | 400 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin | 0.940 $\pm$ 0.042 +++                                                                    | 55.00                                    |
| 9 | 600 $\mu$ g/ml Boron Nitrit<br>Nanotüpleri +Kurkumin | 0.631 $\pm$ 0.152 +++,**                                                                 | 36.90                                    |

\*Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Boron nitrit nanotüpleri ve Kurkumin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 1 DMSO ve pozitif kontrol olarak 20  $\mu$ M sisplatin uygulanmıştır. (+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (20  $\mu$ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır) .

## 4.2. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin Genotoksisitesinin COMET Yöntemi ile Belirlenmesi

### 4.2.1. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde 30 Dakikalık İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin sitotoksik etki göstermediği 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ile bunların standart hataları verilmiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.4).

Boron nitrit nanotüplerinin negatif kontrol ile kıyaslandığında 0.5 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını artırdığı, ancak diğer konsantrasyonlarda azalttığı, bu azalışın 10 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında negatif kontrole kıyasla anlamlı olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Uygulanan tüm konsantrasyonlarda meydana gelen DNA hasarının pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde azaldığı belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, boron nitrit nanotüplerinin 0.5 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk momenti cinsinden DNA hasarının anlamlı olarak arttığı (sırasıyla  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda azaldığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p < 0.001$ ).

Kurkuminin 0.5 µg/ml konsantrasyonunda, insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde oluşturduğu kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı ( $p<0.001$ ), ancak diğer tüm konsantrasyonlarda oluşan DNA hasarının azaldığı, bu azalışın 5, 10, 20 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında anlamlı olduğu gözlenmiştir (5, 20 µg/ml için  $p<0.01$ ; 10, 100 µg/ml için  $p<0.05$ ). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, kurkuminin 0.5 µg/ml konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla DNA hasarının azaldığı, ancak 0.5 µg/ml konsantrasyonunda oluşan DNA hasarının anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ( $p<0.001$ ). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı konsantrasyonlardaki DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, negatif kontrole kıyasla DNA hasarının 1 µg/ml konsantrasyonunda anlamlı şekilde arttığı ( $p<0.05$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda azaldığı, bu azalışın 10 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, negatif kontrole kıyasla DNA hasarının 1 µg/ml konsantrasyonunda anlamlı şekilde arttığı ( $p<0.001$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda azaldığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

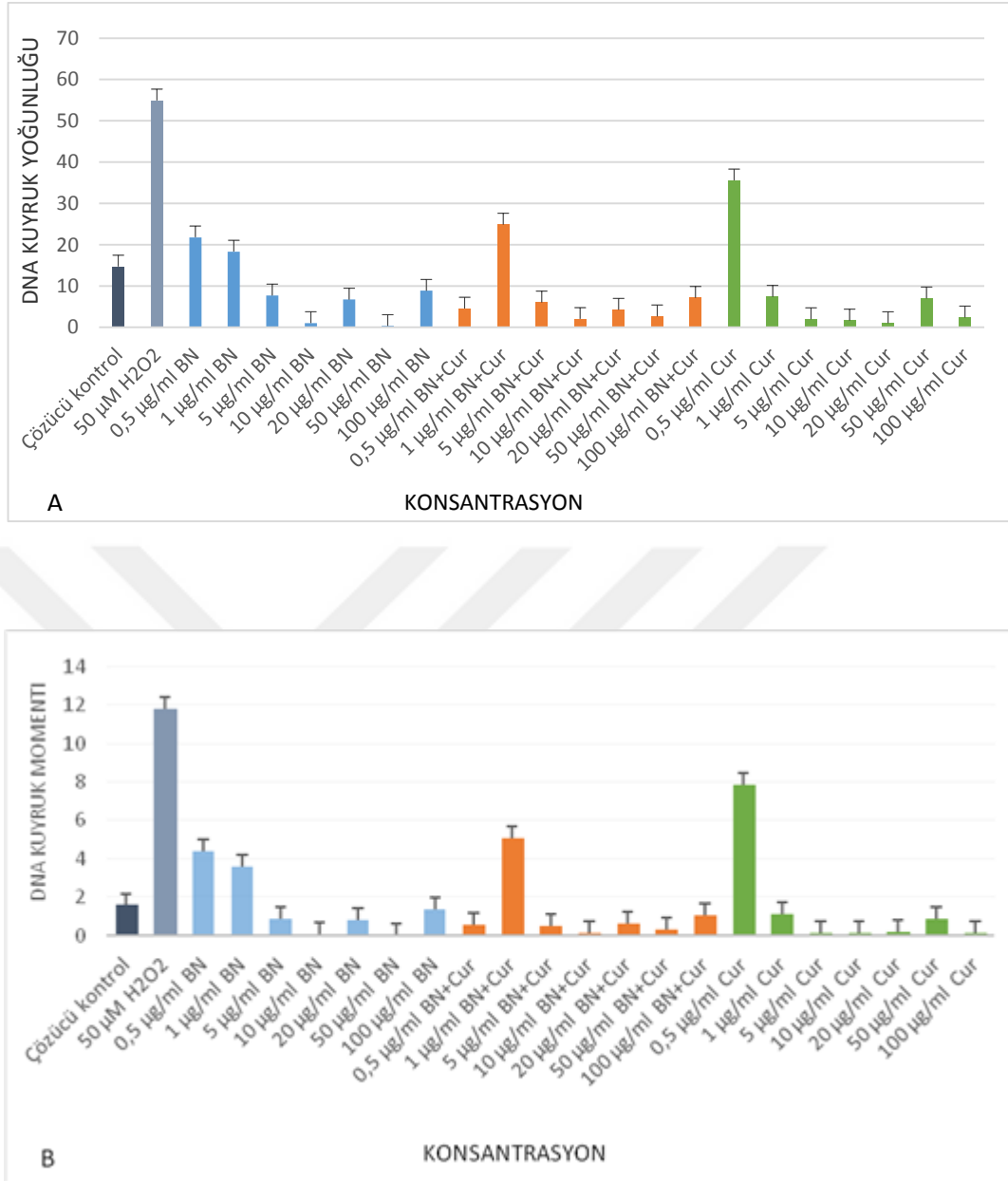
**Tablo 4.4.** Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde 30 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisine ilişkin bulgular. \*

| Konsantrasyon                       | Kuyruk Yoğunluğu     | Kuyruk Momenti       |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Çözücü kontrol                      | 14.69 ± 8.15         | 1.58 ± 1.03          |
| 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 54.91 ± 27.59 +++    | 11.78 ± 5.88 +++     |
| 0,5 µg/ml BN                        | 21.85 ± 1.05 ***     | 4.37 ± 0.23 ++, ***  |
| 1 µg/ml BN                          | 18.33 ± 1.34 ***     | 3.57 ± 0.31 +, ***   |
| 5 µg/ml BN                          | 7.71 ± 1.09 ***      | 0.88 ± 0.13 ***      |
| 10 µg/ml BN                         | 1.03 ± 0.30 ++, ***  | 0.06 ± 0.02 ***      |
| 20 µg/ml BN                         | 6.70 ± 2.49 ***      | 0.78 ± 0.29 ***      |
| 50 µg/ml BN                         | 0.31 ± 0.07 ++, ***  | 0.04 ± 0.007 ***     |
| 100 µg/ml BN                        | 8.84 ± 0.66 ***      | 1.34 ± 0.13 ***      |
| 0,5 µg/ml BN + Cur                  | 4.53 ± 1.72 ***      | 0.58 ± 0.30 ***      |
| 1 µg/ml BN + Cur                    | 24.86 ± 1.11 +, ***  | 5.05 ± 0.26 +++, *** |
| 5 µg/ml BN + Cur                    | 5.99 ± 2.75 ***      | 0.51 ± 0.26 ***      |
| 10 µg/ml BN + Cur                   | 2.02 ± 0.23 ++, ***  | 0.15 ± 0.01 ***      |
| 20 µg/ml BN + Cur                   | 4.25 ± 1.17 ***      | 0.61 ± 0.15 ***      |
| 50 µg/ml BN + Cur                   | 2.65 ± 0.28 +, ***   | 0.31 ± 0.03 ***      |
| 100 µg/ml BN + Cur                  | 7.12 ± 1.42 ***      | 1.04 ± 0.25 ***      |
| 0,5 µg/ml Cur                       | 35.58 ± 1.27 +++, ** | 7.86 ± 0.32 +++, *** |
| 1 µg/ml Cur                         | 7.38 ± 0.75 ***      | 1.12 ± 0.12 ***      |
| 5 µg/ml Cur                         | 1.97 ± 0.26 ++, ***  | 0.14 ± 0.02 ***      |
| 10 µg/ml Cur                        | 1.62 ± 0.54 +, ***   | 0.15 ± 0.05 ***      |
| 20 µg/ml Cur                        | 1.01 ± 0.11 ++, ***  | 0.17 ± 0.01 ***      |
| 50 µg/ml Cur                        | 7.00 ± 0.81 ***      | 0.87 ± 0.11 ***      |
| 100 µg/ml Cur                       | 2.38 ± 0.49 +, ***   | 0.14 ± 0.03 ***      |

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.4.** Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisi. \*

\*DNA hasarı; DNA kuyruk yoğunluğu (A), DNA kuyruk momenti (B) olarak verilmiştir.

Sonuçlar, üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kıyaslanmıştır.

#### **4.2.2. Boron Nitrit Nanotüpleri ve Kurkuminin İnsan Kemik İliği CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Progenitör Hücrelerinde 24 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi**

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin sitotoksik etki göstermediği 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ile bunların standart hataları verilmiştir (Tablo 4.5) (Şekil 4.5).

Boron nitrit nanotüplerinin, negatif kontrol ile kıyaslandığında, 0.5, 1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında, insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını artırdığı, ancak diğer konsantrasyonlarda azalttığı, bu azalışın 5 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında negatif kontrole kıyasla anlamlı olduğu gözlenmiştir (p<0.05). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır (p<0.001).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, boron nitrit nanotüplerinin 0.5, 1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk momenti cinsinden DNA hasarının arttığı, ancak diğer konsantrasyonlarda azaldığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır (p<0.001).

Kurkuminin 50 µg/ml konsantrasyonunda, insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden oluşturduğu DNA hasarının negatif kontrol ile kıyaslandığında azaldığı, ancak diğer tüm konsantrasyonlarda arttığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır (p<0.001).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, negatif kontrole kıyasla kurkuminin 50 µg/ml konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda DNA hasarının arttığı, ancak 50 µg/ml konsantrasyonunda oluşan DNA hasarının azaldığı görülmüştür. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı konsantrasyonlarda DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, negatif kontrole kıyasla DNA hasarının 5, 20 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında anlamlı şekilde azaldığı ( $p<0.05$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda arttığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, negatif kontrole kıyasla DNA hasarının 5, 20 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında azaldığı, ancak diğer konsantrasyonlarda arttığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, meydana gelen DNA hasarında önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

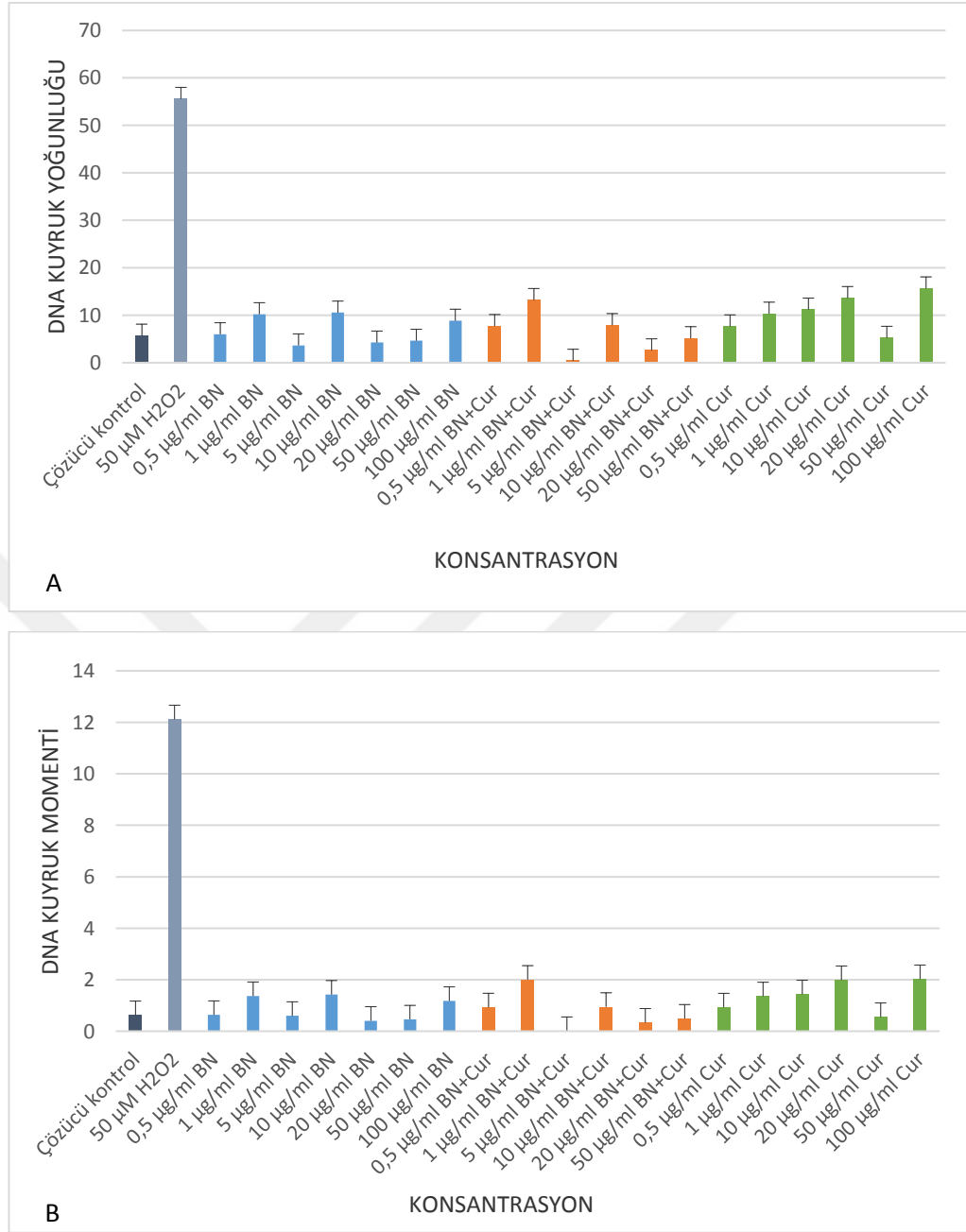
**Tablo 4.5.** Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitor hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine ilişkin bulgular. \*

| Konsantrasyon                       | Kuyruk Yoğunluğu   | Kuyruk Momenti     |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Çözücü kontrol                      | 5.70 ± 2.08        | 0.62 ± 0.20        |
| 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 55.58 ± 27.92 +++  | 12.11 ± 6.05 +++   |
| 0,5 µg/ml BN                        | 5.99 ± 0.41 ***    | 0.63 ± 0.05 ***    |
| 1 µg/ml BN                          | 10.21 ± 0.70 ***   | 1.36 ± 0.11 ***    |
| 5 µg/ml BN                          | 3.65 ± 1.32 +,***  | 0.59 ± 0.25 ***    |
| 10 µg/ml BN                         | 10.54 ± 0.99 ***   | 1.42 ± 0.15 ***    |
| 20 µg/ml BN                         | 4.24 ± 1.15 ***    | 0.40 ± 0.12 ***    |
| 50 µg/ml BN                         | 4.62 ± 0.93 +,***  | 0.45 ± 0.09 ***    |
| 100 µg/ml BN                        | 8.84 ± 0.78 ***    | 1.17 ± 0.12 ***    |
| 0,5 µg/ml BN + Cur                  | 7.71 ± 0.49 ***    | 0.93 ± 0.07 ***    |
| 1 µg/ml BN + Cur                    | 13.20 ± 1.04 ***   | 2.00 ± 0.18 ***    |
| 5 µg/ml BN + Cur                    | 0.41 ± 0.003 +,*** | 0.01 ± 0.00001 *** |
| 10 µg/ml BN + Cur                   | 7.91 ± 0.82 ***    | 0.94 ± 0.11 ***    |
| 20 µg/ml BN + Cur                   | 2.59 ± 1.29 +,***  | 0.33 ± 0.21 ***    |
| 50 µg/ml BN + Cur                   | 5.15 ± 0.48 +,***  | 0.49 ± 0.05 ***    |
| 0,5 µg/ml Cur                       | 7.66 ± 0.69 ***    | 0.92 ± 0.09 ***    |
| 1 µg/ml Cur                         | 10.32 ± 0.49 ***   | 1.35 ± 0.07 ***    |
| 10 µg/ml Cur                        | 11.19 ± 0.89 ***   | 1.43 ± 0.12 ***    |
| 20 µg/ml Cur                        | 13.62 ± 2.04 ***   | 1.98 ± 0.30 ***    |
| 50 µg/ml Cur                        | 5.24 ± 0.96 ***    | 0.55 ± 0.12 ***    |
| 100 µg/ml Cur                       | 15.66 ± 5.93 ***   | 2.02 ± 0.75 ***    |

\*Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.5.** Boron nitrit nanotüpleri (BN) ve kurkuminin (Cur) insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarına etkisi. \*

\*DNA hasarı; DNA kuyruk yoğunluğu (A), DNA kuyruk momentı (B) olarak verilmiştir.

Sonuçlar, üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%1)] ile kıyaslanmıştır.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, pozitif kontrol (50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kıyaslanmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşma özellikleri nedeniyle yenileyici tedavi (kemoterapi, doku onarımı, diş hekimliği, estetik cerrahi), ilaç geliştirme çalışmaları, toksisite testleri, kök hücre kaynaklı hastalıklar ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi alanlarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (3,247).

İnsan hayatında önemli bir yere sahip olan ksenobiyotiklerin olası toksik etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan hayvan modellerine alternatif bulunması ve toksisite mekanizmalarının detaylı incelenmesi için kök hücre potansiyel bir alandır. Kök hücre kullanımına dayanan toksikoloji araştırmaları, toksikanların farklılaşma süreci ve farklılaşmış (olgun) hücre fonksiyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesine olanak sağlar (1,2). Ayrıca, türler arası farklılıktan kaynaklanan toksisite değişimlerini de ortadan kaldırır (248).

Hematopoezden sorumlu olan ve çeşitli hücre hatlarına farklılaşabilen kemik iliği hematopoetik kök hücreleri, bu hücrelerin tedavide kullanımları ve toksisite test modellerinin geliştirilmesi açısından önemlidir (48,72). Genotoksik ajanların kemik iliği kök hücrelerindeki kanser, anemi ve hücre yaşlanması şeklinde sonuçlanabilen etkileri uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler aracılığıyla kalıcı olabilmekte, bu nedenle hematopoetik kök hücrelerinin sitotoksisite ve genotoksisite açısından değerlendirilmesi gerekmektedir (5).

Boron nitrit nanotüpleri, istenmeyen koşullara dayanıklılıkları, biyolojik inert olmaları, manyetik ve piezoelektrik özellikleri nedeniyle pek çok alanda ve klinik uygulamalarda nanovektör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (10,158).

Geleneksel tıp uygulamalarında uzun zamandır kullanılan ve antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar etkileriyle dikkat çekici bir fenolik bileşik olan kurkuminin biyoyararlanımını artırmak amacıyla çeşitli formülasyonlar (nanopartikül, mukoadhesif, lipozom) kullanılmaktadır (179,249,250). Bu açıdan boron nitrit nanotüpleri nanovektör olarak uygun bir formülasyon maddesi olabilir. Ancak, boron nitrit nanotüplerinin ve kurkuminin toksisitesi hakkında farklı bulgular bulunmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında toksisite test çalışmalarında hayvan deneylerine uygun bir alternatif olabilecek ve klinik uygulamalarda kullanılan kemik iliği kök hücrelerinde, boron nitrit nanotüpleri ile kurkuminin sitotoksik ve genotoksik

etkilerinin incelenmesi, olası maruziyet etkilerinin ya da tedavi amaçlı kullanımlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Kemik iliği kök hücrelerindeki genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında kemik iliği mezenkimal ve hematopoetik kök hücreleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise,  $CD34^+$  hematopoetik progenitör hücrelerindeki boron nitrit nanotüplerinin ve bir fenolik bileşik olan kurkuminin genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışılan boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin geniş doz aralığındaki (10-600  $\mu\text{g/ml}$ ) sitotoksik etkileri ise MTT yöntemiyle HeLa (insan serviks kanser) hücrelerinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda boron nitrit nanotüplerinin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde 10-600  $\mu\text{g/ml}$  doz aralığında  $IC_{50}$  değeri saptanamamıştır. Boron nitrit nanotüplerinin, 10-50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, 50-100  $\mu\text{g/ml}$  ve 400-600  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında hücre canlılığında artışa neden olduğu; ancak 100-400  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki oluşturarak hücre canlılığını %80 seviyesine düşürdüğü gözlenmiştir. Benzer bir çalışma Ciofani ve diğ. tarafından insan nöroblastoma hücrelerinde polietilenimin ve glikol-kitosan kaplı boron nitrit nanotüpleri ile yapılmış, sırasıyla 5  $\mu\text{g/ml}$  ve 100  $\mu\text{g/ml}$  dozuna kadar hücre canlılığının olumsuz etkilenmediği görülmüştür. Bu çalışmada MTT ve WST-1 sitotoksisite testlerinde farklı sonuçlar elde edilmiş, bu durum karbon nanotüpleri gibi boron nitrit nanotüplerinin de formazan kristallerine bağlanarak çökmesine, çözücünün etkisiyle beklenen renk değişiminin gözlenememesine bağlanmıştır (102,153,251).

Ferreira ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada glukozamin, kitosan ve polietilen-glikol ile kaplanmış boron nitrit nanotüplerinin insan fetal akciğer fibroblast (MRC-5) hücrelerindeki sitotoksisitesi değerlendirildiğinde 50  $\mu\text{g/ml}$  dozuna kadar hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisi gözlenmemiş, kitosan ve polietilen-glikol kaplı boron nitrit nanotüplerinin belirgin sitotoksik etkileri ise 100  $\mu\text{g/ml}$  dozunda gözlenmiştir (252). Horvath ve diğ. tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada tween 80 kaplı boron nitrit nanotüplerinin akciğer epitel hücreleri (A549), alveoler makrofaj hücreleri (RAW 264.7), insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) ve fibroblast (3T3-L1) hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve 2  $\mu\text{g/ml}$  boron

nitrit nanotüp dozunun tüm hücre türlerinde belirgin sitotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir. Düşük dozda gözlenen sitotoksik etkinin kullanılan dispersiyon ajanından kaynaklandığı düşünülmüştür (158). Boron nitrit nanotüplerinin HEK293 hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonunda sitotoksik olmadığını bildiren çalışma da bulunmaktadır (253).

Hidroksillenmiş (h-BNNT) ve karbonhidrat bağlı (m-BNNT) boron nitrit nanotüpleri 5-200 µg/ml doz aralığında insan dermal fibroblast (HDF) hücre canlılığını etkilemezken, A549 hücrelerinin canlılığını 100-200 µg/ml dozlarında %40-60 oranında azaltmıştır (80). Ferreira ve diğ. tarafından NIH/3T3 ve A549 hücrelerinde yapılan çalışmada ise boron nitrit nanotüplerinin 62,5 µg/ml doz seviyesine kadar hücre canlılığını olumsuz etkilemediği ( $IC_{50}=62,5-125$  µg/ml) belirlenmiştir (254).

Boron nitrit nanotüplerinin insan osteoblast ve fare makrofaj hücreleri için, sitotoksik olmadığı (151), insan glioblastoma, insan dişeti fibroblast hücrelerinin, insan damar endotel hücrelerinin morfolojik ve canlılık özelliklerini etkilemediği görülmüştür (152,154,159,255,256).

Transferrin bağlı boron nitrit nanotüplerinin insan umbilikal damar endotel hücrelerinin ve NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin ise 100 µg/ml doz seviyesinde hücre canlılığını %15 ve %16 azalttığı belirlenmiştir (257,258).

Li ve diğ. tarafından, mezenkimal kök hücrelerinde yapılmış diğer bir çalışmada, boron nitrit nanotüplerinin 0-25 µg/ml doz aralığında hücrelerin alkalen fosfataz (2 µg/ml BNNT) düzeyini artırarak osteoblastik farklılaşmayı indüklediği ve 5 µg/ml BNNT konsantrasyonuna kadar hücre proliferasyonunu artırdığı, 5-25 µg/ml doz aralığında ise hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (259). Boron nitrit nanotüpleriyle yapılmış çalışmalar değerlendirildiğinde, kaplama ya da modifikasyon gibi işlemlerin ve çalışılan hücre türünün boron nitrit nanotüplerinin sitotoksik özellikleri konusunda belirgin farklılıklara neden olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada kurkuminin 10-600 µg/ml konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyon sonundaki HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle değerlendirildiğinde, uygulanan doz aralığında  $IC_{50}$  değeri saptanamamıştır. Benzer bir çalışma Kumar ve diğ. tarafından yapılmıştır. Kurkuminin Hela hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle değerlendirildiğinde,  $IC_{50}$  değeri 16.52

$\mu\text{M}$  olarak, bir başka çalışmada ise 25-50  $\mu\text{M}$  arasında belirlenmiştir (260,261). Strasser ve diğ. tarafından insan myelomonositik U937 hücrelerinde yapılan bir çalışmada 20  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonunda uygulanan kurkuminin hücre canlılığını %84 azalttığı tespit edilmiştir (262). İnsan papiller tiroid karsinoma hücrelerinin canlılık düzeyinde de uygulanan 12,5-25  $\mu\text{M}$  kurkumin etkisiyle belirgin azalma saptanmıştır (263). Feokromositoma PC12 sıçan hücrelerindeki  $\text{IC}_{50}$  değeri 64-128  $\mu\text{g/ml}$  arasında bulunmuştur (264).

Bu çalışmada, boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı dozlardaki hücre canlılığı ile tek başına uygulandıklarındaki hücre canlılığı kıyaslandığında; boron nitrit nanotüplerinin sadece 10  $\mu\text{g/ml}$  dozunda kurkumin ile birlikte uygulanmasının boron nitritin tek başına uygulandığı duruma göre (her doz gurubu kendi içinde kıyaslandığında) hücre canlılığını artırdığı, 20-600  $\mu\text{g/ml}$  aralığında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Bu kıyaslama kurkuminin tek başına uygulaması temel alınarak yapıldığında ise 100  $\mu\text{g/ml}$  dozunda boron nitrit nanotüplerinin ilavesiyle hücre canlılığında artış meydana geldiği, diğer doz gruplarında ise canlılıkta azalma olduğu belirlenmiştir (20  $\mu\text{g/ml}$  ve 600  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında  $p < 0.05$ ; 50 ve 400  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında  $p < 0.001$ ).

Kurkuminin nanoformülasyonlarda kullanılmak üzere incelendiği çalışmalarda tek duvarlı karbon nanotüpleri ve poli (laktik-ko-glikolid) içeren nanokurkuminin antikanser ve antitümör aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (261,271). Boron nitrit nanotüplerinin de, kemik iliği  $\text{CD34}^+$  hematopoetik progenitör kök hücreleri için 100  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda uygun bir kurkumin taşıyıcısı olabileceği düşünülebilir.

Literatürde kemik iliği  $\text{CD34}^+$  hücrelerinde boron nitrit nanotüpleri veya kurkuminin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız,  $\text{CD34}^+$  hücrelerinde, boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu hücrelerde yapılmış genotoksite ve sitotoksisite çalışmalarında UV radyasyon, gama radyasyon, 1,4-benzokinon ve endojen aldehitlerin etkileri araştırılmıştır. Radyasyon etkisinin incelendiği çalışmalarda DNA tek ve çift zincir kırıkları Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. UV radyasyon etkisinin incelendiği çalışmada  $\text{CD34}^+$  hücrelerinin

CD34<sup>-</sup> hücrelerine göre DNA tek zincir kırıklarının onarımında daha etkili olduğu, gama radyasyon etkisinin incelendiği çalışmada ise meydana gelen DNA hasarının 3 saat içinde onarıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, CD34<sup>+</sup> hücrelerinin etilnitrozürenin yol açtığı DNA tek zincir kırıklarının onarımında CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> ve CD33<sup>+</sup> hücrelerine göre yetersiz kaldığı görülmüştür. Abernethy ve diğ. tarafından yapılan çalışmada; 1,4-benzokinonun CD34<sup>+</sup> hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarında p53 yolağının görev aldığı belirlenmiştir (80,83,266,267).

Bu çalışmada boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin 0.5-100 µg/ml konsantrasyon aralığında CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki DNA hasarına etkileri Comet yöntemiyle değerlendirildiğinde, boron nitrit nanotüplerinin 30 dakikalık inkübasyon sonunda 0.5 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden DNA hasarını artırdığı, ancak diğer konsantrasyonlarda azalttığı, gözlenmiştir (p<0.01).

Boron nitrit nanotüplerinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise, 0.5, 1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında, insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden DNA hasarını negatif kontrol ile kıyaslandığında artırdığı, ancak diğer konsantrasyonlarda azalttığı gözlenmiştir (p<0.05).

Boron nitrit nanotüplerinin 30 dakika ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinin sonundaki DNA hasarı, her doz grubu kendi içinde kıyaslandığında ise, meydana gelen DNA hasarının 24 saatin sonunda 30 dakikalık inkübasyon süresine göre 0.5, 1, 5, 20 µg/ml konsantrasyonlarında azaldığı (0.5 ve 1 µg/ml; p<0.001), 10, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında arttığı (10 µg/ml, p<0.001; 50 µg/ml, p<0.05) belirlenmiştir. Bu durum 10-20 µg/ml nin altındaki konsantrasyonlarda boron nitrit nanotüplerine maruz kalan CD34<sup>+</sup> kök hücrelerinde oluşan DNA hasarı 24 saat sonra onarılırken, 10-20 µg/ml nin üstündeki konsantrasyonlarda boron nitrit nanotüplerine maruz kalan CD34<sup>+</sup> kök hücrelerinde oluşan DNA hasarının 24 saat sonra onarılamadığını düşündürmektedir.

Boron nitrit nanotüplerinin 50 µg/ml dozuna kadar akciğer fibroblast hücrelerinde kromozom hasarı oluşturmadığı bu dozun üzerinde ROS (reaktif oksijen türleri) artışına bağlı olarak hücrede hasara yol açtığı belirlenmiştir (252). İnsan dermal fibroblast hücreleri ve alveoler bazal epitel hücrelerinde yapılan çalışmada da 100-200 µg/ml konsantrasyonlarındaki boron nitrit nanotüplerinin DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir (268). Yüksek doz gruplarında 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı artışının ROS oluşumuna bağlı olduğu düşünülebilir.

Kurkuminin 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda, 0.5 µg/ml konsantrasyonunda insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden DNA hasarını negatif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak artırdığı ( $p<0.001$ ), ancak diğer tüm konsantrasyonlarda DNA hasarını azalttığı gözlenmiştir.

Kurkuminin 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki, 50 µg/ml konsantrasyonunda insan kemik iliği CD34<sup>+</sup> hematopoetik progenitör hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden DNA hasarını negatif kontrol ile kıyaslandığında azalttığı, ancak diğer tüm konsantrasyonlarda DNA hasarını artırdığı gözlenmiştir.

Kurkuminin 30 dakika ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda meydana getirdiği DNA hasarı kıyaslandığında ise, 24 saatin sonundaki DNA hasarının 0.5 µg/ml konsantrasyonunda azalırken ( $p<0.001$ ), 1, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında arttığı tespit edilmiştir (1 µg/ml,  $p<0.01$ ; 10 ve 20 µg/ml,  $p<0.001$ ). Kurkuminin genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin meydana gelen DNA hasarından sorumlu olabileceği görülmüştür. Bu durum 0.5 µg/ml konsantrasyonda kurkumine maruz kalan CD34<sup>+</sup> kök hücrelerinde oluşan DNA hasarı 24 saat sonra onarılırken, 1, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda kurkumine maruz kalan CD34<sup>+</sup> kök hücrelerinde oluşan DNA hasarının 24 saat sonra onarılamadığını düşündürmektedir.

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı konsantrasyonlarda 30 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, DNA hasarının 1 µg/ml

konsantrasyonunda negatif kontrole kıyasla anlamlı şekilde arttığı ( $p<0.05$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda azaldığı gözlenmiştir.

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı konsantrasyonlarda 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise, DNA hasarının negatif kontrole kıyasla 5, 20 ve 50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında anlamlı şekilde azaldığı ( $p<0.05$ ), ancak diğer konsantrasyonlarda arttığı belirlenmiştir.

Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin birlikte uygulandığı konsantrasyonlarda 30 dakika ve 24 saatlik inkübasyon süreleri kıyaslandığında ise, 24 saatin sonundaki DNA hasarının 30 dakikalık inkübasyon süresine göre 1, 5 ve 20  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında azaldığı (1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0.001$ ), 10 ve 50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında arttığı tespit edilmiştir (10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0.001$ ; 50  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0.05$ ). Bu durum 10-20  $\mu\text{g/ml}$  nin altındaki konsantrasyonlarda boron nitrit nanotüpleri ve kurkumine birlikte maruz kalan  $\text{CD34}^+$  kök hücrelerinde oluşan DNA hasarı 24 saat sonra onarılırken, 10-20  $\mu\text{g/ml}$  nin üstündeki konsantrasyonlarda boron nitrit nanotüpleri ve kurkumine birlikte maruz kalan  $\text{CD34}^+$  kök hücrelerinde oluşan DNA hasarının 24 saat sonra onarılamadığını düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kök hücreler; uzun süre bölünebilme, kendilerini yenileme ve farklılaşma özellikleri nedeniyle toksisite test yöntemlerinde potansiyel bir alternatiftir. Kan hücrelerine kaynaklık eden hematopoetik kök hücreler ile osteosit, adiposit gibi hücrelere farklılaşan mezenkimal kök hücrelerinin bu çalışmalarda kullanımları test materyalinin farklılaşma sürecine etkilerinin belirlenmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda kimyasal stabilitesi, oksidasyon direnci, gerilim dayanıklılığı gibi kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde geniş kullanım alanına sahip boron nitrit nanotüpleri ile antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser özellikleri nedeniyle dikkat çekici bir fenolik bileşik olan kurkuminin sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin biyolojik sıvılarda çözünür olmaması biyomedikal uygulamarda kullanımına engel olabilecek bir özelliktir. Bu nedenle boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin çözünürlüğünü artırmak amacıyla geliştirilmiş farklı formülasyonlar bulunmaktadır. İnert yapıdaki boron nitrit nanotüplerinin kurkumin için uygun bir nanovektör olabileceği düşünüldüğünde bu maddelerin kemik iliği kök hücrelerindeki etkilerinin bilinmesi tedavi amaçlı kullanımının değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Boron nitrit nanotüplerinin yer aldığı çalışmalar çoğunlukla çözünürlük problemine yöneliktir ve biyolojik etkilerine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Kurkuminin yer aldığı çalışmalarda ise doza bağlı antioksidan-prooksidan, antikanser ya da karsinojen özellikleri, antikoagülan ilaçlarla etkileşme potansiyeli incelendiğinde bu bileşiğin kullanılan tedavi dozu ve hastalık türü konusunda dikkatli olunması gerektiği görülmektedir. Boron nitrit nanotüpleri ve kurkuminin kemik iliği kök hücrelerinin morfolojik, canlılık ve DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerinin, etki mekanizmalarının değerlendirilmesi konusunda olası hastalıkların önlenmesi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Liu, W., Deng, Y., Liu, Y., Gong, W., Deng, W. (2013). Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 27 (1), 17-27.
2. Mori, H., Hara, M. (2013). Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116 (6), 647-652.
3. Kang, K.-S., Trosko, J.E. (2011). Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. *Toxicological Sciences*, 120 (suppl 1), S269-S289.
4. Edwards, R. (2004). Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 9 (5), 541-583.
5. Parmar, K., D'Andrea, A.D. (2012). Stressed out: endogenous aldehydes damage hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 11 (5), 583-584.
6. Xu, A., Hei, T.K. (1992). Genotoxicity of Nanoparticles. *Center for Radiological Research-630 W. 168 St., New York, NY 10032*, 52, 47.
7. Azqueta, A., Dusinska, M. (2015). The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Frontiers in genetics*, 6.
8. Ciofani, G., Raffa, V., Menciassi, A., Dario, P. (2008). Preparation of boron nitride nanotubes aqueous dispersions for biological applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8 (12), 6223-6231.
9. Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., Golberg, D. (2010). Boron nitride nanotubes. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 70 (3), 92-111.
10. Ciofani, G., Raffa, V., Menciassi, A., Cuschieri, A. (2009). Boron nitride nanotubes: an innovative tool for nanomedicine. *Nano Today*, 4 (1), 8-10.
11. Punfa, W., Yodkeeree, S., Pitchakarn, P., Ampasavate, C., Limtrakul, P. (2012). Enhancement of cellular uptake and cytotoxicity of curcumin-loaded PLGA nanoparticles by conjugation with anti-P-glycoprotein in drug resistance cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33 (6), 823-831.
12. Yin, H., Zhang, H., Liu, B. (2013). Superior anticancer efficacy of curcumin-loaded nanoparticles against lung cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45 (8), 634-640.

13. İnan, S.,Özbilgin, K. (2009). Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1, 11-23.
14. Karaşahin, T. (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9 (1).
15. Gundry, R.L., Burrridge, P.W.,Boheler, K.R. (2011). Pluripotent stem cell heterogeneity and the evolving role of proteomic technologies in stem cell biology. *Proteomics*, 11 (20), 3947-3961.
16. Simara, P., Motl, J.A.,Kaufman, D.S. (2013). Pluripotent stem cells and gene therapy. *Translational research*, 161 (4), 284-292.
17. Kansu, E. (2005). Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36, 191-197.
18. Kalra, K.,Tomar, P. (2014). Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2 (7), 919-930.
19. Yılmaz, O., Uçar, M. (2006). Kök Hücre Çalışmaları ve Terapötik Klonlama. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 16 (1), 26-31.
20. Ural, A.U. (2006). Kök hücre. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 5, 3-4.
21. Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441 (7097), 1060-1060.
22. Beksaç, M. (2010). Kök Hücre. *Bilim ve Teknik*, 36-41.
23. Davila, J.C., Cezar, G.G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T.,Trosko, J. (2004). Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological Sciences*, 79 (2), 214-223.
24. Bongso, A.,Lee, E.H. (2005). Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. *Stem Cells: From Bench to Bedside*, 1.
25. Maynard, S., Swistowska, A.M., Lee, J.W., Liu, Y., Liu, S.T., Da Cruz, A.B. ve diğerleri. (2008). Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*, 26 (9), 2266-2274.
26. Zur Nieden, N., Ruf, L., Kempka, G., Hildebrand, H.,Ahr, H. (2001). Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicology in vitro*, 15 (4), 455-461.

27. Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Osawa, E., Hussin, S., Dai, L. (2011). DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS nano*, 5 (3), 2376-2384.
28. Özel, H.B., Enver, O., Dabak, D.Ö. (2008). Embriyonik kök hücreler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28 (3), 333-341.
29. Rohwedel, J., Guan, K., Hegert, C., Wobus, A. (2001). Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicology in vitro*, 15 (6), 741-753.
30. Kerr, C.L., Gearhart, J.D., Elliott, A.M., Donovan, P.J. (2006). Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells [Bildiri]. Seminars in reproductive medicine.
31. Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M. (2014). Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences: Academic Press.
32. Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.B., Deans, R. ve diğerleri. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine*, 6 (11), 1282-1286.
33. Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H. ve diğerleri. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, 288 (5471), 1660-1663.
34. Fiegel, H., Lange, C., Kneser, U., Lambrecht, W., Zander, A., Rogiers, X. ve diğerleri. (2006). Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10 (3), 577-587.
35. Poulsom, R., Alison, M.R., Forbes, S.J., Wright, N.A. (2002). Adult stem cell plasticity. *The Journal of pathology*, 197 (4), 441-456.
36. Blau, H.M., Brazelton, T., Weimann, J. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105 (7), 829-841.
37. Travlos, G.S. (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicologic pathology*, 34 (5), 548-565.
38. Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., Gerson, S.L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 176 (1), 57-66.

39. Wu, Y., Wang, J., Scott, P.G., Tredget, E.E. (2007). Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 15 (s1), S18-S26.
40. Yin, T., Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation*, 116 (5), 1195.
41. Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J. ve diğeri. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107 (5), 1878-1887.
42. Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *cell*, 121 (7), 1109-1121.
43. Bahar Zehra Çamurdanoğlu, E.K. (2009). Erişkin ve Hematopoetik Kök Hücreler (Rapor No). Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi.
44. Erden, S. (2014). Kök Hücreler ve Klinikte Kullanımları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science* (3), 1-8.
45. Suda, T., Takubo, K., Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*, 9 (4), 298-310.
46. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B. ve diğeri. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410 (6829), 701-705.
47. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L. ve diğeri. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*, 6 (11), 1229-1234.
48. Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sävén, P., Röhl, W., Hescheler, J. ve diğeri. (2004). Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine*, 10 (5), 494-501.
49. Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., Robbins, R.C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428 (6983), 668-673.

50. Smith, J.N., Calvi, L.M. (2013). Concise review: current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 31 (6), 1044-1050.
51. Orkin, S.H., Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132 (4), 631-644.
52. Fuchs, E., Tumber, T., Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116 (6), 769-778.
53. Watt, F.M., Hogan, B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287 (5457), 1427.
54. Christensen, J.L., Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (25), 14541-14546.
55. Passegué, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *The Journal of experimental medicine*, 202 (11), 1599-1611.
56. Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, 103 (9), 3258-3264.
57. Li, Z., Li, L. (2006). Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences*, 31 (10), 589-595.
58. He, N., Zhang, L., Cui, J., Li, Z. (2014). Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone marrow research*, 2014.
59. Suda, T., Arai, F., Hirao, A. (2005). Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends in immunology*, 26 (8), 426-433.
60. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25 (6), 977-988.
61. Salter, A.B., Meadows, S.K., Muramoto, G.G., Himburg, H., Doan, P., Daher, P. ve diğeri. (2009). Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. *Blood*, 113 (9), 2104-2107.

62. Roobrouck, V.D., Clavel, C., Jacobs, S.A., Ulloa-Montoya, F., Crippa, S., Sohni, A. ve diğerleri. (2011). Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells*, 29 (5), 871-882.
63. Kundrotas, G., Gasperskaja, E., Slapsyte, G., Gudleviciene, Z., Krasko, J., Stumbryte, A. ve diğerleri. (2016). Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow.
64. Healy, M.E., Bergin, R., Mahon, B.P., English, K. (2015). Mesenchymal Stromal Cells Protect Against Caspase 3-Mediated Apoptosis of CD19+ Peripheral B Cells Through Contact-Dependent Upregulation of VEGF. *Stem cells and development*, 24 (20), 2391-2402.
65. Arnulf, B., Lecourt, S., Soulier, J., Ternaux, B., Lacassagne, M.-N., Crinquette, A. ve diğerleri. (2007). Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 21 (1), 158-163.
66. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. ve diğerleri. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317.
67. Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A.M., Avanzini, M.A., Moretta, A. ve diğerleri. (2007). Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research*, 67 (19), 9142-9149.
68. Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M.R., Ejtemaei, M., Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International journal of stem cells*, 7 (2), 118-126.
69. Watt, S.M., Gullo, F., van der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C.P. ve diğerleri. (2013). The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British medical bulletin*, 108 (1), 25-53.

70. Orbay, H., Tobita, M., Mizuno, H. (2012). Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem cells international*, 2012.
71. Klaassen, C.D. (2013). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons (c. 1236): McGraw-Hill New York (NY).
72. Shao, L., Feng, W., Lee, K.-J., Chen, B.P., Zhou, D. (2012). A sensitive and quantitative polymerase chain reaction-based cell free in vitro non-homologous end joining assay for hematopoietic stem cells. *PloS one*, 7 (3), e33499.
73. Niedernhofer, L.J. (2008). DNA repair is crucial for maintaining hematopoietic stem cell function. *DNA repair*, 7 (3), 523-529.
74. Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447 (7145), 725-729.
75. Nwosu, V.C., Kissling, G.E., Trempus, C.S., Honeycutt, H., French, J.E. (2004). Exposure of Tg. AC transgenic mice to benzene suppresses hematopoietic progenitor cells and alters gene expression in critical signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 196 (1), 37-46.
76. Recio, L., Bauer, A., Faiola, B. (2005). Use of genetically modified mouse models to assess pathways of benzene-induced bone marrow cytotoxicity and genotoxicity. *Chemico-biological interactions*, 153, 159-164.
77. Faiola, B., Fuller, E.S., Wong, V.A., Recio, L. (2004). Gene expression profile in bone marrow and hematopoietic stem cells in mice exposed to inhaled benzene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 549 (1), 195-212.
78. Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M. ve diğ erleri. (2012). Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell stem cell*, 11 (1), 36-49.
79. Zhang, S., Yajima, H., Huynh, H., Zheng, J., Callen, E., Chen, H.-T. ve diğ erleri. (2011). Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *The Journal of cell biology*, 193 (2), 295-305.

80. Abernethy, D.J., Kleyменова, E.V., Rose, J., Recio, L., Faiola, B. (2004). Human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells are sensitive targets for toxicity induced by 1, 4-benzoquinone. *Toxicological Sciences*, 79 (1), 82-89.
81. Yoon, B.-I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D.-Y. ve diğerleri. (2001). Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Experimental hematology*, 29 (3), 278-285.
82. Buschfort-Papewalis, C., Moritz, T., Liedert, B., Thomale, J. (2002). Down-regulation of DNA repair in human CD34<sup>+</sup> progenitor cells corresponds to increased drug sensitivity and apoptotic response. *Blood*, 100 (3), 845-853.
83. Myllyperkiö, M.H., Vilpo, J.A. (1999). Increased DNA single-strand break joining activity in UV-irradiated CD34<sup>+</sup> versus CD34<sup>-</sup> bone marrow cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425 (1), 169-176.
84. Nikitina, V., Chausheva, A., Zhanataev, A., Osipova, E.Y., Durnev, A., Bochkov, N. (2011). Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 151 (4), 550-552.
85. Røslund, G.V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H. ve diğerleri. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research*, 69 (13), 5331-5339.
86. She, Y., Li, Y., Liu, Y., Asai, G., Sun, S., He, J. ve diğerleri. (2013). Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45 (1), 105-110.
87. Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V. ve diğerleri. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem cells*, 24 (4), 1095-1103.
88. Foudah, D., Redaelli, S., Donzelli, E., Bentivegna, A., Miloso, M., Dalprà, L. ve diğerleri. (2009). Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Research*, 17 (8), 1025-1039.

89. Gallina, C., Capelôa, T., Saviozzi, S., Accomasso, L., Catalano, F., Tullio, F. ve diğerleri. (2015). Human mesenchymal stem cells labelled with dye-loaded amorphous silica nanoparticles: long-term biosafety, stemness preservation and traceability in the beating heart. *Journal of nanobiotechnology*, 13 (1), 77.
90. Novotna, B., Turnovcova, K., Veverka, P., Rössner Jr, P., Bagryantseva, Y., Herynek, V. ve diğerleri. (2015). The impact of silica encapsulated cobalt zinc ferrite nanoparticles on DNA, lipids and proteins of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Nanotoxicology*, 1-9.
91. Abnosi, M.H.,Shojafar, E. (2015). Biochemical and morphological changes in bone marrow mesenchymal stem cells induced by treatment of rats with p-Nonylphenol. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18 (4), 317.
92. Abnosi, M.H.,Jafari Yazdi, Z. (2012). Sodium Arsenite Caused Mineralization Impairment in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiating to Osteoblasts. *Iranian Journal of Toxicology*, 6 (16), 577-587.
93. Hussein, A.M.,Hasan, S. (2010). Cadmium affects viability of bone marrow mesenchymal stem cells through membrane impairment, intracellular calcium elevation and DNA breakage. *Indian journal of medical sciences*, 64 (4), 177.
94. Abnosi, M., Mehranjani, M.S., Momeni, H., Najafabadi, M.M., Barati, M.,Shojafar, E. (2012). The induction of apoptosis and autophagy in rats bone Marrow mesenchymal stem cells following in vitro treatment with p-Nonylphenol. *Iranian Journal of Science and Technology*, 36 (A3), 239.
95. Sarvestani, A.S., Abdolmaleki, P., Mowla, S.J., Ghanati, F., Heshmati, E., Tavasoli, Z. ve diğerleri. (2010). Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells. *Micron*, 41 (2), 101-104.
96. Ueyama, H., Horibe, T., Hinotsu, S., Tanaka, T., Inoue, T., Urushihara, H. ve diğerleri. (2012). Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16 (1), 72-82.
97. Lee, J.-S., Park, J.-C., Kim, T.-W., Jung, B.-J., Lee, Y., Shim, E.-K. ve diğerleri. (2015). Human bone marrow stem cells cultured under hypoxic conditions present altered characteristics and enhanced in vivo tissue regeneration. *Bone*, 78, 34-45.

- 98.** King, Y.A., Chiu, Y.J., Chen, H.P., Kuo, D.H., Lu, C.C., Yang, J.S. (2014). Endoplasmic reticulum stress contributes to arsenic trioxide-induced intrinsic apoptosis in human umbilical and bone marrow mesenchymal stem cells. *Environmental toxicology*.
- 99.** Novotna, B., Jendelova, P., Kapcalova, M., Rossner, P., Turnovcova, K., Bagryantseva, Y. ve diğ erleri. (2012). Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicology letters*, 210 (1), 53-63.
- 100.** Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K. ve diğ erleri. (2011). Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology letters*, 201 (1), 27-33.
- 101.** Nune, S.K., Gunda, P., Thallapally, P.K., Lin, Y.-Y., Laird Forrest, M., Berkland, C.J. (2009). Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert opinion on drug delivery*, 6 (11), 1175-1194.
- 102.** Ciofani, G., Danti, S., D'Alessandro, D., Moscato, S., Menciasci, A. (2010). Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: interference with the MTT assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 394 (2), 405-411.
- 103.** Gao, J., Xu, B. (2009). Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*, 4 (1), 37-51.
- 104.** Kang, H., Mintri, S., Menon, A.V., Lee, H.Y., Choi, H.S., Kim, J. (2015). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale*, 7 (45), 18848-18862.
- 105.** Mudshinge, S.R., Deore, A.B., Patil, S., Bhalgat, C.M. (2011). Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal*, 19 (3), 129-141.
- 106.** Yildirim, L., Thanh, N.T., Loizidou, M., Seifalian, A.M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6 (6), 585-607.
- 107.** Kreuter, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*, 331 (1), 1-10.
- 108.** Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*, 55 (3), 329-347.

109. Fonte, P., Reis, S., Sarmiento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*.
110. Ferreira, T.H., Silva, P., Santos, R., Sousa, E. (2011). A novel synthesis route to produce boron nitride nanotubes for bioapplications. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, 2 (04), 426.
111. Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354 (6348), 56-58.
112. Flašker, A., Kulkarni, M., Mrak-Poljšak, K., Junkar, I., Čučnik, S., Žigon, P. ve diğeri. (2016). Binding of Human Coronary Artery Endothelial Cells to Plasma-treated Titanium Dioxide Nanotubes of Different Diameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
113. Worle, M., Krumeich, F., Bieri, F., Muhr, H.-J., Nesper, R. (2002). Flexible V7O16 layers as the common structural element of vanadium oxide nanotubes and a new crystalline vanadate. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 628 (12), 2778-2784.
114. Ballabh, R., Nara, S. (2015). Template based synthesis of gold nanotubes using biologically synthesized gold nanoparticles. *Indian journal of experimental biology*, 53, 828-833.
115. Guo, H., Sreekumar, T., Liu, T., Minus, M., Kumar, S. (2005). Structure and properties of polyacrylonitrile/single wall carbon nanotube composite films. *Polymer*, 46 (9), 3001-3005.
116. Morsi, R.E., Khamis, E., Al-Sabagh, A. (2015). Polyaniline nanotubes: Facile synthesis, electrochemical, quantum chemical characteristics and corrosion inhibition efficiency. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.
117. Küçükyıldırım, B.O., Eker, A.A. (2012). Karbon Nanotüpler, Sentezleme Yöntemleri ve Kullanım Alanları. *Engineer & the Machinery Magazine* (630).
118. Popov, V.N. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43 (3), 61-102.
119. Ayhan, U., Gündüz, G., İçek, B., Göktaş, H., Dişbudak, H. Kimyasal E-Demet Yöntemleri ile Karbon Nanotüp Üretilmesi.[Bildiri].

120. Iijima, S. (2002). Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B: Condensed Matter*, 323 (1), 1-5.
121. Odom, T.W., Huang G, J.L., Lieber, C.M. (2002). Single-Walled Carbon Nanotubes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 960 (1), 203-215.
122. Kukovecz, Á., Kozma, G., Kónya, Z. (2013). Multi-walled carbon nanotubes. *Springer Handbook of Nanomaterials* (s. 147-188): Springer
123. Li, C., Chou, T.-W. (2003). A structural mechanics approach for the analysis of carbon nanotubes. *International Journal of Solids and Structures*, 40 (10), 2487-2499.
124. Chopra, N.G., Luyken, R., Cherrey, K., Crespi, V.H., Cohen, M.L., Louie, S.G. ve diğerleri. (1995). Boron nitride nanotubes. *Science*, 269 (5226), 966-967.
125. Kalay, S., Yilmaz, Z., Sen, O., Emanet, M., Kazanc, E., Çulha, M. (2015). Synthesis of boron nitride nanotubes and their applications. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6 (1), 84-102.
126. Tiano, A.L., Park, C., Lee, J.W., Luong, H.H., Gibbons, L.J., Chu, S.-H. ve diğerleri. (2014). Boron nitride nanotube: synthesis and applications [Bildiri]. *SPIE Smart Structures and Materials+ Nondestructive Evaluation and Health Monitoring*.
127. Wang, J., Gu, Y., Zhang, L., Zhao, G., Zhang, Z. (2010). Synthesis of boron nitride nanotubes by self-propagation high-temperature synthesis and annealing method. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 80.
128. Ciofani, G. (2010). Potential applications of boron nitride nanotubes as drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 7 (8), 889-893.
129. Rubio, A., Corkill, J.L., Cohen, M.L. (1994). Theory of graphitic boron nitride nanotubes. *Physical Review B*, 49 (7), 5081.
130. Chen, Y., Gerald, J.F., Williams, J., Bulcock, S. (1999). Synthesis of boron nitride nanotubes at low temperatures using reactive ball milling. *Chemical Physics Letters*, 299 (3), 260-264.
131. Li, L., Li, L.H., Chen, Y., Dai, X.J., Xing, T., Petravic, M. ve diğerleri. (2012). Mechanically activated catalyst mixing for high-yield boron nitride nanotube growth. *Nanoscale research letters*, 7 (1), 1-8.
132. Golberg, D., Bando, Y., Tang, C., Zhi, C. (2007). Boron nitride nanotubes. *Advanced Materials*, 19 (18), 2413-2432.

133. Golberg, D., Bando, Y., Eremets, M., Takemura, K., Kurashima, K., Yusa, H. (1996). Nanotubes in boron nitride laser heated at high pressure. *Applied Physics Letters*, 69 (14), 2045-2047.
134. Song, J. (2007). Mechanics of Boron Nitride Nanotubes: A Continuum Theory Based on the Interatomic Potential: ProQuest.
135. Golberg, D., Bando, Y., Huang, Y., Terao, T., Mitome, M., Tang, C. ve diğ erleri. (2010). Boron nitride nanotubes and nanosheets. *Acs Nano*, 4 (6), 2979-2993.
136. Kim, J., Lee, S., Uhm, Y.R., Jun, J., Rhee, C.K., Kim, G.M. (2011). Synthesis and growth of boron nitride nanotubes by a ball milling–annealing process. *Acta Materialia*, 59 (7), 2807-2813.
137. Zettl, A., Cumings, J., Han, W.-q., Mickelson, W. (2002). Boron nitride nanotube peapods [Bildiri]. Structural and electronic properties of molecular nanostructures.
138. Wen, G., Zhang, T., Huang, X., Zhong, B., Zhang, X., Yu, H. (2010). Synthesis of bulk quantity BN nanotubes with uniform morphology. *Scripta Materialia*, 62 (1), 25-28.
139. Oku, T., Narita, I., Nishiwaki, A. (2004). Synthesis, atomic structures, and electronic states of boron nitride nanocage clusters and nanotubes. *Materials and manufacturing processes*, 19 (6), 1215-1239.
140. Li, L.H., Chen, Y. (2009). Superhydrophobic properties of nonaligned boron nitride nanotube films. *Langmuir*, 26 (7), 5135-5140.
141. Chen, X., Gao, X., Zhang, H., Zhou, Z., Hu, W., Pan, G. ve diğ erleri. (2005). Preparation and electrochemical hydrogen storage of boron nitride nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (23), 11525-11529.
142. Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., Honda, S., Kuwahara, H., Golberg, D. (2006). Boron nitride nanotubes/polystyrene composites. *Journal of Materials Research*, 21 (11), 2794-2800.
143. Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., Kuwahara, H., Golberg, D. (2009). Large-scale fabrication of boron nitride nanosheets and their utilization in polymeric composites with improved thermal and mechanical properties. *Advanced Materials*, 21 (28), 2889-2893.

- 144.** Kang, J.H., Sauti, G., Park, C., Yamakov, V.I., Wise, K.E., Lowther, S.E. ve diğerleri. (2015). Multifunctional Electroactive Nanocomposites Based on Piezoelectric Boron Nitride Nanotubes. *ACS nano*.
- 145.** Ciofani, G., Raffa, V., Yu, J., Chen, Y., Obata, Y., Takeoka, S. ve diğerleri. (2009). Boron nitride nanotubes: a novel vector for targeted magnetic drug delivery. *Current nanoscience*, 5 (1), 33-38.
- 146.** Li, X., Zhi, C., Hanagata, N., Yamaguchi, M., Bando, Y., Golberg, D. (2013). Boron nitride nanotubes functionalized with mesoporous silica for intracellular delivery of chemotherapy drugs. *Chemical Communications*, 49 (66), 7337-7339.
- 147.** Raffa, V., Ciofani, G., Cuschieri, A. (2009). Enhanced low voltage cell electroporation by boron nitride nanotubes. *Nanotechnology*, 20 (7), 075104.
- 148.** Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., Golberg, D. (2005). Immobilization of proteins on boron nitride nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (49), 17144-17145.
- 149.** Shakerzadeh, E., Noorizadeh, S. (2014). A first principles study of pristine and Al-doped boron nitride nanotubes interacting with platinum-based anticancer drugs. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 57, 47-55.
- 150.** Soares, D.C.F., Ferreira, T.H., de Aguiar Ferreira, C., Cardoso, V.N., de Sousa, E.M.B. (2012). Boron nitride nanotubes radiolabeled with <sup>99m</sup>Tc: preparation, physicochemical characterization, biodistribution study, and scintigraphic imaging in Swiss mice. *International journal of pharmaceutics*, 423 (2), 489-495.
- 151.** Lahiri, D., Rouzaud, F., Richard, T., Keshri, A.K., Bakshi, S.R., Kos, L. ve diğerleri. (2010). Boron nitride nanotube reinforced polylactide–polycaprolactone copolymer composite: Mechanical properties and cytocompatibility with osteoblasts and macrophages in vitro. *Acta biomaterialia*, 6 (9), 3524-3533.
- 152.** Lahiri, D., Singh, V., Benaduce, A.P., Seal, S., Kos, L., Agarwal, A. (2011). Boron nitride nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4 (1), 44-56.
- 153.** 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.

**154.** Del Turco, S., Ciofani, G., Cappello, V., Gemmi, M., Cervelli, T., Saponaro, C. ve diğerleri. (2013). Cytocompatibility evaluation of glycol-chitosan coated boron nitride nanotubes in human endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 142-149.

**155.** Ciofani, G., Ricotti, L., Danti, S., Moscato, S., Nesti, C., D'Alessandro, D. ve diğerleri. (2010). Investigation of interactions between poly-L-lysine-coated boron nitride nanotubes and C2C12 cells: up-take, cytocompatibility, and differentiation. *International journal of nanomedicine*, 5, 285.

**156.** Ciofani, G., Danti, S., Genchi, G.G., D'Alessandro, D., Pellequer, J.-L., Odorico, M. ve diğerleri. (2012). Pilot in vivo toxicological investigation of boron nitride nanotubes. *Int. J. Nanomed*, 7, 19-24.

**157.** Ciofani, G., Danti, S., Nitti, S., Mazzolai, B., Mattoli, V., Giorgi, M. (2013). Biocompatibility of boron nitride nanotubes: an up-date of in vivo toxicological investigation. *International journal of pharmaceutics*, 444 (1), 85-88.

**158.** Horvath, L., Magrez, A., Golberg, D., Zhi, C., Bando, Y., Smajda, R. ve diğerleri. (2011). In vitro investigation of the cellular toxicity of boron nitride nanotubes. *ACS nano*, 5 (5), 3800-3810.

**159.** Danti, S., Ciofani, G., Moscato, S., D'Alessandro, D., Ciabatti, E., Nesti, C. ve diğerleri. (2013). Boron nitride nanotubes and primary human osteoblasts: in vitro compatibility and biological interactions under low frequency ultrasound stimulation. *Nanotechnology*, 24 (46), 465102.

**160.** Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99 (1), 191-203.

**161.** Ho, C.-T. (1992). Phenolic compounds in food. *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry*. Eds. Ho, C., Lee, CY. and Huang, M, 1-7.

**162.** Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews*, 11 (2-3), 153-177.

- 163.** Wahle, K.W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S.D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Bio-Farms for Nutraceuticals* (s. 36-51): Springer
- 164.** Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T.M., Brzóska, K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of nutritional biochemistry*, 32, 1-19.
- 165.** Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134 (12), 3479S-3485S.
- 166.** Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. *Journal of Food Engineering*, 105 (1), 1-27.
- 167.** Nizamlioglu, N.M., Sebahattin, N. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 5 (1), 20-35.
- 168.** Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal research reviews*, 26 (6), 747-766.
- 169.** Vermerris, W., Nicholson, R. (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic compound biochemistry* (s. 1-34): Springer
- 170.** Haminiuk, C.W., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S., Peralta, R.M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47 (10), 2023-2044.
- 171.** Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63 (7), 1035-1042.
- 172.** Musa, M.A., Cooperwood, J.S., Khan, M.O.F. (2008). A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Current medicinal chemistry*, 15 (26), 2664-2679.
- 173.** Jain, P., Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile.
- 174.** Chung, K.-T., Wong, T.Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38 (6), 421-464.

175. Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F., Torti, S. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (11), 1631-1652.
176. Elumalai, M., Muthaiah, R., Alf, M. (2012). Identification of curcumin targets in neuroinflammatory pathways: molecular docking scores with GSK-3 $\beta$ , p38 MAPK, COX, ICE and TACE enzymes. *Acta Pol Pharm*, 69, 237-245.
177. Sharma, R., Gescher, A., Steward, W. (2005). Curcumin: the story so far. *European journal of cancer*, 41 (13), 1955-1968.
178. Araujo, C., Leon, L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (5), 723-728.
179. Akram, M., Uddin, S., Ahmed, A., Usmanghani, K., Hannan, A., Mohiuddin, E. ve diğeri. (2010). *Curcuma longa* and curcumin: a review article. *Rom J Biol Plant Biol*, 55 (2), 65-70.
180. Lin, J.-K., Pan, M.-H., Lin-Shiau, S.-Y. (2000). Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*, 13 (1-4), 153-158.
181. Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer letters*, 269 (2), 199-225.
182. Ravindranath, V., Chandrasekhara, N. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 16 (3), 259-265.
183. Ammon, H.P., Wahl, M.A. (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta medica*, 57 (01), 1-7.
184. Pan, M.-H., Huang, T.-M., Lin, J.-K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug metabolism and disposition*, 27 (4), 486-494.
185. Ireson, C., Orr, S., Jones, D.J., Verschoyle, R., Lim, C.-K., Luo, J.-L. ve diğeri. (2001). Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Cancer Research*, 61 (3), 1058-1064.
186. Sharma, R.A., Ireson, C.R., Verschoyle, R.D., Hill, K.A., Williams, M.L., Leuratti, C. ve diğeri. (2001). Effects of Dietary Curcumin on Glutathione S-

Transferase and Malondialdehyde-DNA Adducts in Rat Liver and Colon Mucosa Relationship with Drug Levels<sup>1</sup>. *Clinical Cancer Research*, 7 (5), 1452-1458.

**187.** Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica*, 64 (04), 353-356.

**188.** Garcea, G., Berry, D.P., Jones, D.J., Singh, R., Dennison, A.R., Farmer, P.B. ve diğeri. (2005). Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14 (1), 120-125.

**189.** Garcea, G., Jones, D., Singh, R., Dennison, A., Farmer, P., Sharma, R. ve diğeri. (2004). Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *British journal of cancer*, 90 (5), 1011-1015.

**190.** Aguilar, F., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D., Grilli, S. ve diğeri. (2010). Scientific opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA J*, 8 (9), 46.

**191.** Program, N.T. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Turmeric Oleoresin (CAS No. 8024-37-1)(Major Component 79%-85% Curcumin, CAS No. 458-37-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *National Toxicology Program technical report series*, 427, 1.

**192.** Dance-Barnes, S.T., Kock, N.D., Moore, J.E., Lin, E.Y., Mosley, L.J., D'Agostino, R.B. ve diğeri. (2009). Lung tumor promotion by curcumin. *Carcinogenesis*, 30 (6), 1016-1023.

**193.** Cao, J., Jia, L., Zhou, H.-M., Liu, Y., Zhong, L.-F. (2006). Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. *Toxicological Sciences*, 91 (2), 476-483.

**194.** Mendonça, L.M., dos Santos, G.C., Antonucci, G.A., dos Santos, A.C., Bianchi, M.d.L.P., Antunes, L.M.G. (2009). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 675 (1), 29-34.

195. Cao, J., Jiang, L.-P., Liu, Y., Yang, G., Yao, X.-F., Zhong, L.-F. (2007). Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells. *Toxicon*, 49 (8), 1219-1222.
196. Mancuso, C., Barone, E. (2009). Curcumin in clinical practice: myth or reality? *Trends in Pharmacological Sciences*, 30 (7), 333-334.
197. Cheng, A.-L., Hsu, C.-H., Lin, J.-K., Hsu, M.-M., Ho, Y.-F., Shen, T.-S. ve diğerleri. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21 (4B), 2895-2900.
198. Chainani-Wu, N. (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 9 (1), 161-168.
199. Sharma, R.A., Euden, S.A., Platton, S.L., Cooke, D.N., Shafayat, A., Hewitt, H.R. ve diğerleri. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical Cancer Research*, 10 (20), 6847-6854.
200. Lao, C.D., Ruffin, M.T., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I., Bailey, J.M. ve diğerleri. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 6 (1), 1.
201. Hsu, C.-H., Cheng, A.-L. (2007). Clinical studies with curcumin. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* (s. 471-480): Springer
202. Gupta, S.C., Prasad, S., Kim, J.H., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, I.K. ve diğerleri. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28 (12), 1937-1955.
203. Menon, V.P., Sudheer, A.R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease* (s. 105-125): Springer
204. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Boone, C.W., Simic, M.G. (1999). H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121 (41), 9677-9681.
205. Ak, T., Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interactions*, 174 (1), 27-37.

206. Unnikrishnan, M., Rao, M. (1995) Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Molecular and cellular biochemistry*, 146 (1), 35-37.
207. Jayaprakasha, G., Rao, L.J., Sakariah, K. (2006). Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food chemistry*, 98 (4), 720-724.
208. Jacob, A., Wu, R., Zhou, M., Wang, P. (2008). Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- $\gamma$  activation. *PPAR research*, 2007.
209. Sugimoto, K., Hanai, H., Tozawa, K., Aoshi, T., Uchijima, M., Nagata, T. ve diğ erleri. (2002). Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology*, 123 (6), 1912-1922.
210. Siddiqui, A.M., Cui, X., Wu, R., Dong, W., Zhou, M., Hu, M. ve diğ erleri. (2006). The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Critical care medicine*, 34 (7), 1874-1882.
211. Kuhad, A., Pilkhwal, S., Sharma, S., Tirkey, N., Chopra, K. (2007). Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (25), 10150-10155.
212. Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N., Gujral, P. (1982). Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents and actions*, 12 (4), 508-515.
213. Ramsewak, R., DeWitt, D., Nair, M. (2000). Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I–III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, 7 (4), 303-308.
214. Dcodhar, S., Sethi, R., Srimal, R. (2013). Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian journal of medical research*, 138 (1).
215. Lal, B., Kapoor, A., Asthana, O., Agrawal, P., Prasad, R., Kumar, P. ve diğ erleri. (1999). Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis. *Phytotherapy Research*, 13 (4), 318-322.
216. Agrawal, D.K., Mishra, P.K. (2010). Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. *Medicinal research reviews*, 30 (5), 818-860.

217. Kuo, M.-L., Huang, T.-S., Lin, J.-K. (1996). Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1317 (2), 95-100.
218. Nagai, S., Kurimoto, M., Washiyama, K., Hirashima, Y., Kumanishi, T., Endo, S. (2005). Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis by curcumin in human malignant astrocytoma cell lines. *Journal of neuro-oncology*, 74 (2), 105-111.
219. Karmakar, S., Banik, N.L., Ray, S.K. (2007). Curcumin suppressed anti-apoptotic signals and activated cysteine proteases for apoptosis in human malignant glioblastoma U87MG cells. *Neurochemical research*, 32 (12), 2103-2113.
220. Bharti, A.C., Donato, N., Aggarwal, B.B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *The Journal of Immunology*, 171 (7), 3863-3871.
221. Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer letters*, 267 (1), 133-164.
222. Naik, R., Mujumdar, A., Ghaskadbi, S. (2004). Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 95 (1), 31-37.
223. Girish, C., Koner, B.C., Jayanthi, S., Ramachandra Rao, K., Rajesh, B., Pradhan, S.C. (2009). Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 23 (6), 735-745.
224. Girish, C., Pradhan, S. (2012). Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3 (2), 149.
225. Padmanaban, G., Rangarajan, P.N. (2016). Curcumin as an adjunct drug for infectious diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 37 (1), 1-3.
226. Mun, S.-H., Joung, D.-K., Kim, Y.-S., Kang, O.-H., Kim, S.-B., Seo, Y.-S. ve diğ erleri. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 20 (8), 714-718.

227. De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G.B. ve diğerleri. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (4), 1592-1597.
228. Singh, R.K., Rai, D., Yadav, D., Bhargava, A., Balzarini, J., De Clercq, E. (2010). Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *European journal of medicinal chemistry*, 45 (3), 1078-1086.
229. Hatamie, S., Nouri, M., Karandikar, S., Kulkarni, A., Dhole, S., Phase, D. ve diğerleri. (2012). Complexes of cobalt nanoparticles and polyfunctional curcumin as antimicrobial agents. *Materials Science and Engineering: C*, 32 (2), 92-97.
230. Chauhan, G., Rath, G., Goyal, A.K. (2013). In-vitro anti-viral screening and cytotoxicity evaluation of copper-curcumin complex. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 41 (4), 276-281.
231. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65 (1-2), 55-63.
232. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, 69 (2), 581-593.
233. Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89 (2), 271-277.
234. Chapdelaine, J.M. (1989). MTT reduction-a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. *Maxline Application Notes. Menlo Park, CA: Molecular Devices Corporation*.
235. Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W., Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114 (8), 785-796.
236. Vellonen, K.-S., Honkakoski, P., Urtti, A. (2004). Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23 (2), 181-188.

237. Azqueta, A., Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87 (6), 949-968.
238. Collins, A.R. (2015). The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis*, 30 (1), 1-4.
239. Langie, S.A., Azqueta, A., Collins, A.R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in genetics*, 6.
240. Ritter, D., Knebel, J. (2009). Genotoxicity testing in vitro—development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro*, 23 (8), 1570-1575.
241. Singh, N.P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1), 111-127.
242. Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. ve diğerleri. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35 (3), 206-221.
243. Azqueta, A., Gutzkow, K.B., Priestley, C.C., Meier, S., Walker, J.S., Brunborg, G. ve diğerleri. (2013). A comparative performance test of standard, medium-and high-throughput comet assays. *Toxicology in Vitro*, 27 (2), 768-773.
244. Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S. ve diğerleri. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and molecular mutagenesis*, 30 (2), 139-146.
245. Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology*, 25 (1), 5-32.
246. Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26 (3), 249-261.
247. Yanbakan, S. (2015). Hücresel tedavi ürünlerinin klinik kullanım alanları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (2).
248. Wobus, A.M., Löser, P. (2011). Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Archives of toxicology*, 85 (2), 79-117.

249. Liu, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, D., Wang, S., Deng, Z. ve diğerleri. (2012). Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. *Carbohydrate polymers*, 90 (1), 16-22.
250. Mazzarino, L., Travelet, C., Ortega-Murillo, S., Otsuka, I., Pignot-Paintrand, I., Lemos-Senna, E. ve diğerleri. (2012). Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *Journal of colloid and interface science*, 370 (1), 58-66.
251. Wörle-Knirsch, J., Pulskamp, K., Krug, H. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters*, 6 (6), 1261-1268.
252. Ferreira, T.H., Soares, D.C.F., Moreira, L.M.C., da Silva, P.R.O., dos Santos, R.G., de Sousa, E.M.B. (2013). Boron nitride nanotubes coated with organic hydrophilic agents: stability and cytocompatibility studies. *Materials Science and Engineering: C*, 33 (8), 4616-4623.
253. Chen, X., Wu, P., Rousseas, M., Okawa, D., Gartner, Z., Zettl, A. ve diğerleri. (2009). Boron nitride nanotubes are noncytotoxic and can be functionalized for interaction with proteins and cells. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (3), 890-891.
254. Ferreira, T., Hollanda, L., Lancellotti, M., de Sousa, E. (2015). Boron nitride nanotubes chemically functionalized with glycol chitosan for gene transfection in eukaryotic cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103 (6), 2176-2185.
255. Ciofani, G., Raffa, V., Menciassi, A., Cuschieri, A. (2008). Folate functionalized boron nitride nanotubes and their selective uptake by glioblastoma multiforme cells: implications for their use as boron carriers in clinical boron neutron capture therapy. *Nanoscale research letters*, 4 (2), 113.
256. Rocca, A., Marino, A., Del Turco, S., Cappello, V., Parlanti, P., Pellegrino, M. ve diğerleri. (2016). Pectin-coated boron nitride nanotubes: In vitro cyto-/immune-compatibility on RAW 264.7 macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860 (4), 775-784.
257. Ciofani, G., Del Turco, S., Genchi, G.G., D'Alessandro, D., Basta, G., Mattoli, V. (2012). Transferrin-conjugated boron nitride nanotubes: protein grafting,

characterization, and interaction with human endothelial cells. *International journal of pharmaceutics*, 436 (1), 444-453.

**258.** Ciofani, G., Genchi, G.G., Liakos, I., Athanassiou, A., Dinucci, D., Chiellini, F. ve diğerleri. (2012). A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes. *Journal of colloid and interface science*, 374 (1), 308-314.

**259.** Li, X., Wang, X., Jiang, X., Yamaguchi, M., Ito, A., Bando, Y. ve diğerleri. (2016). Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104 (2), 323-329.

**260.** Kumar, D., Basu, S., Parija, L., Rout, D., Manna, S., Dandapat, J. ve diğerleri. (2016). Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 31-37.

**261.** Nair, K.L., Thulasidasan, A.K.T., Deepa, G., Anto, R.J., Kumar, G.V. (2012). Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. *International journal of pharmaceutics*, 425 (1), 44-52.

**262.** Strasser, E.-M., Wessner, B., Manhart, N., Roth, E. (2005). The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells. *Biochemical pharmacology*, 70 (4), 552-559.

**263.** Zhang, L., Cheng, X., Gao, Y., Bao, J., Guan, H., Lu, R. ve diğerleri. (2016). Induction of ROS-independent DNA damage by curcumin leads to G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. *Food & function*, 7 (1), 315-325.

**264.** Mendonça, L.M., dos Santos, G.C., dos Santos, R.A., Takahashi, C.S., Bianchi, M.d.L.P., Antunes, L.M.G. (2010). Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. *Human & experimental toxicology*.

**265.** Dai, C., Li, D., Gong, L., Xiao, X., Tang, S. (2016). Curcumin Ameliorates Furazolidone-Induced DNA Damage and Apoptosis in Human Hepatocyte L02 Cells by Inhibiting ROS Production and Mitochondrial Pathway. *Molecules*, 21 (8), 1061.

**266.** Myllyperkiö, M., Koski, T., Vilpo, L., Vilpo, J. (1999). gama-irradiation-induced DNA single-and double-strand breaks and their repair in chronic lymphocytic

leukemia cells of variable radiosensitivity. *Hematology and cell therapy*, 41 (3), 95-103.

**267.** Garaycochea, J.I., Crossan, G.P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M.J., Patel, K.J. (2012). Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature*, 489 (7417), 571-575.

**268.** Emanet, M., Şen, Ö., Çobandede, Z., Çulha, M. (2015). Interaction of carbohydrate modified boron nitride nanotubes with living cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 440-446.

**269.** Sankar, P., Telang, A.G., Ramya, K., Vijayakaran, K., Kesavan, M., Sarkar, S.N. (2014). Protective action of curcumin and nano-curcumin against arsenic-induced genotoxicity in rats in vivo. *Molecular biology reports*, 41 (11), 7413-7422.

**270.** Papież, M.A. (2013). The influence of curcumin and (–)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. *Drug and chemical toxicology*, 36 (1), 93-101.

**271.** Li, H., Zhang, N., Hao, Y., Wang, Y., Jia, S., Zhang, H. ve diğerleri. (2014). Formulation of curcumin delivery with functionalized single-walled carbon nanotubes: characteristics and anticancer effects in vitro. *Drug delivery*, 21 (5), 379-387.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### I-Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı :Tuğbagül ÇAL

Doğum Yeri :Kayseri

Doğum Tarihi :24/06/1989

Uyruğu: T.C.

Adresi :Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji

Anabilim Dalı 61000 TRABZON

Telefon :(0462) 3256762

e-mail : tgcal89@gmail.com /tugbagul.cal@ktu.edu.tr

Ünvanı :Eczacı

Yabancı Dil :İngilizce (YDS 82,5)

### II- Eğitimi

2014 – 2016 :Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji

Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2007 – 2012 :Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)

2003 – 2007 :Nevşehir Anadolu Öğretmen Lisesi

### III- Mesleki Deneyimi

2013-2014 Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi -Araştırma Görevlisi

2014-2016 Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi- Araştırma Görevlisi

### IV- Bilimsel Faaliyetleri

Katıldığı seminer, kurs ve kongreler

- 11. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara/Türkiye, 9-12 Haziran 2015.
- TURKHELTOX Toxicology Congress, İzmir/Türkiye, 21-24 Ekim 2015.
- Toxicology Course, Principles of Toxicology, Zagreb, Hırvatistan, 4-8 Nisan 2016.

