

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
EHRlich ASSİT TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Esma SARAYMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

Doktora Tezi

**Ocak 2025
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
EHRlich ASSİT TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Esma SARAYMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

**Bu Tez; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2022-11610 kodlu proje ile desteklenmiştir**

**Ocak 2025
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Esmâ SARAYMEN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Ehrlich Assit Tümör Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Esmâ SARAYMEN

1. Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER

2. Danışman
Doç. Dr. Aysun ADAN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Harun ÜLGER danışmanlığında **Esma SARAYMEN** tarafından hazırlanan “**Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Ehrlich Assit Tümör Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Harun ÜLGER

Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Üye: Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

Üye: Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Emel Başak GENCER AKÇOK

İmza

.....

.....

.....

.....

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanlığımı yapan Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, tez çalışmam süresince yardım ve önerileri ile destek olarak ikinci danışmanlığımı yapan Doç. Dr. Aysun ADAN'a, yüksek lisans eğitimimden bu yana yol göstericiliği ile destek olan Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a teşekkürlerimi sunarım. Ehrlich assit tümör hücrelerinin elde edilmesinde yardımlarından dolayı Anatomi Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Sümeyye UÇAR'a, titanyum dioksit nanopartiküllerin temini ve karakterizasyon çalışmalarının yapılmasında, akım sitometri analizlerinin yorumlanmasında katkılarından dolayı ERNAM Nanoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Öğr. Gör. Dr. Berkay SARAYMEN'e, TDK-2022-11610 kodlu tez projeme maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve son olarak, çalışmalarım sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esma SARAYMEN

Kayseri, Ocak 2025

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN EHRlich ASSİT TÖMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esma SARAYMEN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak 2025
Danışman: Prof. Dr. Harun ÜLGER**

ÖZET

Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂ NP) gıda katkı maddeleri ve kişisel bakım ürünleri gibi birçok alanda en yaygın kullanılan ve en çok üretilen mühendislik nanopartiküllerindendir. Bu çalışmada TiO₂ NP'lerinin artan konsantrasyonlarıyla (25, 50, 100, 200 µg/mL) kültür edilen Ehrlich Assit Tümör (EAT) hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılığı, proliferasyonu, morfolojisi, apoptoz analizi, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim aktivitesi, CD11b+ hücre, CD3+ T hücre oranları ve inflamatuvar sitokin düzeyleri ölçüldü.

EAT hücre popülasyonunda, hücre canlılığının korunduğu ve hücre proliferasyonunda anlamlı artışlar olduğu gösterildi. Hücre morfolojilerinin değiştiği, hücre içi kompleksitesinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak arttığı, hücre boyutunun azaldığı gösterildi. TiO₂ NP'lerin hücrelerdeki apoptotik etkileri zamanla değiştirdiği, 72. saatte apoptotik sürecin baskılandığı gösterildi. Hücre döngüsünde TiO₂ NP'lerin S fazındaki hücre oranlarını, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artırdığı gösterildi. EAT hücre popülasyonunda CD11b- ve CD11b+ hücrelerin hücre içi ROS düzeylerinin ve NADPH oksidaz enzim aktivitesinin arttığı gözlemlendi. TiO₂ NP'lerinin CD11b+ ve CD3+ T hücre popülasyonunda konsantrasyon bağımlı olarak artırıcı etkisi gözlemlendi. TiO₂ NP'ler CD11b+ hücrelerde IL-12 üretimini baskılamak, IL-1β ve IL-10 sitokin düzeylerini artırdı. CD3+ T hücrelerinde IL-12, IL-10 ve TNF-α düzeylerinin arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, TiO₂ NP'lerinin EAT hücre popülasyonu içinde hem tümör hücreleri hem de immün sistem hücreleri ile etkileşerek hücre içi ROS düzeylerini artırdığı ve sitokin salınımlarını düzenleyerek tümör hücrelerinin gelişimini destekleyen bir mikroçevrenin oluşumunda potansiyel immünomodülatör etkilere sahip olabileceği ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Ehrlich Assit Tümör Hücreleri; İmmünomodülatör Etki; NADPH Oksidaz; Reaktif Oksijen Türleri; Titanyum Dioksit Nanopartiküller.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON EHRlich ASCITES TUMOR CELLS

Esma SARAYMEN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Stem Cell Sciences, PhD Thesis, January 2025
Supervisor: Prof. Dr. Harun ÜLGER

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NP) are among the most widely used and produced engineered nanoparticles in various fields, including food additives and personal care products. In this study, the effects of increasing concentrations of TiO₂ NPs (25, 50, 100, 200 µg/mL) on Ehrlich Ascites Tumor (EAT) cells cultured for 24, 48, and 72 hours were evaluated by measuring cell viability, proliferation, morphology, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) levels, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase enzyme activity, CD11b⁺ cell, CD3⁺ T cell percentages, and inflammatory cytokine levels. In the EAT cell population, it was demonstrated that cell viability was maintained and there were significant increases in cell proliferation. It was shown that cell morphology changed, intracellular complexity increased depending on concentration and time, and cell size decreased. The apoptotic effects of TiO₂ NPs on the cells were found to change over time, with the apoptotic process being suppressed at the 72nd hour. In the cell cycle, it was shown that TiO₂ NPs significantly increased the proportion of cells in the S phase compared to the control group. In the EAT cell population, an increase in intracellular ROS levels and NADPH oxidase enzyme activity was observed in both CD11b⁻ and CD11b⁺ cells. The concentration-dependent stimulatory effect of TiO₂ NPs on CD11b⁺ and CD3⁺ T cell populations was observed. While TiO₂ NPs suppressed IL-12 production in CD11b⁺ cells, they increased IL-1β and IL-10 cytokine levels. An increase in IL-12, IL-10, and TNF-α levels in CD3⁺ T cells was also observed. In conclusion, it can be suggested that TiO₂ NPs interact with both tumor cells and immune system cells within the EAT cell population, increasing intracellular ROS levels and modulating cytokine release, thereby contributing to the formation of a microenvironment that supports tumor cell progression through their potential immunomodulatory effects.

Keywords: Ehrlich Ascites Tumor Cells; Immunomodulatory Effect; NADPH Oxidase; Reactive Oxygen Species; Titanium Dioxide Nanoparticles.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Ehrlich Assit Tümörü (EAT)	5
2.1.2. EAT Gelişim Sürecinde İmmün Sistem Etkileşimleri	6
2.1.3. Kanser ve Nanoteknoloji.....	9
2.2. Nanoteknoloji ve Tarihsel Gelişimi	10
2.3. Nanopartiküller	12
2.4. Titanyum dioksit (TiO ₂) Nanopartiküller	16
2.4.1. TiO ₂ Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımı	18
2.4.2. TiO ₂ Nanopartiküller ve Hücre Canlılığı	19
2.4.3. TiO ₂ Nanopartiküller ve Oksidatif Stres	20
2.4.4. TiO ₂ Nanopartiküller ve Hücre Döngüsü.....	22
2.4.5. TiO ₂ Nanopartiküller ve İmmünomodülatör Etkileri.....	23
2.5. İmmün Sistem Hücreleri	24
2.6. Sitokinlerin Rolü.....	26
2.6.1. IL-12.....	27
2.6.2. IL-1β.....	27
2.6.3. TNF- α.....	28
2.6.4. IL-10.....	29

2.7. Kanser Çalışmalarında TiO ₂ Nanopartiküllerin Boyut, Konsantrasyon ve Etkileri.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	33
3.1.2. Sarf Malzemeler	34
3.1.3. Kitler, Kimyasal Maddeler ve Antikorlar	34
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanı Cinsi ve Sayısı.....	35
3.3. Stok Hayvan Kullanarak Peritoneal EAT Oluşturulması	35
3.3.1. Tripin Mavisini ile Canlı Hücre Sayımı	36
3.4. EAT Hücreleri için Besiyeri Hazırlanması ve Kültür Koşulları	37
3.5. TiO ₂ Nanopartiküllerinin Hazırlanması	37
3.6. TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	37
3.7. EAT Hücrelerine Uygulanacak TiO ₂ Nanopartikül Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	38
3.8. EAT Hücre Analizi ile İlgili Yöntemler	38
3.8.1. EAT Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	38
3.8.2. EAT Hücre Morfolojisinin İncelenmesi.....	39
3.8.3. Apoptotik ve Nekrotik EAT Hücrelerinin Annexin V/ PI ile Analizi	39
3.8.4. EAT Hücre Döngüsü Analizi	40
3.8.5. EAT Hücrelerinde ROS Düzeylerinin Analizi.....	40
3.8.6. EAT Hücrelerinde NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesinin Analizi.....	41
3.8.7. CD11b ⁺ ve CD3 ⁺ EAT Hücre Popülasyonlarının Değerlendirilmesi	42
3.8.8. EAT Hücrelerinde İnflamatuar Sitokin Düzeylerinin Analizi	42
3.9. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Bulguları	45
4.2. EAT Hücreleri ile Etkileşen TiO ₂ Nanopartiküllerinin Konsantrasyon Bulguları.....	48

4.3. EAT Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Bulguları.....	49
4.4. EAT Hücre Morfolojisi Bulguları.....	51
4.5. Apoptotik ve Nekrotik EAT Hücrelerinin Annexin V/PI ile Analiz Bulguları.....	55
4.6. EAT Hücre Döngüsü Analiz Bulguları.....	59
4.7. EAT Hücrelerinde ROS Düzeylerinin Analiz Bulguları.....	62
4.8. EAT Hücrelerinde NADPH Oksidaz Aktivitesi Analiz Bulguları.....	66
4.9. CD11b+ ve CD3+ EAT Hücre Popülasyonlarının Analiz Bulguları.....	69
4.10. EAT Hücrelerinde İnflamatuvar Sitokin Düzeylerinin Analiz Bulguları	71
4.10.1. IL-12 Düzeylerinin Analiz Bulguları	71
4.10.2. IL-1 β Düzeylerinin Analiz Bulguları	76
4.10.3. IL-10 Düzeylerinin Analiz Bulguları	80
4.10.4. TNF- α Düzeylerinin Analiz Bulguları	86
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	116
7. KAYNAKLAR	117
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
•OH	: Hidroksil radikali
APC	: Allofikosiyanin
APC-Cy7	: Allofikosiyanin Siyanin 7
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BD	: Becton Dickinson
BRCA1	: Meme Kanseri 1
BRCA2	: Meme Kanseri 2
BrDU	: 5-Bromo-2-deoksiuridin
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
cc	: Santimetre küp
CD	: Farklılaşma Kümesi
CO₂	: Karbondioksit
Cryo-TEM	: Kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu
DHR 123	: Dihidrorodamin 123
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAT	: Ehrlich Assit Tümörü
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
FACS	: Floresanla aktive edilen hücre ayırma
FBS	: Fetal Sığır Serum
FESEM	: Alan Emisyon Tarama Elektron Mikroskobu
FoxP3	: Forkhead kutusu proteini 3
FSC	: İleri Saçılma
G1 fazı	: Ökaryotlarda tipik hücre döngüsünün büyüme fazı
G2 fazı	: Ökaryotlarda tipik hücre döngüsünün hazırlık fazı

H2AX	: H2A histon ailesi üyesi X
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HBSS	: Hank'in Dengeli tuz çözeltisi
HeLa	: İnsan servikal kanser hücreleri
HUVEC	: İnsan kordon kanı damar endotelyal hücreleri
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-12Rβ1	: İnterlökin 12R Beta 1
IL-12Rβ2	: İnterlökin 12R Beta 2
IL-1α	: İnterlökin 1 alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
JAK2	: Janus kinaz
M fazı	: Ökaryotlarda tipik hücre döngüsünün mitoz fazı:
M1	: Makrofaj 1
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDSC	: Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler
mg	: Miligram
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
mL	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: Metiltiazolil Tetrazolium
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Doğal Kâtil
NLRP3	: NOD-benzeri reseptör ailesi, pirin domaini içeren 3
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NOD-like reseptör	: Nükleotid bağlama ve oligomerizasyon alanı benzeri reseptör
NOX	: NADPH oksidaz
NP	: Nanopartikül
O₂	: Oksijen molekülü

O₂^{-•}	: Süperoksit radikali
PBS	: Fosfatlı tamponlu tuzlu su
PD-L1	: Programlanmış hücre ölümü ligand 1
PE	: Fikoeritrin
PerCP	: Peridinin klorofil proteini
PGE2	: Prostaglandin E2
PI	: Propidyum iyodür
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PMN	: Polimorfonükleer lökositler
PS	: Fosfatidilserin
RNA	: Ribonükleik asit
RNase A	: Ribonükleaz A
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S fazı	: Ökaryotlarda tipik hücre döngüsünün DNA sentezi fazı
SEM	: Standart Hata Ortalaması
SH-SY5Y	: İnsan nöroblastom hücre hattı
SI	: Stimülasyon İndeksi
SSC	: Yan Saçılma
STAT	: Sinyal ileticiler ve transkripsiyon aktivatörleri
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TH	: T yardımcı hücresi
TiO₂	: Titanyum dioksit
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
Treg	: Düzenleyici T hücresi
TYK2	: Tirozin kinaz 2
UV	: Ultraviyole
VIS	: Görünür
z	: Zeta potansiyeli
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1.	TiO ₂ NP'lerin UV-VIS spektrumları.....	45
Şekil 4.2.	TiO ₂ NP'lerin boyut dağılım grafiği.....	46
Şekil 4.3.	TiO ₂ NP'lerin EDX görüntüleri.....	46
Şekil 4.4.	TiO ₂ NP'lerin FESEM görüntüleri.....	47
Şekil 4.5.	TiO ₂ NP'lerin Cryo-TEM görüntüleri.....	47
Şekil 4.6.	TiO ₂ NP'lerin distile su içerisinde ölçülen zeta potansiyeli grafiği	48
Şekil 4.7.	TiO ₂ NP'lerin %10'luk FBS içeren DMEM içerisinde ölçülen zeta potansiyeli grafiği.....	48
Şekil 4.8.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT canlı hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$	49
Şekil 4.9.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT canlı hücre sayıları ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$	50
Şekil 4.10.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT ölü hücre sayıları ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$	51
Şekil 4.11.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	52
Şekil 4.12	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre boyutunun geometrik mean değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$	53
Şekil 4.13.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre içi kompleksitesinin geometrik mean değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$...	54
Şekil 4.14.	EAT hücrelerinin zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak FSC/SSC dağılımının akım sitometrik görüntüleri	54
Şekil 4.15.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak erken apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$	55

Şekil 4.16.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak geç apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	56
Şekil 4.17.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak total apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	57
Şekil 4.18	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak ölü EAT hücre yüzde değerleri ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	58
Şekil 4.19.	Akım sitometri ile apoptotik EAT hücre popülasyonlarının yüzde dağılımlarının gösterilmesi a) 24. Saat, b) 48. Saat, c) 72. Saat.....	58
Şekil 4.20.	Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 24.saat sonundaki dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	59
Şekil 4.21.	Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 48.saat sonundaki dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	60
Şekil 4.22.	Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 72.saat sonundaki dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001	61
Şekil 4.23.	Akım sitometri ile elde edilen EAT hücre döngüsü yüzde dağılımlarının plot görüntüleri a) 24. Saat, b) 48. Saat, c) 72. Saat.....	61
Şekil 4.24.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre ROS düzeylerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi.	62
Şekil 4.26.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluk ROS düzeylerini gösteren akım sitometrik histogram görüntüleri	64
Şekil 4.27.	Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO ₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluk ROS düzeylerini gösteren akım sitometrik histogram görüntüleri.....	65
Şekil 4.28.	Akım sitometri ile EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesinin gösterilmesi.....	66

- Şekil 4.29.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre SI düzeylerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. 67
- Şekil 4.30.** Akım sitometri ile CD11b+ EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesini ölçmek için uygulanan kapılama stratejisi..... 67
- Şekil 4.31.** Akım sitometri ile CD11b+ EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesinin gösterilmesi..... 68
- Şekil 4.32.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre SI düzeylerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. 69
- Şekil 4.33.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD3+ T lenfositlerdeki yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001 70
- Şekil 4.34.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerindeki yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001..... 70
- Şekil 4.35.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001..... 71
- Şekil 4.36.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001..... 72
- Şekil 4.37.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001 73
- Şekil 4.38.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001 74

- Şekil 4.39.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD3^+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 75
- Şekil 4.40.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 76
- Şekil 4.41.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak CD11b^+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 77
- Şekil 4.42.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 78
- Şekil 4.43** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b^+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 79
- Şekil 4.44.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 80
- Şekil 4.45.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak CD11b^+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 81
- Şekil 4.46.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak assit sıvısında CD3^+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 82
- Şekil 4.47.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin

- dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 83
- Şekil 4.48.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 84
- Şekil 4.49.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 85
- Şekil 4.50.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 86
- Şekil 4.51.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak assit sıvısında CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 87
- Şekil 4.52** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 88
- Şekil 4.53.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 89
- Şekil 4.54.** Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$ 90

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi, hızla çoğalması ve vücudun diğer bölgelerine metastazı ile bilinen karmaşık ve zorlu bir hastalık olup hücredeki mutasyonlardan kaynaklanır ve anormal bir şekilde çoğalır. Kanser hücreleri kan ve lenfatik damarlarla vücudun farklı bölgelerine metastaz yaparak tümörjenik hücre kitlesi oluşturur. Hem ABD'de hem de dünya çapında ikinci en yaygın ölüm nedenidir. Bazı bilinen kalıtsal faktörlere ek olarak, çevresel ve kimyasal maruziyetler ile ortaya çıkan ve hastalığın ilerleyişini ya da tedavi cevabını etkileyen genetik faktörler de tanımlanmıştır (Raju ve ark., 2021). Mevcut konvansiyonel tedaviler, çok daha gelişmiş ve daha iyi prognozla birlikte, bazı sınırlamalara sahiptir. Örneğin kemoterapötik ajanlar hem tümör hem de sağlıklı hücreler için sitotoksiktir ve ilaçların tümör bölgelerinde spesifik olmayan dağılımı, uygulanan dozu sınırlamaktadır (Neal ve ark., 2014). Çeşitli bilimsel disiplinlerin birleşmesinden gelişen nanoteknoloji, birçok araştırmanın odak noktası olan yeni bir bilimdir. Bu teknoloji, vücuttaki standart müdahalelere karşı biyomedikal ve biyofiziksel engellerin üstesinden gelmek için daha etkili kanser tedavileri üretmeye çalışmaktadır (Raju ve ark., 2021).

Kanserin erken teşhisi, uygun terapötik müdahale stratejilerinin uygulanması için en iyi şansı sağlamaktadır. Nanoteknolojik araştırmalar, tüm dünyadaki araştırmacılar ve klinisyenler için kanseri sadece erken teşhis etmekle kalmayıp, aynı zamanda hastalığı etkili bir şekilde tedavi edebilmek için en son yaklaşım haline gelmiştir (Rahman ve ark., 2013). Nanotıp, ilaç dağıtımı ve etkili terapötikler için potansiyel bir yaklaşım olarak son zamanlarda yoğun çalışılmaktadır. Kanser araştırmalarında nanotıp, kanser tedavisi için muazzam bir potansiyele sahiptir (Raj ve ark., 2021). Nanopartikül (NP)'lerin yüzeyi, küçük boyutu ve şekli gibi benzersiz özellikleri verimli bir tedavi ve hedeflemede kilit rol olarak kullanılmaktadır. NP'ler kanser teşhisinde geniş bir rol

oyunar ve diğerk geleneksel kemoterapötik ilaçlara göre çeşitli avantajlara sahiptir. NP'ler, hedeflenen doku, hücre veya organlar için daha spesifik ve verimli ilaç özelliğine sahiptir ve yan etki riskini en aza indirir (Rahman ve ark., 2012). NP'lerin boyutu ve yüzey özellikleri, vücuttaki nano taşıyıcı verimliliğini ve kemo ilaçlarının biyolojik dağılımını modüle etmede çok önemli bir rol oynar. Polimerler, dendrimerler, lipozom bazlı ve karbon bazlı gibi çeşitli nano taşıyıcı türleri kanser tedavisinde geniş çapta incelenmektedir (Raju ve ark., 2015). NP'ler, hücrelerde oksidatif strese neden olarak hücre zarına zarar verir ve DNA hasarı yoluyla hücre ölümüne neden olur. Bu nedenle oksidatif stres yoluyla kanser hücreleri üzerinde toksik etkileri olabilir. Bu özellik, tümörleri minimum yan etkilerle yok etmek için etkili yöntemler geliştirmek için kullanılabilir (Nasr ve ark., 2018). Kanser hücrelerinin bir özelliğı metastaz (yayılma) yapabilmesidir. Epitelyal mesenkimal geçiş, kanser hücrelerinin komşu dokulara geçmesinde önemli bir role sahiptir. Matriks metaloproteinazlar metastazı uyarır ve kanser hücreleri diğerk dokulara hareket edebilir. Bazı çalışmalar NP'lerin kanser hücrelerinin yayılımını engelleyebileceğini göstermiştir (Veiseh ve ark., 2009).

TiO₂ NP'leri en sık kullanılan günlük hayatımızın vazgeçilmez bir parçası haline gelen NP'lerdir. Partikül boyutu, 100 nm'den küçük çok ince partiküllerdir. Gıda katkı maddeleri, boyalar, cam, kişisel bakım, kozmetik, güneş pilleri ve atık su arıtımında kullanılmaktadır (Keller ve ark., 2014). TiO₂ NP'lerinin, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil serbest radikal (•OH) üretimi yoluyla memeli hücrelerinde antitümör etkilere ve enflamatuvar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Kalbacoca ve ark., 2008). İnsan epitel hücre hatları TiO₂ NP'lerine maruz bırakıldığında, Bax, sitokrom C ve p53 proteinlerinin ekspresyonunda artış olduğu ve anti-apoptoz B hücreli lenfoma (Bcl-2) hücrelerinde azalma olduğu ve apoptoza uğradığı gösterilmiştir (Shi ve ark., 2010). TiO₂ NP'lerinin farklı formları, mide kanseri hücrelerinde çalışılmış, hücre proliferasyonunu ve canlılığı azalttığını ve inhibitör etkisinin, NP konsantrasyonunu ve maruz kalma süresinin artırılarak çoğaldığı belirtilmiştir (Nasr ve ark., 2018). Son dönemde yapılan araştırmalar, TiO₂ NP'lerinin kanser tedavisinde yeni bir terapötik ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceğini öne sürmektedir (Raju ve ark., 2021). Bununla birlikte, çeşitli kanser türleri ve hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalarda, farklı etkiler gösterdiği ve kanser gelişimini destekleyici etkileri olduğu da

ortaya konmuştur (Moon ve ark., 2011; Botelho ve ark., 2014; Mao ve ark., 2015). Elde edilen veriler, TiO₂ NP'lerinin etkilerini daha iyi anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Literatür tarandığında TiO₂ NP'lerinin etkisi çeşitli kanser hücreleri için gösterilmiş olsa da Ehrlich Assit Tümörü (EAT) hücreleri üzerinde bir çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmada, fare meme adenokarsinomundan kökenlenen EAT hücrelerinin, Balb/C farelere intraperitoneal enjeksiyonu ile deneysel olarak oluşturulan assit tümörü üzerine TiO₂ NP'lerinin kanser gelişimi üzerine potansiyel etkileri ve immünomodülatör etkilerini araştırmak amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, kontrollü hücre bölünmesinin bozulması sonucu hücrelerin hızla çoğalması ve dokularda anormal seviyelerde birikmesiyle karakterize edilen zorlu bir hastalıktır. Bu durum, genellikle hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklanır ve anormal şekilde bölünen hücreler, kan ve lenfatik damarlar aracılığıyla vücudun farklı bölgelerine metastaz yaparak tümörojenik hücre kitlesi oluşturur (Valencia ve ark., 2017). Kanser genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin etkileşimi sonucu gelişen, oluşum nedenleri çok yönlü ve karmaşık bir yapıya sahiptir (Raju ve ark., 2019). Kanser, genetik materyaldeki değişiklikler sonucu meydana gelen somatik mutasyonların, hücrenin büyüme ve bölünme işlevlerini değiştirmesiyle gelişebileceği gibi bazı kanser türleri nesilden nesile aktarılan genetik mutasyonlardan kaynaklanabilir. Ailede, DNA onarım süreçlerini düzenleyen meme kanseri 1 (*BRCA1*) ve meme kanseri 2 (*BRCA2*) genlerindeki mutasyonların varlığı, bireylerde meme ve yumurtalık kanseri riskinin artmasına yol açmaktadır. Yetersiz veya aşırı beslenme, işlenmiş gıdaların tüketimi, hareketsiz yaşam gibi faktörler bireylerin sağlık durumunu olumsuz yönde etkileyerek kanser riskini artırabilir. Tehlikeli olarak bilinen bazı kimyasallara uzun süreli maruz kalma, ultraviyole ışınları ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi çevresel faktörler de DNA hasarına yol açarak kanser türlerinin gelişimine katkıda bulunabilir (Friedenreich ve ark., 2020). Kanser hücreleri tümör içinde çeşitli benign hücre tipleriyle çevrili, değiştirilmiş ve damarlanmış bir ekstraselüler matris içinde yer almaktadır. Yapılan incelemeler, tümör mikroçevresinin son derece sistematik bir organizasyonunun olduğunu ortaya koymaktadır. Tümör mikroçevresi, zengin bir hücresel çeşitliliğe sahip olup, immün hücreleri, kanserle ilişkili fibroblastlar, endotelial hücreler, perisitler ve dokuya özgü

diğer hücre türlerini barındırır (Visser ve Joyce, 2023). Tümör mikroçevresinde hücreler arası iletişim; sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar gibi moleküllerin salınımı aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu moleküller, birden fazla hücre tipinden üretilir, hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanarak veya ekstraselüler matrisin yeniden şekillendirilmesi yoluyla doğrudan ve dolaylı etkiler gösterirler. Tümör mikroçevresinin fonksiyonel durumu, tümörün oluştuğu doku, kanser hücrelerinin özellikleri, tümör evresine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterebilir. Tümör mikroçevresi hücreleri ve bunların salgıladığı moleküller, kanserin patogenezindeki kritik rolleri nedeniyle terapötik hedefler olarak ilgi çekici hale gelmiştir (Bejarano ve ark., 2021). Son yıllarda, kanserin yalnızca genetik bir hastalık değil, aynı zamanda mikroçevresi ile birlikte değerlendirilen karmaşık bir ekosistem olarak kabul edildiği anlayışı giderek yaygınlaşmaktadır (Visser ve Joyce, 2023).

2.1.1. Ehrlich Assit Tümörü (EAT)

Ehrlich assit tümörü (EAT), deneysel çalışmalarda en sık kullanılan tümör modellerinden biridir. İlk olarak spontan meme kanseri olarak 1905 yılında bir dişi fareden ortaya çıkmış daha sonra Ehrlich ve Apolant, tümör dokularının deri altına nakledilmesiyle fareden fareye transplante ederek deneysel tümör olarak kullanmaya başlamışlardır (Ehrlich ve Apolant, 1905). 1932'de Loewenthal ve Jahn, farenin peritonundaki sıvı halini elde etmişler ve karsinom hücreleri ile birlikte assit sıvısından dolayı "EAT" olarak ifade etmişlerdir. 1948'den sonra, EAT hücreleri tüm dünyadaki araştırma enstitüleri tarafından araştırmalarda sıklıkla tercih edilmiştir (Loewenthal ve Jahn, 1932). Lettre ve ark., II. Dünya Savaşı sırasında EAT hücreleriyle yaptıkları çalışmalarla kalitatif ve kantitatif kanser araştırmalarına uygun test sistemine dönüştürülmesini ve aynı zamanda kolşisine dirençli tümör klonu elde etmeyi de başarmışlardır (Lettre ve ark., 1972). Tümör hücrelerinin periton boşluğuna enjekte edilmesinden sonra çoğalan neoplastik hücreleri içeren efüzyon "assit" olarak adlandırılır. Elde edilen Ehrlich assit formu araştırmalarda sıklıkla tercih edilmiştir (Kaleoğlu ve İşli, 1977). EAT, assit veya solid form olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. EAT hücreleri *in vitro* ortamda çoğaltıldığında yapay yüzeye yapışmazlar ve pasajlamadan sonraki 4-6 gün içerisinde assit oluşumu gözlenir ve 5-12 cc assit elde edilebilir. Assit sıvısı gri-beyazdır veya bazen hafif kanlı viskoz bir sıvı

içerir ve 0.1 cc'de 10 milyon neoplastik hücre içerir (Gabrilovac ve ark., 1982). Eğer tümör hücresi içeren assit sıvısı deney hayvanına intraperitoneal yolla enjekte edilirse assit form, subkutan yolla enjekte edilirse solid form elde edilir. EAT, farklılaşmamış olmaları ve çabuk büyüme hızlarına sahip olmaları nedeniyle kemoterapiye en duyarlı olan insan tümörlerine benzemektedir. EAT, kanserler için hem patofizyolojik hem de farmakolojik tarama çalışmalarında uygulanan çok yönlü bir klinik öncesi tümör modelini temsil eder (Sannapa ve ark., 2022). Hızlı tümör büyümesi ve nakilden sonra yüksek oranda tümör oluşumu, yeniden üretilebilirlik, düşük maliyet ve kolay bakım gibi avantajları sebebiyle çok yaygın bir şekilde çalışılmaktadır (Frajacomo ve ark., 2016). Assit formu, fare meme adenokarsinomundan türetilen bir allotransplantasyon modelidir. Bu model, süspansiyondaki hızlı büyüme ve kemoterapilere duyarlılık gibi özellikleri sayesinde meme kanseri üzerine translasyonel araştırmalarda kullanılabilir. Öte yandan, solid form, insan meme kanserlerine benzer immün yanıtlar sunarak özellikle hormon pozitif meme kanserine yönelik klinik uygulamalara önemli katkılar sağlar (Zeng ve ark., 2020). EAT; meme kanseri patogenezi anlamak, tümör mikroçevresini, kanser tarafından üretilen sistemik değişiklikleri, terapilerin yan etkilerini ve yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından en çok kullanılan modellerden biridir. Ayrıca, EAT modeli, *in vitro* ve *in vivo* bulgular arasındaki ilişkiyi ortaya koyarak tartışmalı bilimsel konuların aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Radulski ve ark., 2023).

2.1.2. EAT Gelişim Sürecinde İmmün Sistem Etkileşimleri

Kanser hücreleri ile immün sistem arasındaki ilişki, sürekli olarak gelişen dinamik bir süreç olarak düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin çoğalması, immün sistem hücrelerinin tümör mikroçevresindeki kanser hücreleriyle etkileşime girdiği bir immün modülasyon tepkisiyle belirlenir (Radulski ve ark., 2023). Tümör mikroçevresindeki immün hücrelerinin tüm eylemleri özellikle pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonu ile sonuçlanır (Chatterjee ve ark., 2013). EAT ile ilgili bulgular, karsinogenez esnasında innate (doğuştan) ve adaptif (sonradan kazanılmış) immün sistemin çeşitli hücre fenotiplerinin ifade düzeylerinin değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca EAT'nin spesifik bir tümör nakli antijenine sahip olmaması nedeniyle çoğalma ve immün yanıttan kaçınma kapasitesinin daha yüksek olduğu

bildirilmiştir (Ozaslan ve ark., 2011). EAT'nin farklı fare türlerinde büyüme hızı değişkenlik gösterse de neredeyse tüm türlerde gelişebilmektedir. Bu durum, konak farelerin bağışıklık sisteminin majör histokompatibilite kompleksinin (MHC) üzerinden verdiği tepkilerin önemli bir rol oynamadığını göstermektedir. Assit ve solid tümörlerin inokülasyonu ve yapısındaki farklılıklar, immün yanıt, metabolizma ve diğer patofizyolojik özelliklerde belirgin farklılıklar ortaya koymaktadır. Çoğu çalışma, assit formunun solid forma göre daha güçlü immün modülasyon gösterme eğiliminde olduğunu vurgulamaktadır. Bazı araştırmalar, bu hücelere karşı önemli immün yanıtlar gözlemlerken, diğerleri tümörlerin immün sistemden kaçma stratejilerini bildirmiştir (Feitosa ve ark., 2021). Sağlıklı bir bireyin periton sıvısında nötrofiller, lenfositler, mezotel hücreleri, eozinofiller, mast hücreleri bulunmakla birlikte periton sıvısının çoğunluğunu makrofajlar oluşturmaktadır (Lebovic ve ark., 2001). Peritoneal makrofajlar çeşitli malign assitlerde kritik bir rol oynar ve kanser patogenezi üzerinde önemli etkileri vardır. Ayrıca, sitokinler salgılayarak tümör mikroçevresindeki hücreleri etkiler ve immün yanıtı yönlendirebilir. EAT ile ilgili yapılan bir çalışmada M1 makrofajları, TNF- α ve IL-1 α sitokinlerinin ekspresyon düzeyinde bir azalma gözlemlenirken, M2 makrofajları ile IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin ekspresyon düzeyinde bir artış olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2018.) EAT'de tümör mikroçevresinde genellikle immün baskılama ve tümör büyümesini destekleyici işlevlere sahip olan M2 makrofaj polarizasyonunun insanlardaki abdominal neoplazmalardaki peritoneal makrofajlara benzer özellikler taşıdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, EAT modelinin tümör mikroçevresinin dinamiklerini anlamak ve kanser immünoterapilerinin geliştirilmesi açısından önemini vurgulamaktadır (Cavazzoni ve ark., 2013).

Tümör gelişiminde bir başka önemli hücre grubu da nötrofillerdir. Assit hücrelerin oluşumu, tümör gelişimine dirençli farelerde nötrofiller tarafından desteklenirken, duyarlı hayvanlarda tümör gelişimi kontrol altına alınır (Bergami-Santos ve ark., 2004). Son yıllarda, birçok araştırma grubu mevcut immünoterapötik rejimleri iyileştirmek veya immünoterapiye karşı direnci aşmak amacıyla yeni hedefler belirlemek için myeloid hücreleri incelemektedir. Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC) EAT gelişiminde oldukça önemlidir. Güçlü immünosüpresif aktiviteye sahip patolojik olarak aktive edilmiş nötrofiller ve monositlerdir. Patolojik aktivasyon, myeloid hücre

bileşeninin sürekli uyarılması sonucu ortaya çıkar ve bu durum, kanser, kronik enfeksiyonlar veya inflamasyon ve otoimmün hastalıklar gibi durumlarda myeloid büyüme faktörleri ve inflamatuvar sinyallerin uzun süreli varlığı nedeniyle meydana gelir (Vegliave ark., 2021). MDSC'lerin temel özelliği, T, B ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin etkinliğini azaltma veya inhibe etme yetenekleridir. İnsanlarda ve farelerde, iki ana MDSC grubu bulunmaktadır. Köken aldıkları granülositik veya monositik myeloid hücre soylarına göre granülositik/polimorfonükleer (PMN) MDSC'ler ve monositik (M) MDSC'ler olarak sınıflandırılmaktadır (Bronte ve ark., 2016). Farelerde, klasik nötrofillerin PMN-MDSC'lerden veya klasik monositlerin M-MDSC'lerden ayrılmasına izin veren fenotipik hücre yüzeyi belirteçleri yoktur. Bu nedenle, dokulardaki granülositleri ve monositleri tanımlamak için kullanılan aynı fenotipik özellikler, sırasıyla PMN-MDSC'lerin ve M-MDSC'lerin tanımlanması için de kullanılır ve farelerdeki MDSC'ler, diğer immün hücrelerini baskılama yeteneklerine göre işlevsel olarak ayırt edilir. PMN- MDSC'ler bağışıklık baskılanmasını sağlamak için tercihen reaktif oksijen türleri (ROS), peroksinitrit, arginaz 1 ve prostaglandinE2 (PGE2) kullanırken, M- MDSC'ler nitrik oksit (NO), IL-10 ve TGFβ gibi bağışıklık baskılayıcı sitokinler ve PDL1 gibi bağışıklık düzenleyici moleküllerin ifadesini kullanır (Gabrilovich ve ark., 2017). MDSC'lerin immün yanıtın baskılanmasına olanak tanıyan bazı temel biyokimyasal özellikleri aynıdır. Bu özelliklerden bazıları STAT3 ekspresyonunun artışı, endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesi, arginaz 1 ekspresyonudur (Gabrilovich, 2007). EAT gelişiminde MDSC'lerin ve tümörle ilişkili makrofajların naif CD4+ T hücreleri tarafından IL-17 üretimini indüklediği gösterilmiştir. MDSC aracılı IL-17 yanıtının, MDSC'ler ile T hücreleri arasındaki doğrudan temastan bağımsız olduğu, yani MDSC'lerin T hücreleriyle doğrudan etkileşimine gerek kalmadan IL-17 üretimini teşvik edebileceği belirtilmiştir. IL-17, genellikle T yardımcı hücrelerinin (TH17) bir alt grubu olan TH17 hücreleri tarafından üretilir ve tümör mikroçevresine bağlı olarak kanser üzerinde karmaşık etkilere sahiptir (Chatterjee ve ark., 2013) EAT'nin asit formundaki çalışmalar, M1 makrofajların, B lenfositlerin, TNF-α ve IL-1α gibi sitokinlerin tepkisinin düşük olduğu, tümör mikroçevresinin etkilerine bağlı olarak da nötrofillerin, CD4+ ve CD8+ lenfositlerin etkilerinin değişebileceğini göstermektedir. Ayrıca EAT'de M2 makrofajlarının yanı

sıra IL-17, IL-1 β gibi sitokinlerin artan düzeyleri de gözlenmiştir (Feitosa ve ark., 2021). Ehrlich tümörünün solid formu ile ilgili yapılan çalışmalarda, enjekte edilen tümör hücrelerinin konsantrasyonuna, fiziksel konumuna ve biyolojik süreçlere bağlı olarak farklı immün yanıtların geliştiği gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin fare ön ayak topuğuna enjekte edilmesinin ardından 7. günde CD4+ lenfositlerin varlığında artışa neden olduğunu ve 14. günde CD4+ ile CD8+ lenfosit ekspresyonu arasında bir değişim meydana geldiği gösterilmiştir. Lenfosit infiltrasyonunu, transkripsiyon faktörü FoxP3+ ve lenfosit antijeni Qa-2'nin artan ifadesiyle ilişkilendirilmiştir (Silva ve ark., 2017). FoxP3, düzenleyici T hücreleri tarafından üretilerek M2 makrofajlarının polarizasyonunu teşvik ederken, M2 makrofajları da T hücrelerinin polarizasyonunu etkileyebilir. Solid formun insan inflamatuvar meme kanseri ile benzer özellikleri dikkate alındığında, bu alanda daha fazla araştırma yapılması gerektiği ifade edilmektedir (Mohamed ve ark., 2014).

2.1.3. Kanser ve Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, tıpta, özellikle kanser tedavisi, hedeflenmiş ilaç salınım sistemleri, etkili terapötikler ve biyobelirteçlerin tespiti gibi alanlarda kullanılmak üzere nm ölçeğinde parçacıkların ve materyallerin geliştirilmesi ile ilgilidir (Nie ve ark., 2007). Kanserde, mevcut konvansiyonel tedavilerin, çok daha gelişmiş ve daha iyi prognozla birlikte, bazı sınırlamaları mevcuttur. Örneğin kemoterapötik ajanlar, hem tümör hem de sağlıklı hücreler için sitotoksiktir ve ilaçların tümör bölgelerinde spesifik olmayan dağılımı, uygulanan dozu sınırlamaktadır (Neal ve ark., 2014). Bu teknoloji, vücuttaki standart müdahalelere karşı biyomedikal ve biyofiziksel engellerin üstesinden gelmek için daha etkili kanser tedavileri üretmeye çalışmaktadır (Raju ve ark., 2019). Nanoteknolojik araştırmalar, kanseri sadece erken teşhis etmekle kalmayıp, aynı zamanda hastalığı etkili bir şekilde tedavi edebilmek için en son yaklaşımlardan biri haline gelmiştir (Rahman ve ark., 2013). NP'lerin yüzeyi, küçük boyutu ve şekli gibi benzersiz özellikleri; verimli bir tedavi ve hedeflemede kilit rol olarak kullanılmaktadır. Kanser hücrelerine özgü moleküllerle NP yüzeyleri modifiye edilerek tasarlanabilir. Hedeflenen doku, hücre veya organlar için daha spesifik özellikler sunarak yan etki riskini en aza indirir. (Rahman ve ark., 2012). Polimerler, dendrimerler, lipozom bazlı ve karbon bazlı gibi çeşitli nano taşıyıcılar kanser tedavisinde geniş çapta incelenmektedir (Raju ve ark.,

2015). Kanser tedavisinde fotodinamik tedavi ve immünoterapinin kombinasyonu, önemli ilerlemelere yol açmıştır (Gao ve ark., 2016). Son dönemde, nanoteknoloji destekli fotodinamik tedavi, ileri düzey fotosensitizörler ve immünoterapinin bir araya gelmesi, doku penetrasyonu ve yan etkiler gibi sınırlamaların aşılmasına yönelik umut verici yollar sunmaktadır. Bu yaklaşımların bir araya gelmesi ile gerçekleştirilen araştırmalar, kanserle mücadelede bağışıklık yanıtlarını düzenlemekte ve immün baskılayıcı tümör mikroçevresini aşma kapasitesini artırmaktadır (Jia ve ark., 2023). Kanser araştırmalarında NP'ler tümör mikroçevresinin yönlendirilmesi için muazzam bir potansiyele sahiptir. NP'ler immün sistem hücrelerin aktivitesini etkileyerek tümör mikroçevresinin şekillenmesinde kritik bir rol oynar (Raju ve ark., 2021). Ancak, NP'lerin türleri, boyutları, yüzey özellikleri ve reaktivitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra hücrelere uygulama yöntemleri, süreçleri ve tümör mikroçevresinin özellikleri, bu partiküllerin davranışlarını önemli ölçüde etkileyebilir (Kukia ve ark., 2018). Nanoteknoloji immün sistemin, kanser hücrelerine karşı savunma yeteneğini artırmak veya düzenlemek için kullanılabilir. Bu sayede, NP'lerin immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri hedefe özgü bir şekilde optimize edilebilir. Böylelikle, kanser gelişimi üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılmasına ve daha başarılı tedavi stratejileri geliştirilmesine olanak tanır. Nanoteknolojik gelişmelerin kanser araştırmalarına entegrasyonu, daha etkili ve hedeflenmiş tedaviler için önemli fırsatlar sunmaktadır (Asadujjaman ve ark., 2020).

2.2. Nanoteknoloji ve Tarihsel Gelişimi

Nanoteknoloji maddenin bir metrenin milyarda biri olarak tanımlanan nano boyutunda yürütülen 21. yüzyılın hızla gelişen en önemli teknolojilerinden biridir. Bu teknoloji nanoölçeklerde maddelerin, sistem ve cihazların şekil ve boyutunun ayarlanarak tasarlanması, sentezlenmesi, karakterizasyonu, kontrol edilmesi, benzersiz özellikler kazandırılarak işlevsel hale getirilmesi, üretimi ve uygulaması ile ilgili çalışmaları içermektedir (Whitesides, 2005). Son yıllarda dikkatleri üzerine çeken bu teknoloji aslında binlerce yıldır insanlar tarafından kullanılan uzun bir geçmişe sahiptir. MS 4. yüzyılda dahi resimlerde nano boyutta malzemeler kullanılmıştır. 19. yüzyılın ortalarına doğru araştırma konusu olmaya başlayan bu alan zamanla, nano yapıların elde edilebilmesi, karakterizasyonunun yapılabileceği cihazların geliştirilmesi ve yeni nano boyutta yapıların

keşfi ile günümüzde kapsamlı bir şekilde çalışılmakta ve birçok alanda kullanılmaya başlanmaktadır (Ijaz ve ark., 2020). 1857 yılında Micheal Faraday bu alanda en büyük adımlardan biri olarak kabul edilen 100 nanometreden küçük altın nanoparçacık içeren sulu kolloidal karışım elde etmeyi başarmıştır. Normal boyutlarda sarı rengi olan altının, nano boyutta suda asılı kalmasıyla koyu kırmızı veya pembe renk verdiğini gözlemlemiştir. Faraday elde ettiği kolloidal karışımın o zamanın şartları altında boyut dağılımının değerlendirilmesini ve kontrolünü yapamamış, bilinen mikroskoplarla partikülleri inceleyememiş, sadece optik ve elektriksel özelliklerini gözlemleyebilmiştir (Edwards ve Thomas, 2007). Parçacıkların boyutlarının incelenememesinin nedeninin çok küçük olmalarından kaynaklandığını belirten Richard Zsigmondy 1902 yılında, bugün de kolloidlerin incelenmesinde halen kullanılan ultra mikroskobu keşfetmiştir. Kolloidler kimyasıyla yaptığı çalışmalardan ötürü 1925 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü alan Zsigmondy tarafından ilk defa nanoparçacıkların boyutları ölçülmüş ve nanometre (nm) kavramı ilk kez kullanılmıştır (Komanduri ve ark., 1997). Modern nanoteknolojinin öncüsü olarak kabul edilen kuantum elektrodinamiği ve parçacık fiziği gibi alanlarda yapmış olduğu çalışmalardan dolayı 1965 yılında Nobel Fizik Ödülü alan Richard Feynman normal boyutlardan nanoyapılara inildikçe maddenin fizikokimyasal özelliklerinin ve davranış biçimlerinin değiştiğini vurgulamıştır. Nanoteknoloji terimini kullanmadan nano boyutta üretim yapabilecek yöntemler geliştirilirse birçok yeni keşif ve ilerlemenin kaydedileceğini belirtmiştir (Feynman, 1960). 1974 yılında Nario Taniguchi nanometrik boyutlarda meydana gelen yarı iletken süreçleri tanımlamak için "Nano-teknoloji" terimini kullanmıştır (Taniguchi, 1974). Bu çalışmasından ötürü 1999 yılında Avrupa Mühendislik ve Nanoteknoloji Derneği tarafından kendisine 1. Yaşam Boyu Başarı Ödülü verilmiş ve yaptığı çalışmalar ile bu teknolojinin gelişimine katkıda bulunmuştur (Oberdorster ve ark., 2007). 1981'de taramalı tünelleme mikroskobu, 1986'da atomik kuvvet mikroskobunun icat edilmesi ve bu gelişmeleri takip eden birçok yeni çalışmalar ve keşiflerle nanoteknolojinin altın çağı başlamıştır (Binnig ve ark., 1982). Dünyada moleküler nanoteknoloji alanında doktorasını almış ilk kişi olan Eric Drexler'in biyolojik sistemler kullanılarak cihazlar yapılabileceği ile ilgili yazdığı kitaplarla ve verdiği eğitimlerle nanoteknolojinin tanınmasına katkısı olmuştur (Drexler, 1992). Diğer önemli bir gelişme ilaç salınımı çalışmalarında kullanılan 1 nm çapında 60 karbon atomundan meydana gelen

karbon elementinin bir formu olan fullerenlerin keşfedilmesidir. 1985 yılında fullerenler ile ilgili çalışma Robert ve arkadaşları tarafından Nature dergisinde yayınlanmış ve büyük ilgi görerek bu bilim insanlarına 1996 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır (Kroto ve ark., 1985). Zamanla bu yapılar daha da geliştirilerek benzer ama daha avantajlı ve olağanüstü özelliklere sahip karbon nanotüpleri keşfedilmiştir. 1991 yılında keşfedilen karbon nanotüpler oldukça ince yapıda partikül içeriği, dayanıklı, ısı geçirgen ve elektriksel özelliklerinden dolayı günümüzde de endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. 21. yüzyıla geldiğimizde gıda katkı maddeleri, kozmetik ürünleri, boyalar, su geçirmeyen ve leke tutmayan kumaşlar ve yüzeyler, telefon, bilgisayar teknolojileri gibi pek çok alanda gündelik yaşantımızda nanoteknoloji karşımıza çıkmaktadır (Iijima, 1991). Malzeme bilimi, fizik, kimya, biyoloji, matematik, tıp, elektronik ve bilişim teknolojileri gibi birçok bilim dalında da nanoteknoloji uygulamaları kullanılmaktadır. İnsanın biyolojik sisteminin moleküler düzeyde incelenmesi, hastalıkların tedavisinde, teşhis edilmesinde, izlenmesinde ve kontrolünde nanoteknolojinin uygulanması “nano-tıp” olarak ifade edilmektedir (Thrall, 2004). Nano tabanlı terapötik ve tanısal stratejiler, kanserin kolay ve uygun maliyetli teşhisi için son derece umut verici araçlar olarak ortaya çıkmaktadır. Moleküler tıp, immünoloji, biyokimya ve yapay zeka alanlarındaki gelişmeler yardımıyla kanserin en verimli teşhisi, tedavisi ve yönetiminin gelecekte nanotıp olacağı düşünülmektedir. Nanotıbbın gelişmesi, geleneksel kanser tedavilerine göre yeni ve ümit verici bir alternatif teknoloji olduğunu göstermekle birlikte erken teşhis ile kanser tedavisi için yeni fırsatlar sunmaktadır (Raju ve ark., 2021).

2.3. Nanopartiküller

Nanometre (nm), metrenin (m) milyarda biri olan 10^{-9} m yani maddenin atomdan önceki son basamağı olan nano ölçekteki birim uzunluktur. Nanoteknolojinin ilgilendiği büyüklük ölçeğine giren yapıların bir veya daha fazla boyutunun nm uzunluğunda olması gerekir. Nano yapıli malzemeler veya nanomateryaller bütünü nano ölçekte olmayan ama en az bir boyutta nano yapılar içeren malzemelerdir (Thrall, 2004).

Nanopartikül (NP)'ler 100 nm'den küçük olan, nanoteknolojinin temelini oluşturan çok ince yapılardır. Partiküllerin nano boyutta olması onlara özgün ve avantajlı birçok yeni

özellikler kazandırması açısından oldukça değerlidir. Malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve buna bağlı olarak da davranışlarını değiştirebilmektedir. Altın NP'lerin 20 nm boyutunda olduğu tipik bir kırmızı şarap rengine olması, bu partiküllerin optik özelliklerinin boyutuna bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır. NP'lerin potansiyel etkileri ve davranışları sahip olduğu partikül boyutunun yanı sıra yüzey alanı, yapı ve şekli, yüzey yükü ve yoğunluğu, gözenek boyutu, agregasyon durumu ve kimyasal reaktivitesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Ijaz ve ark., 2020). 100 nm ve altında oldukça küçük boyutta olan bu partiküller incelediğinde basit moleküller olmadığı görülür. Bir NP en az iki katmandan oluşmaktadır. Çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler ile işlevsel hale getirilebilen yüzey tabakasından, her yönden çekirdekten kimyasal olarak farklı bir malzeme olan kabuk tabakasından ve NP'lerin merkezi kısmı olan çekirdek yapısından oluşmaktadır (Shin ve ark., 2016). NP'lerin en az iki farklı yönlerinin etkileşimleri dikkate alınmalıdır. Bu partiküller genellikle çekirdek malzemesi ile adlandırılmasına rağmen yüzey katmanı kendi çekirdeğine farklı kimyasal özellik gösterir ve farklı bir kompozisyona sahip olur. Bu nedenle, maddeler nano boyut düzeyinde iken yüksek yüzey alanı/hacim oranına, çekirdek malzemesinden belirgin bir şekilde farklı bir yüzey kimyasına sahip olacak ve sıra dışı özellikler gösterecektir. NP'ler yüksek yüzey alanı ve atomlarının yaklaşık %20-40'ının yüzeyde yer alması nedeniyle kimyasal olarak daha reaktif hale gelirler. 10 nm'lik bir partikülün atomlarının yaklaşık %35-40'ı yüzeyinde lokalize iken, 30 nm'lik NP'lerin atomlarının %20'den azı yüzeyinde bulunur. Bu boyut aralıklarında partiküllerin, avantajlı özelliklerinden dolayı çevresiyle veya hücrelerle etkileşimi farklı olacak ve buna bağlı olarak da farklı davranışlar gösterecektir (Auffan ve ark., 2009).

NP'ler şekil, boyut ve yapılarına göre sınıflandırılabilirler. İnorganik, organik, seramik, karbon bazlı veya kompozit yapıda olabilirler. İnorganik NP'ler de kendi içinde metal ve metal oksit NP'ler olmak üzere ikiye ayrılır. Toksik etki göstermeyen bu yapıdaki NP'ler çok daha kararlı, biyolojik olarak uyumlu ve hidrofilik özelliktedir. Altın, gümüş, demir, bakır, kurşun, çinko en bilinen metal NP'lerdir. Metal öncülleri kullanarak istenilen saf metal NP'ler sentezlenebilir ve bu partiküller benzersiz optoelektronik özelliklere sahiptir (Dreaden ve ark., 2012).

Metal NP'lerin oksitlenmesi ile elde edilen metal oksit NP'lerin reaktivitesi ve verimliliği daha fazla olmaktadır ve bu nedenle metal oksit NP'lerin sentezi yapılmaktadır. Titanyum dioksit, demir oksit, alüminyum oksit, çinko oksit bilinen metal oksit NP'lerdir (Tai ve ark., 2007).

Polimerik NP'ler olarak da bilinen organik NP'ler hedef ilaç dağıtımı çalışmalarında uygun özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan bu partiküller lipozomlar, miseller, ferritin ve dendrimerleri içermektedir. Ayrıca lipozomlar ve miseller içi boş nanoküre veya nanokapsül şekillere sahiptir. Bu nedenle organik NP'ler ilaçlar için ideal bir taşıyıcı seçimidir (Mansha ve ark., 2017).

Seramikler "anorganik, ametalik katılar" olarak da tanımlanan, yüksek sıcaklıkta dayanıklılık özellikleri, bükülmezlik, sertlik ve mekanik direnç gibi avantajlı özelliklerinden dolayı çeşitli alanlarda yapılan araştırmalarda yoğun olarak kullanılan NP'lerdir. Seramik NP'ler polikristal, amorf, gözenekli, yoğun veya içi boş olarak çeşitli şekillerde bulunabilirler (Sigmund ve ark., 2006).

Fullerenler, karbon nanotüpler, nanolifler, nanoçubuklar, nanohalkalar ve grafen karbondan oluşan nanomalzemelerdir. Karbon nanoyapıların ısı geçirgen olması, yüksek yüzey alanı, elektriksel ve mekaniksel özellikleri, dayanıklılığı gibi üstün özelliklerinden dolayı elektronik bilişim teknolojilerinden medikal uygulamalara kadar çok geniş ölçekte uygulama alanına sahiptir (Astefanei ve ark., 2015).

Biyolojik nanomalzemeler peptitler, bitkiler, bakteriler, nükleik asitler vb. gibi biyolojik moleküllerden oluşan en az bir boyutu 100 nm' den az olan yapılardır. Eksozomlar, lipoproteinler, virüsler, manyetozomlar doğal olarak biyolojik sistemlerde oluşan biyonanomalzemeler olup; doku mühendisliği, ilaç dağıtımı, hastalıkların tanı, teşhis ve takibinin yapılmasında terapötik uygulamalarda kullanılmaktadır (Ijaz ve ark., 2020).

Kompozitler iki farklı tipte NP'lerin bir araya gelmesiyle oluşan nanomalzemelerdir ve istenilen avantajlı özelliklerinin bir araya getirilmesi ile çok işlevli hale gelen bu malzemeler depolama sistemleri, sensörler, cam, boyalar, nano kaplamalar ve otomotiv sektörü gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Subaşı ve ark., 2017).

Bunun yanı sıra nanomalzemeler formlarına göre sıfır boyutlu, tek boyutlu, iki boyutlu veya üç boyutlu yapıda olabilir ve üretilebilirler (Ijaz ve ark., 2020).

Günümüzde farklı şekil, yapı ve boyutlarda NP' ler tasarlanıp üretilebilmektedir. Özellikle yüksek yüzey/hacim alanı, üstün özellikleri ile birçok çeşitli alanda ve uygulamalarda sıklıkla kullanılan metal ve metal oksit NP'lerin sentezlenebilmesi nanoteknoloji alanında en önemli gelişmelerden biridir. NP'lerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik temelli tekniklerle sentezi gerçekleştirilebilmektedir (Singh ve ark., 2021).

Metal NP'lerin sentezinde; termal ayrışma, mikro emülsiyon, inorganik ve organik ajanlar ile kimyasal indirgeme, elektrokimyasal sentez yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal yöntemler arasındadır. Elektroliz, difüzyon, ultrasonik sprey pirolizi, buharlaşma-yoğunlaşma, lazer ablasyonu, mekaniksel-bilye öğütme de kullanılan bazı fiziksel yöntemlerdir (Çiftçi ve ark., 2021).

Bu yöntemler ile NP'ler elde edilebilmekle birlikte sentez sırasında yüksek miktarda kimyasal ve çözücülerin kullanılması, toksik yan ürünlerin oluşması ve yüksek maliyetli olmaları, dezavantaj olarak ifade edilebilir. Bu nedenle yürütülen çalışmalar ile toksik kimyasal ve çözücülerin kullanılmadığı, insan sağlığı ve çevre için risk teşkil etmeyen, maliyeti az, biyoaktif uygulama sınırını ortadan kaldıran yeşil sentez olarak da bilinen biyolojik sentez ile NP'lerin elde edilebilmesi için yöntemler geliştirilmiştir. Biyolojik sentez, bitki özü ve bakteri, mantar, virüs gibi mikroorganizmalar kullanılarak NP'lerin üretildiği yöntemleri içermektedir. NP'lerin sentezi için bitkilerin kullanılması yani fitonanoteknoloji çevre dostu, basit ve düşük maliyetli yeni bir alan sağlamıştır. NP'ler bitkinin kök, meyve, gövde, tohum ve yaprak gibi farklı kısımları kullanılarak sentezlenebilmekte ve kolay erişilebilir olmalarından dolayı tercih edilmektedir. Fitonanoteknolojinin en önemli avantajlarından biri de indirgeyici ajan olarak en iyi bilinen çözücü olan su kullanarak NP'lerin sentezinin gerçekleştirilebilmesidir. Bitki ekstraktlarının metal iyonlarını indirgeyebilmeleri ve alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler, polisakkaritler ve heterosiklik bileşikler gibi sekonder metabolitlerin çeşitli NP'lerin sentezinden sorumlu olduğu gösterilmiş olsa da bitkilerin kullanımıyla NP'lerin sentezi için doğal mekanizma henüz bütünüyle açıklığa kavuşturulmamıştır. Metal ve metal oksit NP'lerin sentezinde bitki ekstraktları birçok araştırmacı tarafından

kullanılmaktadır (Annu ve ark., 2018).

NP'lerin sentezinde kullanılan yöntemler ayrıca iki ana prensip açısından yukarıdan aşağı "Top Down" ve aşağıdan yukarı "Bottom Up" yaklaşımı ile ifade edilebilir. Yukarıdan aşağı prensibinde, genel olarak mekanik öğütme-aşındırma, sıcaklık-lazer uzaklaştırma, püskürtme gibi fiziksel veya kimyasal temelli yıkıcı yöntemler uygulanarak malzemeler küçük parçalara ayrılır ve NP'ler elde edilir. Aşağıdan yukarı prensibinde ise kimyasal buhar biriktirme, sol-jel, piroliz, kimyasal reaksiyonlar gibi yapıcı yöntemler kullanılarak küçük boyuttaki yapılar büyütülerek partiküller elde edilir (Zaki ve ark., 2007; Wolfgang, 2007).

2.4. Titanyum dioksit (TiO₂) Nanopartiküller

Titanyum (IV) oksit, titanya, Ti beyaz olarak da bilinen titanyum dioksit (TiO₂) titanyum elementinin doğada bulunan oksitlenmiş formudur. Titanyum (Ti) yer kabuğunda, volkanik kayalarda, sularda, toprakta en fazla bulunan ve buralardan çıkarılan elementlerden biridir. Güçlü, korozyon karşı dirençli, yüksek dayanıklılığa sahip ve aynı zamanda hafif bir geçiş metalidir. Ti elementi doğada metalik halde bulunmayıp diğer elementler ile bağlı şekilde bulunur. Endüstride en yaygın bulunan bileşiklerden biri de oksijenle tepkimeye girmiş olan beyaz pigment imalatında kullanılan TiO₂'dir (Shi ve ark., 2013). Yirminci yüzyılın başlarında inert ve güvenli bir malzeme olarak kabul edilen TiO₂'nin seri üretimi, beyaz boya için toksik olmayan bir alternatif sağlamak amacıyla başlamıştır. Boyalar, kaplamalar, cam, güneş kremleri, diş macunu, kişisel bakım, kozmetik, dermal ve implant uygulamalar, güneş pilleri, atık su arıtımı ve gıda maddelerinde beyazlatıcı madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, farmasötik ilaçların formülasyonlarında da yer almaktadır. Bu çeşitli uygulama alanları, TiO₂'nin çok yönlülüğünü ve endüstriyel önemini ortaya koymaktadır (Carp ve ark., 2004). Nanoteknolojinin gelişimi, nanoboyutta üretilen TiO₂ bileşiklerinin yeni ve daha kullanışlı özellikler kazanmasını sağlamıştır. TiO₂ NP'ler beyaz, kokusuz ve yanıcı olmayan özel fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip, partikül boyutu 100 nm'den küçük çok ince partiküllerdir. TiO₂ NP'leri, ince parçacık analoglarına kıyasla biyoaktivitelerini değiştirebilecek farklı fizikokimyasal özelliklere ve daha güçlü katalitik aktivitelere sahiptir. Bu durum yüksek yüzey alanı/hacim oranına izin veren küçük boyutlarına bağlanmaktadır (Skocaj ve ark., 2011). TiO₂ NP'ler doğal olarak üç kristal

formda bulunur. Rutil form en kararlı yapıda olup, anataz ve brookit ise rutilin geçiş formlarıdır. Elektriksel ve optik özellikleri nedeniyle anataz formu sensörler, piller, güneş pilleri ve fotokatalizörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve rutil forma göre kimyasal olarak daha reaktiftr. Rutil form, en yüksek termal stabiliteye ve anataz formdan daha yüksek simetriye sahiptir. Kişisel bakım ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Weir ve ark., 2012). Brookite form, doğal ve sentetik nano ölçekli numunelerde yaygındır. Anataz ve rutil formun tetragonal yapısından farklı olarak brookit form ortorombiktir. Brookite form, daha büyük bir hücre hacmine (sekiz TiO_2 grubu) sahiptir, bu da onu anataz (dört TiO_2 grubu) ve rutil (iki TiO_2 grubu) formdan daha az kararlı hale getirir. Anataz ve rutil form karışımı, kaplamalarda, plastikte ve camda pigment olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve Mao, 2007). TiO_2 NP'leri fotokatalitik özelliğe sahip olup ultraviyole (UV) ışığı absorbe ederek uyarılmış duruma geçer, hidrojen peroksit veya serbest radikaller gibi reaktif bileşenler üretir. (Moosavi ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar, UV ışınlamasından sonra TiO_2 NP'lerin anataz formunun rutil formuna kıyasla daha fazla ROS ürettiğini göstermektedir (Yin ve ark., 2012). Ayrıca, anataz formun, rutil forma göre daha yüksek bir toksik potansiyele sahip olduğu öne sürülmüştür (Xue ve ark., 2010; Petkovic ve ark., 2011). Bunun yanı sıra, TiO_2 NP'leri UV ışığı altında antibakteriyel özellikler de göstermektedir. TiO_2 NP'ler, daha az yan etkiye sahiptir ve UV ışık altında etkinlik gibi özellikleri nedeniyle kanser hücrelerine özgü hedefleme stratejileriyle birleştirilerek fotodinamik tedavide potansiyel fotosensitizörler olarak kullanılırlar ve antibiyotiklere dirençli bakterilerin fotodinamik inaktifleştirilmesinde araştırılmaktadır (Ni ve ark., 2017). TiO_2 NP'lerinin UV ışık olmadan da ROS üreterek hücrelerde oksidatif hasara yol açtığını gösteren araştırmalar mevcuttur (Gurr ve ark., 2005). Bu özellik, kanser hücrelerinin hedeflenmesi ve yok edilmesi açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu işaret etmektedir (Nasr ve ark., 2018). Bu nedenle, farklı kanser hücreleri üzerinde TiO_2 NP'lerinin potansiyel etkilerini anlamak amacıyla son yıllarda kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmektedir (Shi ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar TiO_2 NP'lerinin boyut, şekil, yüzey alanı, kristal yapısı ve aglomerasyon durumu gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, hücrelerin maruz kaldığı ortam ve koşullar, uygulanan inkübasyon süreleri ve konsantrasyonların da hücreler üzerine olan biyolojik etkilerini belirlemede rol oynadığını belirtmektedir (Behzadi ve ark.,

2017). Ayrıca TiO_2 NP'lerinin hücre canlılığı ve sitotoksosite üzerindeki uyarıcı etkilerinin kanser hücre türüne özgü olduğunu rapor eden araştırmalar mevcuttur (Huang ve ark., 2009).

2.4.1. TiO_2 Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımı

TiO_2 NP'ler biyolojik olarak güvenli ve düşük toksisiteye sahip parçacıklar olarak kabul edilmekte birlikte, son yıllarda avantajlı özellikleri nedeniyle daha fazla üretilmekte ve günlük hayatta daha fazla kullanılmaktadır (Weir ve ark., 2012). TiO_2 NP'ler, ince partikül analoglarına kıyasla daha güçlü katalitik aktiviteye sahip olmaları ve farklı fizikokimyasal özellikler göstermeleri nedeniyle hücrelerin içine daha kolay girebilmekte ve bu durum, toksikolojik açıdan etkilerini artırabilmektedir. TiO_2 NP'ler hücre içerisine endositoz, pinositoz, mikro pinositoz, serbest difüzyon, yüzey reseptörleri ve fagositoz yolu ile girebilir (Stearns ve ark., 2001; Geiser ve ark., 2008; Marano ve ark., 2011). Özellikle 2-6 nm boyutunda sıvı ve çözünmüş halde bulunan NP'ler, hücre membranının küçük bir bölümü içe doğru kıvrılarak oluşan veziküller aracılığıyla pinositoz mekanizmasıyla hücre içine alınabilir. Alternatif olarak, NP'nin fizikokimyasal özelliklerine ve hücre zarının yapısına bağlı olarak, difüzyon yolu ile de serbestçe hücre içerisine girebilirler. Mikrometre (μm) boyutundaki partiküller fagositoz yoluyla hücre içine alınabilir (Geiser ve ark., 2008). Fagositoz; nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinin, 500 nm'den büyük parçacıkları (örneğin mikroorganizmaları) hücre içerisine alması ve temizlemesi için kullandığı bir mekanizmadır. Bu süreç, immün sistemin enfeksiyonlara karşı savunmasında patojenlerin ortadan kaldırılmasında kritik bir rol oynamakla birlikte, aynı zamanda doku onarımı ve homeostazın sağlanmasında da önemli bir mekanizmadır. Fagositer hücreler, 500 nm'den küçük partikülleri temizleme kapasitesine sahip olmadıkları için bu nanopartiküller, hücre içerisinde veziküller, sitoplazma veya mitokondriler gibi belirli konumlarda birikebilir. Bu birikim, hücrelerde yük oluşturarak mekanik stresi indükleyebilir (Aderem ve Underhill, 1999). Hücre içerisine alınan 50 nm'den küçük nanopartiküller plazma membranında değişiklikler ve hücreler arası iletişimde hasarlar oluşturabilmektedir (Stearns ve ark., 2001).

2.4.2. TiO₂ Nanopartiküller ve Hücre Canlılığı

TiO₂ NP'lerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, zaman ve doza bağlı olarak çeşitli hücre hatları üzerinde incelenmiş ve hücre ölümünün (apoptoz veya nekroz) altında yatan mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, hastalıklı veya hasar görmüş hücrelerin ve gelişimsel olarak gereksiz olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan kontrollü bir hücre ölümü sürecidir. Apoptoza yol açan sinyal iletim yolu, kaspazlar adı verilen sistein proteazlarının ardışık aktivasyonunu içermektedir. Ayrıca, Bax, P53, Fas, TNF ve Ca²⁺ gibi çeşitli uyarıcılar proapoptotik sinyalleri aktive ederek, kaspazların aktive olmasıyla sonuçlanan hücre ölümüne yol açarlar (Li ve ark., 2003).

Nekroz ise anormal veya zararlı koşullar altında ciddi derecede hasar almış hücrelerin kontrolsüz ölümü ile ifade edilir. Nekroz sırasında hücrede başlangıçta bir şişme meydana gelir daha sonra plazma membranının yırtılıp sitozolün çevre dokulara boşalmasını takiben yakınında bulunan hücrelerde iltihaplanma ve hasar oluşur (D'arcy, 2019).

NP'lerin; genellikle oksidatif stresi indüklediği, kaspaz-3'ü aktive ettiği ve apoptozu tetiklediği memeli hücrelerinde antitümör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. ROS gibi hücresel strese yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyerek hücresel proliferasyonu bloke eden bir tümör baskılayıcı protein olan P53'ün birikmesini indükleyebilen ardışık sinyal transdüksiyon olaylarına yol açabileceği belirtilmiştir. TiO₂ ile muamele edilmiş hücrelerde sinyal iletiminde önemli bir rol oynayan hücre içi Ca²⁺ seviyelerinde değişiklikler meydana gelebilir. Ca²⁺ sinyalinin modüle edilmesi mitokondriyal fonksiyonu etkileyerek kaspaz aktivasyonunu ve sonuç olarak apoptozu tetikleyebilir. TiO₂ NP'ler, kanser hücrelerinde integrinlerin parçalanmasına yol açabilir. Bu durum metabolik yolları etkileyerek hücresel yanıtlar üzerinde değişiklikler meydana getirebilir, hücre adhezyonunu zayıflatabilir ve sonuç olarak apoptozun başlamasına yol açabilir. TiO₂ NP'lerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, farklı hücre tiplerinde incelenmiştir. Fare kolon kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, daha küçük boyutlu nanopartiküllerin, daha büyük olanlara kıyasla oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin üretimini artırarak, hücre canlılığını boyuta ve doza bağlı olarak

azalttığı gözlemlenmiştir (Fujiwara ve ark., 2015). A549, insan akciğer adenokarsinomu hücre hattında yapılan çalışmada genel olarak hücrelerin canlılığında konsantrasyona (10-100 µg/mL) ve zamana (6-48 saat) bağlı olarak azalma, ROS üretiminde ve apoptotik cisimlerin oluşumunda artış olduğu, 24 saatlik sürede anlamlı bulunan hücre canlılığındaki azalmanın 48. saatte daha da belirgin olduğu gözlemlenmiştir (Srivastava ve ark., 2013). A549 hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada, 1-200 µg/mL konsantrasyon aralıkları ile yapılan sitotoksosite analizlerinde 6 ve 24 saatlik maruziyet sürelerinde anlamlı bir etki gözlenmezken 48. saatte 150 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Kansara ve ark., 2014). Kültüre alınmış insan bronşiyal epitel hücre hattında, sitotoksitenin, en düşük 5 µg/mL TiO₂ NP konsantrasyonunda olduğu gösterilmiş, zamana ve doza bağlı olarak ROS artışına, glutatyon azalmasına ve oksidatif stresle ilişkili genlerin indüksiyonuna yol açarak apoptozu indüklediği ifade edilmiştir (Park ve ark., 2008). İnsan epitelyal hücre hatlarında TiO₂ NP'lerinin apoptozu etkisinin intrinsik bir mekanizma ile gerçekleştiği, insan kaynaklı kültüre alınmış lenfositlerde kaspaz-8/Bid aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği bulunmuştur. A549 hücrelerinde Kaspaz 8/t-Bid yolundan bağımsız olarak, mitokondriyal apoptozda kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 sinyalleri yoluyla, apoptozun fizyokimyasal indükleyicisi olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, artan TiO₂ NP konsantrasyonlarına maruz kalan, HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde canlılığın arttığı gösterilmiştir. Artan dozlarda TiO₂ NP'ler ile etkileşen insan kordon kanı venöz endotelyal hücrelerinde ise hem canlılık artışı hem de azalışı gözlemlenmiş, ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ve bu hücre hatlarında apoptoz veya nekroz gözlemlenmemiştir (Kukia ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalar, TiO₂ NP'lerin hücre canlılığı ve sitotoksosite üzerindeki etkilerinin, NP'lerin boyutu, kristal yapısı gibi özelliklerine ek olarak, konsantrasyon ve etkileşim sürelerine bağlı olarak da değişkenlik gösterdiğini ve bu etkilerin hücre hattına özgü olduğunu ortaya koymaktadır (Kukia ve ark., 2008).

2.4.3. TiO₂ Nanopartiküller ve Oksidatif Stres

NP'lerin hücre dışı bir sistemde oksidanları üretme mekanizmasının, yüzeyinde bulunan pro-oksidatif fonksiyonel gruplara ve geçiş metallerinin redoks döngüsüne dayandığı

bildirilmektedir (Lucky ve ark., 2015). NP'ler hücre içerisine alındığında, özellikle yüzeylerindeki aktif gruplar, hücre içindeki su molekülleri, membranda bulunan lipidler, proteinler gibi hücresel bileşenler ile etkileşime girerek hidroksil radikalleri ($\bullet\text{OH}$) ve süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gibi reaktif türlerin ROS ve diğer serbest radikallerin oluşumunu tetikleyerek bir reaksiyon zinciri başlatabilir. Hücre içerisinde artan ROS, serbest radikaller ve TiO_2 NP'lerinin, hücre zarları veya mitokondri gibi hücresel organellerle etkileşime geçmesi oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durum DNA, lipidler ve proteinler gibi hücresel bileşenlerde hasara, inflamasyona ve hücre ölümüne neden olabilir. Oksidatif stres, genellikle TiO_2 NP'lerinin hücreler üzerindeki toksik etkilerinin başlıca mekanizmalarından biri olarak kabul edilir. NP'lerin bu özelliği, kanser dokularının yaygın olarak hipoksik ve asidik özellikler taşıması ile oksidatif stres aracılığıyla kanser hücreleri üzerindeki potansiyel toksik etkileri, tümörlerin minimum yan etkilerle yok edilmesi açısından son yıllarda araştırılmaktadır. (Nasr ve ark., 2018). Bununla birlikte, NP'lerin ROS üretimine katkıları, fizikokimyasal özellikleri, katalitik aktiviteleri ve hücresel etkileşimleri gibi faktörler açısından ayrıntılı olarak araştırılıyor olsa da, hücresel sistemlerde bu mekanizmaların tamamı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hücre içerisinde artan ROS üretiminin, doğrudan TiO_2 'nin kimyasal reaktivitesinden değil, hücresel bir kaynaktan da olabileceği vurgulanmaktadır (Schanen ve ark., 2009). Hücrelere uygulanan TiO_2 NP'lere yanıt olarak oluşan oksidatif strese, mitokondri veya NADPH oksidaz gibi mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri aracılığıyla O_2 , elektron kaybı sonucu $\text{O}_2^{\bullet-}$ haline dönüşebilir ve ek olarak, NADPH oksidaz (NOX) kompleksi plazma membranında ve sitozolde büyük miktarda ROS üretebilir (Desouki ve ark., 2005; Indo ve ark., 2007). NOX kompleksi başlangıçta ROS üreterek mikropları öldüren nötrofillerde ve makrofajlarda tanımlanmıştır ve genellikle fagosit NADPH oksidaz olarak adlandırılır. Fagositik hücrelerin patojen mikroorganizmaları öldürdükleri ana mekanizma, NADPH oksidaz tarafından katalizlenen $\text{O}_2^{\bullet-}$ üretimi, doğal immün yanıtın vazgeçilmez bir bileşenidir. Başlangıçta, NOX enzimlerinin yalnızca patojenik organizmalara karşı savunma amacıyla fagositik hücrelerde bulunduğu düşünülüyordu; ancak, NOX homologlarının kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre ve doku tiplerinde keşfedildiği ortaya çıkmıştır. NOX'ların fizyolojik

işlevleri çok çeşitlidir. Hücre çoğalmasında, hücrelerel sinyal iletiminde, serotonin biyosentezinde, endotel sinyalizasyonunda, böbrek işlevlerinin düzenlenmesinde, inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda rol oynarlar, ancak aşırı ekspresyonları çeşitli nörolojik hastalıklar ve kanser türleriyle ilişkilidir (Panday ve ark., 2015; Burger ve ark., 2016). TiO_2 NP'lerinin kanserli ve kanserli olmayan çeşitli hücre hatları üzerindeki etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarla incelenmiştir. Elde edilen bulgular hücre hatlarına spesifik olarak bu NP'lerin farklı tepkiler sergilediğini göstermekte ve sitotoksitesinin ayrıntılı bir moleküler mekanizmasının ortaya konmasını güçleştirmektedir. (Kang ve ark., 2009). Ancak bu çalışmalardan ortaya çıkan ortak bir özellik, hücrelerin TiO_2 NP'lere maruz kalmasının ROS üretimini artırmasıdır. Ancak, ROS artışının NP'lerin sitotoksik etkilerinde gerçekten belirleyici bir rol oynayıp oynamadığı halen belirsizliğini korumaktadır (Zhu ve ark., 2012).

2.4.4. TiO_2 Nanopartiküller ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücrelerin bölünme evresine girmeden önce büyüme, DNA replikasyonu gibi hazırlık aşamalarını ve mitoz veya mayoz yoluyla iki yeni hücreye bölünme fazlarını kapsayan hücrelerin proliferasyonunu kontrol eden biyolojik bir süreçtir. Ökaryotlarda tipik hücre döngüsü, büyüme (G1), DNA sentezi (S), hazırlık (G2) ve mitoz (M) fazlarından oluşmaktadır. Her aşamada belirli kontroller ve mekanizmalar bulunur ve hücre döngüsünün düzenli bir şekilde ilerlemesi sağlanır (Wang, 2021). NP'lerin hücreler üzerindeki etkileri hücre döngüsünü yavaşlatabilir ve kontrol mekanizmalarını değiştirebilir. Çoğunlukla TiO_2 NP'lere maruz kalan hücrelerde ROS birikimi ve oksidatif stres ile ilişkili olarak hücrelerel proliferasyonun azaldığı ve hücre döngüsünün yavaşladığı bildirilmiştir (Armand ve ark., 2016). Sıçan adrenal medulla tümör hücreleri kullanılarak nörotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, anataz formdaki 20 nm TiO_2 NP'lerle (25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$) 24 saat boyunca muamele edildiklerinde G2/M fazında hücre döngüsünün durduğu, apoptozda p53 ve JNK aktivasyonunun indüklendiği gösterilmiştir. Mikron boyuttaki TiO_2 partiküllerinin herhangi bir toksik tepki göstermediği ve anataz formuna kıyasla, rutil formunun nöron hücreleri üzerinde orta derecede toksik etki gösterdiğini de gözlemlemişlerdir. TiO_2 NP'lerinin ROS ve JNK/p53 aracılı apoptoz yoluyla nöronlarda hasar oluşturabileceğini ve p53/p21 yolunun aktivasyonu ile hücre döngüsünün G2/M

aşamasında duraksamasına neden olabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2010). A549 hücrelerinde 5 nm boyutundaki TiO_2 NP'lerin sitotoksitesi üzerine yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lerin apoptoz ve G2/M aşamasındaki hücre oranlarını doza bağımlı olarak artırdığı ve replikasyon sürecinde DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015). A549 hücrelerinde TiO_2 NP'lerin genotoksik potansiyeli incelenmiş, ATM, P53 ve CdC-2'nin artan, ATR, H2AX ve Siklin B1'in ise azalan ekspresyon düzeylerinin, DNA çift sarmal kırıklarının indüklemiş olabileceğine değinilmiştir. Çift sarmal kırıkların meydana gelmesi, hücre döngüsünde G2/M fazında duraksama ile ilişkilendirilmiştir (Kansara ve ark., 2014). Hücreler içerisindeki NP birikiminin hücre döngüsünün aşamasına bağlı olduğu gösterilmiştir. G2/M fazında, S fazına ve G0/G1 fazına göre daha verimli bir alım gerçekleşmektedir (Aberg, 2013). Yapılan bir çalışmada, TiO_2 NP'lere 60 gün maruz kalan hücrelerde Ti içeriğinin, 2 gün maruz kalan hücrelere göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu durum, hücrelerin NP 'leri veziküllerin ekzositozu ile veya bölünen hücrelerin Ti içeriğini paylaştırırken yeni hücrelerdeki birikiminin azalması şeklinde olabileceği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2015). TiO_2 NP'lere daha uzun süre maruz kalan hücrelerde, G1 fazında birikim ve hücre döngüsündeki yavaşlama, NP'lerin hücrelerden dışarı atılmadığı, aksine hücre içi birikiminin azalacağı hipotezini desteklemektedir (Armand ve ark., 2016). İnsan mezenkimal kök hücreleri üç hafta süre ile TiO_2 NP'ler ile muamele edildiğinde hücrelerin membran yapılarındaki değişiklikler ile nanotubuler çıkıntıların oluştuğu ve hücre döngüsünün sub G1 fazındaki hücrelerin oranının arttığı gözlenmiştir (Kocbek, 2010). Çin Hamster Ovary hücreleri, 10-40 $\mu\text{g/mL}$ anataz formdaki TiO_2 NP'lere sürekli olarak 2 ay maruz kaldığında, G2/M fazındaki hücrelerin oranında bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrelerde ROS birikimi ile ilişkilendirilmiştir (Wang, 2011).

2.4.5. TiO_2 Nanopartiküller ve İmmünomodülatör Etkileri

NP'ler, vücuda girdikten sonra makrofajlar, monositler ve nötrofiller gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin fagositer hücreleriyle etkileşime girerek immün sistemi aktive edebilir ve bağışıklık sisteminin işleyişini önemli ölçüde etkileyebilirler. NP'lerin sahip olduğu özellikler, yüzey kimyası ve bulundukları hücrel mikroyçevreye bağlı olarak immün yanıtı artırabilir veya baskılayabilir. Bu faktörler, onların immünomodülatör

özellikler geliştirmesine sebep olur. (Dobrovolskaia ve ark., 2009). Metalik NP'lerin dendritik hücre aktivasyonu ve CD4+ T yardımcı hücre (TH) farklılaşma durumu üzerindeki potansiyel etkilerinde, yüzey reaktivite özelliklerinin önemli bir rol oynadığı vurgulanmaktadır. Yüzey reaktivitesi, NP'lerin immün sistemle etkileşim biçimlerini belirleyerek, TiO₂ NP'ler gibi oksidan özelliklere sahip NP'lerin, dendritik hücrelerin IL-12 üretimini ve TH'lerinin proinflatuar TH1 sitokinlerini sentezlemek üzere farklılaşmasını sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca, antioksidan özelliğe sahip NP'ler TH1 eğiliminden uzaklaşp TH2/Treg eğilimine doğru yönlendirilmiş edinsel yanıtların artmasına olanak tanıyabilir. Ayarlanabilir yüzey kimyalarına sahip NP'ler kullanılarak bağışıklık sisteminin düzenlenmesine yönelik yeni bir temel önerilmektedir. (Schanen ve ark., 2013). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, TiO₂ NP'lerin mitokondriyal disfonksiyona neden olabileceği, makrofajlarda fagositozu indükleyebileceği, proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını aktive edebileceği ve T hücre yanıtını etkileyebileceğini göstermektedir (Vamanu ve ark., 2008). TiO₂ NP'lerin dendritik hücrelere olan etkileri, antijen sunumunu ve T hücre yanıtlarını destekleyebileceğini ortaya koymaktadır. Hem immün sistem hem de kanser hücrelerinin TiO₂ NP'lere maruz kalmasının hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda proinflatuar ve immün baskılayıcı etkilere yol açabileceği gösterilmiştir. Yüksek fotokatalitik aktiviteye ve geniş bir uygulama alanına sahip olan TiO₂ NP'lerinin, sahip olduğu bu özellikler sayesinde immünomodölatör etkileri önemli bir araştırma konusu haline getirmiştir (Schanen ve ark., 2013).

2.5. İmmün Sistem Hücreleri

Nötrofiller, inflamatuar bölgelere göç eden ilk hücreler olarak, doğuştan immün sisteminin temel bileşenlerindendir. Fagositoz, ROS üreterek ve enzimler aracılığıyla patojenlere karşı savaşır. Nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi fagositler yalnızca bakterileri değil aynı zamanda ölü, yaşlı hücreleri ve yabancı parçacıkları da yutar (Fernandes ve ark., 2015).

Monositler vücuda girdiklerinde, makrofajlara dönüşerek daha etkili bir şekilde fagositoz gerçekleştirebilirler. Sitokinler ve diğer inflamatuar molekülleri üreterek enfeksiyonlarla mücadelede ve immün yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynarlar.

Makrofajlar, hücrel homeostazı korumak için hücrel döküntüleri temizleyerek işlev görürler (Olingy ve ark., 2019). Makrofajlar, NP'lerin temizlenmesinde, homeostazı ve bağışıklık fonksiyonunu sürdürmede çok önemli roller oynarlar. Makrofajlar, proinflatuar M1 fenotipi ve anti-inflatuar M2 fenotipi gibi polarizasyon durumlarına bağlı olarak farklı ve dinamik işlevler gerçekleştirir. M1, enfeksiyonlara karşı savunma ve tümör büyümesine direnç ile ilişkilidir, M2 ise immün baskılama, dokunun yeniden şekillenmesi ve tümör ilerlemesi ile ilişkilidir. Son zamanlarda, NP'lerin kanser tedavisi için M2'yi M1'e kaydırarak makrofaj polarizasyonunu başarılı bir şekilde hedeflediği belirtilmektedir. Bu nedenle kanserde makrofajın farklı işlevi göz önüne alındığında, TiO₂ NP'lerinin *in vivo* ve *in vitro* immünomodülatör etkisini ve kanser metastazındaki kritik rollerini belirlemek çok önemlidir. TiO₂ NP'lerin *in vitro* makrofaj polarizasyonunu araştırmak için peritoneal makrofajların kullanıldığı çalışmada, M1 ile ilgili biyobelirteçler ve proinflatuar gen ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığı, buna karşılık M2 ile ilişkili belirteçlerin mRNA seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Sonradan kazanılmış immün sistem ise enfekte hücreleri tanıyıp yok eden ve diğer immün hücrelerin faaliyetlerini düzenleyerek hücrel yanıtı oluşturan T hücreleri ve antikor üreterek patojenleri nötralize eden humoral yanıtı sağlayan B hücreleri ile hedefe yönelik etkili yanıtlar geliştirir (Nicholson, 2016). T lenfositleri, TH'leri, sitotoksik (CD8+) T hücreleri, Treg'leri olmak üzere alt gruplara ayrılır. TH'ler CD3 ve CD4 proteinlerini yüzeyde eksprese ederler. Belirli bir antijenin varlığı, yanıt esnasında salgılanan sitokinler ve mikroçevreye bağlı olarak TH1 veya TH2 gibi alt gruplarına farklılaşabilir. TH1 hücreleri, proinflatuar sitokinler (IFN- γ , IL-2) salgılar ve bu da makrofajların aktivasyonunu artırır. TH2 hücreleri, salgıladığı IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler ile inflamasyonu azaltarak bağışıklık yanıtını baskılayabilir ve tümörlerin büyümesine katkıda bulunabilir. Sitotoksik T hücreleri ise CD3 ve CD8 reseptörlerini eksprese eder. MHC I molekülleri üzerinde sunulan spesifik antijenleri tanıyarak enfekte hücrelerin veya kanser hücrelerinin yok edilmesinde önemli bir rol oynar (Medzhitov ve ark., 2011; Schanen ve ark., 2013).

Treg hücreleri CD4+CD25+ ve FoxP3+ reseptörleri ile tanınırlar ve immün toleransın sağlanmasında, otoimmün hastalıkların önlenmesinde ve inflammatuar yanıtların kontrol

edilmesinde önemli işlevlere sahiptirler. Bu hücreler, T efektör (CD4+ ve CD8+) hücrelerinin çoğalmasını ve işlevini baskılayabilir. Dolaşımdaki Treg hücrelerinin sayısının artması genellikle birçok kanserde kötü bir prognozun göstergesidir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, Treg hücreleri tarafından efektör T hücrelerinin baskılanmasının ROS' un etkilerinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüştür (Lee ve ark., 2011).

2.6. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını yönlendiren, hücreler arasındaki iletişimi sağlayan, doğuştan ile sonradan kazanılmış immün sistemler arasındaki etkileşimleri düzenleyen proteinlerdir. Çeşitli hücre türleri tarafından salgılanan bazı sitokinler, vücudun enfeksiyon veya yaralanma gibi durumlara karşı başlattığı inflamasyon sürecini desteklerken, diğerleri bu süreci baskılayarak anti-inflamatuar yanıtları artırır. Bu denge, immün yanıtın yönünü belirleyen temel bir faktör olarak kabul edilir (Shrihari, 2017). TH hücreleri tarafından üretilen sitokinler genellikle diğer T hücrelerinin işlevlerini inhibe eder ve böylece belirli bir immün yanıt modelini güçlendirebilir. TH1 hücreleri tarafından salgılanan pro-inflamatuar sitokinler, makrofaj aktivasyonunu ve sitotoksik T hücrelerinin etkisini artırarak tümör hücrelerinin öldürülmesini desteklerken, TH2 hücreleri tarafından üretilen sitokinler, tümör mikroçevresini etkileyerek tümörlerin büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırabilir. Tümör mikroçevresinde stroma hücreleri tarafından salgılanan sitokinler malign hücrelerin aktivitelerini değiştirebilir. Bununla birlikte, sitokinler kanser hücreleri tarafından da üretilir ve tümör mikro ortamında uygun büyüme koşullarının elde edilmesini destekler. Kanserde inflamasyonun tümörün başlatılmasında, büyümesinde ve metastazında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle TH1/TH2 dengesi ile sitokin düzeylerinin analizi kanser tedavisinde hedeflenebilir stratejilerin geliştirilmesinde kritik bir öneme sahiptir. Tümör mikroçevresinde pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin, antitümör veya tümör destekleyici immünitinin gelişimini şekillendirebileceği belirtilmektedir. Sitokinler, immün yanıtı düzenleyen ve aracılık eden çok yönlü işlevleri nedeniyle genellikle immün toksisite biyobelirteçleri olarak kabul edilmektedir (Elsabhy ve Wooley, 2013). Pro-inflamatuar ve diğer inflammatuar sitokin seviyelerinin

ölçülmesi ile TH1/TH2 sitokin dengelerinin izlenmesi, NP'lerin immün toksisitesini değerlendirmek ve immünomodülatör etkilerini daha iyi anlamak için kritik bir öneme sahiptir (Wang ve ark., 2011; Schanen ve ark., 2013).

2.6.1. IL-12

IL-12, iki disülfid bağı ile bağlı olan p35 ve p40 adlı iki alt birimden oluşan heterodimerik bir sitokindir. İnsan ve fare IL-12, p40 ve p35 alt birimlerinde sırasıyla %70 ve %60 amino asit dizisi benzerliğine sahiptir ve aynı hücrede her iki alt birimin birlikte ekspresyonu, disülfid bağlantılı biyoaktif IL12p70 sitokinini salgılamak için gereklidir (Jalah ve ark., 2013). IL-12, antijenik uyarı sonucu aktive olan nötrofiller, makrofajlar, dentritik hücreler ve TH hücreleri tarafından üretilirler (Hunter ve ark., 2005). Naif T hücrelerinin, başlıca IFN- γ gibi pro-inflamatuar sitokinler üretebilen TH1 hücrelerine farklılaşmasında kilit rol oynarlar. IL-12'nin, aktif T hücreleri, NK hücreleri ve dendritik hücreler üzerinde eksprese edilen yüksek afiniteli reseptörüne (IL-12R β 1/IL-12R β 2) bağlanması, TYK2, JAK2 ve STAT sinyal iletim yollarını aktive eder. STAT1, STAT3 ve STAT4, *in vitro* olarak farklı derecelerde aktive edilmesine rağmen, IL-12'ye karşı fizyolojik yanıtlar esas olarak STAT4 aracılığıyla sağlanır. IL-12, naif CD4⁺ T hücrelerinin TH1 hücrelerine farklılaşmasını indükler. IL-12 ve IFN- γ , T hücrelerini ve NK hücrelerin efektör fonksiyonlarını doğrudan aktive etmenin yanı sıra, anjiyogenezi inhibe ederek tümör mikroçevresini antitümör yanıtları artıracak şekilde düzenleyebilir. Bununla birlikte IL-12'nin, IFN- γ 'dan bağımsız tümör baskılayıcı özelliklere sahip olabileceği, T ve NK hücrelerinin değil, doğuştan gelen lenfoid doku indükleyici hücrelerin tümör baskılanmasını indüklediği IL-12'nin antitümör immünitesinin birden fazla yolunu aktive etmedeki rolleri gösterilmiştir (Trinchieri ve ark., 2003).

2.6.2. IL-1 β

IL-1 sitokin ailesini oluşturan proteinlerden biri olan IL-1 β , IL-1 α 'nın agonisti olup, işlevsel olarak benzerlik gösterir. Genellikle inflammatuar uyaranlar, enfeksiyon veya doku hasarı gibi durumlarda, başlıca makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler tarafından salgılanır. IL-1 β , genellikle inaktif formda (pro-IL-1 β) üretilir ve bu form, IL-1 β dönüştürücü enzim gibi proteazlar tarafından aktif forma dönüştürülür.

İnflamazomlar olarak adlandırılan çok proteinli kompleksler çeşitli uyarılara yanıt olarak bir araya gelerek kaspaz-1'in aktivasyonunu kontrol eder. İnflamazom kompleksi aracılığıyla aktive olan kaspaz-1 IL-1 β 'yi keser, bu kesilen aktif form daha sonra salgılanır (Garlanda ve ark., 2013; Bent ve ark., 2018). Çeşitli inflamazomlar arasında, IL-1 β ve IL-18 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımının uyarılmasında en çok incelenen NOD-like reseptör ailesine ait bir tür olan NLRP3 inflamazomlarıdır. İnflamatuar yanıtı başlatan ve sürdüren güçlü mediatörler olarak kabul edilen IL-1 β birçok biyolojik sürecin düzenlemesinde etkin bir rol oynar (Awad ve ark., 2017). Kemotaktik faktör salgılamasına yol açar ve inflammatuar hücrelerin yerleşimini düzenler. IL-1 β , IFN- γ üreten sitotoksik T lenfositlerinin sayısında artışa neden olurken, CD4+ T hücrelerinin TH1 yönünde farklılaşmasını da teşvik eder (Ben ve ark., 2013). Ayrıca, TGF- β tarafından indüklenen FoxP3 ifadesine karşıt etki gösterdiğini, yani IL-1 β 'nin Treg farklılaşmasını engellediği belirtilmektedir. IL-1 β , immün hücreleri yanı sıra tümör hücreleri tarafından da salgılanmaktadır. Bu süreç, IL-1'in hem anti-tümör hem de immün yanıtın baskılanma süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Shrihari ve Ramesh, 2016)

2.6.3. TNF- α

TNF- α , çoğunlukla aktif makrofajlar ve monositler tarafından üretilmekle birlikte, aktif T hücreleri, B hücreleri, NK hücreler, mast hücreleri, fibroblastlar ve tümör hücreleri gibi çeşitli hücrelerden de sentezlenebilir. TNF- α 'nın temel görevleri, inflamasyon yanıtını tetikleyen sitokin kaskadını başlatmaktır (Aggarwal, 2003). TNF- α , ilk olarak öncelikle pro-inflamatuar bir molekül olarak kabul edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar, TNF- α 'nın aynı zamanda çelişkili bir anti-inflamatuar ve immünomodülatör etki gösterdiği immünosupresif bir etkisinin de olduğunu ortaya koymaktadır (Wu ve ark., 2002). TNF- α , hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerine (TNFR1 ve TNFR2) bağlanarak, reseptörlerin iç kısmında yer alan sinyal iletim yollarını aktive eder. Bu aktivasyon ile TNFR1 üzerinden hücrede apoptozu başlatabilir ve NF- κ B ve MAPK yollarını aktive ederek pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırabilir (Aggarwal, 2000; Salomon ve ark., 2018). TNF- α makrofajlardaki IL-1, IL-6, IL-8 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırmakla birlikte, serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksit gibi sitotoksik faktörlerin oluşumunu ve salınımını uyararak tümör hücrelerine etki etmektedir. Bunun

yanı sıra, TNF- α , dendritik hücreleri uyarak makrofaj haline gelmelerini sağlar ve T hücrelerine antijen sunmalarını teşvik ederek hücresele immün yanıtın oluşumuna katkıda bulunur (Anderson ve ark., 2004). NK hücreleri, makrofaj yardımı olmadan sitotoksik maddelerle tümör hücrelerini doğrudan yok eder. TNF- α , NK hücrelerinin anti-tümör sitolitik aktivitesini ve sitotoksik proteinlerin üretimini uyarak, dolaylı yoldan anti-tümör etkisi gösterir (Mocellin ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar, TNF- α 'nın potansiyel anti-tümör etkilerini desteklemekle birlikte, aynı zamanda tümör destekleyici etkilerinin de ortaya çıkmasıyla kanser ve tümör immün yanıtında karmaşık bir rol oynadığını göstermektedir. İn vitro çalışmalarda düşük doz TNF- α 'nın, bazı kanser hücre kültürlerinde tümör hücrelerinin proliferasyonuna, yayılmasına ve metastazına neden olarak tümör gelişimini tetiklediği gösterilmiştir (Işık ve ark., 2008). TNF- α 'nın tümör destekleyici mekanizmaları hücre dönüşümünü teşvik etme, inflamatuvar yanıtları artırma, neovaskülarizasyonu destekleme ve MDSC'lerin aktivitesini artırma gibi süreçleri içerir (Ba ve ark., 2016). Ayrıca, TNF- α 'nın Treg hücreler üzerindeki etkileri, anti-tümör yanıtın baskılama potansiyeli ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Chopra ve ark., 2013).

2.6.4. IL-10

IL-10; monositler, makrofajlar, T hücre alt grupları, dendritik hücreler, B hücreleri, NK hücreleri gibi birçok immün hücre tarafından üretilmektedir (Saraiva ve Garra, 2010). IL-10, anti-inflamatuvar özelliklere sahip bir sitokin olarak, enfeksiyonlar sırasında immün yanıtı patojenlere sınırlar, konağa zarar verilmesini önlemek için immün yanıtı zayıflatır. IL-10 endojen antijenlere, zararsız dışsal antijenlere, yani alerjenlere karşı immün yanıtı düzenleyerek otoimmün hastalıkların önlenmesine katkı sağlar. IL-10, MHC-II düzeylerini düşürerek dendritik hücrelerin antijen stimülasyonuna yanıtını zayıflatır ve böylece çeşitli uyarıcı sitokinlerin üretimini inhibe eder. Ayrıca, IL-10, çeşitli malignitelerde tümör hücreleri tarafından da üretilmektedir. Başlıca Treg ve MDSC tarafından üretilen IL-10, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 ve TNF gibi sitokinlerin salınımını inhibe eder ve tümör mikro ortamında immünosupresif bir etki yaratarak, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve büyümesini destekleyebilir (Moore ve ark., 2001). Bunun yanı sıra, intratumoral T hücreleri ve makrofajlar tarafından IL-10 ile indüklenen IFN- γ ekspresyonu, daha fazla CD8⁺ T hücresinin

lenfoid dokulardan tümör alanına çekilmesi ve toplanması için pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturur (Emmerich ve ark., 2012). IL-10'un, CD4+ antijenik uyarımını azaltarak ve antijenle uyarılmış CD8+ T hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik ederek, inflamasyon kaynaklı tümörlerin oluşumunu azaltmada bir rol oynayabileceği görülmüştür (Oft, 2019; Dennis ve ark., 2015). IL-10'un immünosupresif bir tümör mikro ortamı oluşturduğuna dair varsayımların aksine, tümör yerleşimli CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu teşvik ederek tümör reddine yardımcı olduğu da gözlemlenmiştir (Naing ve ark., 2016). IL-10'un bu çok yönlü etkileri tümör tiplerine göre farklı sonuçlar göstermiştir. Tümör destekleyici inflamasyondan anti-tümör yanıtı geçişin mekanizmalarının tanımlanması, IL-10'un kanser immünoterapisindeki potansiyel etkilerinin daha iyi kavranmasını mümkün kılacaktır. (Salkeni ve Naing, 2023).

2.7. Kanser Çalışmalarında TiO₂ Nanopartiküllerin Boyut, Konsantrasyon ve Etkileri

Yapılan literatür taramasında, Fujiwara ve ark. (2015), CT26 ve LL2 fare kanser hücrelerine, UV ışınlama olmaksızın 6 nm anataz formda TiO₂ NP uyguladıklarında, oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu gözlemişlerdir. CT26 hücrelerinin 10-70 nm rutil formda TiO₂ NP'lerle tedavisinde, daha küçük NP'lerin daha büyük olanlara göre daha fazla oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin ürettiğini göstermişlerdir. TiO₂ NP'lerin difüzyonunu önlemek ve toksisiteyi en aza indirmek için, 10 nm TiO₂ NP'ler, CT26 farede subkutan tümör içine yerleştirilen bir kolajen jelde süspanse edilmiştir. Bu yöntem yoluyla tek bir TiO₂ NP tedavisinin, tümör büyümesini boyuta ve doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini ve tümörlerin lokal tedavisi için yararlı olabileceğini vurgulamışlardır. Nasr ve ark. (2018), polietilen glikol ve sıgır serum albümini ile kaplanmış amorf, brookit, anataz ve rutil gibi farklı formlardaki TiO₂ NP'lerle mide kanseri hücrelerini muamele etmişlerdir. Üç farklı zaman aralığında (24, 48 ve 72 saat) farklı NP konsantrasyonları (0, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL) kullanılmıştır. TiO₂ NP'lerinin çeşitli formlarının varlığında kanser hücrelerinin canlılığı ve çoğalmasının azaldığını, hücre proliferasyonundaki ve canlılığındaki bu azalmanın, NP'lere maruz kalma konsantrasyonu ve süresi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20 ve

40 µg/mL) TiO₂ NP'lerinin sitotoksiteleri, kültüre alınmış insan bronşiyal epitel hücre hattında değerlendirilmiştir. Kültüre alınmış hücrelerin NP'lere maruz kalmasının; hücre ölümüne, ROS artışına, glutatyon azalmasına ve hem oksijenaz-1, tioredoksin redüktaz, glutatyon-S-transferaz gibi oksidatif stresle ilişkili genlerin indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca 5, 10, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile muamele edildiğinde, kaspaz-3 aktivitesinin en düşük konsantrasyon olan 5 µg/mL'den en yüksek konsantrasyon olan 40 µg/mL'ye kadar arttığı gösterilmiştir. Hücre canlılığının, 40 µg/mL ile tedavi edilen grupta %40'a düştüğünü ve sitotoksitenin, en düşük 5 µg/mL konsantrasyonunda olduğu gösterilmiştir (Park ve ark., 2008). Srivastava ve ark. (2013), insan akciğer kanseri hücre hattı, A549 hücrelerini 6 ile 24 saat boyunca TiO₂ NP'lere (1 µg/ml, 10 µg/mL ve 50 µg/mL) maruz bırakmıştır. 10 ve 50 µg/mL TiO₂ NP'lere maruz kalan hücrelerde oksidatif stres, genotoksisite ve apoptozun indüklediğini göstermişlerdir. Zhao ve ark. (2018), kanser metastazı üzerinde TiO₂ NP'lerin indüklediği immünomodüle edici etkiyi, hem *in vitro* hem de karaciğer ve akciğer kanseri metastaz modeli üzerinde çalışmışlardır. Peritoneal makrofaj aktivasyon analizi için, kültür ortamından çıkarılan hücreler 24 saat boyunca 10⁻² mg /mL TiO₂ NP'ler ile inkübe edilmiştir. TiO₂ NP maruziyetinden sonra, IL-1β, IL-6, TNF-α gibi M1 ile ilgili pro-inflamatuar genlerin ekspresyonunun artmış olduğunu göstermişlerdir. Birincil partikül boyutları 21 nm olan TiO₂ NP'ler 21 gün boyunca her üç günde bir intraperitoneal enjeksiyonla farelere uygulanmıştır. 20 mg/kg ile tedavi edilen grupta karaciğer, dalak ve serumda pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminin arttığını, TiO₂ NP'lerin indüklediği doku ve sistemik enflamasyonu göstermişlerdir. TiO₂ NP'ler ile *in vivo* ortamda indüklenebilen inflammatuar yanıtın aktivasyonu ile kanser metastazını inhibe etme yeteneklerini ilişkilendirmişlerdir. TiO₂ NP'lerin sinir sistemi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ile yapılan çalışmada, hücre canlılığının etkilenmediği, ancak 10-100 µg/mL TiO₂ NP konsantrasyonları arasında belirgin morfolojik değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. TiO₂ NP'lerin mikrotübüllerde düzensizlik, bozulma gibi etkilerinin gözlemlendiği, bu etkileşimlerin mikrotübüllerin kararsızlığını artırarak nörotoksositeye katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Mao ve ark., 2015). TiO₂ NP'lerin *in vivo* tümör büyümesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, B16F10 melanoma

hücrelerinin farelere subkutan implante edilmesinden önce fareler 28 gün boyunca günlük olarak TiO₂ NP'ler ile aşılanmıştır. Elde edilen veriler, TiO₂ NP'lerine 4 hafta boyunca maruz kalan farelerde tümör büyümesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arttığını göstermiştir. TiO₂ NP'lerinin B ve T lenfositlerinin gelişimini ve proliferasyonunu zayıflatabileceği, makrofajların aktivitesini azaltabileceği ve bu nedenle immünomodülasyon yoluyla tümör büyümesini artırma potansiyeline sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Moon ve ark., 2011). Kolorektal kanser hücreleri (HCT116) 50, 100, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'lerine 48 saat süreyle maruz bırakılmış ve ardından sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 100 ve 400 µg/mL TiO₂ NP'ler ile tedavi edilen HCT116 hücrelerinde hayatta kalma ve proliferasyonun önemli ölçüde arttığı ve bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ifade edilmiştir. 50 µg/mL TiO₂ NP'lerine maruz kalındığında tümör baskılayıcı protein P53'ün mRNA ifadesinin azaldığı, 100 µg/mL'de apoptozla ilişkili olan Bax mRNA seviyesinin de azaldığı bulunurken, 200 ve 400 µg/mL TiO₂ NP konsantrasyonlarında hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olan bir protein olan Bcl-2 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Kukia ve ark., 2018). Mevcut veriler, TiO₂ NP'lerinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini açıklıyor olsa da, bu NP'lerin vücutta nasıl davrandığı ve toksisite profilleri hakkında kapsamlı ve ayrıntılı bilgi sunmamaktadır. Dolayısıyla, bu alanda uzun vadeli etkiler ve potansiyel toksisite konusunda detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TDK-2022-11610 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklendi ve deney hayvanları üzerinde yapılacak uygulamalar için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul belgesi alındı. Erciyes Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu onayı no: 21/162, karar tarihi: 07.07.2021

Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel prosedürler ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları Erciyes Üniversitesi GENKÖK Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi’de yapıldı.

3.1. Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. +4° Buzdolabı (Siemens)
2. -20° Buzdolabı (Siemens)
3. -80° Dondurucu (Panasonic)
4. Akım Sitometri Cihazı (BD FACS Aria III)
5. Inverted Mikroskop (Leica DMI1)
6. Ultrasonik Su Banyosu (Nüve ST30)
7. Vorteks (Heidolph)
8. Etüv (SANYO)
9. Santrifüj (Beckman Coulter Allegra 25R Centrifuge)
10. Laminer Kabin (Telstar, CleanAir)

11. Otomatik pipet (1000, 200, 10ul) (DLAB)

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. 24 kuyucuklu Hücre Kültür Kapları (NEST)
2. Cryo Tüp (Corning)
3. Thoma Lamı (Marienfeld)
4. Falcon tüp (15 ve 50 mL) (Golden Gate)
5. 0,22 µm Steril Enjektör Filtre (İsolab)
6. Ependorf tüp (1,5 mL) (Labselect)
7. 10-200-1000 µL tip (Labselect)
8. 12x75 mm Flow tüpü (FRM)

3.1.3. Kitler, Kimyasal Maddeler ve Antikorlar

1. TiO₂ NP'leri (ürün numarası: NG04SO3501) (Nanografi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Teknokent, Ankara, Türkiye),
2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-(High Glucose (4.5 g/L), with L-Glutamine) (SEROX/SLD-526-500),
3. Fetal Bovine Serum (FBS) (CAPRICORN/FBS-11B),
4. Penicillin-Streptomycin (ThermoFisher),
5. Hank's Balance salt solution (HBSS) (Sigma),
6. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) (MEDCHEMEXPRESS/HY-101894),
7. Katalaz C-40 (Sigma),
8. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma),
9. Phosphate Buffered Saline (PBS),
10. PE anti-mouse IL-12/IL-23 p40 (Klon: C15.6, Biolegend/505204),
11. APC anti-mouse TNF-a (Klon: MP6-XT22 9, SONY/3131540),
12. APC-Cy7 CD11b (Klon: M1/70, SONY/1106130),

13. PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse IL-10 (Klon: JES5-16E3, Biolegend/505028),
14. FITC IL-1 β (Klon: NJTEN3, Thermo/11-7114-82),
15. FITC anti-mouse CD3 Antibody (Klon:17A2, ELABSCIENCE/E-ABF1013UC),
16. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with Propidium Iodide (PI) (ELABSCIENCE/E-CKA211-100A),
17. Cell Staining Buffer (Biolegend/420201),
18. Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set (Biolegend/426803),
19. %96'lık etil alkol,
20. RNase A (GDSBIO/N9046),
21. PI (SE3367101-SERVA),
22. Triton® X-100 (SOLARBIO/T8200),
23. Ionomycin (Sigma/10634),
24. Golgistop (BD/554724).

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanı Cinsi ve Sayısı

Çalışmada EAT hücresinin çoğaltılması için 5 adet, ağırlıkları 25-30 g arasında değişen, 8-10 haftalık Balb/C türü erkek fare stok hayvan olarak kullanıldı. Araştırma süresince fareler, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngülerin olduğu ve 21°C sabit sıcaklıkta iklim kontrolü olan odalarda muhafaza edildi. Yem olarak standart fare pelet yemi, içme suyu olarak da çeşme suyu kullanıldı.

3.3. Stok Hayvan Kullanarak Peritoneal EAT Oluşturulması

In vitro deneyler için stok farelerin oluşturulmasında, -80°C'de muhafaza edilen EAT hücreleri kullanıldı. %10'luk DMSO ile dondurulmuş olan hücreler oda sıcaklığına çıkarıldı ve çözünmesi beklendi. Hücrelerin fareye verilmeden önce canlılığı tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak kontrol edildi. Hayvanın periton boşluğuna, bacak ve karın bölgesinin birleştirilmiş yerinden steril insülin enjektörü kullanılarak 0.1 cc yaklaşık 2×10^5 EAT hücresi uygulandı. Stok farenin genel durumu, ağırlığı, karın çevresinin ölçüsü günlük olarak takip edildi ve görüntüleri alındı. Yedinci gün itibari ile

birlikte farenin karın çevresinde şişlik olduğu gözlemlendi (**Şekil 3.1**). Çalışmamızda, 12. gün farenin intraperitoneal boşluğundan assit sıvısı alındı. Stok hayvandan alınan assit sıvısındaki hücrelerin canlılık oranının ve kültür için uygun hücre sayısının belirlenmesi için tripan mavisi kullanılarak hücreler mikroskop altında incelendi.



Şekil 3.1 EAT hücresi uygulanan stok farenin görünümü

3.3.1. Tripın Mavisini ile Canlı Hücre Sayımı

12. günde stok hayvanın intraperitoneal boşluğundan enjektör yardımıyla falkon tüpe alınan assit sıvısı 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücre pelletinin üzerine PBS eklenerek homojenize edildi. Yeniden 300 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant alındı ve sonrasında PBS eklenerek yıkandı. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, besiyeri ortamına süspanse edilerek sayım için hazır hale getirildi. Hücre süspanسیونundan 100 µL, ependorf tüpüne alındı ve üzerine 400 µL PBS eklendi. Elde edilen karışımdan 50 µL, yeni bir ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 50 µL %10'luk tripan mavisi eklenerek pipetle iyice karışması sağlandı. Son karışımdan alınan örnek, thoma lamı üzerinde yer alan ve lamel ile kapatılmış olan sayımın yapılacağı kare çizgilerinin olduğu alanı kaplayacak şekilde pipet yardımıyla uygulandı ve ışık mikroskopunda 40X objektifte analiz edildi. Canlı hücrelerin membran bütünlüğü korunmakta olduğundan dolayı boya dışlanırken; ölü hücreler, içersine boyayı alarak sitoplazmaları mavi renge boyanmış olarak görülür ve sayım esnasında canlı hücrelerden ayırt edilirler. Thoma lamı sayım

protokolüne göre 1 mL’de bulunan toplam canlı EAT hücre sayısı belirlendi. Lamın sayma alanlarından 5’er büyük kare seçilerek içerisinde yer alan canlı hücreler sayıldı ve daha sonra ortalaması alındı. Lam üzerinde bir sayma alanında 16 büyük kare olduğu için 16 ile çarpıldı ve daha sonra elde edilen sonuç, sabit kat sayı olan 10^4 ile ve dilüsyon oranı ile çarpılarak hücre sayısı belirlendi. Hücrelerin canlılık oranı, canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle elde edilen yüzdelik değer olarak hesaplandı.

3.4. EAT Hücreleri için Besiyeri Hazırlanması ve Kültür Koşulları

EAT hücreleri için %84 DMEM, %15 FBS ve %1 penicilin/streptomycin içeren kültür besiyeri steril biyogüvenlik kabini içerisinde hazırlandı. 0,22 μm ’lik steril enjektör filtrelerden geçirilerek steril şişelere alındı. İn vitro deney grupları oluşturulduktan sonra, 24 kuyucuklu kültür kaplarında her kuyucuğa 2 mL besiyeri ortamında 5×10^5 EAT hücresi ekildi ve %5 CO_2 içeren 37°C ’lik inkübatöre alındı.

3.5. TiO_2 Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Herhangi bir kaplama olmaksızın temin edilen TiO_2 NP’lerin ($d < 50$ nm, özgül yüzey alanı $200\text{--}220$ m^2/g) stok çözeltisi mL’de 1 mg olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM ile süspanse edilerek hazırlandı. Stok çözelti 5 dakika vortekslendi ve daha sonra topaklanmayı önlemek için 30 dakika ultrasonik banyoda sonike edildi. TiO_2 NP’lerin stok solüsyonu 4°C ’de muhafaza edildi ve deneyler için 1 hafta süresince kullanıldı. Her deneyden önce, stok solüsyonu 10 dakika ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutuldu, ardından %10 FBS içeren DMEM ortamında çalışma için belirlenen konsantrasyonlara seyreltilti. Hazırlanan çalışma konsantrasyonları kültürdeki hücrelere uygulanmadan önce 5 dakika vortekslendi.

3.6. TiO_2 Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

TiO_2 NP’lerin boyut dağılımı dinamik ışık saçılımı (DLS) deneyleri, Zetasizer Nano ZS90 ile (Panalytical Malvern, Malvern); alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) (Zeiss, Gemini 500) ve kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu (Cryo-TEM) (Hitachi, HT7800) kullanılarak belirlendi. TiO_2 NP’lerinin optik özellikleri UV/VIS Spektrometre (Perkin Elmer, Lambda 25) ile kararlılıkları ise zeta potansiyeli

ölçümleri yapılarak Zetasizer Nano ZS90 (Panalytical Malvern, Malvern) ile incelendi. TiO₂ NP'lerini oluşturan elementlerin bileşimi, Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi (EDX) (Zeiss, Gemini 500) ile karakterize edildi.

UV/VIS absorbans spektrumu, DLS ve zeta potansiyeli ölçümleri Erciyes Üniversitesi ERNAM Nanoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, FESEM ve EDX analizleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM) çalışıldı. Kriyo-TEM görüntüleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) elde edildi.

3.7. EAT Hücrelerine Uygulanacak TiO₂ Nanopartikül Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

EAT hücrelerine uygulanacak TiO₂ NP'lerinin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, farklı kanser hücre hatları üzerinde daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalar incelendi. Literatür taraması sonucunda belirlenen 25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarının *in vitro* sitotoksik etkileri, tripan mavisi boyama yöntemi ile mikroskop altında ve PI boyama yöntemi ile akım sitometri kullanılarak değerlendirildi. Çalışma konsantrasyonları ve kontrol grubu 24, 48 ve 72 saat süreyle EAT hücreleri ile kültür edilerek denendi. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için 24 kuyucuklu kültür kaplarında dört kuyucuğa ekim yapıldı. İki farklı yöntemle elde edilen veriler analiz edildi ve bu verilerin ortalaması karşılaştırıldı.

3.8. EAT Hücre Analizi ile İlgili Yöntemler

İlgili çalışmalar BD FACSAria III (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) model akım sitometre cihazında gerçekleştirilmiş olup, her örnekten en az 20000 hücre sayıldı ve veriler BD FACS Diva Software v:8.0.1 programı ile analiz edildi.

3.8.1. EAT Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Kültüre alınan asit sıvısı hücreleri belirlenen sürelerde, artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile inkübe edildi. Deney süreleri tamamlanan hücreler ependorf tüplerine alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra besiyeri eklenerek hücreler yavaşça yeniden süspanse edildi.

Tripan Mavisi ile Boyama: 50 µL hücre süspansiyonu, tripan mavisi çözeltisi ile 1:1

oranında karıştırılarak homojen bir karışım haline getirildi. Hazırlanan karışım, Thoma lamı üzerine uygulandı ve invert mikroskopla incelendi. Canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak, canlı hücre yüzde değerleri hesaplandı.

Her bir deney grubunda, canlı hücre sayıları zamana ve konsantrasyona bağlı olarak belirlendi ve bu veriler ile TiO₂ nanopartiküllerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi.

Propidyum iyodür ile Boyama: EAT hücreleri inkübasyon süreleri sonunda ependorf tüplere alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler yavaşça yeniden süspanse edildi. 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve tekrar süpernatant atıldı. PI boyası eklenerek nazikçe vortekslendi ve karanlıkta 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Akım sitometre cihazı ile canlı ve ölü hücre gruplarının yüzde değerleri analiz edildi.

3.8.2. EAT Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Artan konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µg/mL) TiO₂ NP'leri ile 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilen asit sıvısı hücrelerinin morfolojisi, 20X ve 40X objektiflerle invert mikroskop ve akım sitometrede incelendi.

3.8.3. Apoptotik ve Nekrotik EAT Hücrelerinin Annexin V/ PI ile Analizi

Çalışmaya başlamadan önce 10X Annexin V Bağlama Tamponu hazırlandı. 1 birim Annexin V Bağlama Tamponu / 9 birim distile su ile karıştırılarak çalışma solüsyonu elde edildi.

TiO₂ NP 'lerin farklı konsantrasyonları ile kültüre edilmiş EAT hücreleri inkübasyon süreleri sonunda ependorf tüplere alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve yavaşça yeniden süspanse edildi. 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve tekrar süpernatant atıldı. Her bir tüpe 100 µL 1×Annexin V Bağlama tamponu eklenerek resüspanse edildi. Her tüpe 2,5 µL Annexin V-FITC ve 2,5 µL PI boyası eklenerek nazikçe vortekslendi ve karanlıkta 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüplere 400 µL 1×Annexin V bağlama tamponu eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Akım sitometri ile canlı,

apoptotik ve nekrotik hücre gruplarının yüzdelik değerleri analiz edildi.

3.8.4. EAT Hücre Döngüsü Analizi

Çalışmaya başlamadan önce kimyasallar hazırlandı.

PI boyasının kullanımı: 1 mg/mL stok solüsyonu PBS içerisinde mL'sinde 50 µg olacak şekilde hazırlandı.

Ribonükleaz (RNase) A stok solüsyonunun hazırlanması: Üretici firmanın önerdiği şekilde 1 mL PBS içerisinde son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 100 µL'lik hacimlerde steril ependorf tüplere alikotlanarak -20 °C' de muhafaza edildi. Sadece DNA'nın boyanmasını sağlamak için PBS içerisinde mL'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

Triton X-100: PI boyasının membrandan içeri geçebilmesi ve DNA' ya bağlanabilmesi için 1 mL PBS içerisinde % 0,1 konsantrasyonda hazırlandı.

Hücreleri sabitlemek için %70'lik etanol kullanıldı.

EAT hücreleri 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Süpernatant atıldı ve hücre pelletlerinin üzerine 1 mL soğuk PBS eklenerek homojenize edildi. 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti hafifçe vorteks ile karıştırılırken 4 mL soğuk %70'lik etanol damla damla eklendi ve gece boyunca -20 °C' de bekletildi. Ertesi gün etanolla süspanse edilmiş hücreler tekrar 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre pelletleri %0,1 triton X-100 içeren 1 mL PBS ile homojenize edildi. Hücrelerin üzerine 50 µl RNase A (100 µg/mL) eklendi ve 37 °C 'de 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücrelere 200 µL PI (50 µg/mL) eklendi. Bu hücreler, oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildikten sonra akım sitometrede analizi yapıldı.

3.8.5. EAT Hücrelerinde ROS Düzeylerinin Analizi

Artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP 'lerle inkübe edilen EAT hücreleri inkübasyon süreleri sonunda ependorf tüplere alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile iki defa yıkandı. EAT hücrelerinin yanı sıra, assit sıvısında bulunan monosit, makrofaj ve nötrofiller gibi immün hücrelerinin de ROS analizini yapabilmek için öncelikle antikor boyaması yapıldı. Hücreler, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika

boyunca CD11b antijenine spesifik antikor ile inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücreler PBS ile yıkanarak fazla antikor uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler DHR 123 ile karanlık ortamda, 37 °C’de, 30 dakika inkübe edildi. Boyama işleminden sonra hücreler PBS ile yıkandı. Süspansiyon hâlindeki hücreler, akım sitometrede analiz edildi.

3.8.6. EAT Hücrelerinde NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesinin Analizi

Çalışmaya başlamadan önce ilgili solüsyon ve kimyasallar hazırlandı.

Katalaz: mg katalaz başına, 14.3 µL HBSS ile karıştırılarak stok solüsyon elde edildi. 1:13 oranında HBSS içinde, mL’de 1000 ünite katalaz içeren solüsyon elde edildi. Hücrede var olan bazal aktivasyonu durdurmak için kullanıldı.

DHR 123: 2 mg DHR 123 ile 2000 µL dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılarak elde edilen 2.4 mM DHR 123 çalışma solüsyonu herhangi ek bir dilüsyon işlemi yapılmadan kullanıldı.

PMA: mL’de 2 mg PMA içeren stok solüsyon DMSO içinde seyreltilerek elde edildi. 1 µL stok solüsyon 400 µL HBSS ile seyreltildi ve son konsantrasyonu 5 ng/mL olan PMA çalışma solüsyonu elde edildi.

HBSS: Üretici firmadan temin edildiği sekliyle +4°C’de saklanarak doğrudan kullanıldı.

Artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP 'lerle inkübe edilen EAT hücreleri inkübasyon süreleri sonunda endorf tüplere alındı ve 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler yeniden süspanse edildi. Her bir grup için için 1 µL CD11b antikor, 2 µL DHR, 5 µL katalaz ve 400 µL HBSS buffer’dan oluşan çalışma solüsyonu örnek sayısı kadar hazırlandı ve solüsyonun tam karışabilmesi için iyice vortekslendi. Elde edilen 408 µL çalışma solüsyonu hücre pelletlerinin bulunduğu tüplere ilave edildi. Hafifçe sallanarak ve alt üst yapılarak tüp içeriğinin karışması sağlandı ve 37°C’de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Çalışma solüsyonu içeren her bir örnek 200’er µL olarak iki ayrı flow tüpüne paylaştırıldı. Tüplerden birine 50 µL HBSS, diğerine ise daha önceden 1: 400 HBSS ile dilüe edilen PMA çalışma solüsyonundan 50 µL eklenerek tüpler vortekslendi. 37°C’de 10 dakika inkübasyon işlemi uygulandı. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz edildi. Uyarılma sonucunda mavi lazer yeşil floresan emisyonu (F530, FL1) aktive olan hücreleri

gösterebilmektedir. Bu yüzden, önce stimulan eklenmeyen tüpteki süspanse halindeki hücreler analiz edildi. Aynı örneğe ait stimulan eklenmiş olan tüpün analizinde bir önceki tüpte yapılan dedektör ayarları kullanıldı ve bütün örnekler için ayrı ayrı tekrar edildi. DHR 123 yöntemi ile akım sitometrik analiz sonrasında uygun hücre popülasyonu kapılanarak (gating) geometrik ortalama değerlerinin hesaplanmasıyla stimülasyon indeksi (SI) değerleri elde edildi.

3.8.7. CD11b+ ve CD3+ EAT Hücre Popülasyonlarının Değerlendirilmesi

EAT hücreleri, TiO₂ NP'lerinin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra endorf tüplerine alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve yeniden süspanse edilerek CD3 FITC ve CD11b APC-Cy7 antikorları eklendi. Karanlık ortamda 4°C'de 30 dakika inkübe edildi. Boyama işleminden sonra hücreler PBS ile iki defa yıkandı. Süspansiyon hâline getirilen hücreler, akım sitometrede analiz edildi.

3.8.8. EAT Hücrelerinde İnflamatuar Sitokin Düzeylerinin Analizi

Farenin intraperitoneal boşluğundan alınan EAT hücrelerinin zaman ve doza bağlı TiO₂ NP'ler ile muamele edildikten sonra inflammatuar sitokinlerin düzeyleri akım sitometrede analiz edildi.

Çalışmaya başlamadan önce ilgili solüsyon ve kimyasallar hazırlandı.

Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer seti: Hücre içi akım sitometrik boyama yapmak için kullanıldı.

Perm Wash solüsyonu: 1 hacim Perm Wash solüsyonu (10x), 9 hacim distile su ile dilüe edilerek kullanıldı.

Fix Perm solüsyonu: Herhangi bir dilüsyon işlemi ve ön hazırlık yapılmadan kullanıldı.

Hücre boyama tampon solüsyonu: Herhangi bir dilüsyon işlemi ve ön hazırlık yapılmadan kullanıldı.

Monoklonal antikorlar: IL-12/IL-23 p40 PE, TNF-α APC, IL-1 beta FITC, IL-10 PerCP/Cyanine5.5, CD3 FITC, CD11b APC-Cy7 antikorları üretici firma tarafından hazırlandığı şekli ile kullanıldı.

Golgi stop: Üretici firma tarafından hazırlandığı şekli ile kullanıldı.

PMA: 1 mg PMA 1000 µL DMSO içinde seyreltilti. Stok solüsyondan 2 µL alındı ve üzerine 40 µL %10 FBS içeren DMEM eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

Ionomycin: 1 mg Ionomycin 100 µL DMSO ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Çalışma solüsyonu mL' de 1 µg olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

Etkin bir şekilde sitokin üretimini sağlamak ve sitokinlerin hücre dışına salgısını inhibe etmek amacıyla, hücreler Golgi stop, Ionomycin ve PMA içeren sitokin kokteyl karışımları ile inkübe edildi. Hücre içi akım sitometrik boyama yöntemi ile IL-1β, IL-12, TNF-α, IL-10, CD3 ve CD11b ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

EAT hücreleri inkübasyon süreleri sonunda ependorf tüplere alındı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve besiyeri ortamında süspanse edilerek 24'lü kültür kaplarına yeniden ekildi. Hücre içi sitokin tayini için, i) Ionomycin ve Golgi Stop içeren ve ii) Ionomycin, Golgi Stop ve PMA içeren karışımlar besiyeri ortamında hazırlandı. Bu iki karışım, hücrelere ayrı ayrı uygulandı ve hücreler 6 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Süre sonunda inkübatörden alınan hücreler 300 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Hücre pelletleri üzerine CD3 FITC, CD11b APC-Cy7 antikorları eklendi ve 4°C'de 30 dakika inkübe edilerek yüzeyel boyama yapıldı. Hücrelere 1 mL Hücre Boyama Tamponu solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Ardından 150 µL Fix/Perm Buffer solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, 1 mL 1X Perm Wash solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Daha sonra yeniden 1 mL 1X Perm Wash solüsyonu eklendi ve 350 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.

Monoklonal antikorların hazırlanması:

1. Çalışma tüpüne toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1X Perm Wash solüsyonu içerisine 1 µL IL-12 p40 PE, 0.25 µL IL-1β FITC, 1 µL IL-10 PerCP/Cyanine5.5, 0.25 µL CD11b APC-Cy7 eklendi (Her bir tüp için hazırlanan miktardır).
2. Çalışma tüpüne toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1X Perm Wash solüsyonu içerisine 1 µL IL-12 p40 PE, 1 µL TNF-α APC, 1 µL IL-10 PerCP/Cyanine5.5, 1 µL CD3

FITC eklendi (Her bir tüp için hazırlanan miktardır).

Hazırlanan kokteyl karışımlar her bir deney grubu için çalışılan iki ayrı flow tüpüne eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. Hücrelere 1 mL Perm Wash solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücrelere 1 mL Hücre Boyama Tamponu solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücre peletleri 300 µL Hücre Boyama Tamponunda yeniden süspanse edildi ve akım sitometrede analiz edildi.

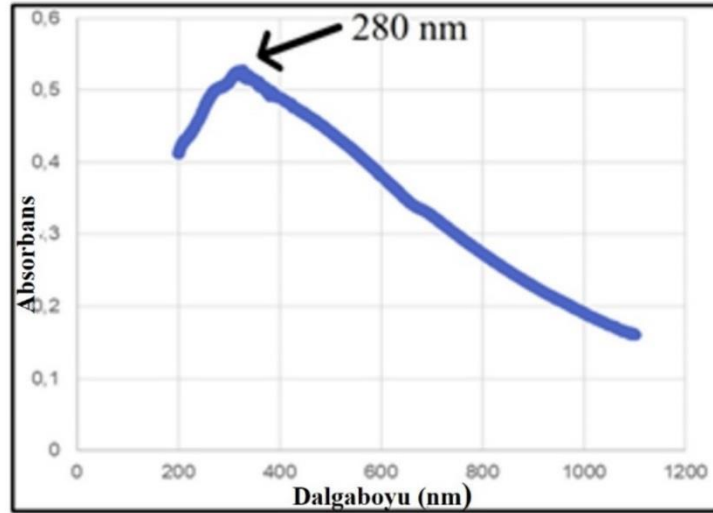
3.9. İstatistiksel Analiz

Deneyler, en az iki bağımsız tekrar ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata ortalaması (SEM) olarak verildi. İstatistiksel analiz, iki yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak gerçekleştirildi. Post-hoc analizi olarak Dunnett's testi kullanıldı. Verilerin analizi GraphPad Prism (San Diego, CA) yazılımı ile değerlendirildi. $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

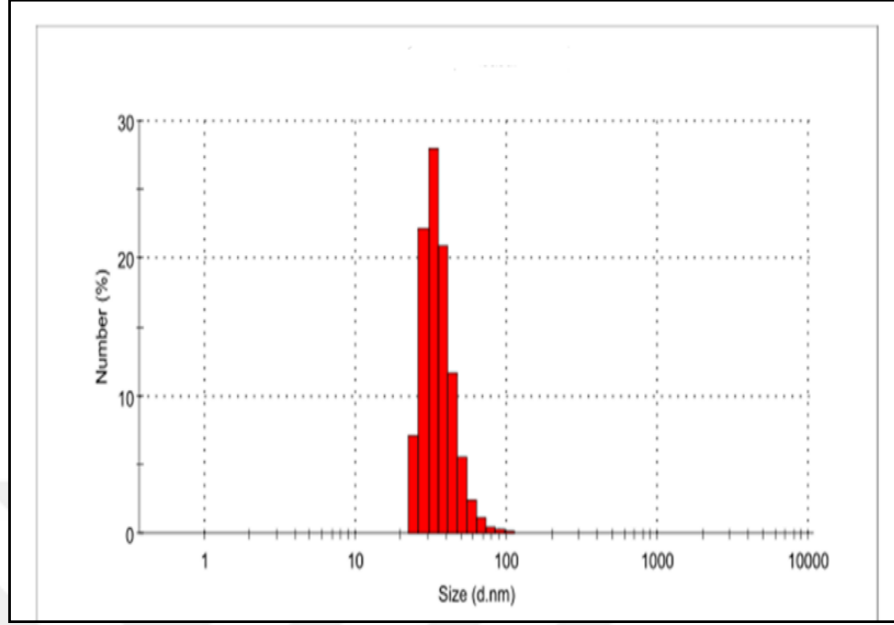
4. BULGULAR

4.1. TiO₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Bulguları

TiO₂ NP'lerinin optik özellikleri Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Spektrometre kullanılarak incelendi. 200 ve 1100 nm arasında değişen spektrumlarda <1 absorbans ile 250-400 nm arasındaki dalga boyunda bir tepe noktası ile karakterize edildi (Şekil 4.1). TiO₂ NP'lerin DLS analizi ile ortalama boyutunun 13 nm olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2). EDX analizi ile NP'lerin Ti ve O elementlerinden oluştuğu ve ağırlıkça oranlarının sırasıyla %60,63 ve %39,37; atomik oranlarının ise %33,97 ve %66,03 olduğu tespit edildi (Şekil 4.3). FESEM ve Cryo-TEM görüntüleri partikül boyut dağılım grafiklerinden farklı olarak TiO₂ NP'lerin aglomerasyona (kümeleşme) eğilimli olduğunu gösterdi (Şekil 4.4, Şekil 4.5). TiO₂ NP'lerin zeta potansiyeli, distile su içerisinde -22.6 ± 5.90 mV (Şekil 4.6), %10'luk FBS içeren DMEM içerisinde -9.72 ± 4.40 mV olarak ölçüldü (Şekil 4.7).

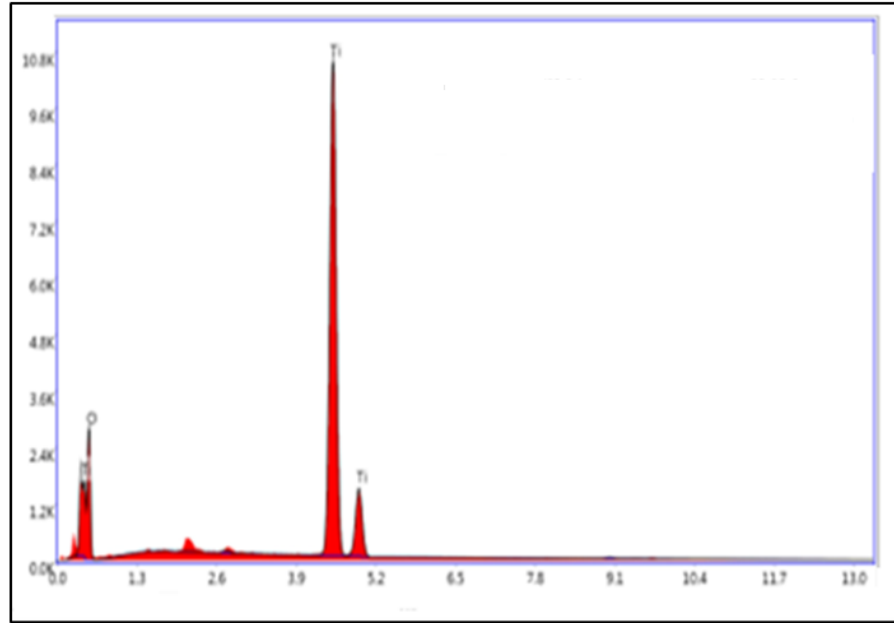


Şekil 4.1. TiO₂ NP'lerin UV-VIS spektrumları

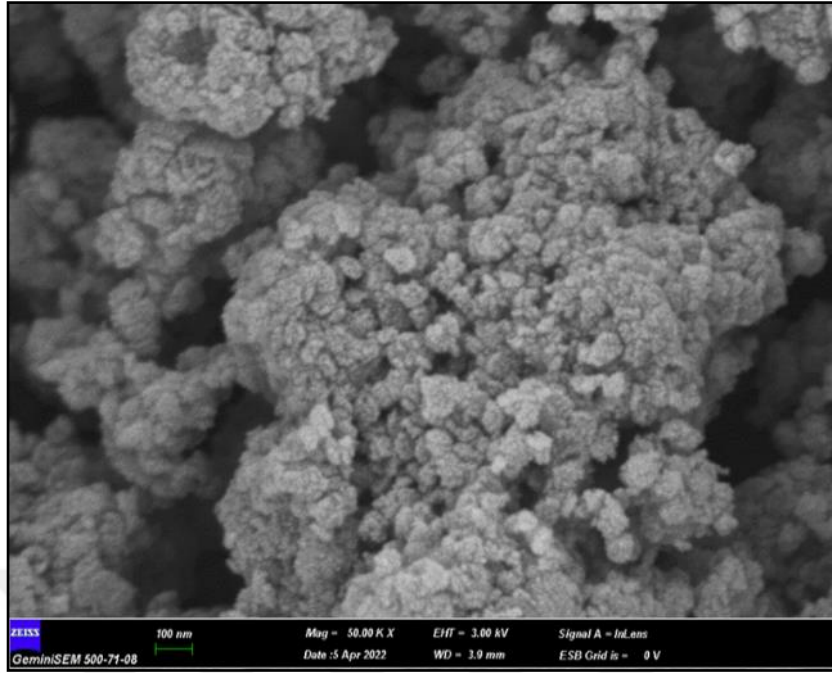


Şekil 4.2.
NP'lerin boyut dağılım grafiği

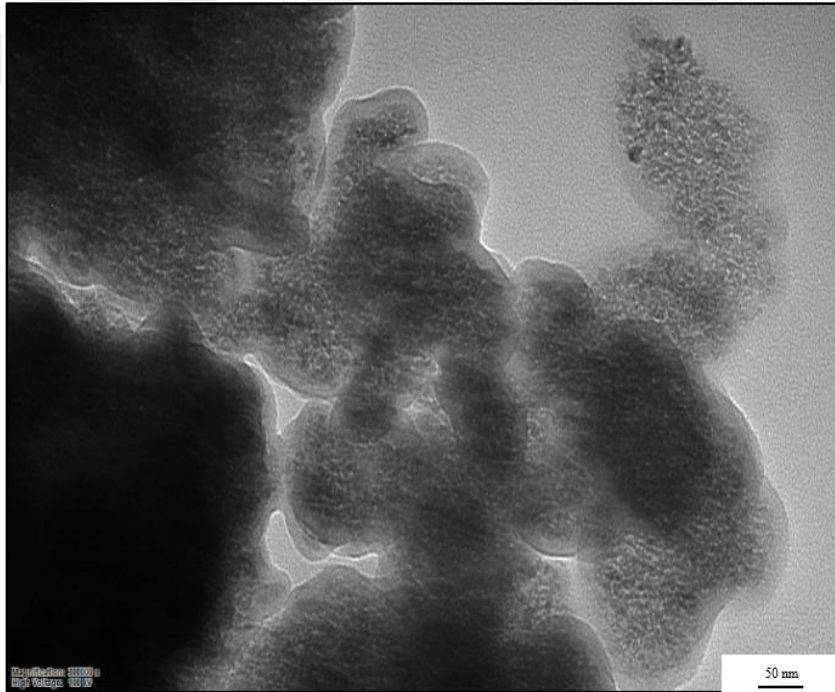
TiO₂



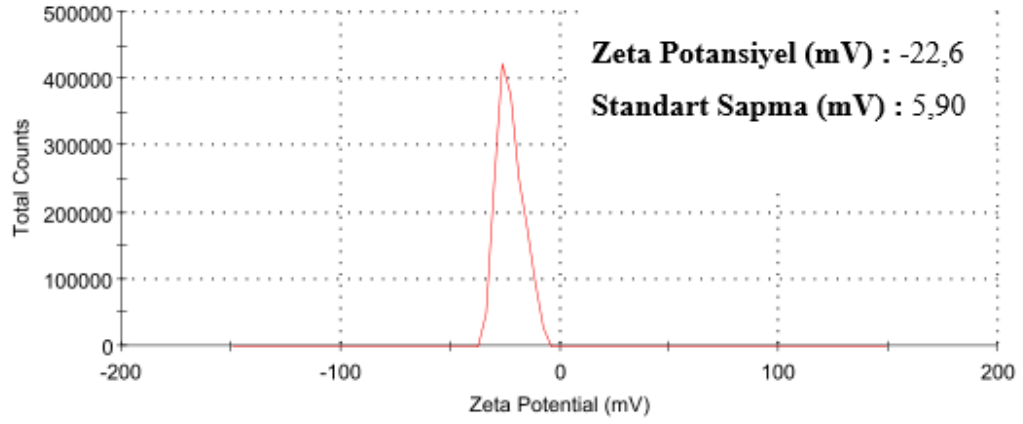
Şekil 4.3. TiO₂ NP'lerin EDX görüntüleri



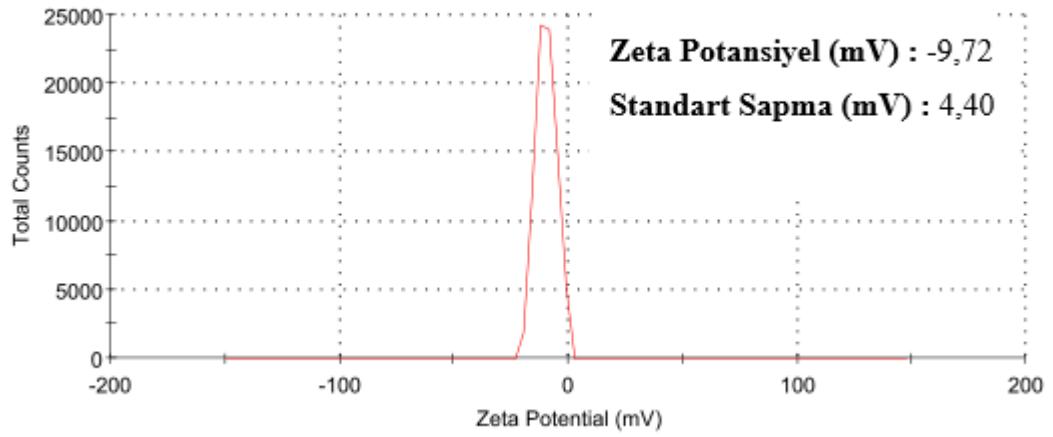
Şekil 4.4. TiO₂ NP'lerin FESEM görüntüleri



Şekil 4.5. TiO₂ NP'lerin Cryo-TEM görüntüleri



Şekil 4.6. TiO₂ NP'lerin distile su içerisinde ölçülen zeta potansiyeli grafiği



Şekil 4.7. TiO₂ NP'lerin %10'luk FBS içeren DMEM içerisinde ölçülen zeta potansiyeli grafiği

4.2. EAT Hücreleri ile Etkileşen TiO₂ Nanopartiküllerinin Konsantrasyon Bulguları

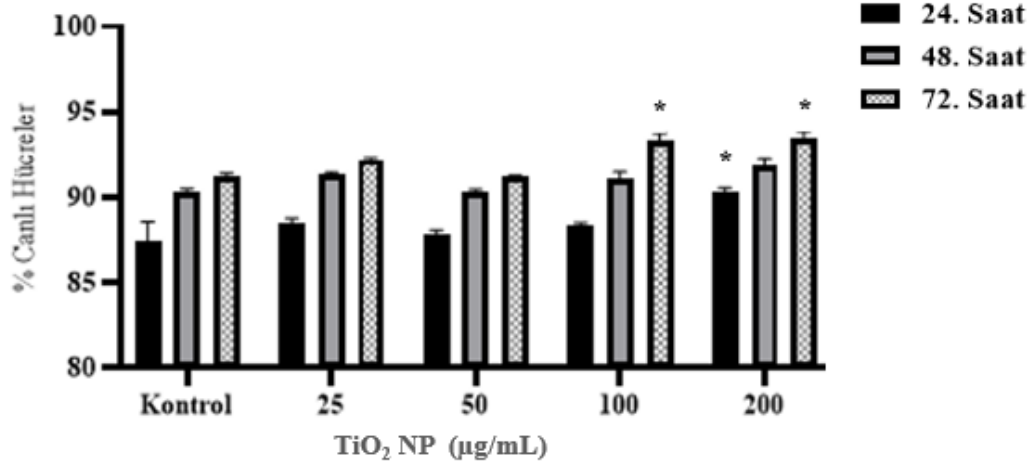
TiO₂ NP'lerinin EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri hem tripan mavisi hem de PI boyama yöntemi ile akım sitometrede değerlendirildi. Her iki yöntem ile elde edilen verilerin ortalama değerleri karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler sonucunda, iki yöntem arasındaki sonuçların benzer olduğu ve TiO₂ NP'lerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin tutarlı olduğu gözlemlendi. Yapılan analizler sonucunda, 24. saatte 150 µg/mL

(%90,1), 200 µg/mL (%90,3), 250 µg/mL (%89,3) ve 300 µg/mL (%89,9) konsantrasyonlarında kontrole göre (%87,4); EAT hücrelerinin canlılığında anlamlı artışlar gözlenirken 72. saatte 250 µg/mL (%87,5) ve 300 µg/mL (%88,2) konsantrasyonlarında kontrole göre (%91,2) hücre canlılığının azalmaya başladığı tespit edildi. Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonların hücreler üzerindeki etkisini, zamanla nasıl farklılıklar gösterdiğini incelemek ve potansiyel etkilerinin daha iyi anlaşılması amacıyla TiO₂ NP'lerinin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat süreleriyle çalışılması belirlendi.

4.3. EAT Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Bulguları

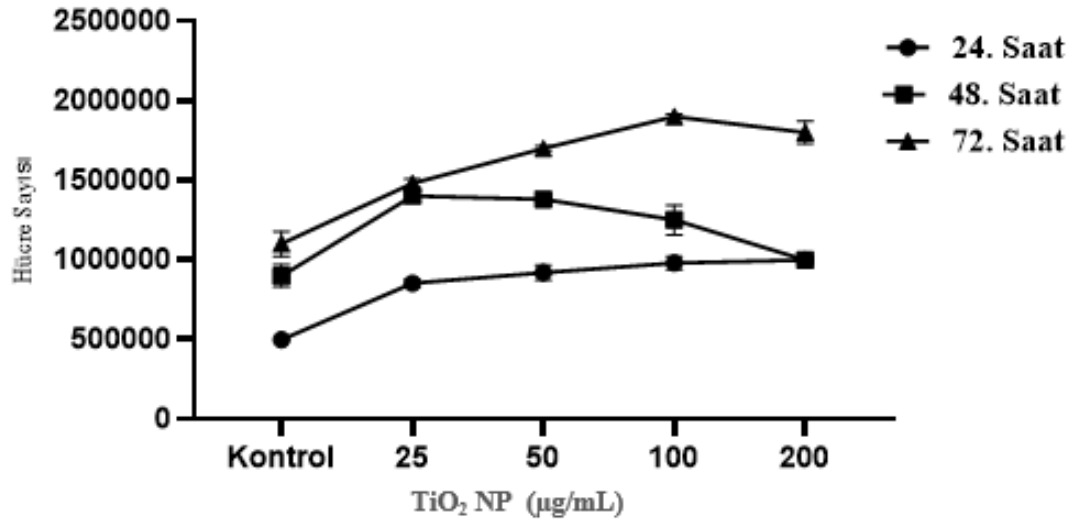
Kültüre alınan asit sıvısı hücreleri, artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'leri ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra canlı ve ölü hücre sayısı analiz edildi.

Yapılan analizler sonucunda EAT hücre canlılığında, 24. saatte 200 µg/mL konsantrasyonunda (%90,3) kontrole göre (%87,4) anlamlı artış gözlemlendi. 72. saatte ise 100 µg/mL (%93,3) ve 200 µg/mL (%93,5) konsantrasyonlarında kontrole göre (%91,2) anlamlı artışlar gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).



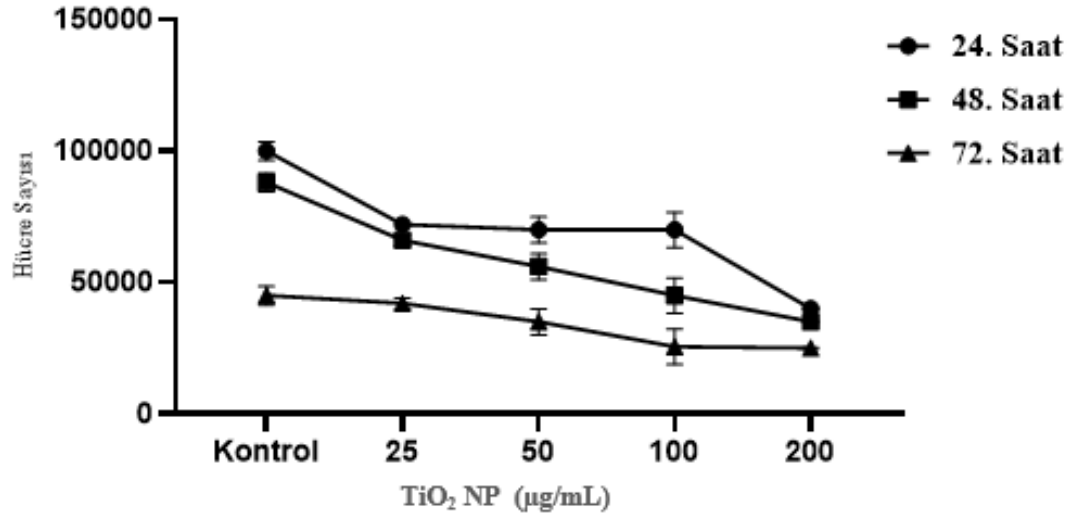
Şekil 4.8 Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT canlı hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Canlı hücre sayıları analiz edildiğinde, 24. saatte TiO₂ NP konsantrasyonlarının artışıyla birlikte hücre sayısının kontrole göre belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. 48. saatte ise, kontrole göre TiO₂ NP konsantrasyonlarındaki artışa rağmen, hücre sayısında bir artış gözlemlense de yüksek konsantrasyonlarda (özellikle artan konsantrasyonlara doğru) hücre sayısında azalma meydana geldi. 72. saatte, canlı hücre sayıları kontrole göre yüksek seviyelerde bulunmasına rağmen, 200 µg/mL konsantrasyonda canlı hücre sayısının azalmaya başladığı tespit edildi (p<0,05) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT canlı hücre sayıları ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

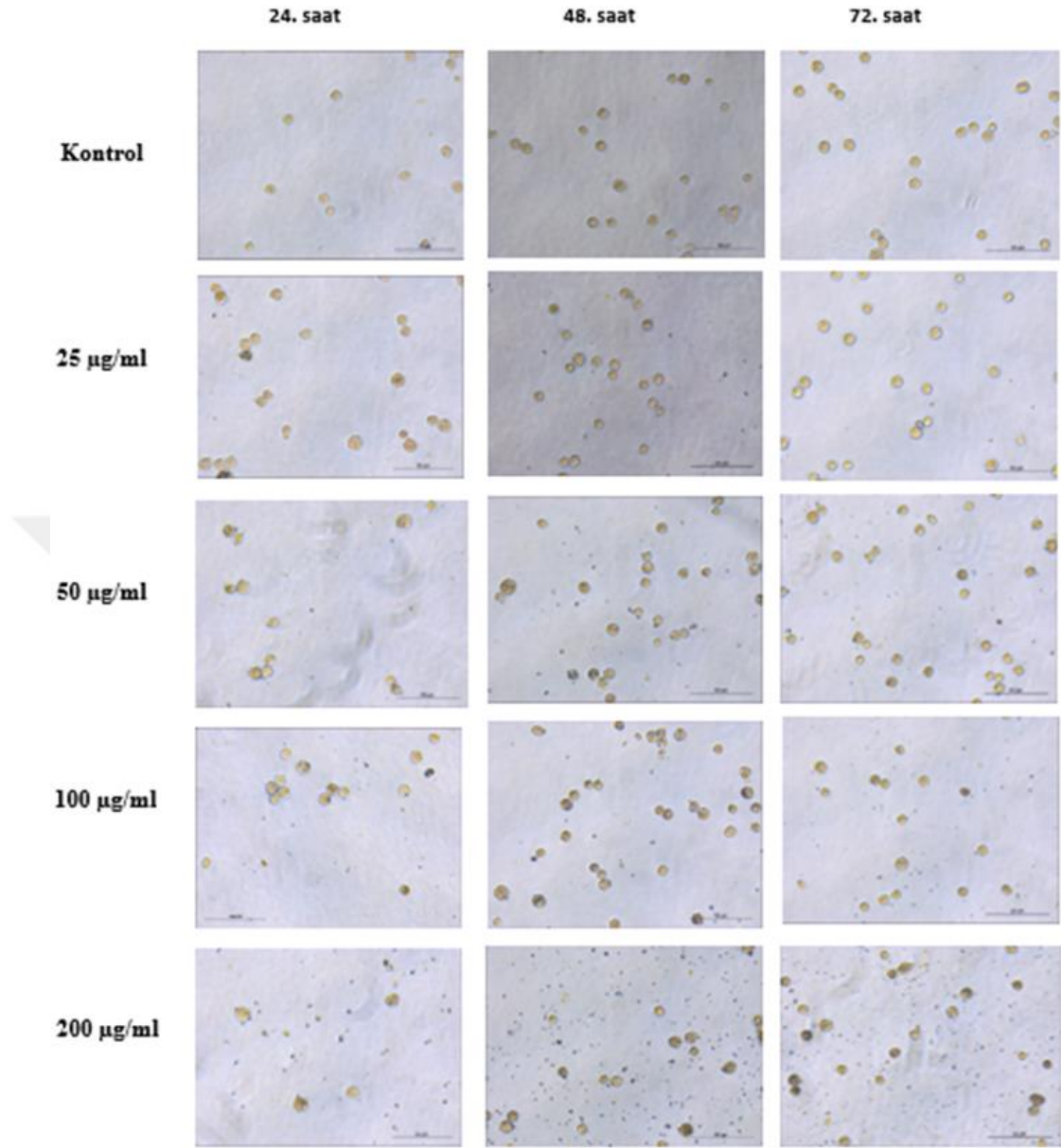
24. saatte TiO₂ NP konsantrasyonlarının artışı ile ölü hücre sayısının kontrole göre belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi (p<0,05). Özellikle 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında ölü hücre sayıları (sırasıyla 7.2×10^5 , 7.0×10^5 , 7.0×10^5) birbirine oldukça yakın değerler gösterirken (p>0,05), 200 µg/mL konsantrasyonunda belirgin bir azalma tespit edildi (p<0,05). 48. saatte TiO₂ NP konsantrasyonu arttıkça ölü hücre sayısının kontrole göre azaldığı, (p<0,05) 72. saatte TiO₂ NP konsantrasyonu arttıkça ölü hücre sayısının kontrole göre azaldığı (p<0,05), ancak, 100 ve 200 µg/mL TiO₂ NP konsantrasyonlarında ölü hücre sayılarının birbirine oldukça yakın değerlerde olduğu tespit edildi (p>0,05) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT ölü hücre sayıları ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$

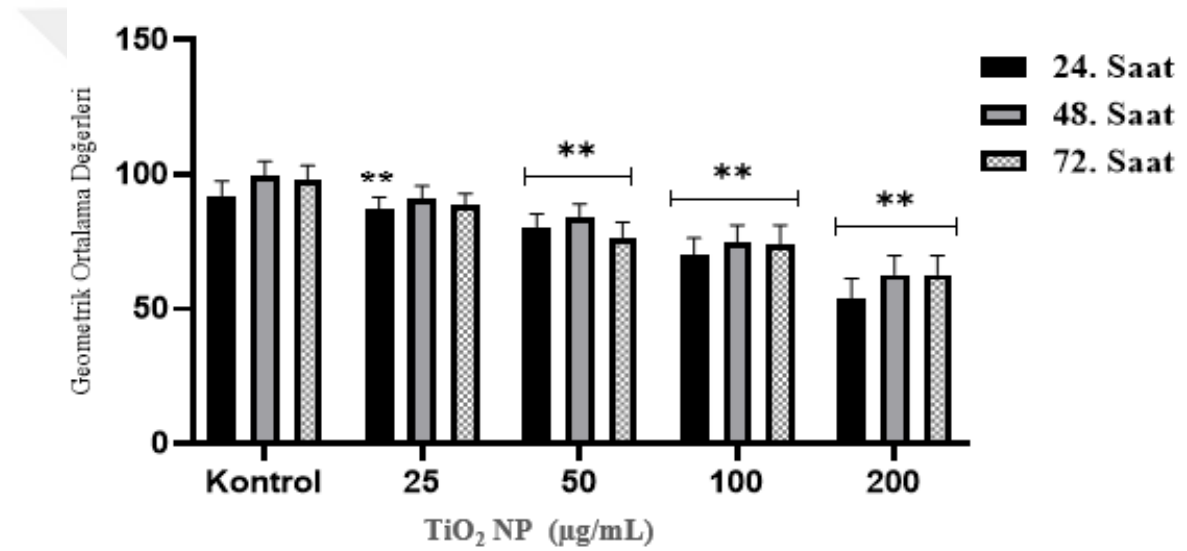
4.4. EAT Hücre Morfolojisi Bulguları

Artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerinin (25, 50, 100, 200 µg/mL) EAT hücre morfolojisi üzerindeki etkisi, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 40x büyütme ile invert mikroskop kullanılarak incelendi. Ölçek çubuğu olarak 50 mikron kullanıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinin morfolojik görüntüleri

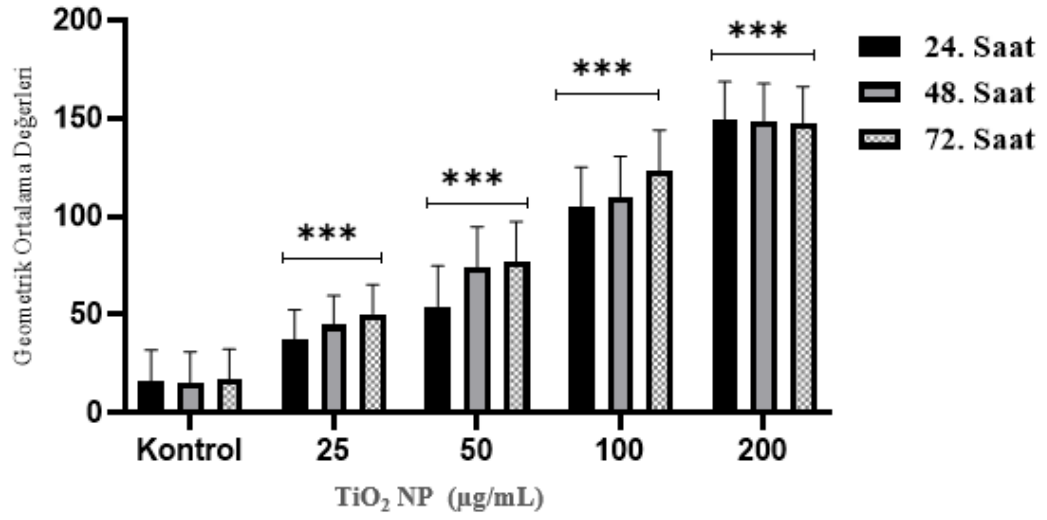
TiO₂ NP'lerin hücre içine alımı ve hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler akım sitometri ile de değerlendirildi. Akım sitometride ışığın hücrelerin şekline göre ön taraftan saçılma (FSC- Forward Scatter) ve yan taraftan saçılma (SSC- Side Scatter) özelliklerinden yararlanılarak sırasıyla EAT hücrelerinin boyutları ve granüler yapılarındaki değişiklikler gözlemlendi. TiO₂ NP'ler ile muamele edilen EAT hücrelerinin yaklaşık büyüklük ve hücre içi granüler yapılarının, kompleksitesinin zamana ve artan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. 24. saatte tüm TiO₂ NP konsantrasyonlarında, kontrol grubuna göre hücre büyüklüğünde anlamlı azalma; 48. ve 72. saatlerde 50, 100, 200 µg/mL TiO₂ NP konsantrasyonlarında hücre boyutunda kontrole göre anlamlı azalma tespit edildi (p<0,05) (Şekil 4.12).



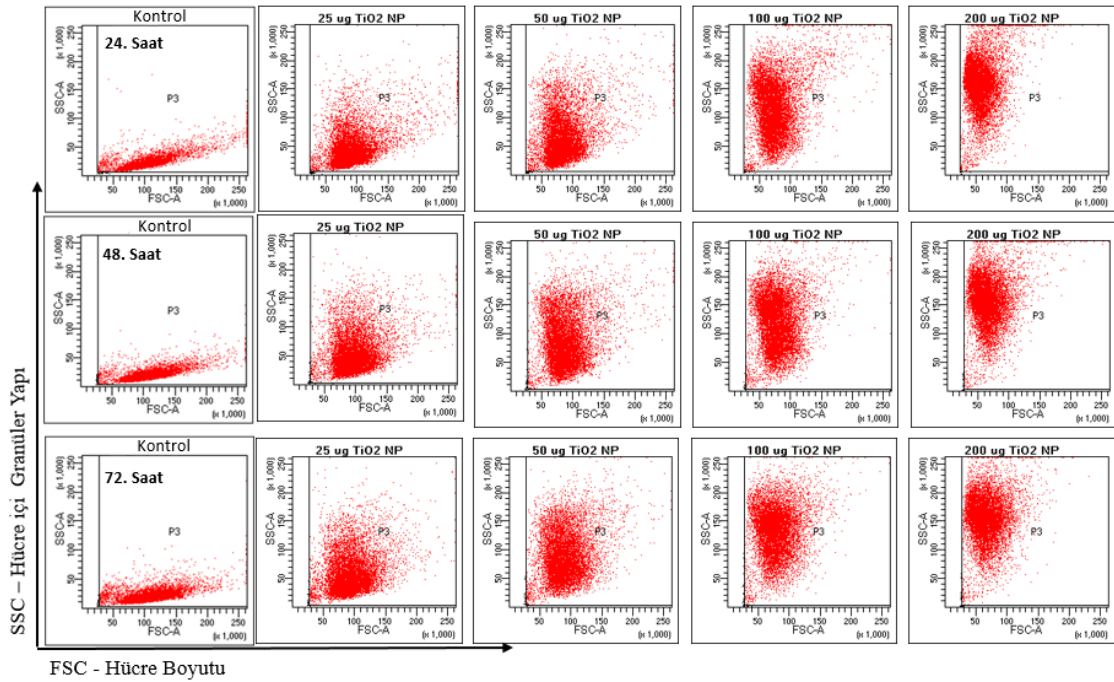
Şekil 4.12 Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre boyutunun geometrik mean değerleri ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

24, 48, 72. saatlerde, tüm TiO₂ NP konsantrasyonlarında hücre içi granüler yapının kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi (p<0,05). TiO₂ NP konsantrasyonları ve bu NP'lere maruz kalma süresi arttıkça, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarında hücre içi granüler yapının (SSC) arttığı gözlemlendi (p<0,05).

EAT hücrelerinin SSC dağılımının geometrik mean değerlerinin dağılımı Şekil 4.13'de ve FSC- SSC dağılımının akım sitometrik görüntüleri Şekil 4.14'de gösterildi.



Şekil 4.13. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre içi kompleksitesinin geometrik mean değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$

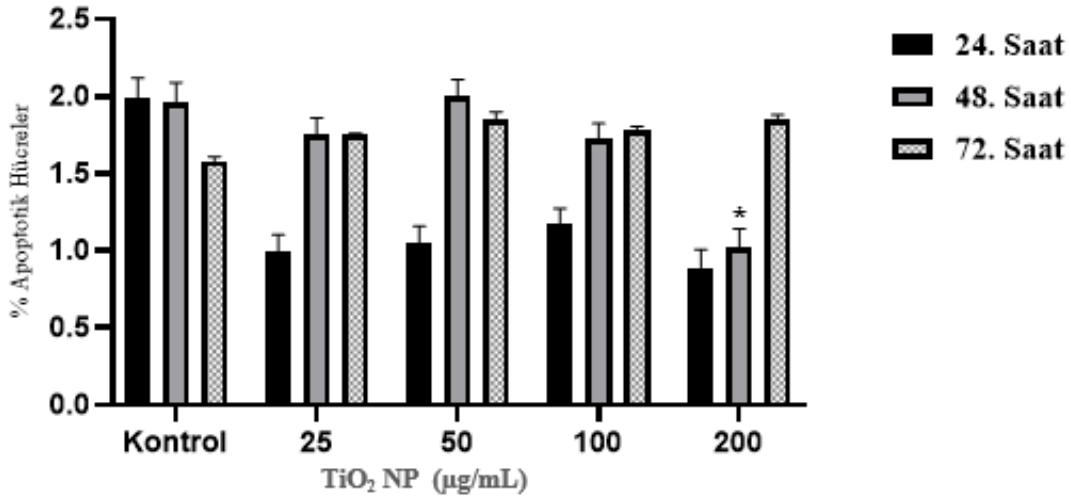


Şekil 4.14. EAT hücrelerinin zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak FSC/SSC dağılımının akım sitometrik görüntüleri

4.5. Apoptotik ve Nekrotik EAT Hücrelerinin Annexin V/PI ile Analiz Bulguları

Annexin V ve PI boyası kombinasyonu kullanılarak, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve nekrotik hücre gruplarının yüzde değerleri belirlendi.

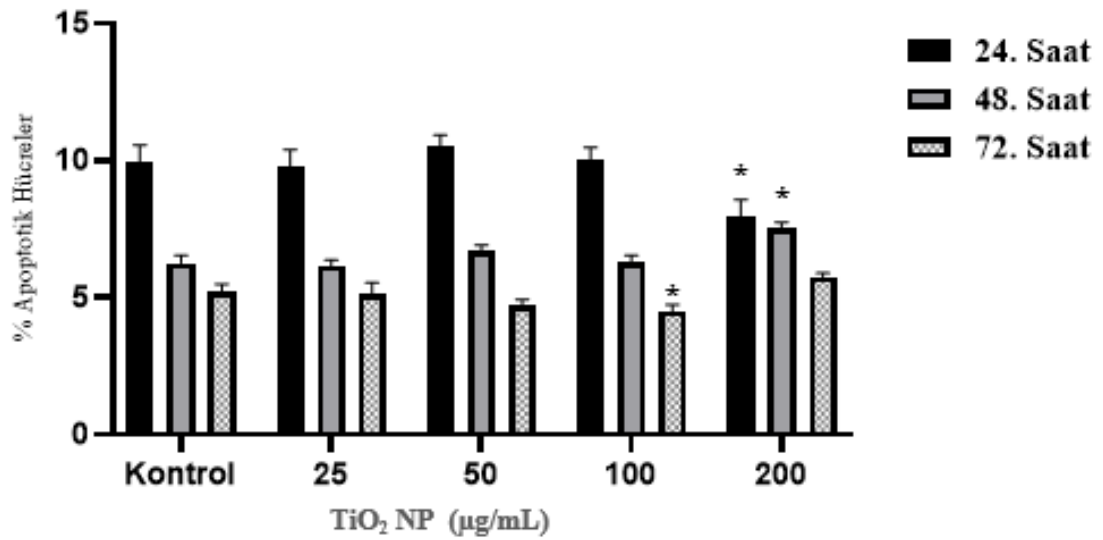
48. saatte 200 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde erken apoptotik hücre yüzde değeri (1.2), kontrol grubuna (2) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (p<0.05). 200 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde erken apoptotik hücrelerin yüzde değeri 24. saatte 0.89, 48. saatte 1.02 ve 72. saatte 1.85 olarak bulundu. Bu değerler, süre uzadıkça erken apoptotik hücre sayısının arttığını gösterdi. Ancak 24. ve 48. saatlerdeki değerler, kontrol grubuna göre düşük bulunurken, yalnızca 72. saatte kontrol grubuna göre artış görüldü. 48. saatteki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Bu zaman diliminde TiO₂ NP etkisinin belirginleştiği ve 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerinin, 48. saatte EAT hücrelerindeki apoptotik etkiyi azalttığı tespit edildi (p<0.05) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak erken apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

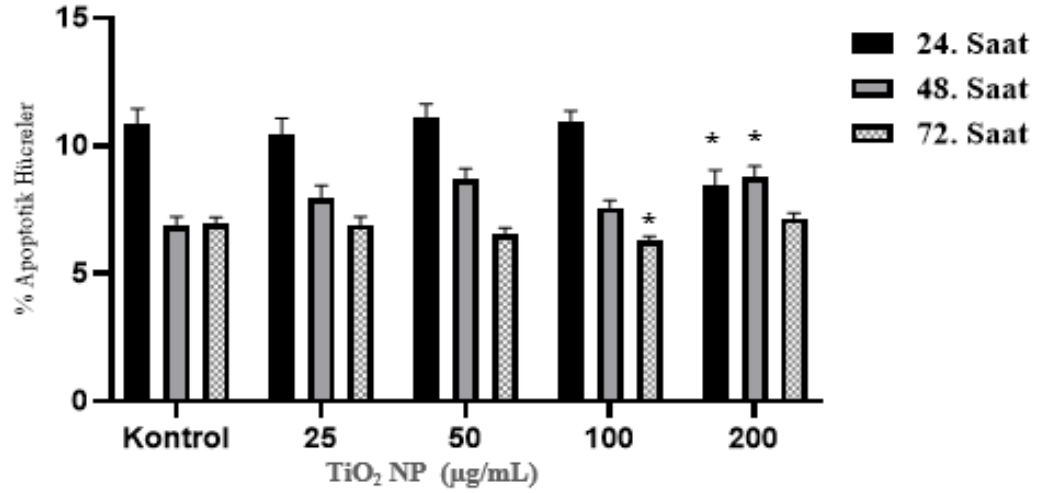
24. saatte 200 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde geç apoptotik hücrelerin yüzde değeri (7.9), kontrol grubuna (9.9) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (p<0.05). 48. saatte 200 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'ler ile etkileşen geç apoptotik hücrelerin yüzde değeri (7.5), kontrol grubuna (6.2) göre yüksek bulundu (p<0.05). 72. saatte 100 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'ler ile etkileşen

geç apoptotik hücrelerin yüzde değeri (4.5), kontrol grubuna (5.2) göre düşük bulundu ($p<0.05$). 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde, 24. saatte apoptotik süreçlerin baskılandığı görülürken 48. saatte bu etkinin tersine döndüğü görüldü. 72. saatte ise geç apoptotik hücrelerin yüzde değeri (5.2), kontrol grubuna göre (5,75) nispeten bir artış gösterdi. Ancak bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). EAT hücrelerinin zamana ve TiO_2 NP konsantrasyonuna bağlı geç apoptotik hücre yüzde değerlerinin dağılımı Şekil 4.16'da gösterildi.



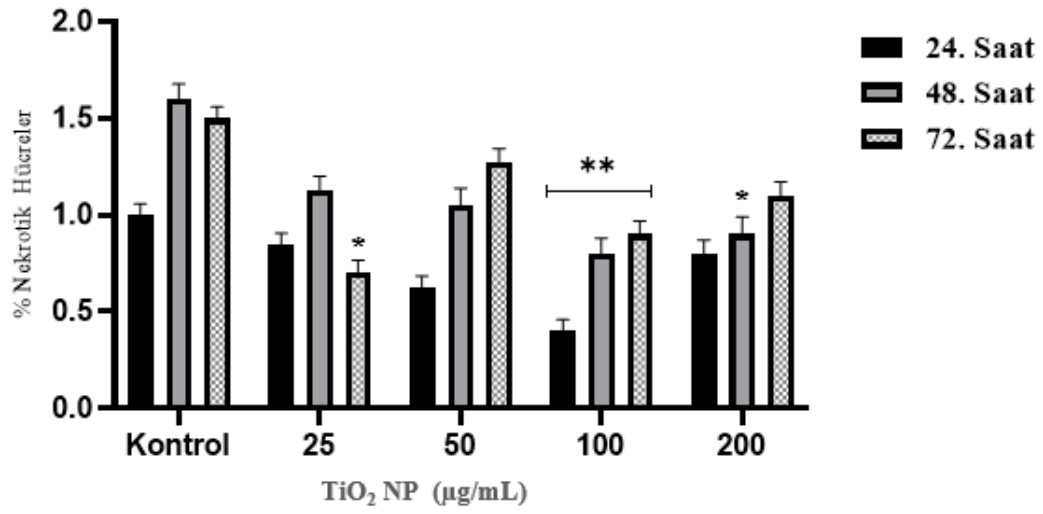
Şekil 4.16. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak geç apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$

25. saatte 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde total apoptotik hücrelerin yüzde değeri (8.4), kontrol grubuna (10.8) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). 48. saatte 200 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde total apoptotik hücrelerin yüzde değeri (8.7), kontrol grubuna (6.8) göre yüksek bulundu ($p<0.05$). 72. saatte 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde total apoptotik hücrelerin yüzde değeri (5.7), kontrol grubuna (6.9) göre düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.17).

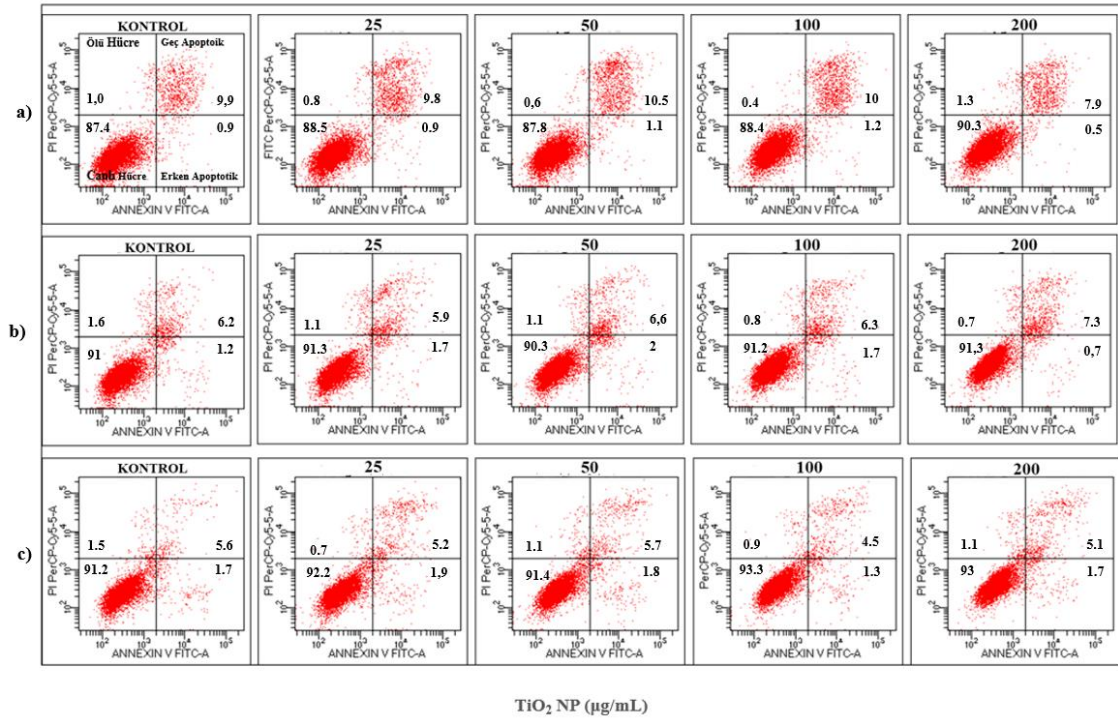


Şekil 4.17. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak total apoptotik EAT hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

24. saatte 100 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde Annexin V (-), PI (+) ölü hücrelerin yüzde değeri (0.4), kontrol grubuna (1,0) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (p<0.05). 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde ölü hücrelerin yüzde değerlerinin (sırasıyla 0.8 ve 0.9) kontrol grubuna (1,6) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu (p<0.05). 72. saatte 25 µg/mL ve 100 µg/mL TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde ölü hücrelerin yüzde değerleri (sırasıyla 0.7 ve 0.9), kontrol grubuna (1.5) göre düşük bulundu (p<0.05) (Şekil 4.18). Akım sitometri ile apoptotik EAT hücre popülasyonları Şekil 4.19'da gösterildi.



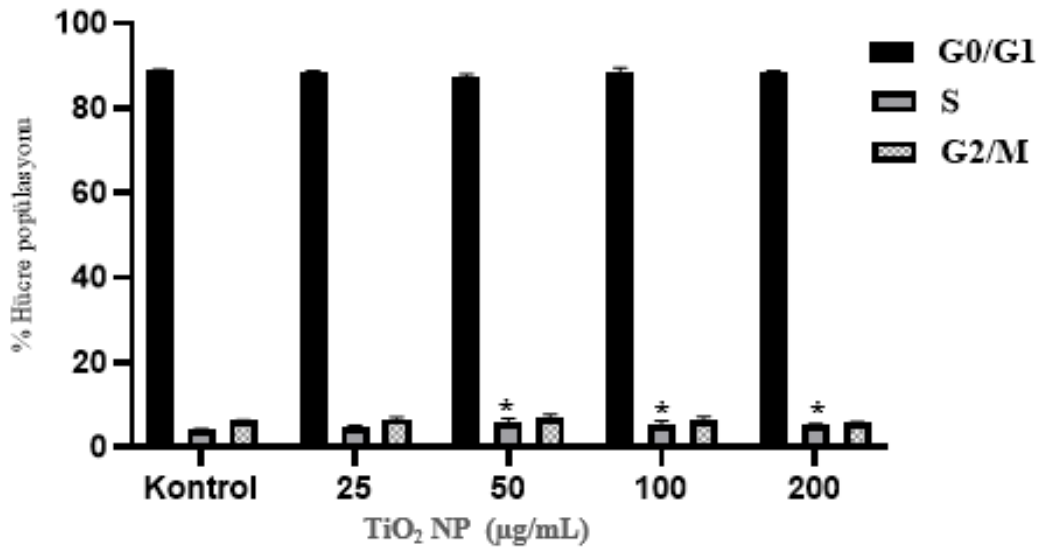
Şekil 4.18 Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak ölü EAT hücre yüzde değerleri ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001



Şekil 4.19. Akım sitometri ile apoptotik EAT hücre popülasyonlarının yüzde dağılımlarının gösterilmesi a) 24. Saat, b) 48. Saat, c) 72. Saat

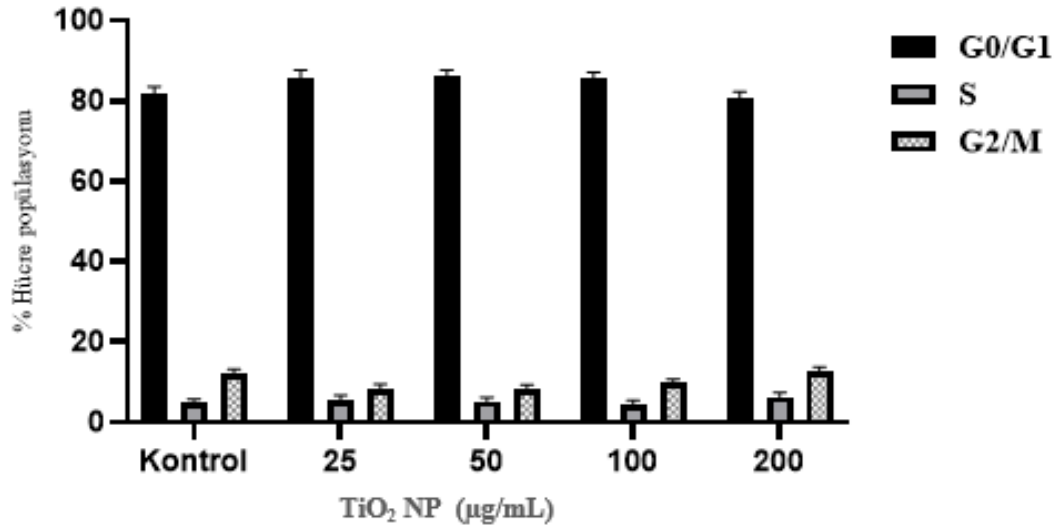
4.6. EAT Hücre Döngüsü Analiz Bulguları

TiO₂ NP 'lerin artan konsantrasyonları ile 24, 48, ve 72 saat kültüre edilen EAT hücrelerinin, PI boyaması yapılarak akım sitometri ile hücre döngüsü fazları belirlendi. Hücre döngüsü analizlerinde, 24. saatte S fazındaki 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyon yüzde değerleri sırasıyla 5.9, 5.3 ve 5.5 olarak bulundu. Bu değerler kontrol grubuna (4.3) göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (p<0,05) (Şekil 4.20).



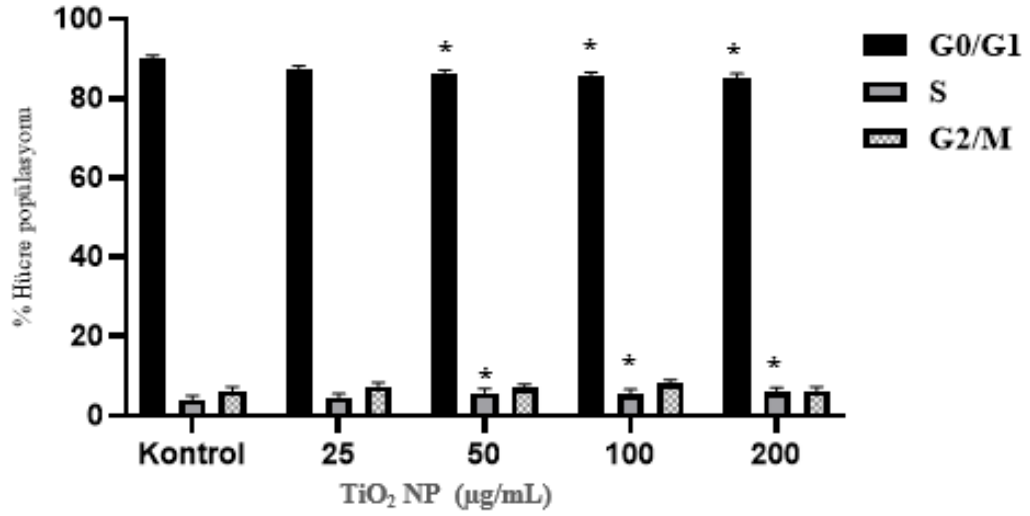
Şekil 4.20. Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 24.saat sonundaki dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

48. saatte S fazındaki 25, 50 ve 200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyon yüzde değerleri sırasıyla 5.7, 5.2 ve 6.4 olarak bulundu. Bu değerlerin kontrol grubuna (4.6) göre artış gösterdiği gözlemlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.21) (p>0.05).



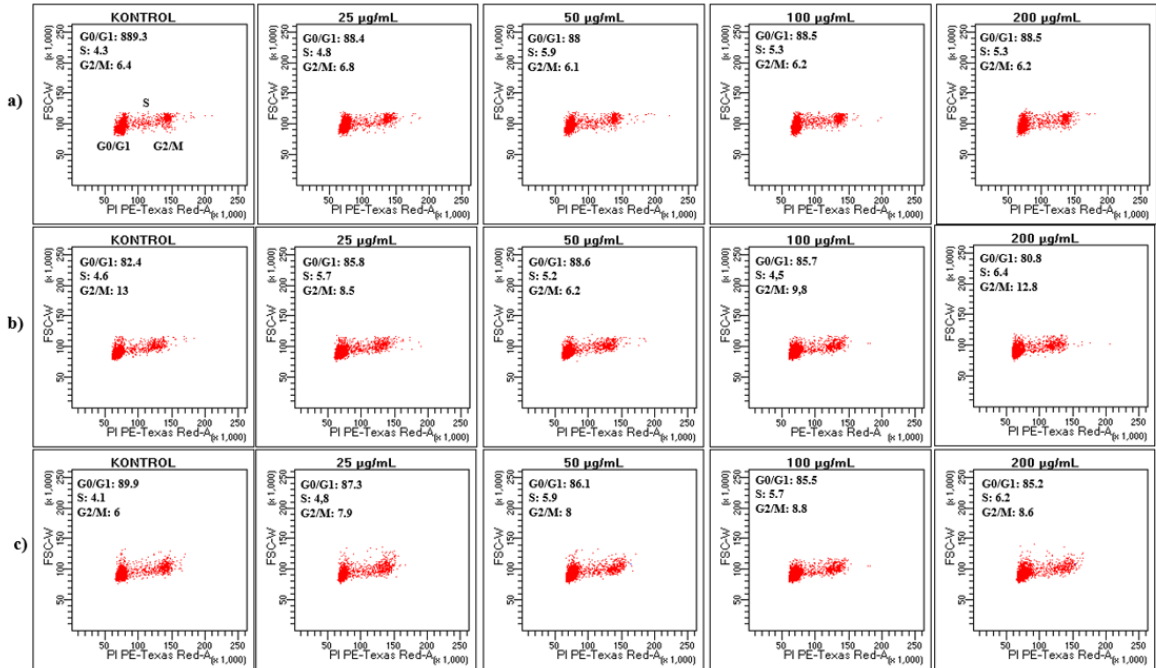
Şekil 4.21. Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 48.saat sonundaki dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$

72. saatte S fazındaki 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyon yüzde değerleri sırasıyla 5.9, 5.7 ve 6.2 olarak bulundu. Bu değerler kontrol grubuna (4.1) göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Bununla birlikte, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde G0/G1 fazındaki hücre popülasyon yüzde değerleri sırasıyla 86,1, 85,5 ve 85,2 olarak bulundu. Bu değerler kontrol grubuna (89,9) göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Akım sitometri ile EAT hücre döngüsü fazlarının 72.saat sonundaki dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

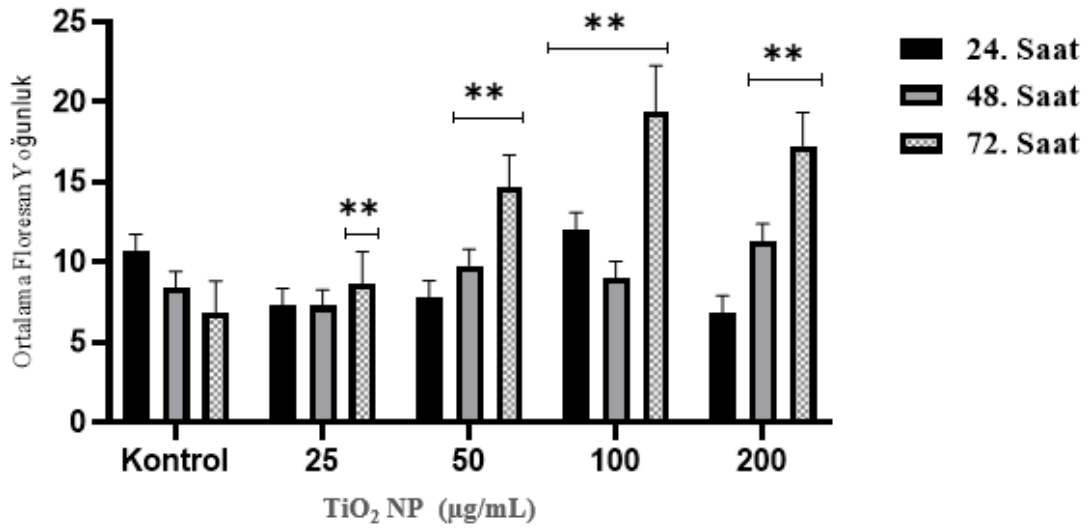
EAT hücre döngü fazlarını gösteren akım sitometrik görüntüleri Şekil 4.23’de gösterildi.



Şekil 4.23. Akım sitometri ile elde edilen EAT hücre döngüsü yüzde dağılımlarının plot görüntüleri a) 24. Saat, b) 48. Saat, c) 72. Saat

4.7. EAT Hücrelerinde ROS Düzeylerinin Analiz Bulguları

EAT hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saat süreyle TiO_2 NP'lerinin 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları ile inkübe edilmesi sonrasında hücre içindeki ROS düzeyleri akım sitometri ile analiz edildi. Ortalama floresan yoğunluğu ölçümleri sonucunda, 24. saatte 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda TiO_2 NP'leri ile etkileşen EAT hücrelerinde ROS düzeyleri (12.7) kontrol grubuna (10.5) göre anlamlı bir artış gösterdi. 48. saatte ise 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'leri ile etkileşen EAT hücrelerinde ROS düzeyleri (sırasıyla 9.8, 9.2, 11.3) kontrol grubuna (7,8) göre anlamlı bir artış gösterdi. 72. saatte ise, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'leri ile etkileşen EAT hücrelerinde ROS düzeyleri (sırasıyla 8.6, 14.6, 19.3, 17.2) kontrol grubuna (6.8) göre belirgin bir artış gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4.24)

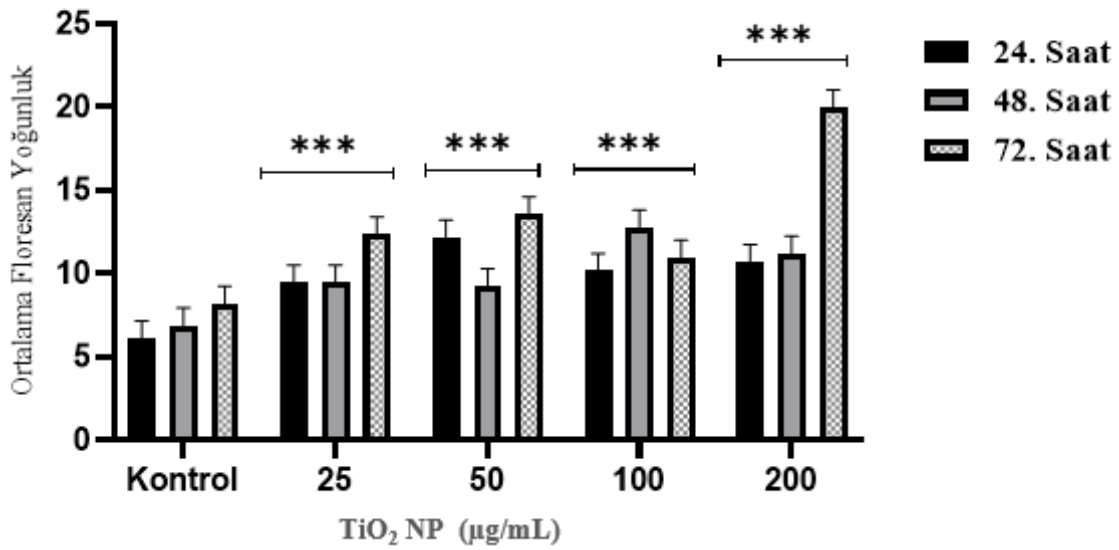


Şekil 4.24. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre ROS düzeylerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

* $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$

Assit sıvısı hücrelerinden akım sitometri kapılama tekniği kullanılarak CD11b+ EAT hücreler seçildi ve bu hücrelerdeki ROS düzeyleri ölçüldü. 24. saatte 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT

hücrelerinde ROS düzeyleri (sırasıyla 9.2, 12.2, 10.2, 10.7) kontrol grubuna (6.1) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte ise, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde ROS düzeyleri (sırasıyla 9.5, 9.3, 12.8, 11.2) kontrol grubuna (6.9) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte ise, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde ROS düzeyleri (sırasıyla 12.4, 13.6, 20) kontrol grubuna (8.2) göre belirgin artışlar gösterdi (p <0,05) (Şekil 4.25).

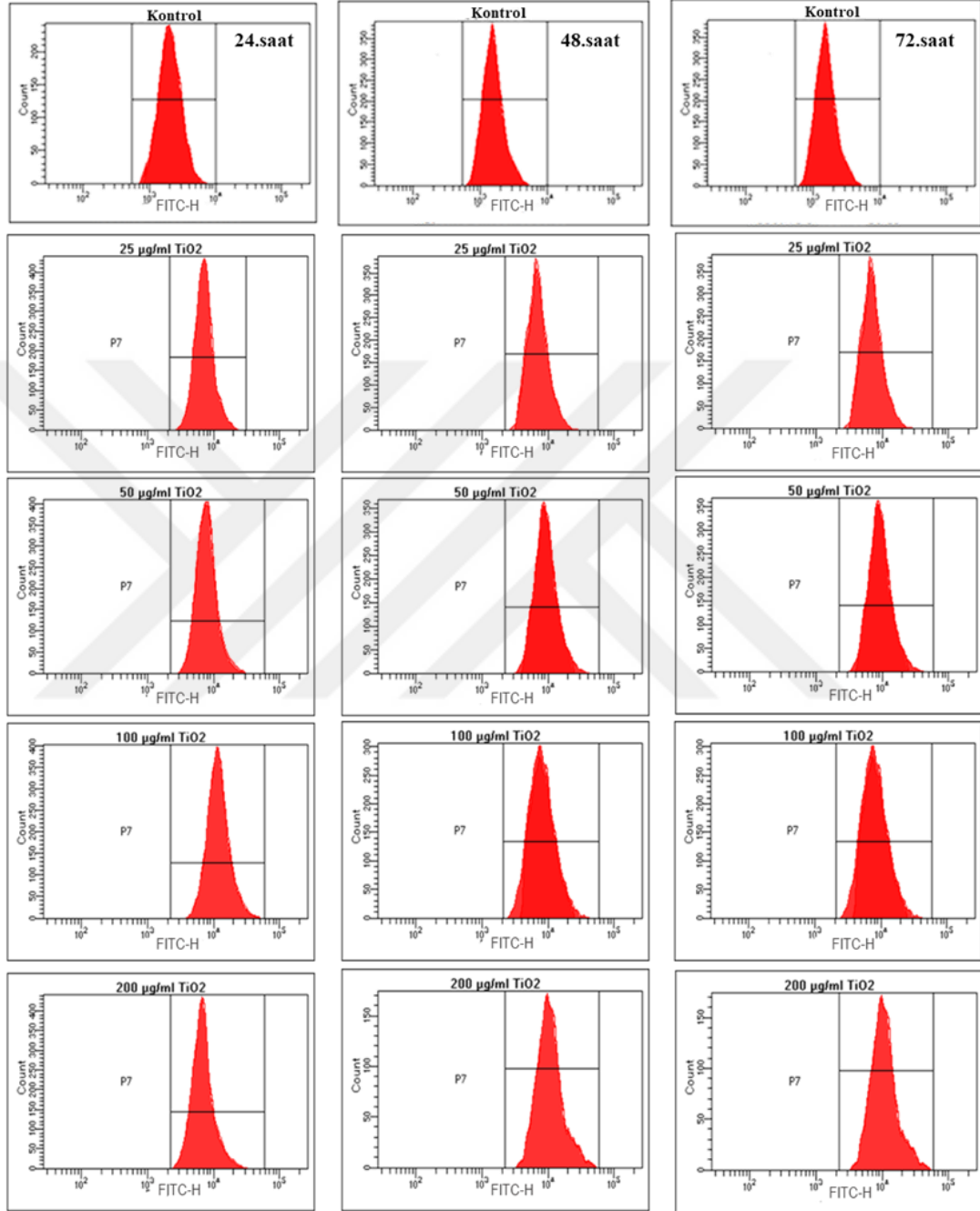


Şekil 4.25. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre ROS düzeylerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

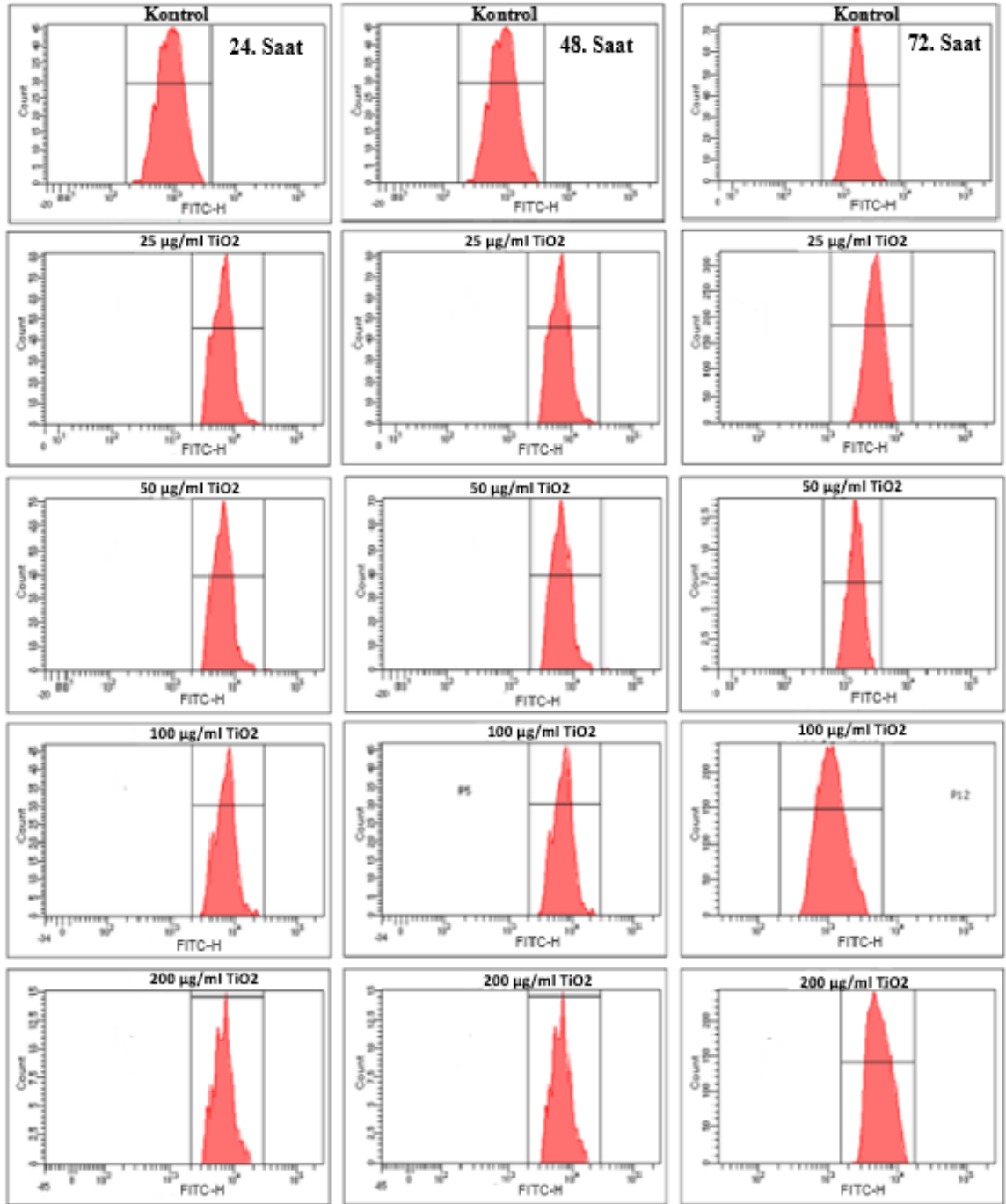
EAT hücreleri ile etkileşen TiO₂ NP'lerinin konsantrasyonu ve bu NP'lere maruz kalma süresi arttıkça, üretilen ROS düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0.05). Kontrol grubunda ise TiO₂ NP'lere maruz kalma süresi arttıkça ROS düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (p<0.05). Artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinin 24, 48, 72. saatlerdeki ortalama floresan yoğunluk değerlerini gösteren akım sitometrik histogramlar Şekil 4.26'da gösterildi.

CD11b+ EAT hücreleri ile etkileşen TiO₂ NP'lerinin konsantrasyonu arttıkça 24. saatten itibaren üretilen ROS düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0.05). Artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinin 24, 48, 72.

saatlerdeki ortalama floresan yoğunluk değerlerini gösteren akım sitometrik histogramlar Şekil 4.27’de gösterildi



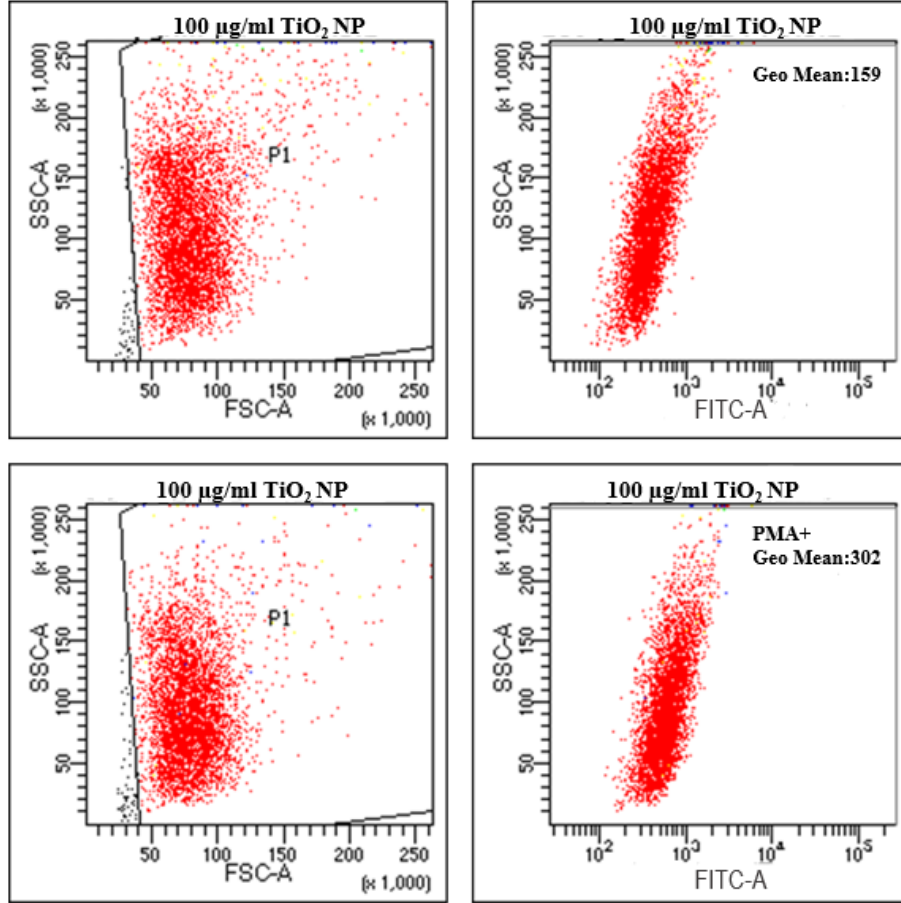
Şekil 4.26. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluk ROS düzeylerini gösteren akım sitometrik histogram görüntüleri



Şekil 4.27. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluk ROS düzeylerini gösteren akım sitometrik histogram görüntüleri

4.8. EAT Hücrelerinde NADPH Oksidaz Aktivitesi Analiz Bulguları

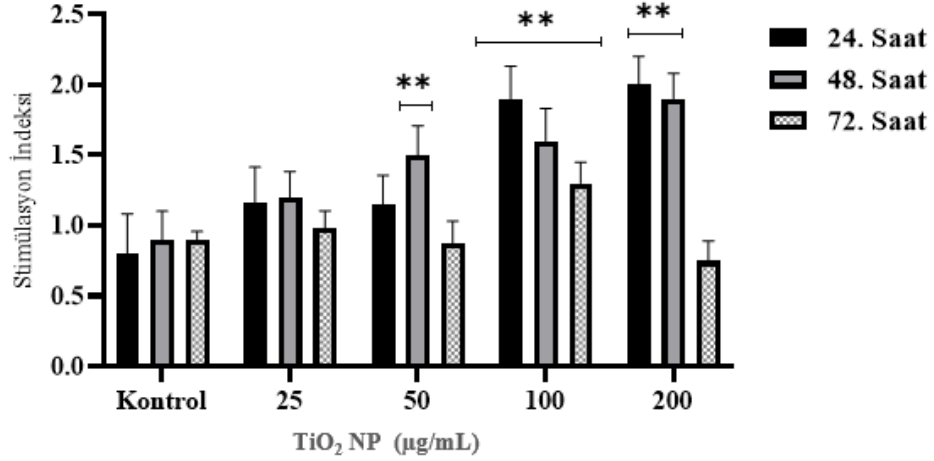
Assit sıvısı hücrelerinde DHR 123 boyaması yapılarak NADPH oksidaz aktivitesi ölçüldü. Akım sitometri analizi ile hedeflenen hücre grupları seçilerek PMA ile uyarılan ve uyarılmayan hücrelerde ortalama floresan yoğunluk değerleri oranlanarak SI değerleri hesaplandı (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Akım sitometri ile EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesinin gösterilmesi

24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde SI değerleri (sırasıyla 1.9, 2.0) kontrol grubuna (0,8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde SI değerleri (sırasıyla 1.5, 1.6, 1,9) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte ise 100 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile

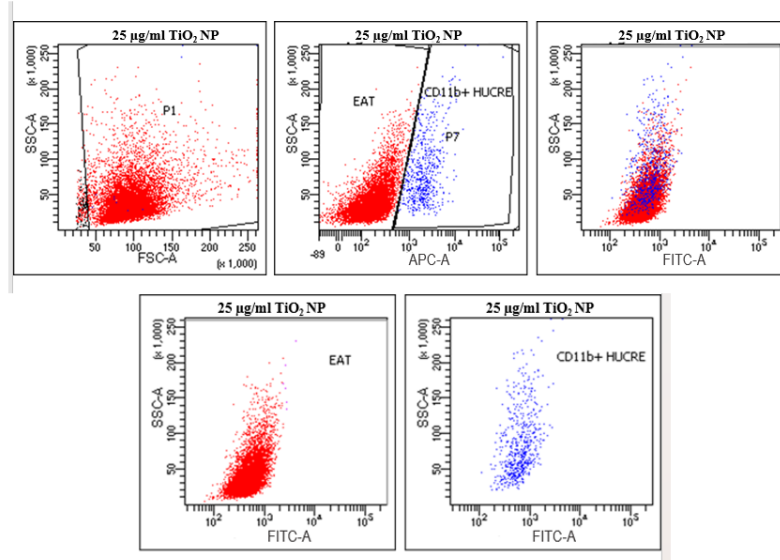
etkileşen EAT hücrelerinde SI değeri (1.3) kontrol grubuna (0,9) göre anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,05$) (Şekil 4.29).



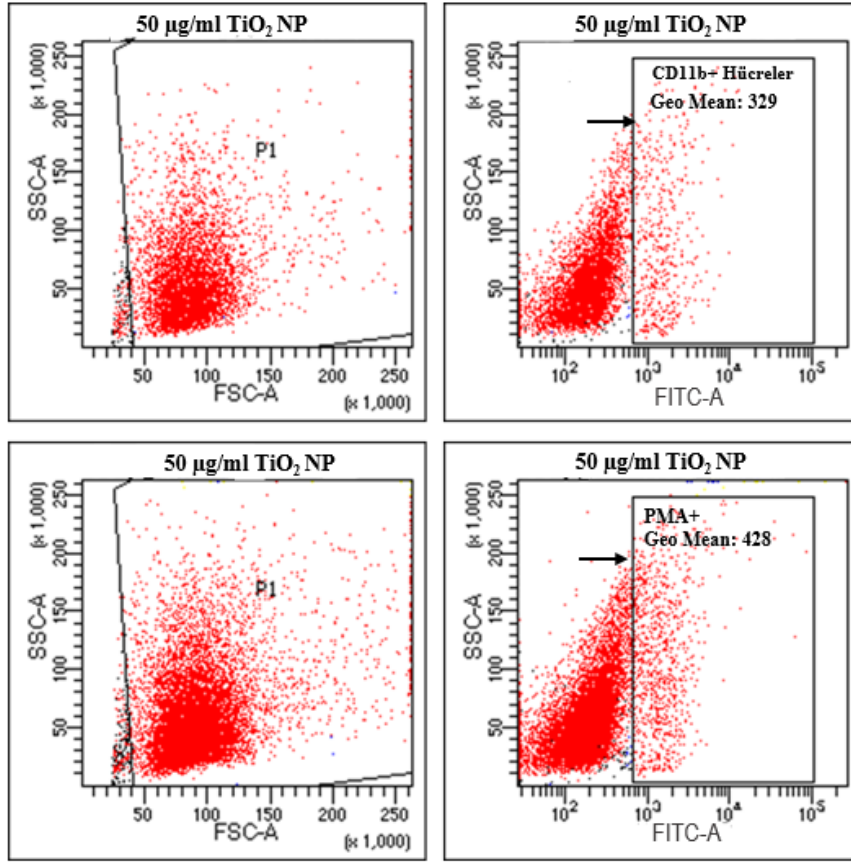
Şekil 4.29. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre SI düzeylerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Assit sıvısı hücrelerinden akım sitometri kapılama tekniği kullanılarak CD11b+ EAT hücreleri seçildi (Şekil 4.30) ve bu hücrelerdeki NADPH oksidaz aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.31).

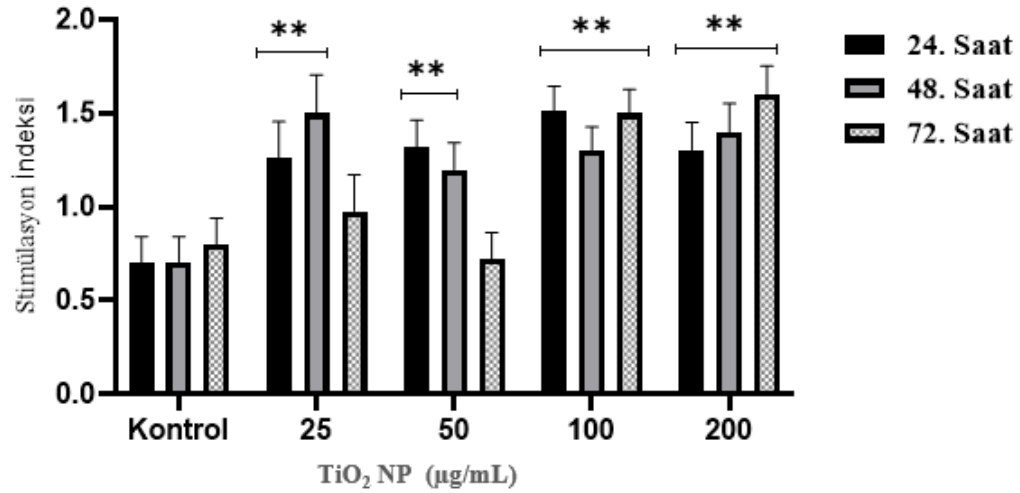


Şekil 4.30. Akım sitometri ile CD11b+ EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesini ölçmek için uygulanan kapılama stratejisi



Şekil 4.31. Akım sitometri ile CD11b+ EAT hücrelerinin NADPH oksidaz aktivitesinin gösterilmesi

24. saatte 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde SI değerleri (sırasıyla 1.2, 1.3, 1.5, 1.3) kontrol grubuna (0.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde SI değerleri (sırasıyla 1.5, 1.2, 1.3, 1.4) kontrol grubuna (0.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde SI değerleri (sırasıyla 1.5, 1.6) kontrol grubuna (0,8) göre anlamlı artışlar gösterdi (p <0,05) (Şekil 4.32).



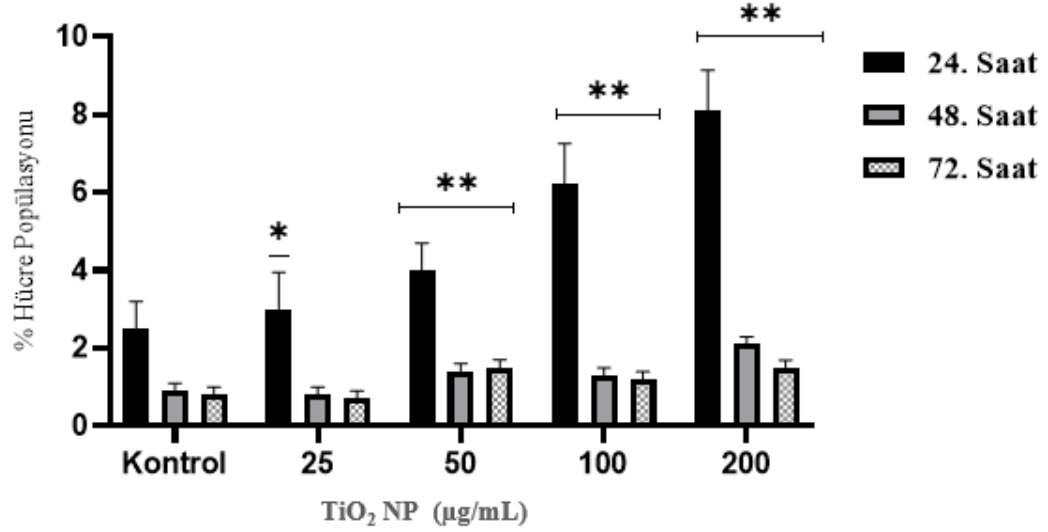
Şekil 4.32. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerinde ortalama floresan yoğunluğa göre SI düzeylerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

* p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

4.9. CD11b+ ve CD3+ EAT Hücre Popülasyonlarının Analiz Bulguları

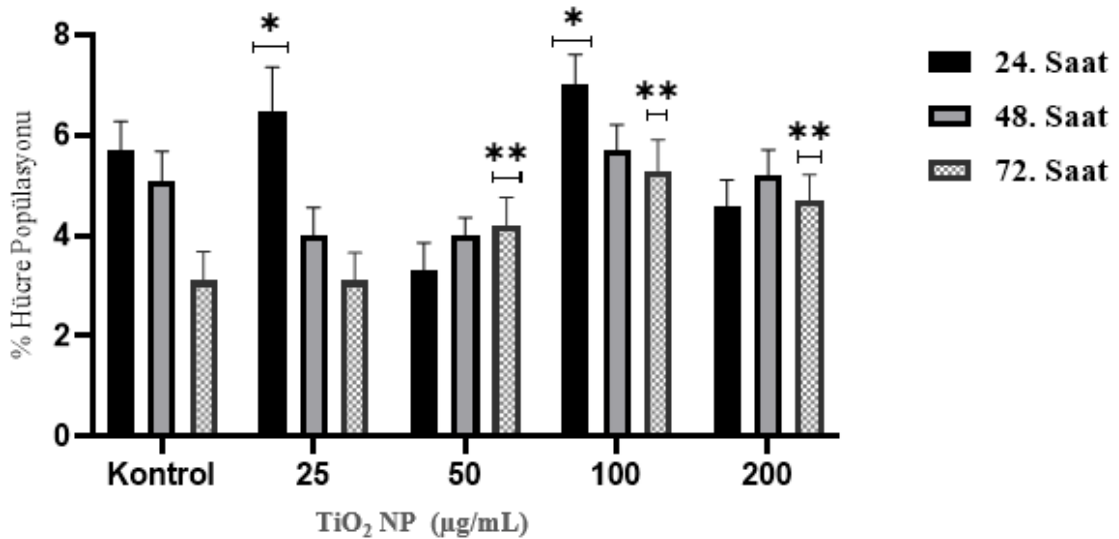
Assit sıvısı hücreleri, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası akım sitometrik yüzeyel boyama işlemi uygulanarak, CD3+ ve CD11b+ EAT hücre popülasyonlarının yüzde değerleri ölçüldü.

24. saatte 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfositlerde yüzde değerleri (sırasıyla 3.0, 4.0, 6.2, 8.1) kontrol grubuna (2.5) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfositlerde yüzde değerleri (sırasıyla 1.4, 1.3, 2.1) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfositlerde yüzde değerleri (sırasıyla 1.5, 1.2, 1.5) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD3+ T lenfositlerdeki yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001

24. saatte 25 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde yüzde değerleri (sırasıyla 6.5, 7.0) kontrol grubuna (5.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte ise, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücrelerinde yüzde değerleri (sırasıyla 4.2, 5.3, 4.7) kontrol grubuna (3.4) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücrelerindeki yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001

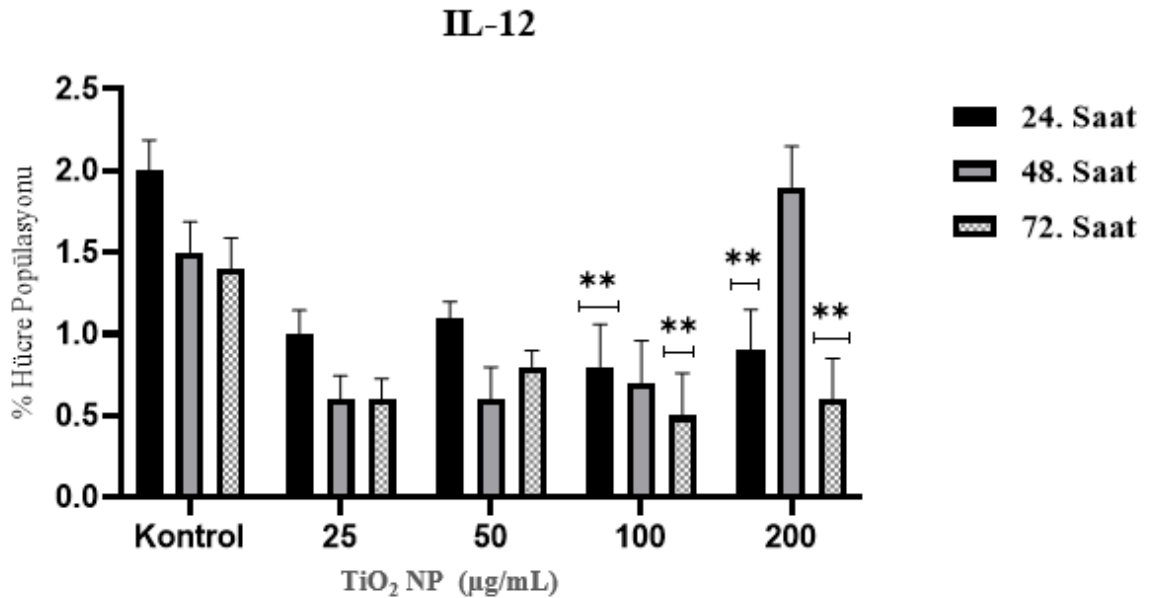
4.10. EAT Hücrelerinde İnflamatuvar Sitokin Düzeylerinin Analiz Bulguları

TiO₂ NP'lerinin EAT hücreleri üzerindeki immün yanıt etkilerini daha ayrıntılı değerlendirmek amacıyla, inflamatuvar sitokin seviyeleri akım sitometri ile analiz edildi.

4.10.1. IL-12 Düzeylerinin Analiz Bulguları

CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 0.8, 0.9) kontrol grubuna (2) göre anlamlı azalışlar gösterdi. 72. saatte, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 0.5, 0.6) kontrol grubuna (1.4) göre anlamlı azalışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.35).

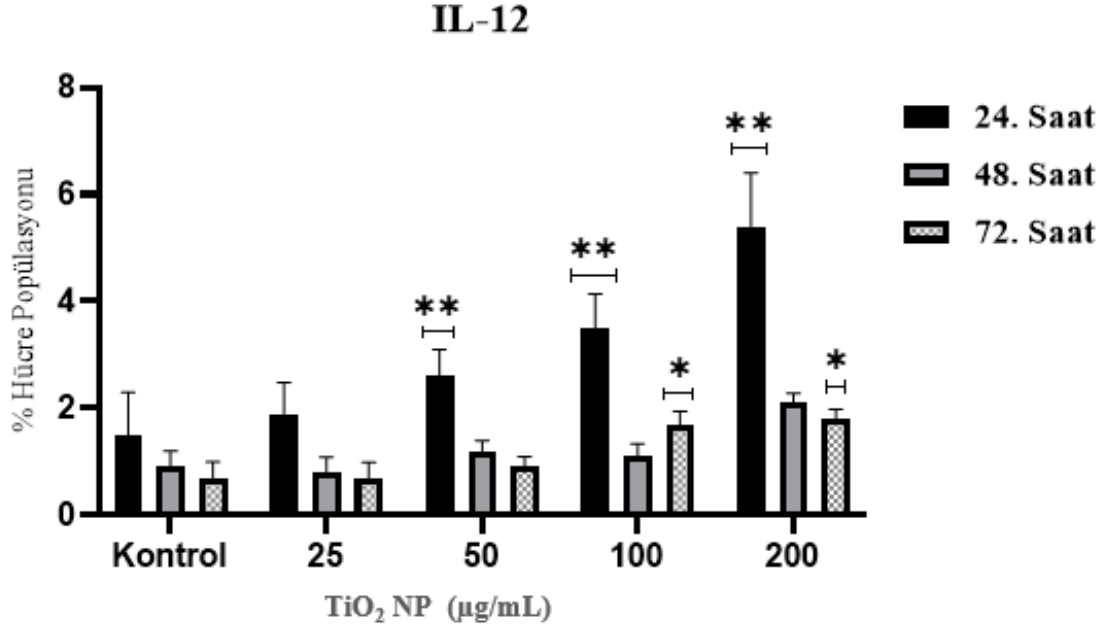


Şekil 4.35. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.6, 3.5, 5.4) kontrol grubuna (1.5) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100

$\mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'ler ile etkileşen CD3^+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.7, 1.8) kontrol grubuna (0.7) göre anlamlı artışlar gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 4.36).

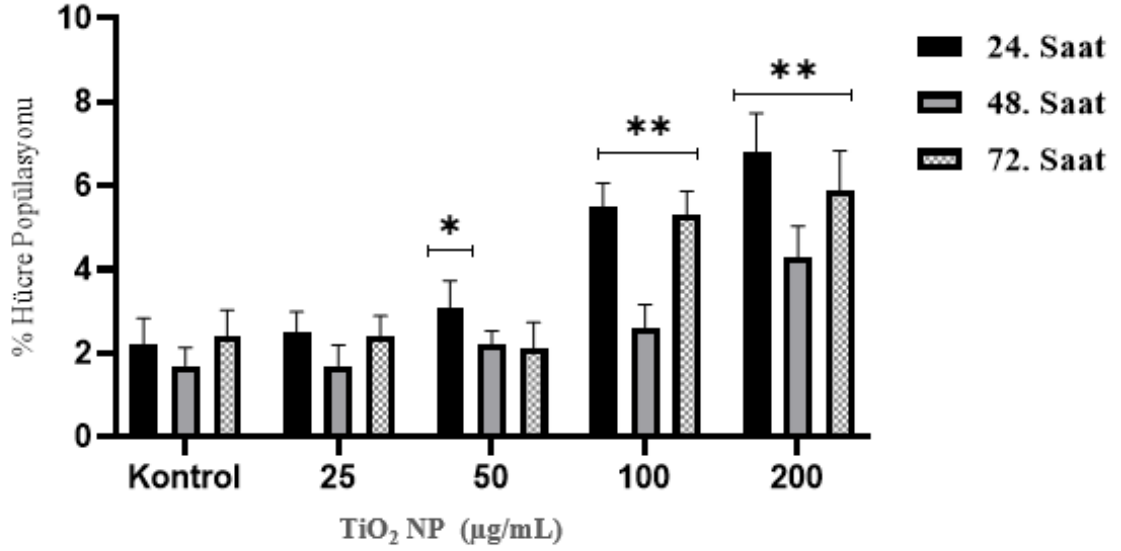


Şekil 4.36. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'lere bağlı olarak CD3^+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$

EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.1, 5.5, 6.8) kontrol grubuna (2.2) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte $100 \mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.6, 4.3) kontrol grubuna (1.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte $100 \mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 5.3, 5.9) kontrol grubuna (2.4) göre anlamlı artışlar gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 4.37).

IL-12

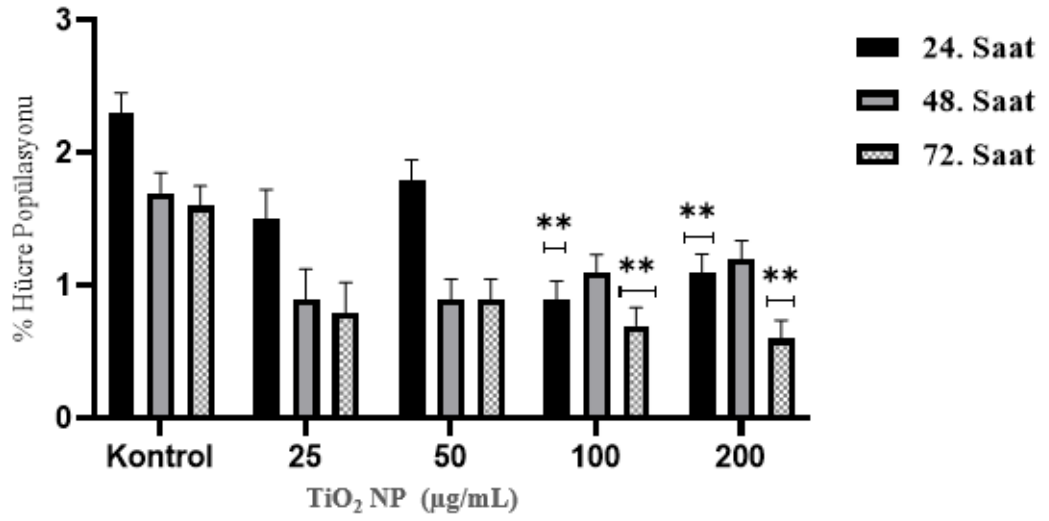


Şekil 4.37. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 0.9, 1.1) kontrol grubuna (2.3) göre anlamlı azalışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyesinin yüzde değeri (sırasıyla 0.7, 0.6) kontrol grubuna (1.6) göre anlamlı artış gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.38).

IL-12

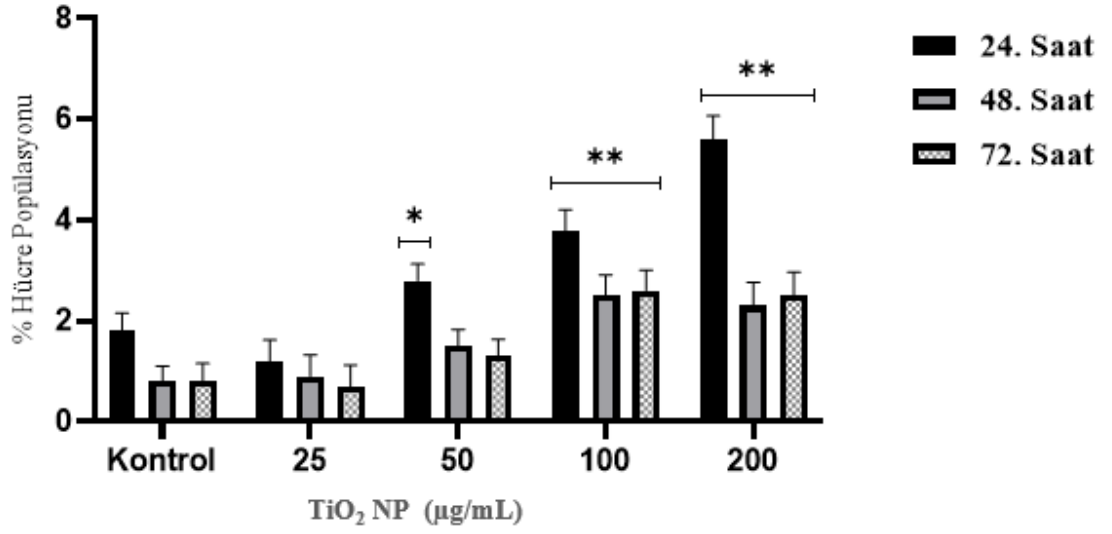


Şekil 4.38. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.8, 3.8, 5.6) kontrol grubuna (1.8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.5, 2.3) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. Saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.3, 2.6) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.39).

IL-12

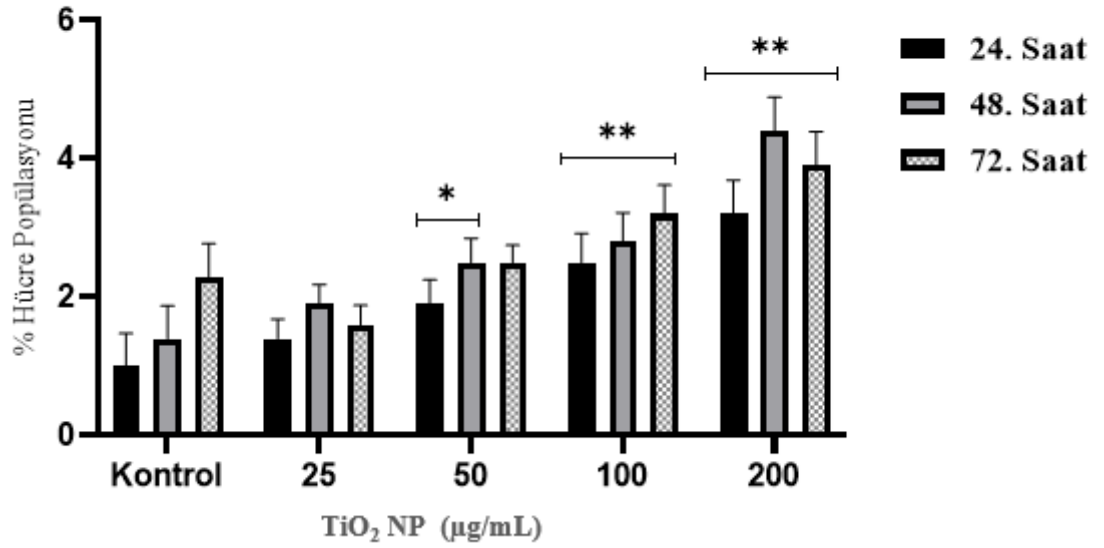


Şekil 4.39. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.9, 2.5, 3.2) kontrol grubuna (1.0) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.5, 2.8, 4.4) kontrol grubuna (1.4) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.2, 3.9) kontrol grubuna (2.3) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.40).

IL-12

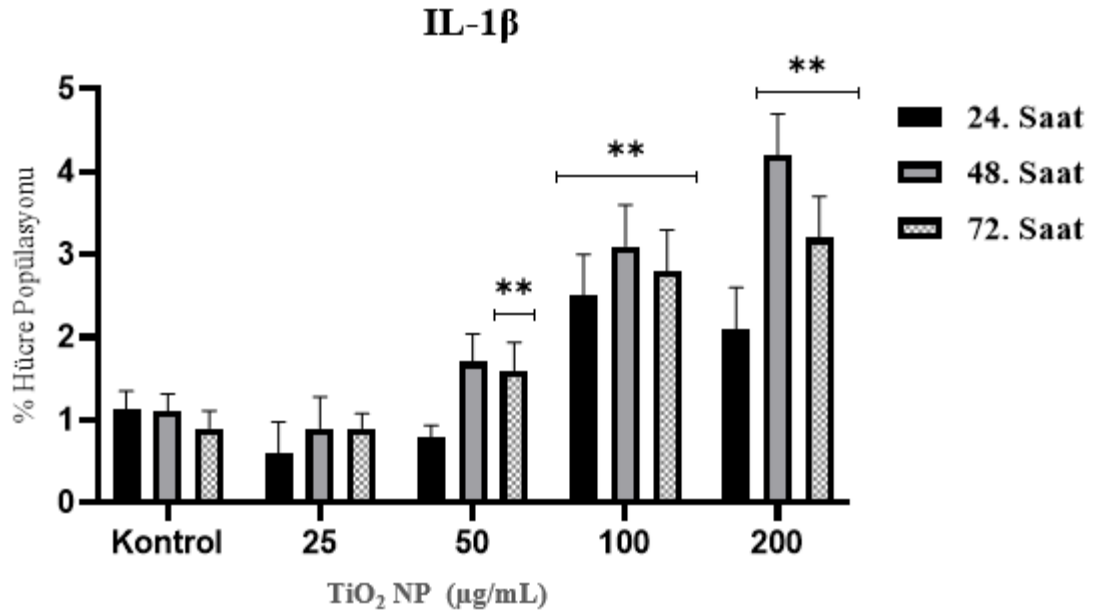


Şekil 4.40. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-12 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$

4.10.2. IL-1 β Düzeylerinin Analiz Bulguları

CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değeri (2.5) kontrol grubuna (1,1) göre anlamlı artış gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.1, 4.2) kontrol grubuna (1.1) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.6, 2.8, 3.2) kontrol grubuna (0,9) göre anlamlı artışlar gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 4.41).

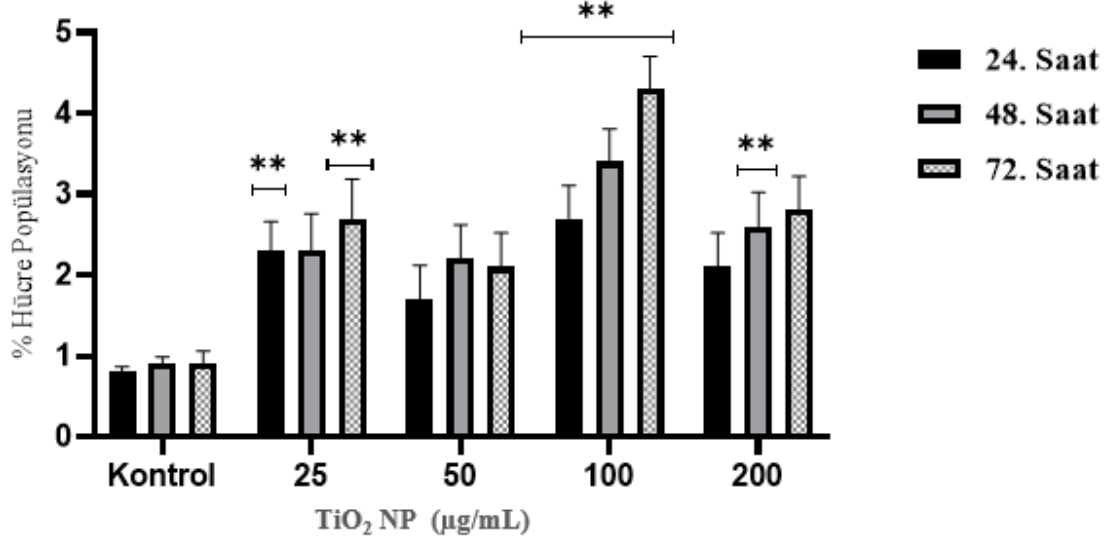


Şekil 4.41. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 25 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.3, 2.7) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.4, 2.6) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 25 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.7, 4.3) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.42).

IL-1 β

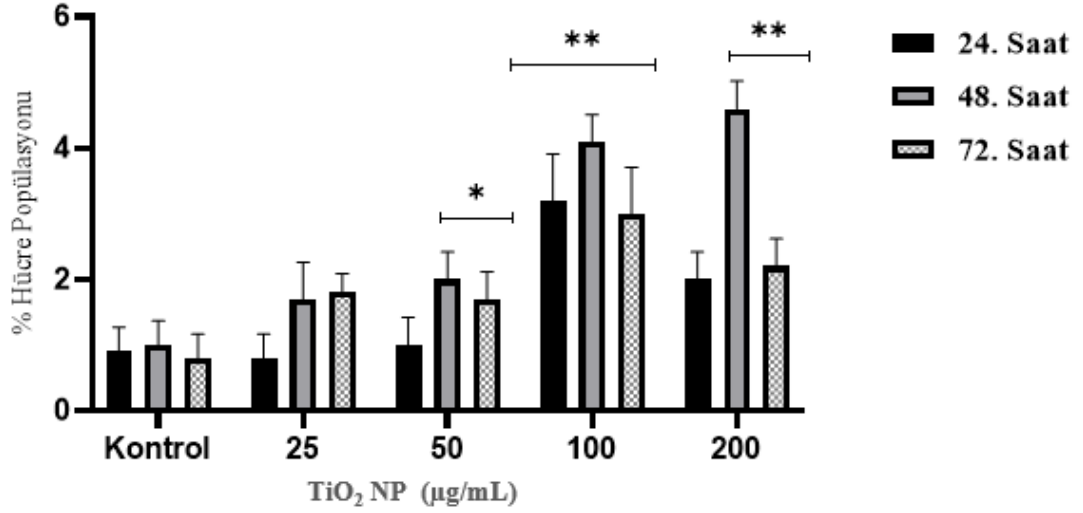


Şekil 4.42. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değeri (3.2) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artış gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2, 4.1, 4.6) kontrol grubuna (1) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.7, 3, 2.2) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.43).

IL-1 β

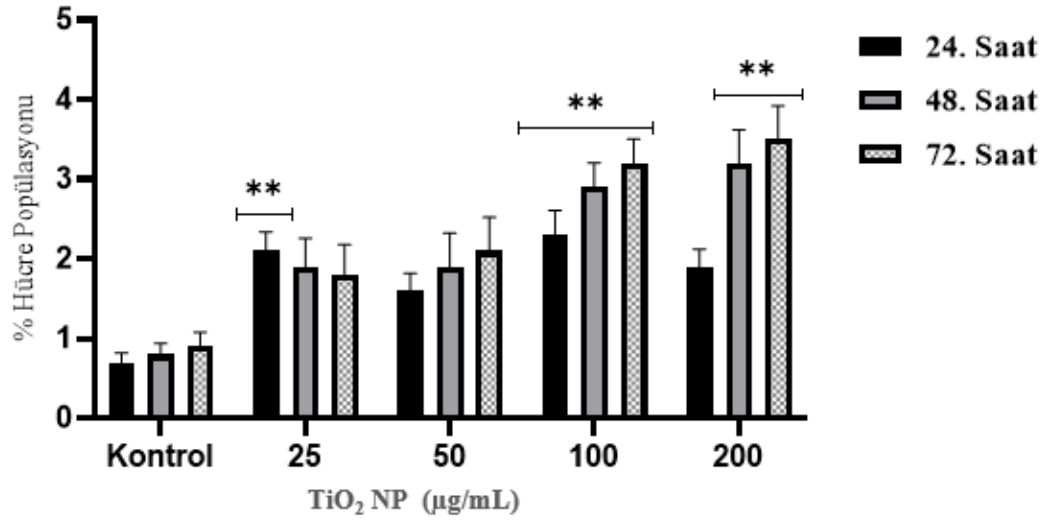


Şekil 4.43 Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 25 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.1, 2.3) kontrol grubuna (0.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.9, 3.2) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.2, 3.5) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.44).

IL-1 β



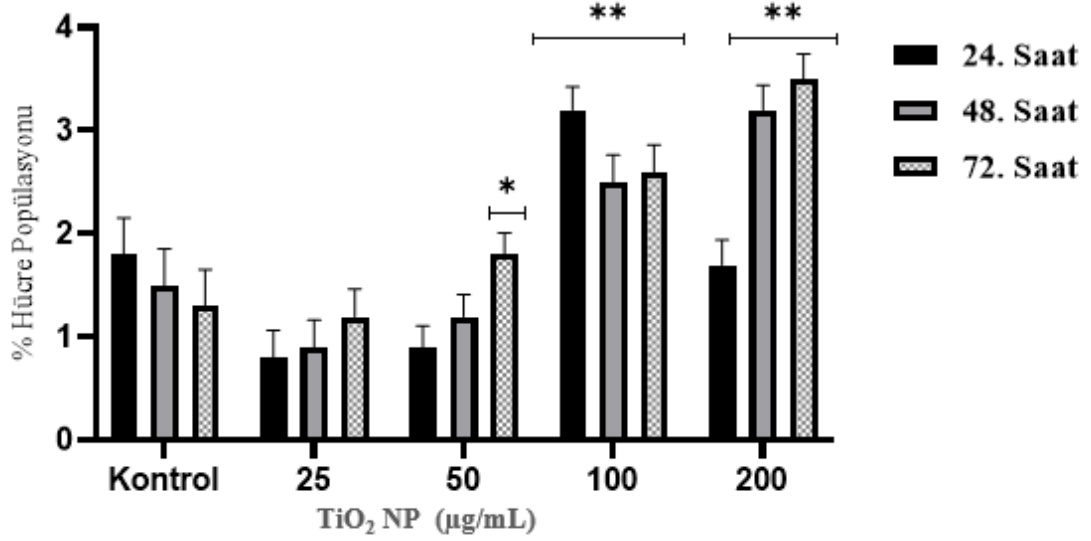
Şekil 4.44. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-1 β üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

4.10.3. IL-10 Düzeylerinin Analiz Bulguları

CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değeri (3.2) kontrol grubuna (1.8) göre anlamlı artış gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.5, 3.2) kontrol grubuna (1.5) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.8, 2.6, 3.5) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.45).

IL-10

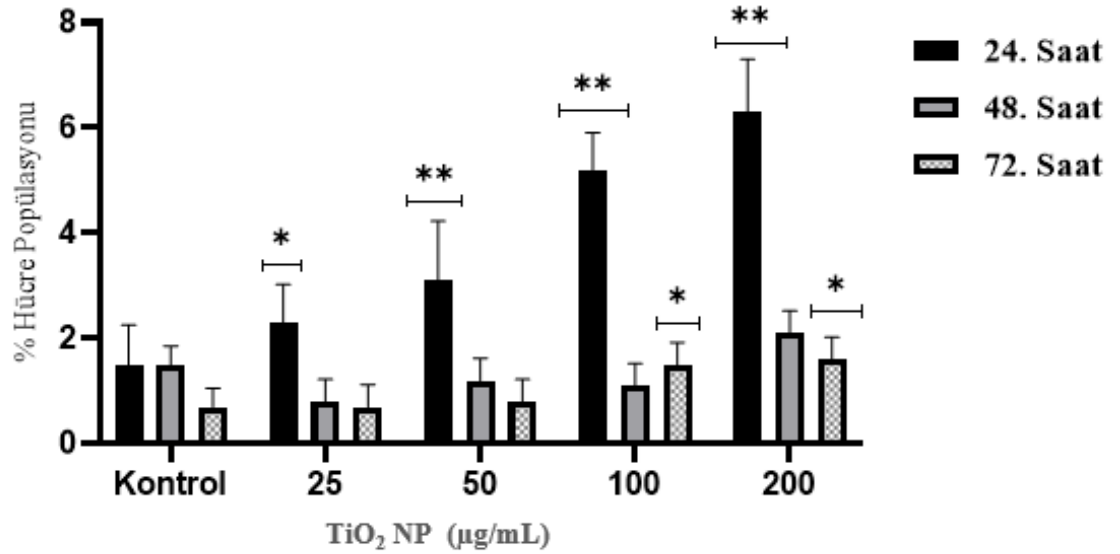


Şekil 4.45. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

Assit sıvısında CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.3, 3.1, 5.2, 6.3) kontrol grubuna (1.5) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.5, 1.6) kontrol grubuna (0.6) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.46).

IL-10

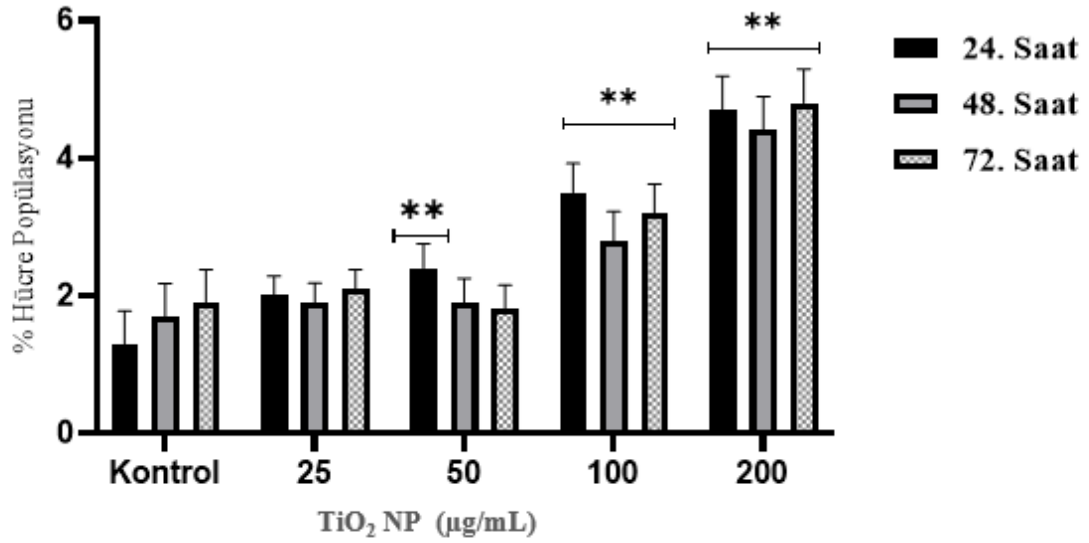


Şekil 4.46. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak asit sıvısında CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.4, 3.5, 4.7) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.8, 4.4) kontrol grubuna (1.7) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.2, 4.8) kontrol grubuna (1.9) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.47).

IL-10

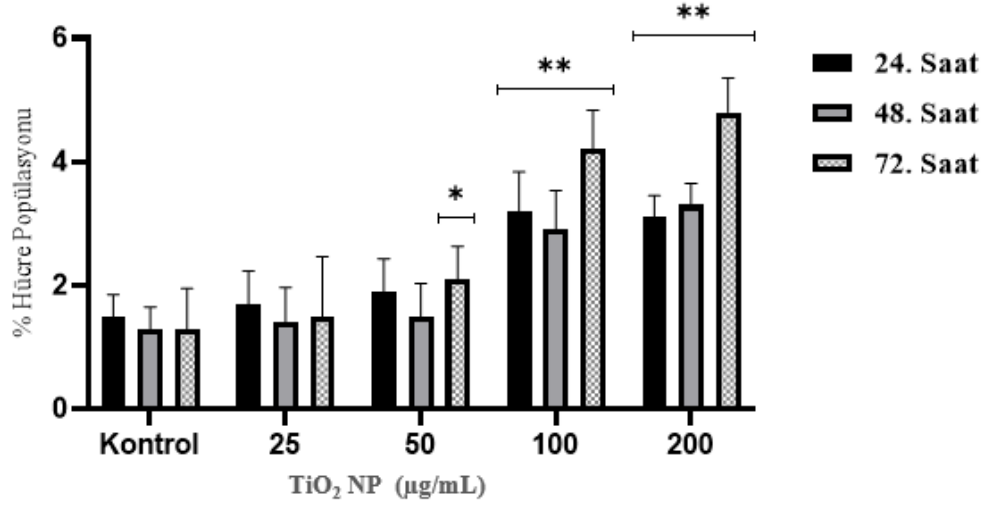


Şekil 4.47. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.2, 3.1) kontrol grubuna (1.5) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.9, 3.3) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.1, 4.2, 4.8) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.48).

IL-10

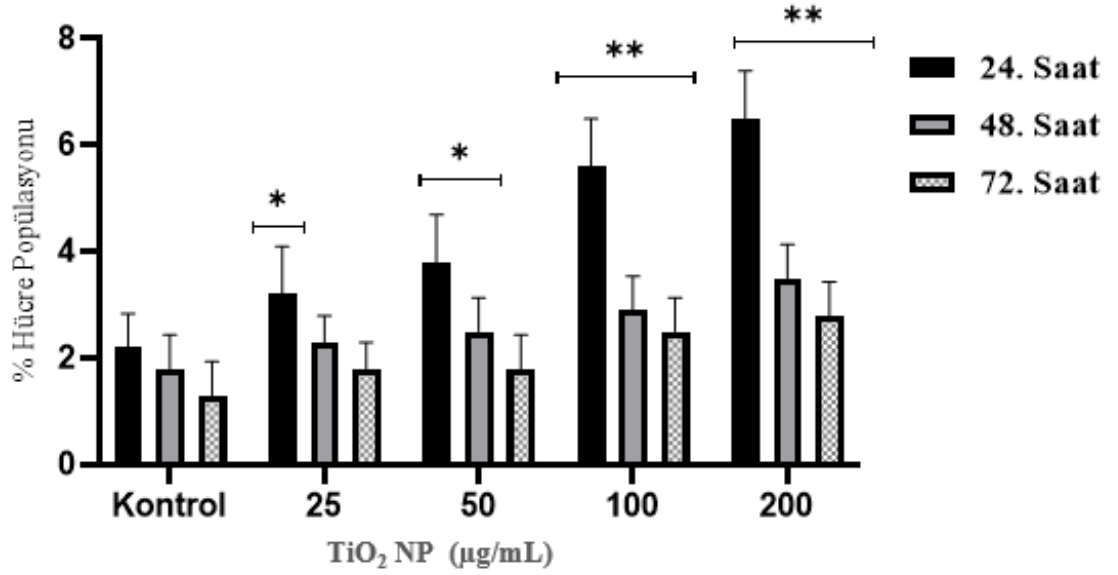


Şekil 4.48. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen CD11b+ EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

Assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.2, 3.8, 5.6, 6.5) kontrol grubuna (2.2) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.5, 2.9, 3.5) kontrol grubuna (1.8) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.5, 2.8) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.49).

IL-10

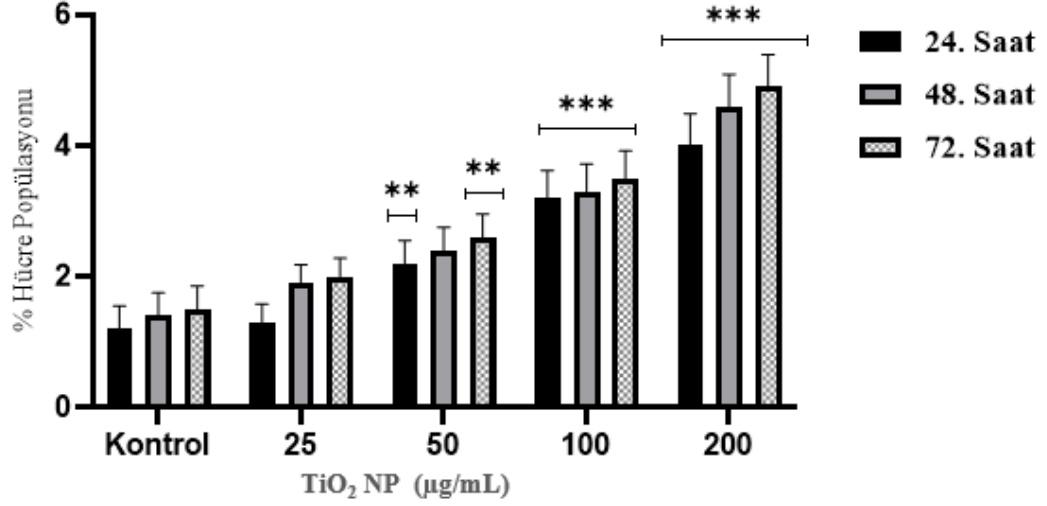


Şekil 4.49. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3⁺ T lenfosit popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p<0.05$; **: $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$

PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.2, 3.2, 4) kontrol grubuna (1.2) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.3, 4.6) kontrol grubuna (1.4) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyesinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.6, 3.8, 5) kontrol grubuna (1.5) göre anlamlı artışlar gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 4.50).

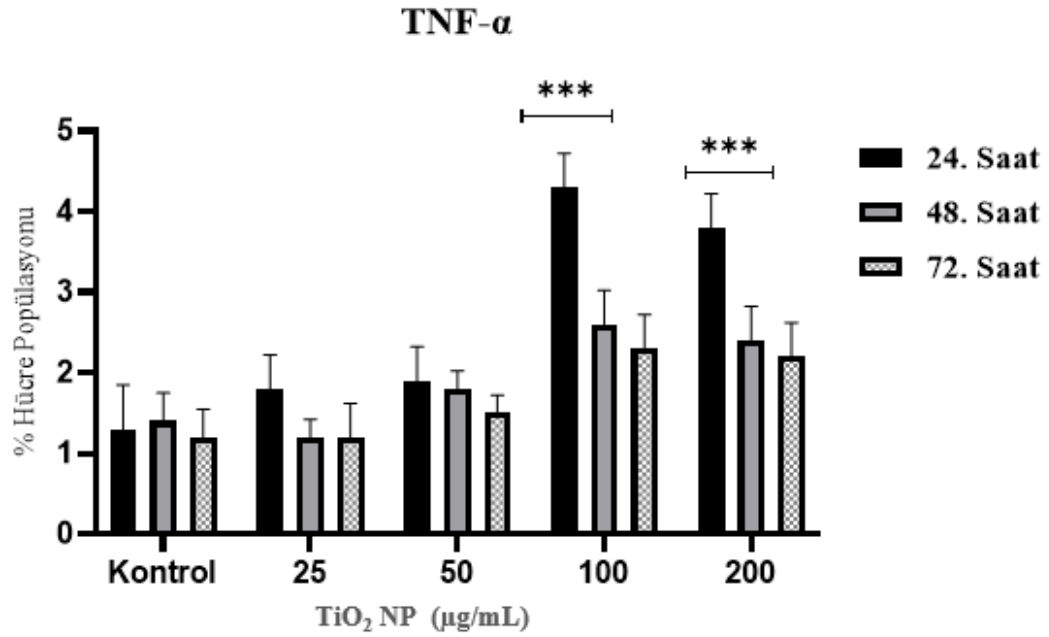
IL-10



Şekil 4.50. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda IL-10 üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama ± SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

4.10.4. TNF-α Düzeylerinin Analiz Bulguları

Assit sıvısında CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF-α üretim seviyeleri ölçüldü. 24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF-α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 4.3, 3.8) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF-α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.6, 2.4) kontrol grubuna (1.4) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.51).

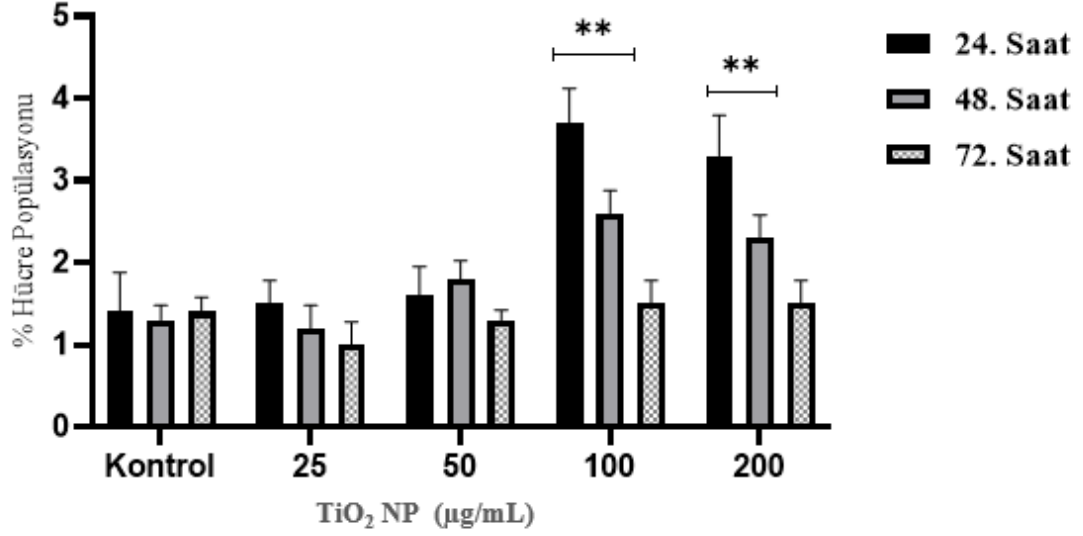


Şekil 4.51. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak assit sıvısında CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.7, 3.3) kontrol grubuna (1.4) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.6, 2.3) kontrol grubuna (1.3) göre anlamlı artışlar gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 4.52).

TNF- α

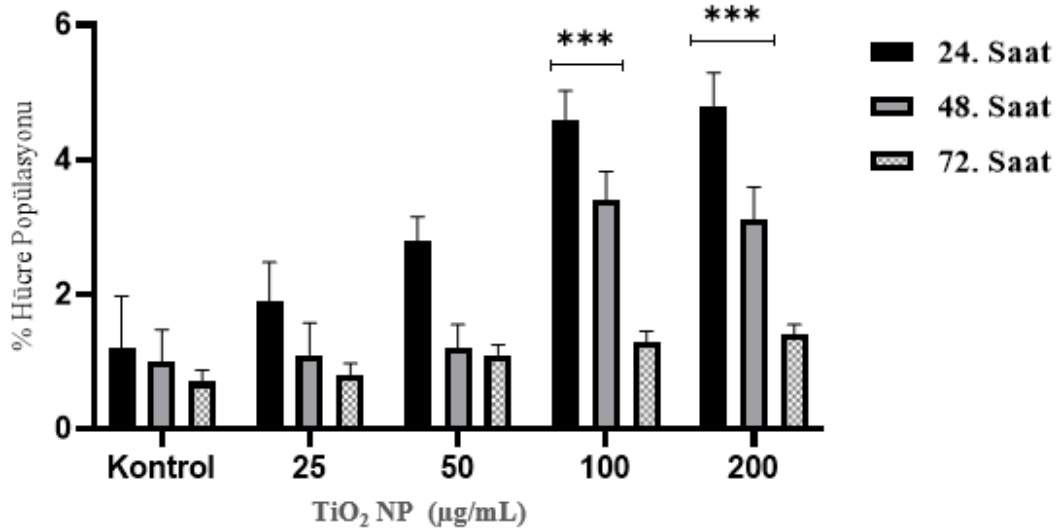


Şekil 4.52 Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

Assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 2.8, 4.6, 4.8) kontrol grubuna (1.2) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.4, 3.1) kontrol grubuna (1) göre anlamlı artışlar gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.53).

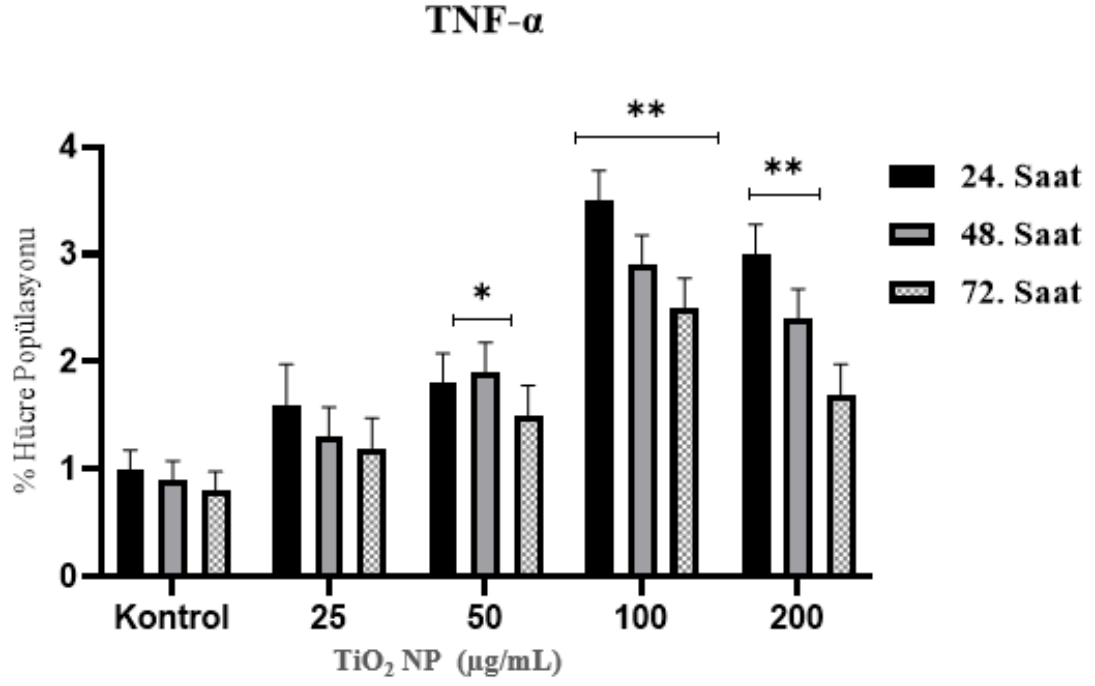
TNF- α



Şekil 4.53. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak assit sıvısında PMA karışımı ile stimüle edilen CD3+ T lenfosit popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyeleri ölçüldü.

24. saatte 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 3.5, 3.0) kontrol grubuna (1) göre anlamlı artışlar gösterdi. 48. saatte 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerleri (sırasıyla 1.9, 2.9, 2.4) kontrol grubuna (0.9) göre anlamlı artışlar gösterdi. 72. saatte 100 µg/mL konsantrasyonunda TiO₂ NP'ler ile etkileşen ve PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyesinin yüzde değeri (2.5) kontrol grubuna (0.8) göre anlamlı artış gösterdi (p<0.05) (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Zamana ve artan konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere bağlı olarak PMA karışımı ile stimüle edilen EAT hücre popülasyonunda TNF- α üretim seviyelerinin yüzde değerlerinin dağılımı ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. * p<0.05; **:p<0.01; *** :p<0.001; **** :p<0.0001

5. TARTIşMA

Kanser, dünya genelinde en önemli ölüm nedenlerinden biri olan, hücrelerdeki yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açarak hücrelölümsüzlük, apoptoza direnç gibi mekanizmaların geliştiği çok faktörlü bir süreçtir (Coussens ve Werb, 2002). 2020 yılında, meme kanseri, akciğer kanserini geride bırakarak dünya genelinde en yaygın kanser türü haline gelmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) ve Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) gibi kuruluşların verileri, meme kanserinin küresel olarak halen yayılmaya devam ettiğini ve diğer kanser türlerini geride bıraktığını göstermektedir (<https://gco.iarc.fr/en>).

Ehrlich tümör hücreleri, hormon pozitif insan meme kanseri hücrelerine oldukça benzeyen özelliklere sahiptir. *In vitro* ve *in vivo* modelleri yüz yıldan fazla bir süredir meme kanserinin deneysel onkoloji biyokimya, farmakoloji ve karsinogenez araştırmalarında kullanılmaktadır (Radulski ve ark., 2023). Ehrlich tümör hücrelerinin indüksiyonu ile peritoneal boşlukta büyüme yeteneği ve insanlara ait patolojik ve davranışsal süreçlere benzerliği, bu tümörü kanser araştırmaları için en yaygın uygulanan modellerden biri haline getirmektedir. Assit formdaki tümör hücreleri, insanda periton boşluk içerisinde gelişen abdominal neoplazmalar gibi, immün sisteme karşı savunma mekanizmaları geliştiren özelliklere sahiptir (Ozaslan ve ark., 2011).

Tümör mikroçevresinde, immün sistem ile kanser hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucu olarak tümör büyümesini teşvik etme veya baskılanmasını sağlama gibi çift yönlü etkiler ortaya çıkmaktadır (Cruz-Merino ve ark., 2017). Bu nedenle Ehrlich tümörü ile yapılan araştırmalar, kanser biyolojisi, immünoloji ve tümör-immün etkileşimi konularının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak tedavi için yeni stratejiler geliştirilmesine

katkı sağlamaktadır (Cekanova ve Rathore, 2014).

Bir malzemenin özellikleri, boyutları nm ölçeğine yaklaştıkça değişmektedir. Nanoteknoloji ile boyutları 100 nm'den küçük olan NP'lerin sentezlenebilmesi, parçacık boyutları ve yüzey özelliklerinin kontrol edilebilir olması bu nano materyallerin pek çok alanda kullanılmasına fırsat sunmaktadır (Mahmoodi ve ark., 2016). Nanoteknolojideki gelişmeler sayesinde NP'lerin biyolojik dokular veya hücreler arasındaki olası etkileşimleri ayrıca kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmaktadır (Sunderland ve ark., 2006). TiO_2 gibi bazı mikro boyutlu metal oksit partiküllerin hayvanlar ve insanlar için zararsız kabul edilmesine rağmen, NP'leri toksik olarak kabul edilmektedir (Kim ve ark., 2011). Hücre içerisine alınan TiO_2 NP'lerinin ROS üreterek oksidatif hasara yol açabileceği, birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle, farklı kanser hücreleri üzerindeki TiO_2 NP'lerinin potansiyel etkileri araştırılmaktadır (Jugan ve ark., 2012; Wu ve ark., 2010).

İnsan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) ile yapılan bir çalışmada 0.1, 1, 10 ve 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda TiO_2 NP'ler, %10 FBS içeren kültür ortamında hazırlanmış ve bu hücrelerle 24 saat boyunca muamale edilerek, hücre canlılığı MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Uygulanan TiO_2 NP'lerin konsantrasyonlarının hücre canlılığını etkilemediği bildirilmiştir (Mao ve ark., 2015).

TiO_2 NP'lerinin (<20 nm) kolorektal kanser hücreleri (HCT116 ve HT29) ve insan kordon kanı damar endotelial hücrelerinin (HUVEC) canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, hücreleri 48 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$) TiO_2 NP'ler ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, TiO_2 NP'lerinin bu üç hücre hattı üzerinde farklı etkiler yarattığını ortaya koymuştur. HCT116 kanser hücrelerinin, kontrol hücrelerine kıyasla çoğaldığı gözlenmiştir. 100 ve 400 $\mu g/mL$ TiO_2 NP'leri ile HCT116 hücrelerinde anlamlı bir sağkalım ve proliferasyon artışı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 50 ve 400 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda TiO_2 NP'lerine maruz bırakılan HT29 hücrelerinde ise 48 saat sonunda yaklaşık %20-30 oranında bir canlılık azalması gözlenmiştir. 50 ve 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda TiO_2 NP'lerine maruz kalan HUVEC'lerde canlılığın arttığı gözlenirken 200 ve 400 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında bu artışın inhibe olduğu gösterilmiş, ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada, TiO_2 NP'lerin artan konsantrasyonlarının hücre canlılığını 48 saatlik süre zarfında konsantrasyon ve hücre bağımlı bir şekilde

etkilediği ifade edilmiştir (Kukia ve ark., 2018).

Fare nöroblastoma kaynaklı N2A hücre hattında metal oksit NP'lerin toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 20 nm boyutundaki TiO₂ NP'lerin değişen konsantrasyonları ile bu hücreleri 12 saat muamele ettikten sonra tripan blue yöntemi ile hücrelerin canlılıklarını kaybetmedikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte, TiO₂ NP'lerin 200 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarda 48 saat sonunda mitokondriyal fonksiyonun değişmediği bildirilmiştir (Jeng ve Swanson, 2006).

Çeşitli solunum yoluyla alınan metalik NP'lerin A549 hücreleri üzerine *in vitro* biyolojik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, 0, 5, 10, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'leri ile hücreler 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Aynı zamanda hücreler, mikro boyuttaki (1 µm) TiO₂ ile de muamele edilmiştir. Sonuç olarak, hem mikro hem de nanoboyuttaki TiO₂ partiküllerinin en yüksek konsantrasyonlarında dahi hücre canlılığının %17 den daha fazla azalmadığı ve bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir (Park ve ark., 2007).

TiO₂ NP'lerine maruz kalan mide kanseri (AGS) hücrelerinde artan proliferasyon ve insan mide epitel hücrelerinde tümör benzeri fenotipler olduğu gösterilen bir çalışmada, AGS hücrelerinin %10 FBS içeren DMEM ortamında hazırlanan TiO₂ NP'lerin artan konsantrasyonları ile (20,40,60,80,100,120,150 µg/mL) farklı sürelerde (3, 6, 24 saat) inkübe edildiklerinde hücre büyümesinde herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiş ve hücrelerin normal büyüme seviyelerinde kaldığı belirtilmiştir. Ayrıca, NP'ler aynı konsantrasyonlarda %2 BSA (bovin serum albümini) içeren PBS içerisinde hazırlanıp hücreler inkübe edildiklerinde, kontrole göre hücrelerin daha fazla proliferasyon gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle, 150 mg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'lerin 3 saat boyunca hücre canlılığında en yüksek artışı sağladığı, MTT ve tripan mavisi boyama yöntemi ile doğrulanmıştır. TiO₂ NP'lerin kültür ortamından gelen proteinlerle kaplanmasının, NP'lerin biyolojik aktivitelerini değiştirebildiği bildirilmiştir (Botelho ve ark., 2014).

Fare embriyonik fibroblastlarının (NIH 3T3), 15 nm boyutundaki TiO₂ NP'lerin farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildiği bir çalışmada. 24 saatlik maruz kalma sonrası 50 µg/mL konsantrasyonunda ve 48 ile 72 saatlik sürelerde 10 µg/mL TiO₂ NP'lerin hücre canlılığında belirgin bir artış gösterdiği ve TiO₂ NP'lerin memeli hücre sağkalımı ve çoğalması üzerinde beklenmedik bir etkisinin olduğu bildirilmiştir. MTT testi

ile elde edilen verileri karşılaştırmak ve TiO_2 NP'lerin proliferatif etkisini daha derinlemesine incelemek amacıyla, NIH 3T3 hücreleri $10 \mu\text{g/mL}$ TiO_2 NP'lerine maruz bırakılmış ve toplam canlı hücreler tripan mavi boyama testi ile ölçülmüştür. Sonuçların uyumlu olduğu ve zamana bağımlı olarak 24 ile 72 saat arasında canlı hücre sayısının kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Ancak 72 saatten sonra anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Genel olarak, elde edilen veriler sonucunda, TiO_2 NP'lerin NIH 3T3 hücrelerinin canlılığını artırdığı ve hücre proliferasyonunu zaman ve konsantrasyon bağımlı bir şekilde teşvik ettiğini gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, uzun süreli maruziyetin yalnızca hücrelerin hayatta kalmasını ve büyümesini artırmadığı, hücre döngüsü ilerlemesini ve çoğaltılmış genom segregasyonunu bozarak kromozomal instabilite ve hücre dönüşümüne yol açtığı ifade edilmiştir (Huang ve ark., 2009).

Bununla birlikte, çeşitli kanser hücreleri üzerine TiO_2 NP'lerin sitotoksik etkileri de farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Anataz ve rutil karışımı TiO_2 NP'lerin ($<100 \text{ nm}$) insan servikal kanser hücrelerinde (HeLa) sitotoksik etkisi olduğunu gösteren bir çalışmada hücreler, farklı konsantrasyonlardaki TiO_2 NP'ler ($0.005, 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 \text{ mg/mL}$) ile 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Hücre büyüme inhibisyonunun konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bununla birlikte, 16 ve 32 mg/mL konsantrasyonlarında TiO_2 NP'lerin, HeLa hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Pandurangan ve ark., 2016).

Fare akciğer kanseri hücre hattı (LL2) ve fare kolorektal kanser hücre hattı (CT26) 6 nm boyutunda anataz formdaki TiO_2 NP'ler ($50, 100, 200, 400 \mu\text{g/mL}$) ile 1, 3 ve 6 saat süre ile muamele edilmiştir. 6. saatte hücre canlılığının her iki hücre hattında da azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca CT26 hücrelerinin 48 saat boyunca farklı boyutlardaki ($20, 40, 60, 80 \text{ nm}$) rutil formdaki TiO_2 NP'ler ($200 \mu\text{g/mL}$) ile muamele edilmesinin hücre sayısı üzerindeki etkileri de incelenmiştir. NP boyutunun azalması ile hücre sayısındaki azalmanın paralel olduğu bildirilmiştir (Fujiwara ve ark., 2015).

TiO_2 NP'lerin, çeşitli kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri gösterilse de, A549 hücreleri kullanılarak yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar bazı benzerlikler taşımasına rağmen önemli farklılıklar da göstermektedir.

TiO_2 NP'lerine kronik maruziyetin A549 hücreleri üzerindeki hücresel yanıtlarının

incelendiği bir çalışmada, hücreler 0, 1, 2.5, 5, 10, 50 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'ler ile 2 ay süreyle kültür edilmiştir. 2.5, 5, 10 veya 50 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP'lerine maruz bırakılan hücrelerde, hücre proliferasyon hızında konsantrasyonla bağımlı bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Kronik TiO₂ NP maruziyetinin, akut TiO₂ NP maruziyetiyle aynı hücresel işlevleri etkilediğini ve daha düşük TiO₂ NP konsantrasyonlarının ve daha uzun maruziyet sürelerinin daha yoğun bir hücresel yanıt oluşturduğu vurgulanmıştır (Armand ve ark., 2016).

TiO₂ NP toksisitesinin yüksek konsantrasyonlarda ve kısa maruziyet süreleri ile incelendiği bir çalışmada, TiO₂ NP'lerinin genotoksik etkileri uzun süreli ve düşük konsantrasyonda maruziyet koşulları altında değerlendirilmiştir. A549 alveolar epitelyal hücreleri, 1-50 µg/mL konsantrasyonlarda TiO₂ NP'lere 2 ay boyunca maruz bırakılmıştır. MTT testi ile hücre mitokondriyal aktivitesi değerlendirilerek, NP'lere kronik maruziyetin, 2 aylık süreye ve 50 µg/mL gibi yüksek konsantrasyondaki TiO₂ NP'lere rağmen hücre sağkalımını etkilemediği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, her hücre pasajında yapılan tripan mavisi boyama ve hücre sayımı doğrulanmış olup, herhangi bir belirgin mortalite gözlenmediği ifade edilmiştir. Ayrıca, PI boyama ve canlı/ölü hücrelerin akım sitometri analizinin de herhangi bir belirgin mortaliteye işaret etmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, en yüksek konsantrasyonlardaki (10 ve 50 µg/mL) TiO₂ NP'lerin ve en uzun maruziyet süresinin (2 ay) hücre proliferasyonunu orta derecede yavaşlatmış olduğu, ancak bu durumun hücrelerin ölmesine (sitotoksositeye) yol açmadığı belirtilmiştir (Armand ve ark., 2016).

TiO₂ NP'lerinin insan akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri üzerinde oluşturulan apoptoz, oksidatif stres ve genotoksitenin incelendiği bir çalışmada, 10 ve 50 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerine 6-24 saat maruziyet sonrasında hücre canlılık oranında, konsantrasyon ve zamana bağımlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. 24 saat boyunca 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında TiO₂ NP maruziyeti sonrasında hücre canlılık oranında anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiş ve bu etkinin 48 saatlik maruziyet süresince daha da yoğunlaştığını gözlemişlerdir (Srivastava ve ark., 2013).

TiO₂ NP'lerinin A549 hücrelerinde genotoksik potansiyelinin incelendiği bir diğer çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlardaki (1-200 µg/mL) TiO₂ NP'lerine 6, 24 ve 48 saat boyunca maruz bırakılmıştır. 48 saatlik maruziyet sonrasında, 150 ve 200 µg/mL TiO₂

NP konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Ancak, 6 ve 24 saatlik maruziyet sürelerinde hücre canlılık oranlarında bir azalma görülmüş olmakla birlikte, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir (Kansara ve ark., 2014).

5 nm boyutunda anataz formdaki 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile A549 hücrelerini 24, 48 ve 72 saat süre ile kültür ettikten sonra hücre canlılığının değerlendirildiği bir çalışmada, hücre proliferasyonunun konsantrasyona ve zamana bağlı olarak güçlü bir şekilde inhibe edildiği ifade edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, 50 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'ler ile 48 saatlik maruziyet sonrası inhibisyon oranının anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015).

Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, TiO₂ NP'lerinin konsantrasyona bağlı ve zamanla değişen toksik etkiler gösterdiğini ve bu etkilerin hücre tipine, maruziyet süresine, konsantrasyona, NP'lerin fizyokimyasal özelliklerine ve kullanılan test yöntemlerine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Çevresel faktörler ve hücre kültürü koşulları, NP'lerin biyolojik etkileşimlerini etkileyebilir. Bu nedenle, hücre kültürü koşullarındaki farklılıklar da çalışmalardaki farklılıklara yol açabilir. Her bir çalışmada, NP'lerin sahip olduğu özellikler ve maruziyet koşullarının öneminin göz önünde bulundurulması gerektiği ifade edilebilir.

TiO₂ NP'lerinin peritoneal gelişen Ehrlich asit hücreler üzerine olan etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşılmamıştır. Bu çalışma ile TiO₂ NP'lerinin EAT hücreleri üzerindeki sitotoksik ve immünomodulator etkileri araştırılmıştır. EAT hücreleri, TiO₂ NP'lerinin artan konsantrasyonları (25, 50, 100, 200 µg/mL) ile 24, 48 ve 72 saat süreyle etkileşerek hücre canlılığı ve proliferasyonu değerlendirildi.

Çalışmamızda, 24. saatte en yüksek konsantrasyondaki (200 µg/mL) TiO₂ NP'lerinin, 72. saate ise 25, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarındaki TiO₂ NP'lerinin kontrole göre hücre canlılığını artırdığı gözlemlendi. TiO₂ NP'lerinin zamana ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak asit sıvısı hücrelerinin canlılığını artırdığı gösterildi. Canlı hücre sayıları sonuçlarına göre, 24. saatte, TiO₂ NP konsantrasyonlarının artışı ile hücre sayısında belirgin bir artış gözlemlendi. 48. saatte, TiO₂ NP konsantrasyonlarındaki artışa ve kontrole göre hücre sayısında artış gözlemlense de, özellikle yüksek TiO₂ NP konsantrasyonlarına doğru hücre sayısının azalmaya başladığı görüldü. Bu durum, yüksek konsantrasyonlardaki

TiO₂ NP'lerin toksik etkilerinin ortaya çıkmaya başladığına dikkat çekebilir. 72. saatte ise canlı hücre sayılarının kontrole göre yüksek seviyelerde olduğu tespit edildi. Ayrıca, 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde, canlı hücre sayısında 100 µg/mL'ye kıyasla nispeten bir azalma olduğu görüldü. Zamana ve konsantrasyona bağlı olarak ölü hücre sayısında genel olarak bir azalma gözlemlendi. 72. saatte, TiO₂ NP konsantrasyonu arttıkça ölü hücre sayısının kontrole göre azaldığı tespit edildi. Ancak, 100 µg/mL ve 200 µg/mL arasındaki TiO₂ NP konsantrasyonlarında ölü hücre sayıları birbirine oldukça yakın değerler gösterdi.

24. saatte yüksek konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde, hücre proliferasyonunu artırıcı bir etki gözlenirken, 48. saatte bu konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerinin toksik etkilerinin ortaya çıkmaya başladığı, ancak 72. saatte yine bazı konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerinin hücre canlılıklarını arttırdığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, TiO₂ NP'lerinin hücreler üzerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak farklı etkiler gösterdiğine işaret edebilir. 72. saatteki hücre canlılığı yüksek olmasına rağmen, canlı hücre sayısındaki azalma hücrelerin yüksek konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere adaptasyon süreciyle ilgili olabilir. 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinde, hücre canlılığının yüksek olması ve canlı hücre sayısının 100 µg/mL'ye kıyasla daha az olması, hücrelerin bu yüksek konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lere adaptasyon sağlamaya çalışırken aynı zamanda proliferasyonlarını sınırlamış olabileceğini işaret edebilir. Yüksek konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'ler başlangıçta hücrelerin hayatta kalmalarını artırabilirken, uzun vadede hücreler oksidatif stres ve metabolik yük gibi faktörlerle karşı karşıya kalıp çoğalma hızlarını yavaşlattığı ifade edilebilir.

Ayrıca, TiO₂ NP'lerin EAT hücreleri üzerindeki etkileri literatürdeki çalışmaları desteklemekte ve hücre sağkalımı üzerindeki uyarıcı etkisinin, hücre hattına, TiO₂ NP'lerinin konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yüksek konsantrasyonda TiO₂ NP'ler zamanla hücre metabolizmasında bazı denge bozuklukları oluşturabilir ve bu durum hücrelerin bölünme hızlarını azaltabilir. Ancak, bu adaptasyon sürecinde hücrelerin metabolik aktiviteleri korunduğu için canlılık oranı yüksek olabilir. Canlı hücre sayısındaki fark aynı zamanda asit sıvısının heterojenliği ile de ilgili olabilir. Yüksek konsantrasyonda NP'lere karşı bazı hücreler daha duyarlı olabilirken, diğerleri daha dayanıklı olabilir. Hücreler arasında bu tür

farklı yanıtlar, toplam canlı hücre sayısındaki değişikliklere yol açabilir. Bu heterojenite, popülasyon düzeyinde hücrelerin çoğalma yeteneğini etkilemiş olabilir, fakat tüm hücreler bu durumdan etkilenmediği için, genel canlılık oranı yüksek kalabilir.

Artan konsantrasyonlarda TiO_2 NP'ler ile etkileşen EAT hücrelerinin morfolojisinde meydana gelen değişiklikler invert mikroskop ve akım sitometri ile değerlendirildiğinde, hücre boyutu ve granüler yapısının TiO_2 NP'lerinin konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Hücrelerin yaklaşık boyutunda nispeten azalma, inkübasyon süresi arttıkça (48. ve 72. saatler) daha yüksek TiO_2 NP konsantrasyonlarında anlamlı azalma gözlenirken, hücre içi kompleksitesinin tüm TiO_2 NP konsantrasyonlarında ve ilerleyen inkübasyon süresi ile orantılı olarak arttığı gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak;

NIH 3T3 ve insan fibroblast (HFW) hücrelerini 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda TiO_2 NP'ler ile 8 saat inkübe ettikten sonra akım sitometri ile SSC saçılımının analiz edildiği bir çalışmada, hücresel granüler yapının arttığı gösterilmiştir. Bu durumun, TiO_2 NP'lerin memeli hücreleri tarafından hücre içine alındığını ve biriktiğini düşündürmekte olduğu belirtilmiştir (Huang ve ark., 2009).

2 μm ve 30 nm boyutunda 5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında TiO_2 partikülleri ile A549 hücrelerini 24 saat inkübe ettikten sonra, hücrelerdeki morfolojik değişimleri değerlendiren bir çalışmada, akım sitometri ile FSC/SSC grafiği değerlendirilmiş ve 2 μm boyutundaki TiO_2 partiküllerine maruz kalmanın, hücre granülerliğini konsantrasyona bağımlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir. Nano boyutta olan TiO_2 NP'lerin de benzer şekilde hücre granülerliği üzerinde etkisi olduğu ve morfolojik değişim derecesi olarak mikron boyutunun daha etkili olduğu belirtilmiştir (Park ve ark., 2007).

HepG2 hücrelerinde TiO_2 NP'lerin etkileşimlerinin SSC saçılma oranını akım sitometri ile ölçerek değerlendiren bir çalışmada bu saçılma oranındaki değişimin NP'lerin hücre içine alınması, hücre yüzeyine bağlanması veya hücre zarı ile NP etkileşiminden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$) TiO_2 NP'leri ile muamele edilmiştir. Bu çalışmada, TiO_2 NP'leri %0.1 BSA içeren DMEM veya %10 FBS içeren DMEM ortamlarında süspansiyon edilerek hazırlanmış ve her iki ortam kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. TiO_2

NP'lerin her iki ortamda da kontrol grubuna kıyasla, SSC oranlarında artan konsantrasyonlarla orantılı olarak anlamlı bir artışa neden olduğu ancak iki ortam arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ifade edilmiştir (Prasad ve ark., 2014).

SH-SY5Y hücreleri ile yapılan bir çalışmada 0.1, 1, 10 ve 100 µg mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'ler ile 24 saat kültür sonrası hücre morfolojisindeki değişiklikler ışık mikroskobu, akım sitometri ve TEM ile değerlendirilmiştir. En yüksek konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerin varlığında, hücrelerin yaklaşık %50'sinin morfolojisinin değiştiği bildirilmiştir. Akım sitometrik analizler ile TiO₂ NP konsantrasyonlarının artışıyla birlikte, hücre boyutu ve hücre içi yoğunluğun arttığı, TEM görüntülemesi ile de çoğu TiO₂ NP'lerin sitoplazma ve lizozomlarda birikmiş olduğu, çekirdekte birikim olmadığı gözlenmiştir. Bu değişikliklerin, hücre içi sinyal iletiminin ve yapısal düzenin TiO₂ NP'ler tarafından bozulabileceği ve mikrotübüllerin kararsızlığını artırarak nörotoksisiteye katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Mao ve ark., 2015).

TiO₂ NP'lerin EAT hücre morfolojisi üzerine olan etkisini araştırdığımız çalışmada, daha uzun süreli inkübasyon ve yüksek konsantrasyonların hücre boyutunda nispeten bir azalma ve hücre içindeki yapısal kompleksiteyi arttırdığı gösterildi. Hücrelerin boyutunda nispeten bir azalma gözlenmesi, TiO₂ NP'lerinin hücre içine alındıktan sonra hücrelerin fiziksel büyüklüklerini etkileyebileceğini göstermektedir. Ancak, inkübasyon süresi arttıkça (48. ve 72. saatler), daha yüksek konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerin bu azalma üzerinde anlamlı etkiler yaptığı gösterildi. Hücre içi kompleksitenin artması, TiO₂ NP'lerinin hücre içindeki organellerle etkileşimini ve bu etkileşimlerin hücrenin metabolik durumunu etkilediği ve hücre fonksiyonlarını değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde yapılan TiO₂ NP'lerin etkilerini araştıran çalışmalarda, hücrelerde hem apoptotik ölüm süreçlerinin gözlemlendiği hem de bu süreçlerin meydana gelmediği durumlar bildirilmiştir. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Apoptoz belirteçlerinin mRNA seviyelerindeki değişikliklerinin incelendiği bir çalışmada, TiO₂ NP'lerin HCT116 hücre hattında apoptozu indüklediği, bunun yerine hücre büyümesini desteklerken, HT29 hücrelerinde apoptozu aktive ettiği ifade edilmiştir (Kukia ve ark., 2018).

Farklı bir çalışmada, TiO₂ NP'lerin HepG2 hücre hattında apoptoz sürecini tetiklemediği ve sitotoksik bir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Ahamed ve ark., 2017).

TiO₂ NP'leri ile inkübe edilen AGS hücreleri ile yapılan bir çalışmada, apoptozun dramatik bir şekilde azaldığı ve bu duruma paralel olarak hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki dengenin kanser gelişimi için önemli bir mekanizmayı yansıtabileceği vurgulanmıştır. Elde edilen bulgular, TiO₂ NP'lerin hücre döngüsü ve apoptozda yer alan çok sayıda genin ekspresyonunu modüle etmedeki rolünü gösteren mikroarray gen ekspresyon profilleriyle desteklemiş ve hücre içi fizyolojik süreçleri etkileyebileceği ifade edilmiştir (Botelho ve ark., 2014).

Bu çalışmaların yanı sıra, bazı kanser hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve bu süreci etkileyen mekanizmaların ortaya konduğu gösterilmiştir. A549 hücreleri ile yapılan çalışmada konsantrasyona (10-100 µg/mL) ve zamana (6-48 saat) bağlı olarak azalma, ROS üretiminde ve apoptotik cisimlerin oluşumunda artış olduğu bildirilmiştir (Srivastava ve ark., 2013).

TiO₂ NP'lerine maruz kalan insan mide kanseri (MKN-45) hücreleri ile ilgili bir çalışmada, hücre ölümünün gözlemlendiği ve apoptozun indüklendiği belirtilmiştir. Ayrıca, azalan proliferasyon, artan TiO₂ NP konsantrasyonu ve maruziyet süresi arasında doğrudan bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Nasr ve ark., 2018).

Rat adrenal medullasından kökenlenen PC12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, anataz formdaki TiO₂ NP'leri ile 24 saat muamele sonucunda apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayısında belirgin bir artış gözlemlendiği ifade edilmiştir. 25-200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerin, mitokondriyal zarın geçirgenliğini bozması, aşırı ROS üretimi ve G2/M fazı duraklamasından elde edilen bulguların apoptozun nedeni olabileceği belirtilmiştir (Wu ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda, EAT hücreleri, TiO₂ NP'ler ile inkübe edildikten sonra apoptotik ve nekrotik hücrelerin analizi Annexin V/PI boyaması yapılarak akım sitometri ile analiz edildiğinde yüksek konsantrasyonların apoptotik yanıtın üzerinde zamanla değişen etkilerinin olduğu gözlemlendi. Özellikle, 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerin 24. saatte apoptotik süreci baskıladığı görülürken, 48.ve 72. saatlerde bu etkinin giderek azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerin hücrelerdeki apoptotik etkilerini zamanla değiştirdiğini ve bu etkinin uygulama süresi ile ilişkili olarak farklılaştığını göstermektedir. 100 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerin etkisinin zamanla arttığı 72. saatte apoptoz sürecini baskılama etkisinin belirgin olduğu gözlemlendi.

Bununla birlikte nekrotik hücre oranları incelendiğinde, özellikle 48. saatte 100 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerin ölü hücre oranlarının azalmasında daha belirgin bir etkisinin olduğu görüldü. 72. saatte ise, daha düşük konsantrasyonlardaki (25 µg/mL) TiO₂ NP'lerin, hücrelerin hayatta kalma üzerine olumlu etki sağladığı tespit edildi. Elde edilen bulgular, TiO₂ NP'lerin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre ölümüne karşı etkisini ortaya koymaktadır.

Literatürde, TiO₂ NP'lerinin hücre döngüsü üzerine etkilerinin farklı hücrelerde gösterildiği çalışmalar incelenmiştir. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

TiO₂ NP'lerine kronik maruziyetin A549 hücreleri üzerindeki hücresel yanıtlarının incelendiği çalışmada 2.5, 5, 10 ve 50 µg/mL TiO₂ NP'lere maruziyetin, hücre proliferasyon hızında konsantrasyona bağımlı bir azalma gösterdiği bildirilmiştir. TiO₂ NP'lerin hücre proliferasyonu üzerindeki fizyolojik etkilerinin nedeni olarak hücre döngüsünü takip ettiklerinde hücrelerin G1 fazındaki oranının, 50 µg/mL TiO₂ NP'lere kronik olarak maruz bırakıldığında, kontrol hücrelerine kıyasla ılımlı ancak anlamlı olarak daha yüksek bulunduğu ifade edilmiştir. Bu artışın, S fazındaki hücre oranında 10 ve 50 µg/mL TiO₂ NP'lere 2 ay boyunca maruz kalma sonrası gözlenen bir azalma ile korelasyonunun bulunduğu gösterilmiştir. Bu durumun, hücrelerin konsantrasyona bağımlı bir trend izleyerek hücre döngüsünün ilerlemesinde orta derecede bir yavaşlama yaşadığını ifade etmişlerdir (Armand ve ark., 2016).

Daha önce nanotoksikolojide kullanılan üç farklı ortamda, insan akciğer epitelyal hücreleri üzerinde (BEAS-2B) 10-100 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerin varlığında sitotoksikite ve genotoksikite etkilerinin incelendiği bir çalışmada. hücreler üzerine etkilerini incelemek için TiO₂ NP'lerini keratinosit büyüme ortamı (KGM) ve %0.1 BSA içeren ortam (KB), %0.6 BSA ve %0.001 DSPC (1,2-dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfokolin, bir yüzey aktif madde) içeren PBS ortamı (dağılmayı iyileştirebilen bir ortam, DM) ve %10 FBS içeren medium ortamında (KF) hazırlanmıştır. Üç farklı ortamda hazırlanan TiO₂ NP'ler ile, 24 saat muamele edilen hücrelerde, 100 µg/mL'ye kadar herhangi bir konsantrasyonda sitotoksik etki olmadığı ifade edilmiştir. KF ortamında TiO₂ NP'ler ile 24 saat muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde ortam bileşiminin hücre döngüsü üzerindeki etkisi gösterilmiştir. KF ortamında TiO₂ NP'ler ile muamele edilen hücrelerin, konsantrasyona bağlı olarak S fazındaki hücrelerin oranında anlamlı bir artış gösterdiği,

ancak KB ve DM ortamlarında TiO₂ NP'ler ile muamele edilen hücrelerde herhangi bir değişim gözlenmediği belirtilmiştir (Prasad ve ark., 2013).

TiO₂ NP'lerinin FBS içeren ve içermeyen iki farklı ortamda hazırlanarak insan kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 hücrelerine 6 ile 24 saati süre ile uygulandığı bir çalışmada, her iki ortam içinde hücre döngüsü ilerlemesinde anlamlı değişiklikler gözlenmediği bildirilmiştir (Zijno ve ark., 2015).

İnsan karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinin Ag katkılı TiO₂ NP'lerinin artan konsantrasyonları ile (0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL) 24 saat kültüre edildiği çalışmada, TiO₂ NP'lerinin hücre canlılığı ve hücre döngüsü ilerlemesini anlamlı olarak etkilemediği ifade edilmiştir. Ayrıca, %5 Ag-katkılı TiO₂ NP'leri'nin konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı ve (100 µg/mL, 24 saat) sub-G1 fazında önemli bir şekilde hücre birikimi oluşturduğu bildirilmiştir (Ahamed ve ark., 2017).

Artan konsantrasyonlardaki (50, 100, 200 µg/mL, 24 saat) TiO₂ NP'lerinin insan meme kanseri (MCF-7) hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada hücre canlılığının korunduğu ve hücre döngüsünde duraklamaya neden olmadığı gösterilmiştir (Ahamed ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda, artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile kültür edilen EAT hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda yapılan PI boyamasıyla elde edilen hücre döngüsü analizlerinde, TiO₂ NP konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte S fazındaki hücre popülasyon oranlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Özellikle 24. ve 72. saatlerde, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerin varlığında S fazındaki hücre popülasyon oranları, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttı. Buna karşılık, 72. saatte aynı konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerin varlığında G0/G1 fazındaki hücre popülasyon oranlarında ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bu durum, hücre proliferasyon bulgularımızla uyumlu olarak TiO₂ NP'lerinin hücrelerin G0/G1 fazındaki duraklama süresini kısaltarak hücrelerin daha hızlı bölünmeye geçiş yapmasına neden olabileceğini gösterebilir. 48 saatte, S fazındaki hücre popülasyon oranlarında artış gözlenmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Elde edilen bulgular, TiO₂ NP'lerinin hücre döngüsünü etkileyebileceğini ve hücrelerin bölünme hızlarını artırabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu etkilerinin sadece konsantrasyona bağlı değil inkübasyon süresine de bağlı olarak değişebileceği ve zamanla daha belirgin hale geldiği

ifade edilebilir.

Bununla birlikte, TiO₂ NP'lerinin hücreler üzerindeki etkilerinin genel olarak oksidatif mekanizmalar aracılığıyla tetiklendiği ve hücre döngüsünün yavaşladığı, literatürdeki çalışmalarda yaygın olarak bildirilmektedir (Johnston ve ark., 2009; Shi ve ark., 2013; Wang ve ark., 2011).

Nöronal hücrelerin (PC12) 24 saat süre ile artan konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µg/mL) TiO₂ NP'lerle 24 saat süreyle muamele edildiği bir çalışmada, ROS ve JNK/p53 aracılı apoptoz yoluyla nöronlarda hasar oluşabileceği ve p53/p21 yolunun aktivasyonu ile hücre döngüsünün G2/M aşamasında duraksamasına neden olabileceği ifade edilmiştir (Wu ve ark., 2010).

TiO₂ NP'lerine 24 saat süreyle maruz kalan A549 hücreleri ile yapılan çalışmada, kontrol grubuna kıyasla, artan konsantrasyona (50, 75 ve 100 µg/mL) bağlı olarak hücre döngüsünün G2/M fazında durakladığı gösterilmiştir (Kansara ve ark., 2015).

TiO₂ NP'lerinin SH-SY5Y hücreleri üzerine etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirildiği çalışmada, hücre canlılığında nispeten bir azalma gözlemlendiği ve bu durumun TiO₂ NP'lerinin hücre bölünmesine müdahale edip etmediğini belirlemek amacıyla yapılan hücre döngüsü analizinde, S fazındaki hücre popülasyonunda nispeten bir artış ve G0/G1 fazında ise azalma olduğu ifade edilmiştir (Lojk ve ark., 2020).

TiO₂ NP'lerin, hücrelerde ROS seviyelerinde artışa yol açarak oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. Bununla birlikte, TiO₂ NP'lerinin sitotoksik etkileri hücre türüne, konsantrasyona ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bazı araştırmalarda TiO₂ NP'lerinin hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturmamakla birlikte, yine de ROS üretimini artırdığını bunun her zaman hücre hasarıyla sonuçlanmadığı ortaya koyulmuştur (Botelho ve ark., 2014, Runa ve ark., 2016).

150 µg/mL TiO₂ NP'ler ile 3 saatlik inkübasyon süresi sonrası, AGS hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla oksitlenmiş glutatyon (GSSG) seviyelerinde artış gözlenirken, hücre büyümesinde herhangi bir olumsuz etki gözlenmediği bildirilmiştir (Botelho ve ark., 2014).

Ayrıca, TiO₂ NP'lerin akciğer hücrelerine olan toksisitesi hücre içi ROS üretimi ve mitokondriyal hasar ile ilişkilendirilmiştir (Jugan ve ark., 2012). PC12 hücrelerinde TiO₂

NP'lerin ROS üretimini artırarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olduğu, bu durumun da hücrel hasara ve toksik etkilere yol açtığı belirtilmiştir (Wu ve ark., 2010).

HeLa hücrelerinin TiO₂ NP'leri ile inkübe edilmesine yanıt olarak 84 farklı oksidatif stresle ilişkili genin değişimini taramak için PCR array'lerin kullanıldığı bir çalışmada, peroksiredoksin ailesinin dört genin ifadesini değiştirdiği ve oksidatif stres yanıtının TiO₂ NP'lere özgü olduğu gösterilmiştir. Polistiren NP'lerin bu genlerin ifadesini değiştirmediği ayrıca, TiO₂ NP'lerinin yüzeyine adsorplanan serum proteinlerinin koruyucu etkisi olduğu, ancak serum proteinleri yoksa TiO₂ NP'lerinin sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu sonuçların, protein-TiO₂ NP komplekslerinin hücrelerde benzersiz bir oksidatif stres yanıtına yol açtığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, sitotoksositeye yol açmayan ancak daha ince hücrel değişikliklere neden olabilen düşük konsantrasyonlardaki NP'ler için hücrel yanıtların incelenmesinin önemi vurgulanmıştır (Runa ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda, EAT hücre popülasyonunda CD11b⁺ hücrelerde artan TiO₂ NP konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak hücre içi ROS üretiminin arttığı görüldü. 24. saatte, en düşük konsantrasyondaki (25 µg/mL) TiO₂ NP'lerinin varlığında dahi, ROS düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterildi. 72. saatte, yüksek konsantrasyonlardaki (100 µg/mL ve 200 µg/mL) TiO₂ NP'lerinin varlığında ROS düzeylerinde önemli artışlar gözlemlendi. Ayrıca, TiO₂ NP'lerin hücrelerin canlılığını korumakla birlikte ROS seviyelerini arttırdığı gösterildi. Elde ettiğimiz bulgura benzer olarak, 100 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'lerinin SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığını etkilemediği ancak, ROS üretimini anlamlı bir şekilde artırabileceği gösterilmiştir (Mao ve ark., 2015). TiO₂ NP'leri ile kolon kanseri hücreleri (Caco-2) üzerinde yapılan çalışmalarda, ROS duyarlı floresan boya kullanılarak hücre içindeki ROS üretiminde bir artış gözlemlendiği ifade edilmiştir (Angelis ve ark., 2013).

Çalışmamızda, EAT hücre popülasyonunda CD11b⁻ hücrelerde, 100 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP varlığında, ROS düzeyleri tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, 48. saatte nispeten bir azalma göstermiş, ancak 72. saatte tekrar artışa geçerek TiO₂ NP konsantrasyonları arasında en yüksek seviyelere ulaştığı gözlenmiştir. CD11b⁺ hücrelerde ise ROS düzeyleri, 100 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP varlığında 48. saatte anlamlı bir artış gösterirken 72. saatte azalma eğilimine girdiği görüldü. 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP varlığında CD11b⁺ hücrelerde en

güçlü etkiyi sağladığı ve zamanla bu etkinin daha belirgin hale geldiği tespit edildi. Elde ettiğimiz bulgular ROS düzeylerindeki artışların hücre tipine göre farklılıklar gösterdiğini işaret etmekte ve hücrelerin artan TiO_2 NP konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak nasıl tepkiler verdiğinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

TiO_2 NP'leri periferel kan mononükleer hücreleri (PMBC) ile 48 saat inkübe edildikten sonra ROS seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. PBMC'lerin bileşenlerinden herhangi bir alt popülasyonda ROS üretimi yönünde bir eğilim olup olmadığı incelendiğinde, en büyük oranın monositler olduğu tespit edilmiştir. Toplam CD14^+ monosit hücre popülasyonunun %80'inden fazlasında ROS üretimi olduğu görülmüştür. Bu nedenle, ortaya çıkan artan ROS üretiminin büyük olasılıkla öncelikle NADPH oksidaz gibi hücrel bir kaynaktan geldiği ve doğrudan TiO_2 'nin kimyasal reaktifliğinden kaynaklanmadığı vurgulanmaktadır. Ancak, TiO_2 NP'nin kimyası veya kristal yapısı aracılığıyla düşük seviyeli ROS üretiminin monositler tarafından ROS tepkisini tetiklemekten sorumlu olup olmadığı henüz net değildir (Schanen ve ark., 2009).

Mu ve ark. (2000), makrofajlar tarafından üretilen ROS'un titanyum iyonu salınımını indüklediğini, ancak metal iyonu salınımının FBS, penisilin ve streptomisin tarafından önlendiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, bu fagositer hücrelerin *in vivo* olarak inflamatuvar bir yanıt oluşturmada ROS üretiminin çoğunluğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Park ve ark., 2009). Hücrelerde fizyolojik süreçlerin ürünü olan ROS'un aşırı üretilmesinde hücrel hasara neden olabilmekte ve kanser gelişiminde, makromoleküllerin oksidasyonu ve nitasyonu yoluyla önemli bir rol oynamaktadır. ROS, bu süreçlere özgü hücre sinyal yollarının tetiklenmesi yoluyla hücrel proliferasyon ve anjiyogenez gibi çeşitli kanser belirtilerini etkiler ve ayrıca tümör ortamında anjiyogenezi teşvik eden makrofajlar ve düzenleyici T hücreleri gibi temel bağışıklık hücrelerinin işlevini düzenleyebilir. Endotel, bağışıklık ve tümör hücreleri içindeki sinyal yollarıyla anjiyogenezi ve tümör oluşumunu teşvik eden ROS'un en olası kaynağı olarak NADPH oksidaz enzimleri ailesi olduğu vurgulanmaktadır (Harrison ve ark., 2014). Enzimler, ROS oluşumunun ana kaynaklarıdır. Bunlardan, tek işlevi ROS üretmek olan NADPH oksidazlar (NOX) birçok redoks bağımlı sinyal yollarını düzenleyen enzimlerdir (Skonieczna ve ark., 2017). NOX ailesi, elektronları NADPH'den moleküler oksijene aktararak, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 olarak indirgeme yeteneğine sahip bir transmembran proteinleri

grubudur (Bedard ve ark., 2007). NOX'un işlevleri, kanserli olmayan hücrelerde iyi bir şekilde tanımlanmışken, NOX tarafından üretilen ROS'un kanser ve kök hücrelerin biyolojisi üzerindeki etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Maraldi ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar, NADPH oksidaz bağımlı ROS'un protümör süreçleri teşvik ettiğini ortaya koymaktadır. NOX'un ROS üretimi yoluyla tümör hücrelerinin proliferasyonu ve istilas için pro-onkojenik hayatta kalma sinyalleri sağladığı oksidatif bir mikroçevrenin gelişiminde kritik bir rol oynayabileceği düşüncesi üzerinde durulmaktadır (Han ve ark., 2016). Başlangıçta, NOX'ların yalnızca konakçıyı patojenik organizmalara karşı korumak için fagositik hücrelerde var olduğu düşünülüyordu. Ancak, son yıllarda, NOX'ların homologları kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli farklı hücre ve doku tiplerinde keşfedildi (Lambeth, 2004). Kanser gelişimi sırasında NOX'ların etkilediği ilgili sinyal yollarının daha net anlaşılması, yeni terapötik yaklaşımlar ortaya çıkaracaktır. Bu bağlamda, son çalışmalar, NOX aktivitesinin veya mRNA ekspresyonunun akciğer kanserinde arttığını ve NOX türleri tarafından ROS üretiminin hem tümör büyümesini hem de akciğer kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını güçlü bir şekilde etkileyebileceğini öne sürmektedir (Meitzler ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda, NADPH oksidaz enzim aktivitesi ölçümünde, EAT hücre popülasyonunda hem CD11b- hem de CD11b+ hücrelerde enzim aktivitesinin TiO₂ NP konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlardaki TiO₂ NP varlığında, EAT hücrelerinde özellikle 24. saatte güçlü etkiler gösterdiği bulundu. 48. saatte, 50 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP varlığının dahi ROS üretimini artırmada etkili olduğu ve bazı konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerinin zamanla etkisini daha fazla gösterebileceği ifade edilebilir. 100 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'lerinin 72. saatte assit sıvısı hücrelerinde anlamlı artış sağladığı gözlemlendi, ancak etki daha düşük seviyelerde görüldü. Bu durum, yüksek konsantrasyonların etkisinin zamanla daha belirgin hale gelebileceğini ve uzun süreli etkilerinin farklılaşabileceğini düşündürmektedir. CD11b+ hücrelerde konsantrasyon arttıkça ROS üretiminde belirgin bir artış gözlemlendi. Bu veriler, hücrelerin konsantrasyona duyarlı olduğunu ve yüksek konsantrasyonlarda daha fazla ROS üretime yol açtığını göstermektedir. 48. saatte 25 µg/mL gibi daha düşük TiO₂ NP konsantrasyonların daha belirgin bir etki gösterdiği, 72. saatte ise daha yüksek konsantrasyonların (özellikle 200 µg/mL) etkisinin daha fazla arttığını

görüldü. Bu, zamanla konsantrasyon etkisinin farklılaştığını ve özellikle yüksek TiO₂ NP konsantrasyonlarının uzun vadede etkili olduğunu ortaya koymaktadır. EAT hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir tepki gösterse de, etkisinin zamanla azalma eğiliminde olduğu görüldü. CD11b+ hücreler ise, daha düşük konsantrasyonlardaki TiO₂ NP varlığında dahi NADPH oksidaz aktivitesinin arttığı ve daha yüksek konsantrasyonlarda zamanla daha fazla etkili olduğu görüldü. CD11b+ hücrelerin düşük TiO₂ NP konsantrasyonlarına da duyarlı olduğunu ve erken zaman dilimlerinde dahi ROS üretiminde artış gösterdiğini belirlemek, immün yanıtlarını anlamada önemli bir veri sunmaktadır.

Çalışmamızda, TiO₂ NP'lerinin asit sıvı içeriğindeki immün sistem hücrelerinin yanıtını nasıl etkilediğini incelemek amacıyla CD11b+ olan nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerin yanı sıra, CD3+ T hücrelerinin dağılımı incelendi. Elde edile bulgulara göre, CD11b+ hücre popülasyonunu artırıcı bir etkisi olduğu görüldü. 72. saatte gözlenen artışın, 24. saate göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu, NP'lerin hücre üzerinde başlangıçta daha güçlü bir etki oluşturduğu, ancak zamanla etkilerinin bir miktar azaldığı görülmekle birlikte uzun süreli inkübasyonda da bu hücreleri etkileyerek popülasyonunu kontrole göre artırmaya devam ettiği görüldü. TiO₂ NP'lerinin etkisi, konsantrasyon ile birlikte değişim göstererek, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında daha yüksek artışlar gözlemlendi. Yüksek konsantrasyonların, hücreleri daha fazla uyarak fagositik hücrelerin artışını tetiklemede konsantrasyon bağımlı bir etkisinin olduğu gösterildi. CD3+ T hücrelerinin dağılımı incelendiğinde, 24. saatte daha belirgin artışlar gözlenirken, 48 ve 72. saatlerde artışların nispeten daha düşük olduğu tespit edildi. Bu, TiO₂ NP'lerinin erken aşamada immün sistem hücrelerini güçlü bir şekilde etkileyebileceğini, ancak etkilerinin zamanla azalabileceğini göstermektedir. Yine de, yüksek konsantrasyonların (200 µg/mL) T hücre sayısını artırmadaki etkinliğinin, düşük ve orta konsantrasyonlardan daha fazla olduğu görüldü. TiO₂ NP'lerinin immün sistemi aktive etme potansiyeli gösterdiği, T lenfositlerinin proliferasyonu ve aktivasyonunda artış sağladığı, CD11b+ hücrelerin aktive olmasını sağlayarak immün yanıtını güçlendirebileceği veya düzenleyebileceği, potansiyel olarak inflamasyonu tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Kanserin temel karakteristik özelliklerinin yanı sıra, inflamasyonun tümör progresyonunda kritik rolü olan bir bileşen olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir (Mantovani ve Scia,

2010). Kanserdeki inflamasyonun bu rolünün merkezinde, özellikle makrofajlar ve T hücreleri olmak üzere hem efektör T hem de özellikle T düzenleyici (Treg) hücrelerinin etkisi vardır (Flavell ve ark., 2010). Mevcut kanıtlar, tümörle ilişkili makrofajların ve nötrofillerin tümörijenik olduğunu ve bu tümörler içindeki artan yoğunluklarının prostat, göğüs ve akciğer olmak üzere birçok kanserde sağ kalım oranının azalmasına yol açtığını ileri sürülmektedir (Qian ve Pollard, 2010). Tümör mikroçevresinde, makrofajların sürekli toplanması, onları aktive ederek, ROS ve VEGF gibi pro-anjiyojenik büyüme faktörlerinin salınmasına yol açmaktadır. Ek olarak, makrofajlar nötrofillerle birlikte diğer hücre tiplerinden daha fazla ROS üretir. Bu durum, fagositer hücrelerin ve ilişkili NOX2'nin tümör anjiyogenezinde potansiyel olarak anahtar modülatörler olduğunu göstermektedir (Coso ve ark., 2012). Yüksek Treg hücre yoğunluğu kötü prognosisla yakından ilişkilidir. İnsan ve fareler üzerinde yapılan araştırmalarda Treg hücrelerinin çeşitli tümör tiplerine sızdığı ve tümör mikroçevresinde miktarlarının fazla olduğu gösterilmiştir (Takeuchi ve Nishikawa, 2016). Tipik olarak Treg hücreleri ve MDSC'ler dahil olmak üzere immün düzenleyici hücrelerin, tümöre spesifik T hücresi immün tepkisini derinden baskıladığı iyi bilinmektedir. TAM'ler de MDSC'ler ve Treg hücreleriyle etkileşime girerek kötü huylu bir immün baskılama üçgeni oluşturabilir (Munn Bronte, 2016; Tie ve ark., 2022). Yapılan bir çalışma, Treg hücrelerinin efektör T hücrelerini baskılama mekanizmasının ROS'un etkileriyle ilişkilendirilebileceğini öne sürmüştür. Oksidanlar, Treg fonksiyonunun terapötik modülasyonu için potansiyel yeni bir hedef olabileceğini bildirmektedir (Efimova ve ark., 2011). Sitokinler, immün yanıtı düzenlemek ve aracılık etmek için çok çeşitli işlevlere sahip olan moleküllerdir. Sitokin düzeyleri, immün sistemdeki istenmeyen veya toksik reaksiyonların bir göstergesi olarak kullanılabilir. Belirli sitokinlerin, kimyasallar mikro ve makromoleküler ilaçlar için olumsuz immün yanıtının göstergeleri olarak özgüllüğü ve geçerliliği kanıtlanmışken, mühendislik ürünü nanomaddelerin immunotoksitesini tahmin etmek ve izlemek için bu sitokinlerin uygulanabilirliği üzerine araştırmalar devam etmektedir (Mahmoud Karen, 2013). Kanseri tedavisi ve immün uyarıcılar olarak *in vivo* uygulamalara NP teknolojilerinin entegrasyonu, nanomalzemenin immünojenitesini karakterize etmek ihtiyacının gerekliliği vurgulanmaktadır (Schanen ve ark., 2009). Tümör mikroçevresindeki immün sistem hücrelerinin tüm eylemleri sitokin ekspresyonuyla sonuçlanır. Tümör mikroçevresindeki çeşitli hücre tiplerinden üretilen pro-

inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin, antitümör veya tümör destekleyici immüitenin gelişimini şekillendirebileceği bilinmektedir (Chatterjee ve ark., 2013).

Bu çalışmada, TiO₂ NP'lerinin immün yanıt üzerindeki etkilerini daha iyi incelemek amacıyla, PMA bulunan ve bulunmayan sitokin karışımları hücrelere uygulanarak inflamatuvar sitokin düzeyleri değerlendirildi.

Yapay bir uyarıcı olmasına rağmen, PMA, özellikle fagositer hücreleri incelemek için sıkça tercih edilir, çünkü PMA, hücre içinde belirli sinyal yollarını aktive eder ve bu da immün yanıtı tetikler (Goel ve ark., 2007). PMA, hücre zarını geçerek protein kinaz C (PKC) enzimini aktive eder. PKC'nin aktivasyonu, hücre içindeki diğer sinyal yollarını, özellikle PI3K ve MAPK yollarını uyarır. Bu süreçlerin sonucunda, NADPH oksidaz kompleksinin bileşenlerinin fosforilasyonu ve yer değiştirmesi gerçekleşir. NADPH oksidazı aktive eden sinyal yollarını tetikleyerek, ROS üretimini artırır (Damascena ve ark., 2022).

PMA, immün sistemin aktivasyonunu simüle ederek sitokin salınımını teşvik etmektedir. Bu mekanizma, araştırılan etken maddelerin sitokin salınımı üzerindeki potansiyel artırıcı veya baskılayıcı etkilerini daha net bir şekilde ortaya koymaktadır.

İnsan makrofajlarının TiO₂ NP'leri ile etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada, IL-1β, IL-2, IL-5 ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin yanı sıra anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-10'un salgılandığını tespit etmişlerdir (Borgognoni ve ark., 2015).

TiO₂ NP'lerine maruz kalan peritoneal makrofajların incelendiği bir çalışmada, IL1β, IL6, TNFα, CCR7 ve indüklenebilir nitrit oksit sentaz (iNOS) mRNA ekspresyonlarının artışı ile aktive olmuş M1 makrofaj yanıtı sergilediğini göstermiştir. Yapılan *in vivo* çalışmada, 21 gün süreyle TiO₂ NP'lerine maruz bırakılan farelerde karaciğer, dalak ve serumda pro-inflamatuvar sitokin üretiminin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular ile, TiO₂ NP'lerin hem dokularda hem de sistemik düzeyde inflamasyonu indüklediğini işaret ettiği belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Bizim çalışmamızda, TiO₂ NP'leri EAT hücre popülasyonu içerisindeki CD11b+ hücrelerde IL-12 üretimini baskımlarken, IL-1β ve IL-10 sitokin düzeylerinin artmasını sağladı. IL-12 üretiminin baskımlandığı ve bu etkinin 72. saate kadar devam ettiği görüldü. 200 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂ NP'ler varlığında, 48. saatte IL-12 üretiminde geçici

bir artış olsa da, 72. saatte bu etkinin kaybolduğu, IL-12 seviyelerinin yeniden azaldığı görüldü. PMA'nın katkısı, hücrelerin uyarılmasına yardımcı olsa da, TiO₂ NP'lerinin etkisinin konsantrasyon ve zamanla farklılık gösterdiği ve yüksek konsantrasyonlarda IL-12 üretiminin genellikle baskılandığı görüldü. IL-1β üretiminde 48. saatteki artışın en belirgin olduğu, 72. saatte ise bu etkinin kısmen azaldığı gözlemlendi. CD11b+ hücre popülasyonunda TiO₂ NP'lerinin IL-10 üretimini artırarak immün yanıtı modüle edebileceği gösterildi. 100 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'lerin varlığında, en yüksek artış 24. saatte gözlenirken, 200 µg/mL konsantrasyonda daha uzun vadede (72. saatte) IL-10 üretiminin en yüksek seviyelere ulaştığı belirlendi. Yapılan analizlerde genel olarak, PMA'nın hücreleri daha aktif hale getirerek bu etkileri güçlendirdiği ve TiO₂ NP'lerinin etkisini daha belirgin hale getirdiği görüldü.

MDSC kavramı, kanserle ilgili bazı çalışmalarda, 'N1' ve 'N2' polarize nötrofil olarak isimlendirilmesi, M1/M2 polarize makrofajların isimlendirmesini taklit etmek için kullanılmaktadır. N1 nötrofilleri klasik nötrofillerin özelliklerine sahipken, 'N2 nötrofilleri' PMN-MDSC'lerin tipik özelliklerine sahiptir. Uygun fenotipik belirteçlerin bulunmaması nedeniyle, aynı faredeki PMN-MDSC'lerin nötrofillerden ayırt edilmesi zor olsa da, antijen sunumu ve sitokinlerle ilişkili genler (örneğin, TNF, IL-1α, IL-1β) dahil olmak üzere birçok immün yanıtla ilişkili gen ve yolakların, PMN-MDSC'lerde arttığı ve bu artışın tümörle ilişkili nötrofillerde daha belirgin olduğu gösterilmiştir (Fridlender ve ark., 2012). Çoğu çalışmadan elde edilen veriler, ARG1 ve ROS'un yukarı regülasyonunun esas olarak PMN-MDSC'lerin immünoşüpresif işlevlerinde yer aldığını, buna karşın immünoşüpresif TGFβ, IL-10 ve PD-L1'in artan ekspresyonunun M-MDSC'ler için daha tipik olduğunu göstermektedir (Gabrilovich ve ark., 2017). Tümör mikroçevresi aynı zamanda TAM birikimi ile de karakterizedir ve birçok çalışma, MDSC'ler ile TAM'ler arasındaki karşılıklı etkileşimleri tanımlamıştır. Bu etkileşimler, immünoşüpresyonu önemli ölçüde artırmaktadır (Ostrand ve ark., 2012). Bu tür bir iletişim, MDSC'ler tarafından immünoşüpresif IL-10 üretiminin artmasına ve TAM'ler tarafından genellikle antitümör etkilerle ilişkilendirilen bir sitokin olan IL-12'nin salgılanmasının azalmasına yol açmaktadır (Beyry ve ark., 2014). Ayrıca, tümör mikroçevresine göç ettikten sonra, M-MDSC'ler TAM'lere farklılaşabilir (Vlerken-Ysla ve ark., 2023).

Mide kanseri veya fibrosarkom modellerinde IL-1β'nin aşırı ekspresyonun da tümör

bölgesinde MDSC'lerin birikmesine yol açtığı gösterilmiştir. Tümör bölgesinde üretilen IL-1 β , makrofaj kemotaksisini indükleyebileceği belirtilmiştir. İnsan mide kanseri hücre hatlarında *in vitro* olarak yapılan çalışmada, IL-1 β , tümör hücreleri tarafından monosit kemotaktik protein (MCP)-1 ekspresyonuna izin vererek makrofajların tümör alanına toplanmasını sağlamıştır. Tümör hücrelerinin, TAM aracılı IL-1 β üretimini kolaylaştırabileceği belirtilmiştir (Li ve ark., 2014).

ROS, immün yanıtları güçlendirmek veya yönlendirmek için farklı mekanizmalar ile işlev görebilir. Özellikle NLRP3 inflammasomunun aktive edilmesi immün yanıt üzerinde güçlü etkilere yol açabilmektedir. IL-1 β tespiti, NLRP3 inflammasomunun aktivasyonunu belirlemede yaygın olarak kullanılan bir göstergedir (Yazdi ve ark., 2010).

TiO₂ NP'lerinin insan dendritik hücrelerini (DC) uyararak IL-1 β üretimini artırdığı gösterilen bir çalışmada, TiO₂ NP'lerin, inflammatuar yanıtları ROS/inflammasom/IL-1 β yolu aracılığıyla tetiklediği belirtilmiş ve NP'lerin immün fonksiyonu bir ROS yolu aracılığıyla modüle ettiği vurgulanmıştır. DC'lerle yapılan uyarım sonucunda T hücre yanıtlarında nasıl bir farklılık oluşturduğu incelendiğinde, T hücre fenotipi ve fonksiyonu üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. T hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve PMA ile birlikte kullanıldığında bu yanıtı sinerjik olarak güçlendirdiği ifade edilmiştir (Schanen ve ark., 2013).

IL-1 β 'ye bağlı inflamasyonda, MDSC'ler tarafından IL-10 üretiminin arttığı ve MDSC'leri aktive ettiği bildirilmiştir. Bu da, daha az inflamasyonlu tümör mikroçevrelerinden izole edilen MDSC'lere kıyasla, makrofajların IL-12 üretimini daha etkili bir şekilde baskıladığını göstermiştir (Bunt ve ark., 2009).

Bizim çalışmamızda, özellikle CD11b+ hücrelerde, immünsüpresif bir sitokin olan IL-10 üretiminin, CD3+ T hücrelerine kıyasla uzun vadede etkilerinin sürdüğünü, antitümör etkilerle ilişkilendirilen IL-12'nin baskılanması, bu hücre grubunun MDSC'ler ve TAM'ler ile ilişkili heterojen bir hücre popülasyonunu barındırdığına işaret ettiği ifade edilebilir. TiO₂ NP'lerin bu hücreler ile etkileşimi sonucunda, ROS üretimi ve NADPH oksidaz enzim aracılığıyla hücresel aktivitelerin daha da artarak sitokin üretimini ve T hücre plastisitesini düzenleyebileceği ve bu durumun EAT hücre popülasyonundaki immün baskılanmayı artırmış olabileceği öngörülebilir.

Ayrıca, NOX2 bağımlı ROS ürünlerinin Th17 ve Treg hücre farklılaşmasının kontrolünde

yer aldığı gösterilmiştir. NOX2'nin CD11b+Gr-1+ myeloid hücrelerin gelişimi ve aktivasyonunun modülasyonu için önemli olabileceğini düşündürmektedir (Lee ve ark., 2017). CD11b+Gr-1+myeloid hücreler, tümörde T hücresi disfonksiyonuna ve antijene özgü T hücresi toleransına neden olan baskılayıcı hücreleri MDSC'leri tanımlamak için kullanılmıştır (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). Bu bulgular ile, NOX2 aktivasyonunun artması CD11b+ myeloid hücreler tarafından sitokin üretimini değiştirebileceğini ve dolayısıyla Th17/ Treg hücrelerinin gelişimini etkileyebileceği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda, CD3+ T hücre popülasyonunda yapılan sitokin analizlerinde, IL-12 üretiminde, zamanla artan bir etki görüldü. Ancak, 48. ve 72. saatlerde IL-12 üretimi artmaya devam etse de, artış oranlarında azalma tespit edildi. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlardaki (100 µg/mL ve 200 µg/mL) TiO₂ NP'lerinin varlığında, IL-12 üretiminin daha fazla artması konsantrasyon bağımlı bir etkisinin olduğunu ve T hücreleri üzerinde daha güçlü aktive edici bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. IL-10 üretim seviyeleri analiz edildiğinde, 200 µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'lerinin IL-10 üretimini en yüksek seviyeye ulaştırdığı görüldü. 24. saatte IL-10 üretimi en yüksek artışı gösterirken zamanla bu artışların azalma eğilimine girdiği görüldü. Bu sonuçlar, TiO₂ NP'lerinin IL-10 üretimindeki etkisinin zamanla azalabileceğini ve başlangıçta daha etkili olduğunu göstermektedir.

CD3+ T hücre popülasyonunda TNF-α üretim seviyeleri analiz edildiğinde, özellikle 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda TiO₂ NP'lerinin TNF-α üretimini artırıcı bir etkisi olduğu görülmektedir. 24. saatte gözlenen artış, TiO₂ NP'lerinin etkisinin daha kısa vadede etkili olduğunu gösterirken, 48. saatte etkisinin biraz daha azaldığı ancak yine de önemli bir artış sağladığı görülmektedir.

Genel olarak, TiO₂ NP'lerinin, CD3+ T hücrelerinde IL-12, IL-10 ve TNF-α üretimini konsantrasyon ve zamana bağımlı şekilde artırıcı etkileri olduğu gözlenirken, 24. saatten sonra etkilerinin zamanla azaldığı görüldü. Ancak, TNF-α üretiminin 48. saatte etkisi azalmaya başlamış olsa da, IL-10 ve IL-12 üretimine göre yüksek düzeyde olmasının dikkat çekici olduğu ifade edilebilir.

TNF-α'nın potansiyel anti-tümör etkileri göz önünde bulundurulduğunda, aynı zamanda tümör destekleyici etkilerinin de ortaya çıkması, bu sitokinin kanser ve tümörle ilişkili

immün yanıtlar üzerindeki karmaşık rolünü açığa çıkarmaktadır. TNF- α 'nın bazı kanser hücrelerinde, hücre dönüşümünü teşvik etme, inflamatuvar yanıtları artırma ve MDSC'lerin aktivitesini artırarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve gelişimini tetiklediği gösterilmiştir (Hu ve ark 2014). Kanser fare modellerinde, anti-TNF ilaçları ile tedavi edilen veya TNFR2 knockout farelerinde tümör büyümesinin azaldığı, bununla birlikte MDSC sayılarında bir azalma gözlenmiştir, bu da TNF'nin, antitümör bağışıklığını baskılayan MDSC'lerin hayatta kalmasını, kümelenmesini veya fonksiyonlarını artırdığını düşündürmektedir (Zhao ve ark., 2012; Ba ve ark., 2016). TNF/TNFR1 reseptör etkileşimi de çoğunlukla pro-inflamatuvar olarak tanımlanmışken, TNFR1 tetiklenmesinin, makrofajlar tarafından IL-12/IL-23 p40 üretimini inhibe edebileceği belirtilmiştir. (Bystrom ve ark., 2018). Ayrıca, TNF- α 'nın bu immünsüpresif etkisinin doğrudan Treg hücrelerin aktivasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bir melanoma fare modelinde, TNF enjeksiyonu, TNFR2'yi eksprese eden hematopoietik hücreler üzerinde etkili olarak tümör metastazını artırmış, bu da Treg hücrelerin sayısında bir artışla ilişkilendirilmiştir (Chopra ve ark., 2013). Benzer bir mekanizma, kolorektal kanser ve hepatokarsinom modellerinde de gözlenmiştir. Tümöre bağlı Treg genişlemesi, anti-TNFR2 monoklonal antikoru ile ortadan kaldırılmıştır (Chang ve ark., 2015). Diğer yandan, fagositer hücrelere ek olarak, T hücreleri de NOX2 aktivasyonu yoluyla ROS üretebilir. Bu, redoks bağımlı sinyal iletimi T hücrelerinin aktivitesini, farklılaşma potansiyellerini etkilemektedir (Jackson ve ark., 2004).

Bizim çalışmamızda, TiO₂ NP'lerinin, CD11b+ hücreleri aktive ederek T hücre yanıtlarını modüle etmesinin yanı sıra, doğrudan T hücreleri ile etkileşime girerek tümör mikroçevresinde sitokin salınımı düzenleyebileceği öngörülebilir. Elde edilen sonuçlar, TiO₂ NP'lerinin EAT hücre popülasyonu içerisindeki immün sistem hücreleri üzerindeki etkilerinin dinamik ve kompleks bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

EAT hücre popülasyonundaki sitokin düzeyleri analiz edildiğinde, IL-12 ve IL-1 β üretiminin, yüksek konsantrasyonlardaki (100 μ g/mL ve 200 μ g/mL) TiO₂ NP'lerinin varlığında, zamanla etkilerinin arttığı gösterildi. IL-10 ve TNF- α üretim seviyeleri analiz edildiğinde, TiO₂ NP'lerinin artırıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Özellikle, yüksek konsantrasyonlar ve daha uzun sürelerde (48. ve 72. saatlerde) TiO₂ NP'lerinin etkisinin daha belirgin hale geldiği tespit edildi. Artan konsantrasyonlarda TiO₂ NP'ler ile PMA'nın

birlikte kullanılması, etkilerinin zamanla daha belirginleştğini göstermektedir.

Tümör mikroçevresinde IL-1 β , MDSC gelişiminde yer alan immün hücreleri ve tümör hücreleri tarafından üretilmektedir. Bu süreç, TNF- α düzeylerinin artması, MDSC'nin immün baskılanması, kanserojenez, tümör büyümesi, invazyon ve kimyasal olarak indüklenmiş tümörlerde metastaz ile ilişkilendirilmiştir. IL-1'in bağışıklık yanıtlarını düzenlemedeki rolü, hem anti-tümör hem de bağışıklık dengeleme süreçlerinde önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Landskron ve ark 2014, Shrihari ve ark 2016). TiO₂ NP'lerinin, EAT hücre popülasyonunda proinflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokin dengesini modüle ederek, antitümör veya protümör immün yanıtların gelişimini şekillendirebileceği belirtilebilir.

In vitro ve *in vivo* çalışmalarda, inflamatuvar sitokinlerin hem kanser hücreleri hem de kanserli olmayan dokular tarafından üretildiği gösterilmiştir (Andersson ve ark., 2000). Bu sitokinler, oksidatif stresi artırarak ve granümatöz nötrofil ve makrofajları aktive ederek hücrel yanıtı etkileyebilir. İnflamatuvar sitokinler ile ROS üretimi arasındaki bu kısır döngü, NP'lerin hücreler üzerindeki potansiyel etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu etkileşim, kanser hücrelerinin ilerlemesi ve tedaviye karşı direnç geliştirmesi gibi biyolojik süreçleri etkileyebilmektedir (Manke ve ark., 2013).

TiO₂ NP'lerinin UV ışınımı uygulanmadan CT26 ve LL2 fare kanser hücreleri ile muamele edildiği bir çalışmada, ROS üretimi ve TNF α , IL-1 β , CXCL2 ve HMGB1 inflamatuvar sitokinlerin mRNA ifadelerinin indüklendiği gözlenmiştir (Fujiwara ve ark., 2015).

Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 20 ve 40 μ g/mL) TiO₂ NP'ler tarafından tetiklenen BEAS-2B hücrelerinde ROS artışının, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve CXCL2 gibi inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarını konsantrasyona bağlı bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2008).

Bu çalışmalara ek olarak, NOX türevi ROS'un etki mekanizmaları ile kanser hücrelerinin çoğalması, invazivliği, metastazı ve anjiyogenezi üzerindeki etkilerine dair önemli bilgiler sunmuştur. Bu bulgular ışığında, NOX2 türevi ROS'un, özellikle altta yatan inflamatuvar etiyolojisi olan kanserlerde, terapötik modülasyon için potansiyel hedefler olabileceği ifade edilmiştir (Weyemi ve ark., 2013; Meitzler ve ark., 2014).

TiO₂ NP'lerinin çeşitli kanser hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu NP'lerin fizikokimyasal özellikleri, uygulanan inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlarının yanı

sıra, etkilerinin hücre türüne özgü olduğu belirlenmiştir (Huang ve ark., 2009; Behzadi ve ark., 2017). Hücrelerin genetik yapıları, metabolik süreçleri ve ortam koşulları gibi faktörlerin çeşitliliği, TiO₂ NP'lerinin hücredeki büyüme, proliferasyon ve apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkilerinin farklılık göstermesine neden olan etmenlerden biri olabileceği düşünülmektedir (Kukia ve ark., 2018).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, TiO₂ NP'lerinin EAT hücre popülasyonu içerisindeki tümör hücrelerinin yanı sıra, innate ve adaptif immün sistem hücreleri ile de etkileşerek, hücre popülasyonlarının artmasına ve NADPH oksidaz enzim aktivitesi ile birlikte ROS artışlarına neden olduğu gösterildi. Ayrıca, TiO₂ NP'lerinin inflamasyonu aktive etme kapasitelerine sahip olduğu ve CD11b⁺ ve CD3⁺ T hücrelerinde sitokin üretimini modüle ederek, EAT hücrelerinin gelişimini destekleyen bir mikroçevrenin oluşumunda potansiyel immünomodülatör etkileri gösterildi.

TiO₂ NP'lerinin hücreler üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması için ayrıntılı bir değerlendirme yapılması ve bu alanda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, NP'lerin tümör immün mikroçevresinde, nasıl davrandıklarının bilinmesi ve bu yolların aydınlatılması, NP'ler tarafından immün baskılayıcı hücrelerin plastisitesinin nasıl değiştiğini anlamak için detaylı araştırılmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

EAT hücre popülasyonunda, sitotoksositeye yol açmayan TiO₂ NP konsantrasyonlarında gerçekleştirdiğimiz çalışma, tümör mikroçevresindeki hücresel değişiklikleri ayrıntılı bir şekilde ortaya koyarak immünomodülatör etkilerinin potansiyelini ve bu etkilerin kanserin immünolojik kontrolüne katkı sağlama olasılığını vurgulamaktadır.

Nanoteknolojik gelişmeler, akılcı tasarımılanan ve doğru koşullarda uygulanan NP'ler ile tümör mikroçevresinin manipüle edilmesini sağlayarak, MDSC'ler, Treg hücreleri veya NOX enzimlerinin hedeflenmesi yoluyla tedavi etkinliğini artıran ve tümör immün yanıtını iyileştirerek kanser tedavisinde daha etkili sonuçlar elde edilmesine olanak tanıyacak yeni bir yaklaşım sunabilir.

7. KAYNAKLAR

- Aberg C, Kim JA, Salvati A, Dawson KA. Theoretical framework for nanoparticle uptake and accumulation kinetics in dividing cell populations. *EPL*, 2013: 101(3); 1-6.
- Aderem A, Underhill DM. Heterogeneity in macrophage phagocytosis. In: Gordon S, Dunn W (eds), *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. Elsevier, Amsterdam 1999; p.:195-213.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003: 3(9); 745-756.
- Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis*, 2000: 59(1); 6-16.
- Ahamed M, Khan MM, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Alshamsan A. Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. *Sci Rep*, 2017: 7(1); 17662.
- Ahamed M, Khan MM, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Alshamsan A. Role of Zn doping in oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles in human breast cancer MCF-7 cells. *Sci Rep*, 2016: 6(1); 30196.
- Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2004: 4(3); 314-320.
- Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*, 2000:192(4); 565-570.
- Annu AA, Ahmed S. Green synthesis of metal, metal oxide nanoparticles, and their various applications. *Handbook of Ecomaterials* 2018; p.: 1-45.
- Armand L, Biola-Clier M, Bobyk L, Collin-Faure V, Diemer H, Strub JM, Cianferani S, Van Dorsselaer A, Herlin-Boime N, Rabilloud T, Carriere M. Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view. *J Proteomics*, 2016: 134; 163-173.
- Armand L, Tarantini A, Beal D, Biola-Clier M, Bobyk L, Sorieul S, Pernet-Gallay K, Marie-Desvergne C, Lynch I, Herlin-Boime N, Carriere M. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology*, 2016: 10(7); 913-923.

- Asadujjaman M, Cho KH, Jang DJ, Kim JE, Jee JP. Nanotechnology in the arena of cancer immunotherapy. *Arch Pharm Res*, 2020: 43(1); 58-79.
- Astefanei A, Núñez O, Galceran MT. Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Anal Chim Acta*, 2015: 882; 1-21.
- Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*, 2009: 4(10); 634-641.
- Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, Piterboth W, Thomas L, Stankovic-Stojanovic K, Louvrier C, Giurgea I, Grateau G, Amselem S, Athina-Karabina S. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 2017: 12(4); e0175336.
- Ba H, Li B, Li X, Li C, Feng A, Zhu Y, Wang J, Li Z, Yin B. Transmembrane tumor necrosis factor- α promotes the recruitment of MDSCs to tumor tissue by upregulating CXCR4 expression via TNFR2. *Int Immunopharmacol*, 2017: 44; 143-152.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007: 87(1); 245-313.
- Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell, *Chem Soc Rev*, 2017: 46(14); 4218-4244.
- Bejarano L, Jordao MJ, Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discov*, 2021: 11(4); 933-959.
- Ben-Sasson SZ, Wang K, Cohen J, Paul WE. IL-1 β strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2013: 78; 117-124.
- Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta-a friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci*, 2018: 19(8); 2155.
- Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JA. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci*, 2004: 75(2); 245-255.
- Beury DW, Parker KH, Nyandjo M, Sinha P, Carter KA, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol*, 2014: 96(6); 1109-1118.
- Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl Phys Lett*, 1982: 40(2); 178-180.
- Borgognoni CF, Mormann M, Qu Y, Schäfer M, Langer K, Öztürk C, Wagner S, Chen C, Zhao Y, Fuchs H, Riehemann K. Reaction of human macrophages on protein corona covered TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine*, 2015: 11(2); 275-282.

- Botelho MC, Costa C, Silva S, Costa S, Dhawan A, Oliveira PA, Teixeira JP. Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells in vitro. *Biomed Pharmacother*, 2014; 68(1); 59-64.
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, 2016; 7; 12150.
- Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell crosstalk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol*, 2009; 85(6); 996-1004.
- Burger D, Turner M, Munkonda MN, Touyz RM. Endothelial microparticle-derived reactive oxygen species: role in endothelial signaling and vascular function. *Oxid Med Cell Longev*, 2016; 2016; 5047954.
- Bystrom J, Clanchy FI, Taher TE, Mangat P, Jawad AS, Williams RO, Mageed RA. TNF α in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases. *Cytokine*, 2018; 101; 4-13.
- Carp O, Huisman CL, Reller A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog Solid State Chem*, 2004; 32(1-2); 33-177.
- Cavazzoni E, Bugiantella W, Graziosi L, Franceschini MS, Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *Int J Clin Oncol*, 2013; 18(1); 1-9.
- Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther*, 2014; 8; 1911-1921.
- Chang LY, Lin YC, Chiang JM, Mahalingam J, Su SH, Huang CT, Chen WT, Huang CH, Jeng WJ, Chen YC, Lin SM, Sheen IS, Lin CY. Blockade of TNF- α signaling benefits cancer therapy by suppressing effector regulatory T cell expansion. *Oncoimmunology*, 2015; 4(10); e1040215.
- Chatterjee S, Das S, Chakraborty P, Manna A, Chatterjee M, Choudhuri SK. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) can induce the generation of Th17 response from naïve CD4⁺ T cells. *Immunobiology*, 2013; 218(5); 718-724.
- Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev*, 2007; 107(7); 2891-2959.
- Chopra M, Riedel SS, Biehl M, Krieger S, von Krosigk V, Bauerlein CA, Brede C, Jordan Garrote AL, Kraus S, Schafer V, Ritz M, Mattenheimer K, Degla A, Mottok A, Einsele H, Wajant H, Beilhack A. Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis*, 2013; 34(6); 1296-1303.
- Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR, Williams ED, Selemidis S. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid Redox Signal*, 2012; 16(11); 1229-1247.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002; 420(6917); 860-867.

- Çiftçi H, Çalışkan ÇE, Öztürk K, Yazıcı B. Yeşil yöntemle sentezlenen biyoaktif nanopartiküller. *BSJ Eng Sci*, 2021: 4(1); 29-42.
- da Silva IL, Veloso ES, Gonçalves INN, Braga AD, Lopes MTP, Cassali GD, Quintanilla M, Simoes RT, Ferreira E. Qa-2 expression levels is related with tumor-infiltrating lymphocytes profile during solid Ehrlich tumor development. *Biomed Pharmacother*, 2017: 92; 750-756.
- Damascena HL, Silveira WAA, Castro MS, Fontes W. Neutrophil activated by the famous and potent PMA (Phorbol myristate acetate). *Cells*, 2022: 11(18); 2889.
- D'arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 2019: 43(6); 582-592.
- De Angelis I, Barone F, Zijno A, Bizzarri L, Russo MT, Pozzi R, Franchini F, Giudetti G, Ubaldi C, Ponti J, Rossi F, De Berardis B. Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*, 2013: 7(8); 1361-1372.
- De la Cruz-Merino L, Chiesa M, Caballero R, Rojo F, Palazón N, Carrasco FH, Sánchez-Margalet V. Breast cancer immunology and immunotherapy: current status and future perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017: 331; 1-53.
- De Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 2023: 41(3); 374-403.
- Dennis KL, Saadalla A, Blatner NR, Wang S, Venkateswaran V, Gounari F, Cheroutre H, Weaver CT, Roers A, Egilmez NK, Khazaie K. T-cell expression of IL-10 is essential for tumor immune surveillance in the small intestine. *Cancer Immunol Res*, 2015: 3(7); 806-814.
- Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GM, Singh KK. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biol Ther*, 2005: 4(12); 1367-1373.
- Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver JL. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nat Nanotechnol*, 2009: 4(7); 411-414.
- Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*, 2012: 41(7); 2740-2779.
- Drexler KE. *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*. Wiley, New York: 1992; p.: 1-1.
- Edwards PP, Thomas JM. Gold in a metallic divided state—from Faraday to present-day nanoscience. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007: 46(29); 5480-5486.
- Efimova O, Szankasi P, Kelley TW. Ncf1 (p47phox) is essential for direct regulatory T cell mediated suppression of CD4⁺ effector T cells. *PLoS One*, 2011: 6(1); e16013.
- Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen über maligne mausentumoren. *Berlin Klin Wochenschr*, 1905: 42; 871-874.
- Elsabaky M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem Soc Rev*, 2013: 42(12); 5552-5576.

- Emmerich J, Mumm JB, Oft M. Autochthonous T cells to the rescue: IL-10 directly activates tumor-resident CD8⁺ T cells. *Oncoimmunology*, 2012; 1(9); 1637-1639.
- Feitosa IB, Mori B, Teles CBG, da Costa AG. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? *Life Sci*, 2021; 264; 118578.
- Fernandes JV, Cobucci RNO, Jatobá CAN, de Medeiros Fernandes TAA, de Azevedo JWV, de Araújo JMG. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res*, 2015; 21; 527-534.
- Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Eng Sci*, 1960; 23(5); 22-36.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat Rev Immunol*, 2010; 10(8); 554-567.
- Frajacono FTT, de Souza Padilha C, Marinello PC, Guarnier FA, Cecchini R, Duarte JAR, Deminice R. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. *Life Sci*, 2016; 162; 47-53.
- Fridlender ZG, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Cheng G, Kapoor V, Horng W, Fridlender G, Bayuh R, Worthen GS, Albelda SM. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One*, 2012; 7(2); e31524.
- Friedenreich CM, Stone CR, Hayes SC. Physical activity and cancer survival. In: *Exercise oncology: prescribing physical activity before and after a cancer diagnosis*. 2020. p. 29-59.
- Fujiwara R, Luo Y, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Cancer therapeutic effects of titanium dioxide nanoparticles are associated with oxidative stress and cytokine induction. *Pathobiology*, 2015; 82(6); 243-251.
- Gabrilovac J, Benkovic B, Burek B, Cepelak I, Boranic M. Immunoregulatory activity of cell-free peritoneal washings of mice with Ehrlich ascitic carcinoma. *Res Exp Med*, 1982; 180(2); 147-154.
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenborg S, Schreiber H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 2007; 67(1); 425.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2009; 9(3), 162-174.
- Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*, 2017; 5(1); 3-8.
- Gao L, Zhang C, Gao D, Liu H, Yu X, Lai J, Wang F, Lin J, Liu Z. Enhanced anti-tumor efficacy through a combination of integrin $\alpha\beta 6$ -targeted photodynamic therapy and immune checkpoint inhibition. *Theranostics*, 2016; 6(5); 627-637.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 2013; 39(6); 1003-1018.
- Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008; 38(3); 371-376.

- Goel G, Makkar HPS, Francis G, Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*, 2007: 26(4); 279-288.
- Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 2005: 213(1-2); 66-73.
- Han M, Zhang T, Yang L, Wang Z, Ruan J, Chang X. Association between NADPH oxidase (NOX) and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis*, 2016: 8(7); 1704-1711.
- Harrison IP, Selemidis S. Understanding the biology of reactive oxygen species and their link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014: 41(8); 533-542.
- <https://gco.iarc.fr/en> Erişim Tarihi: 22.11.2024
- Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, Yu M, Wang J, Jiang X, Feng W, Qin Z, Yin B, Li Z. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol*, 2014: 192(3); 1320-1331.
- Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009: 241(2); 182-194.
- Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*, 2005: 5(7); 521-531.
- Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991: 354; 56-58.
- Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chem Lett Rev*, 2020: 13(3); 223-245.
- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 2007: 7(1-2); 106-118.
- Işık G, Demirezen Ş, Bektaş MS. Tümör nekroz faktör ve servikal kanser bağlantısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 1, 2008: (2); 55-61.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol*, 2004: 5(8); 818-827.
- Jalah R, Rosati M, Ganneru B, Pilkington GR, Valentin A, Kulkarni V, Bergamaschi C, Chowdhury B, Zhang GM, Beach RK, Alicea C, Broderick KE, Sardesai NY, Pavlakis GN, Felber BK. The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. *J Biol Chem*, 2013: 288(9); 6763-6776.
- Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2006: 41(12); 2699-2711.

- Jia J, Wu X, Long G, Yu J, He W, Zhang H, Wang D, Ye Z, Tian J. Revolutionizing cancer treatment: nanotechnology-enabled photodynamic therapy and immunotherapy with advanced photosensitizers. *Front Immunol*, 2023: 14; 1219785.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*, 2008: 21(9); 1871-1877.
- Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol*, 2009: 6(33); 1-27.
- Jugan ML, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 2012: 6(5); 501-513.
- Kalbacova M, Macak JM, Schmidt-Stein F, Mierke CT, Schmuki P. TiO₂ nanotubes: photocatalyst for cancer cell killing. *Physica Status Solidi (RRL) Rapid Res. Lett*, 2008: 2(4); 194-196.
- Kaleoğlu Ö, İşli N. Ehrlich-Lettre Asit Tümörü. *Tıp Fakültesi Mecmuası*, 1977: 40; 978-984.
- Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Hong SH, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009: 386(4); 682-687.
- Kansara K, Patel P, Shah D, Shukla RK, Singh S, Kumar A, Dhawan A. TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environ Mol Mutagen*, 2015: 56(2); 204-217.
- Keller AA, Lazareva A. Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local. *Environ Sci Technol*, 2014: 1(1); 65-70.
- Kim D, Yu MK, Lee TS, Park JJ, Jeong YY, Jon S. Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents. *Nanotechnology*, 2011: 22(15); 155101.
- Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J. Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO₂ Nanoparticles. *Small*, 2010: 6(17); 1908-1917.
- Komanduri R, Lucca DA, Tani Y. Technological Advances in Fine Abrasive Processes. *CIRP Ann*, 1997: 46(2); 545-596.
- Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature*, 1985: 318(6042); 162-163.
- Kukia NR, Rasmi Y, Abbasi A, Koshoridze N, Shirpoor A, Burjanadze G, Saboory E. Bio-effects of TiO₂ nanoparticles on human colorectal cancer and umbilical vein endothelial cell lines. *Asian Pac J of Cancer Prev*, 2018: 19(10); 2821-2829.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 2004: 4(3); 181-189.

- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*, 2014; 2014; 149185.
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2001; 75(1); 1-10.
- Lee K, Won HY, Bae MA, Hong JH, Hwang ES. Spontaneous and aging-dependent development of arthritis in NADPH oxidase 2 deficiency through altered differentiation of CD11b⁺ and Th/Treg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; 108(23); 9548-9553.
- Lettre R, Paweletz N, Werner D, Granzow C. Sublines of the Ehrlich-Lettre Mouse Ascites Tumor, A New Tool for Experimental Cell Research. *Naturwissenschaften*, 1972; 59(2); 59-63.
- Li H, Xu L, Dunbar JC, Dhabuwala CB. Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes. *Urology*, 2003; 61(3); 646-650.
- Li S, Wang W, Zhang N, Ma T, Zhao C. IL-1 mediates MCP-1 induction by Wnt5a in gastric cancer cells. *BMC Cancer*, 2014; 14; 480.
- Liu T, Liu F, Peng LW, Chang L, Jiang YM. The peritoneal macrophages in inflammatory diseases and abdominal cancers, *Oncol Res*, 2018; 26(5); 817-826.
- Loewenthal H, Jahn G. Übertragung-Suersuche mit carcinomatöser Mause-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. *Z Krebsforsch*, 1932; 37; 439-447.
- Lojk J, Repas J, Veranič P, Bregar VB, Pavlin M. Toxicity mechanisms of selected engineered nanoparticles on human neural cells in vitro. *Toxicology*, 2020; 432; 152364.
- Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev*, 2015; 115(4); 1990-2042.
- Mahmoodi NO, Ghavidast A, Amirmahani N. A comparative study on the nanoparticles for improved drug delivery systems. *J Photochem Photobiol B*, 2016; 162; 681-693.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*, 2013; 2013; 942916.
- Mansha M, Khan I, Ullah N, Hussain I, Quarashi A. Synthesis, characterization and visible-light-driven photoelectrochemical hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers. *Int J Hydrogen Energy*, 2017; 42(16), 10952-10961.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 2010; 22(2); 231-237.
- Mao Z, Xu B, Ji X, Zhou K, Zhang X, Chen M, Han X, Tang Q, Wang X, Xia, Y. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. *Nanoscale*, 2015; 7(18); 8466-8475.

- Maraldi T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 2013(1); 271602.
- Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*, 2011: 85(7); 733-741.
- Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, Mellor AL, Munn DH, Gordon S, Libby P, Hansson GK, Shortman K, Dong C, Gabrilovich D, Gabrysova L, Howes A, O'garra, A. Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol*, 2011: 11(10); 693-702.
- Meitzler JL, Antony S, Wu Y, Juhasz A, Liu H, Jiang G, Lu J, Roy K, Doroshow JH. NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology. *Antioxid Redox Signal*, 2014: 20(17); 2873-2889.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005: 16(1); 35-53.
- Mohamed MM, Al-Raawi D, Sabet SF, El-Shinawi M. Inflammatory breast cancer: new factors contribute to disease etiology: a review. *J Adv Res*, 2014: 5(5); 525-536.
- Moon EY, Yi GH, Kang JS, Lim JS, Kim HM, Pyo S. An increase in mouse tumor growth by an in vivo immunomodulating effect of titanium dioxide nanoparticles. *J Immunotoxicol*, 2011: 8(1); 56-67.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001: 19; 683-765.
- Moosavi MA, Sharifi M, Ghafary SM, Mohammadalipour Z, Khataee A, Rahmati M, Hajjarian S, Los MJ, Klonisch T, Ghavami S. Photodynamic N-TiO₂ nanoparticle treatment induces controlled ROS-mediated autophagy and terminal differentiation of leukemia cells. *Sci Rep*, 2016: 6; 34413.
- Mu Y, Kobayashi T, Sumita M, Yamamoto A, Hanawa T. Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res*, 2000: 49(2); 238-243.
- Munn DH, Bronte V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*, 2016: 39; 1-6.
- Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, Falchook GS, Pant S, Whiteside M, Rasco DR, Mumm JB, Chan IH, Bendell JC, Bauer TM, Colen RR, Hong DS, Vlasselaer PV, Tannir NM, Olt M, Infante JR. Safety, antitumor activity, and immune activation of pegylated recombinant human interleukin-10 (AM0010) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 2016: 34(29); 3562-3569.
- Nasr R, Hasanzadeh H, Khaleghian A, Moshtaghian A, Emadi A, Moshfegh S. Induction of apoptosis and inhibition of invasion in gastric cancer cells by titanium dioxide nanoparticles. *Oman Med J*, 2018: 33(2); 111-117.
- Neal JW, Sledge GW. Successes, toxicities and challenges in solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014: 11(11); 627-628.
- Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*, 2016: 60(3); 275-301.

- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007; 9; 257-288.
- Oberdorster G, Stone V, Donaldson, K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 2007; 1(1); 2-25.
- Oft M. Immune regulation and cytotoxic T cell activation of IL-10 agonists- Preclinical and clinical experience. *Semin Immunol*, 2019; 44; 101325.
- Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*, 2019; 106(2); 309-322.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol*, 2012; 22(4); 275-281.
- Ozaslan M, Karagöz ID, Kılıç İH, Güldür ME. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr J Biotechnol*, 2011;10; 2375-2378.
- Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity associated pathologies. *Cell Mol Immunol*, 2015; 12(1); 5-23.
- Pandurangan M, Enkhtaivan G, Young JA, Hoon HJ, Lee H, Lee S, Kim DH. In vitro therapeutic potential of TiO₂ nanoparticles against human cervical carcinoma cells. *Biol Trace Elem Res*, 2016; 171(2); 293-300.
- Park EJ, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett*, 2009; 184(1); 18-25.
- Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*, 2008; 180(3); 222-229.
- Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, Lim Y, Lee KH. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol*, 2007; 19(Suppl 1); 59-65.
- Petkovic J, Zegura B, Stevanovic M, Drnovsek N, Uskokovic D, Novak S, Filipic M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*, 2011; 5(3); 341-353.
- Prasad RY, Simmons SO, Killius MG, Zucker RM, Kligerman AD, Blackman CF, Fry RC, Demarini DM. Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: role of cell culture media. *Environ Mol Mutagen*, 2014; 55(4); 336-342.
- Prasad RY, Wallace K, Daniel KM, Tennant AH, Zucker RM, Strickland J, Dreher K, Kligerman AD, Blackman CF, Demarini DM. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano*, 2013; 7(3); 1929-1942.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010; 141(1); 39-51.

- Radulski DR, Stipp MC, Galindo CM, Acco A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. *Transl Breast Cancer Res*, 2023; 4; 22.
- Rahman M, Ahmed MZ, Kazmi IS, Akhter S, Afzal M, Gupta G, Ahmad F, Anwar F. Novel approach for the treatment of cancer: Theranostic nanomedicines. *Pharmacologia*, 2012; 3(9); 371-376.
- Rahman M, Beg S, Ahmed A, Swain S. Emergence of functionalized nanomedicines in cancer chemotherapy: recent advancements, current challenges and toxicity considerations. *Recent Pat Nanomed*, 2013; 3(2); 128-139.
- Raj S, Khurana S, Choudhari R, Kesari KK, Kamal MA, Garg N, Ruokolainen J, Das BC, Kumar D. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2021; 69; 166-177.
- Raja G, Cao S, Kim DH, Kim TJ. Mechanoregulation of titanium dioxide nanoparticles in cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020; 107; 110303.
- Raju GSR, Benton L, Pavitra E, Yu JS. Multifunctional nanoparticles: recent progress in cancer therapeutics. *Chem Commun*, 2015; 51(68); 13248-13259.
- Raju GSR, Dariya B, Mungamuri SK, Chalikonda G, Kang SM, Khan IN, Sushma PS, Nagaraju GP, Pavitra E, Han YK. Nanomaterials multifunctional behavior for enlightened cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol*, 2021; 69; 178-189.
- Runa S, Khanal D, Kemp ML, Payne CK. TiO₂ nanoparticles alter the expression of peroxiredoxin antioxidant genes. *J Phys Chem C*, 2016; 120(37); 20736-20742.
- Salkeni MA, Naing A. Interleukin-10 in cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Trends Cancer*, 2023; 9(9); 716-725.
- Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, Ronin E, Piaggio E, Cohen JL. Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology. *Front Immunol*, 2018; 9; 444.
- Sannappa Gowda NG, Shiragannavar VD, Prabhuswamimath SC, Tuladhar S, Chidambaram SB, Santhekadur PK. Ehrlich Ascites carcinoma mice model for studying liver inflammation and fibrosis. *Adv Cancer Biol Metastasis*, 2022; 4; 100029.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10(3); 170-181.
- Schanen BC, Das S, Reilly CM, Warren WL, Self WT, Seal S, Drake DR. Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. *PloS One*, 2013; 8(5); e62816.
- Schanen BC, Karakoti AS, Seal S, Drake DR, Warren WL, Self WT. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS Nano*, 2009; 3(9); 2523-2532.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*, 2013; 10; 1-33.

- Shi Y, Wang F, He J, Yadav S, Wang H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*, 2010; 196(1); 21-27.
- Shin WK, Cho J, Kannan AG, Lee YS, Kim DW. Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO₂ nanoparticles for lithium-ion polymer batteries. *Sci Rep*, 2016; 6; 26332.
- Shrihari TG, Ramesh DNSV. Chronic inflammation induced immunosuppression in tumor microenvironment of oral cancer. *Global J Med Res J Dentist Otolaryngol*, 2016; 16; 1-8.
- Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience*, 2017; 11; 721.
- Sigmund W, Yuh J, Park H, Maneeratana V, Pyrgiotakis G, Daga A, Taylor J, Nino JC. Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems. *J Am Ceram Soc*, 2006; 89(2); 395-407.
- Singh KR, Nayak V, Singh RP. Introduction to bionanomaterials: an overview. *Bionanomaterials*, 2021; 1; 1.
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol*, 2011; 45(4); 227-247.
- Skonieczna M, Hejmo T, Poterala-Hejmo A, Cieslar-Pobuda A, Buldak RJ. NADPH oxidases: insights into selected functions and mechanisms of action in cancer and stem cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2017; 2017; 9420539.
- Srivastava RK, Rahman Q, Kashyap MP, Singh AK, Jain G, Jahan S, Lohani M, Lantow M, Pant AB. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Hum Exp Toxicol*, 2013; 32(2); 153-166.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001; 24(2); 108-115.
- Subaşı A, Zurnacı M, Kahyaoğlu A, Demir E. Polyester/Grafen kompozitlerin mekanik ve termal özelliklerinin incelenmesi. *El-Cezeri J Sci Eng*, 2017; 4(3); 472-481.
- Sunderland CJ, Steiert M, Talmadge JE, Derfus AM, Barry SE. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Dev Res*, 2006; 67; 70-93.
- Tai CY, Tai CT, Chang MH, Liu HS. Synthesis of magnesium hydroxide and oxide nanoparticles using a spinning disk reactor. *Ind Eng Chem Res*, 2007; 46(17); 5536-5541.
- Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*, 2016; 28(8); 401-409.
- Taniguchi N. On the basic concept of nanotechnology. In: *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Part II*. Tokyo: Japan Society of Precision Engineering; 1974. p. 18-23.
- Thrall, JH. Nanotechnology and medicine. *Radiology*, 2004; 230(2); 315-318.

- Tie Y, Tang F, Wei YQ, Wei XW. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol*, 2022: 15(1); 61.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003: 19(5); 641-644.
- Uskokovic V. Nanotechnologies: What we do not know? *Technol Soc*, 2007: 29; 43-61.
- Valencia OM, Samuel SE, Viscusi RK, Riall TS, Neumayer LA, Aziz H. The role of genetic testing in patients with breast cancer: a review. *JAMA Surg*, 2017: 152(6); 589-594.
- Vamanu CI, Cimpan MR, Høl PJ, Sørnes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol In Vitro*, 2008: 22(7); 1689-1696.
- van Vlerken-Ysla L, Tyurina YY, Kagan VE, Gabrilovich DI. Functional states of myeloid cells in cancer. *Cancer Cell*, 2023: 41(3); 490-504.
- Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol*, 2021: 21(8); 485-498.
- Veisheh O, Gunn JW, Kievit FM, Sun C, Fang C, Lee JSH, Zhang M. Inhibition of tumor-cell invasion with chlorotoxin-bound superparamagnetic nanoparticles. *Small*, 2009: 5(2); 256-264.
- Wang Q, Yang Y, Li P, Dong R, Sun C, Song G, Wang Y. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through ROS- Ca²⁺ -p38/AKT/mTOR pathway in TM4 cells. *J Appl Toxicol*, 2024: 44(6); 818-832.
- Wang S, Hunter LA, Arslan Z, Wilkerson MG, Wickliffe JK. Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutagen*, 2011: 52(8); 614-622.
- Wang Y, Cui H, Zhou J, Li F, Wang J, Chen M, Liu Q. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015: 22(7); 5519-5530.
- Wang Z. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, 2021: 10(12); 3327.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, van Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*, 2012: 46(4); 2242-2250.
- Weyemi U, Redon CE, Parekh PR, Dupuy C, Bonner WM. NADPH oxidases NOXs and DUOXs as putative targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013: 13(3); 502-514.
- Whitesides GM. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 2005: 1(2); 172-179.
- Wolfgang, L. Bottom-up methods for making nanotechnology products. Erişim: [<http://www.azonano.com/details.asp>], Erişim Tarihi: 15 Ekim 2024.

- Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(19); 12287-12292.
- Wu J, Sun J, Xue Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett*, 2010; 199(3); 269-276.
- Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, Xu H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010; 10(12); 8500-8507.
- Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107(45); 19449-19454.
- Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP, Zhao B. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes--generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012; 263(1); 81-88.
- Zaki A. Processing and synthesis techniques for the preparation of nanomaterials. Erişim: [<http://www.azonano.com/article.aspx>.], Erişim Tarihi: 15 Ekim 2024.
- Zeng L, Li W, Chen CS. Breast cancer animal models and applications. *Zool Res*, 2020; 41(5); 477-494.
- Zhao F, Wang C, Yang Q, Han S, Hu Q, Fu Z. Titanium dioxide nanoparticle stimulating pro-inflammatory responses in vitro and in vivo for inhibited cancer metastasis. *Life Sci*, 2018; 202; 44-51.
- Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, Wu H, Xu X, Erben U, Wu P, Syrbe U, Sieper J, Qin Z. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest*, 2012; 122(11); 4094-4104.
- Zhu Y, Eaton JW, Li, C. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles preferentially induce cell death in transformed cells in a Bak/Bax-independent fashion. *PloS One*, 2012; 7(11); e50607.
- Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Mlynarczyk DT, Glowacka-Sobotta A, Stanis B, Goslinski T, Sobotta L. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine. *Nanomaterials*, 2020; 10(2); 387.
- Zijno A, De Angelis I, De Berardis B, Andreoli C, Russo MT, Pietraforte D, Scorza G, Degan P, Ponti J, Rossi F, Barone F. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro*, 2015; 29(7); 1503-1512.

EKLER



Tarih: 07.07.2021

Toplantı Sayısı: 07

Karar No:21/162

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.07.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜT
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi A.D'dan Prof.Dr.Harun ÜLGER tarafından sunulan "Titanium Dioksit Nanopartiküllerinin Ehrlich Assit Tümör Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 07.07.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza

.

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN EHRlich ASSİT TUMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%7

İNTERNET KAYNAKLARI

%4

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%5

2

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<%1

3

Ateş, Halil. "Lösemik Kök Hücrelerde Erken Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonunun Araştırılması", Dokuz Eylul Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

<%1

4

Submitted to Ege Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

5

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%1

6

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%1

7

Çalışkan, Ceyda. "Kronik Miyeloid Lösemide Dishevelled Proteinlerinin Onkogenik Etkisinin Araştırılması", Dokuz Eylul Üniversitesi (Turkey), 2024

<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Esmâ SARAYMEN

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

<u>DERECE</u>	<u>KURUM</u>	<u>MEZUNİYET</u>
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi SBE Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı	2018
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi SBE İmmünoloji Anabilim Dalı	2018
Lisans	İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Atatürk Kız Anadolu Lisesi, Malatya	2009

İŞ DENEYİMLERİ

<u>YIL</u>	<u>KURUM</u>	<u>GÖREV</u>
2021 Mart - Hâlen	AGÜ Merkezî Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce