

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU  
2. Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan ERGİN

**FARKLI PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜNE SAHİP  
SERYUM OKSİT PARTİKÜLLERİN İNSAN AORT  
DAMAR DÜZ KASI ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK  
ETKİSİNİN İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

( Yüksek Lisans Tezi )

**ARJETE SIMITCIU**

**Referans no: 10499123**

**EDİRNE-2024**

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU  
2. Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan ERGİN

**FARKLI PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜNE SAHİP SERYUM  
OKSİT PARTİKÜLLERİN İNSAN AORT DAMAR DÜZ  
KASI ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İN-  
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

( Yüksek Lisans Tezi )

**ARJETE SIMITCIU**

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2022/220

**EDİRNE-2024**

# İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	i
ETİK BEYAN .....	ii
İTHAF .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Nanopartikül Türleri.....	4
2.2. Nanotoksikoloji .....	5
2.3. Sitotoksikite Testleri ve Değerlendirilmesi .....	5
2.4. Oksidatif Stres.....	8
2.4.1. Süperoksit dismutaz .....	9
2.4.2. Katalaz .....	9
2.4.3. Glutasyon .....	10
2.5. Apoptoz.....	10
2.6. Seryum Oksit.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	16
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	16
3.2. MTT Testi ile IC <sub>50</sub> Dozunun Belirlenmesi.....	16
3.3. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi ile Seryum Miktar Tayini.....	17
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	18
3.5. İstatistiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR .....	21
4.1. MTT Testi ile Sitotoksikitenin Belirlenmesi .....	21
4.2. ICP-MS ile Seryum Miktar Tayini .....	24
4.3. qRT-PCR Sonuçları .....	25
5. TARTIŞMA.....	27
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ .....	I



# ONAY SAYFASI



## ETİK BEYAN

“Farklı Partikül Büyüklüğüne Sahip Seryum Oksit Partiküllerin İnsan Aort Damar Düz Kası Üzerine Olan Sitotoksik Etkisinin İn-Vitro Değerlendirilmesi” adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Adı Soyadı

İmza

# İTHAF



Anneme ve Babama ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca beni yönlendiren ders dönemim ve tez dönemimde çok değerli katkıları olan yüksek lisans danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU başta olmak üzere, ikinci tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Ahmet Doğan Ergin'e, tez çalışmamın yapılmasında desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Dr. Nebiye Pelin TÜRKER'e teşekkür ederim. Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2022/220) birimine çalışmalarımızın yürütülmesinde sağladıkları maddi destekten dolayı ayrıca teşekkür ederim.



## SİMGE VE KISALTMALAR

**CAT:** “Catalase” (Katalaz)

**GSH:** Glutasyon

**ICP-MS:** “Inductively coupled plasma mass spectrometry” (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi)

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür

**qRT-PCR:** Kuantatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

**SOD:** Süperoksit dismutaz

**TNF $\alpha$ :** Tümör nekroz faktörü alfa

## ÖZET

“Farklı Partikül Büyüklüğüne Sahip Seryum Oksit Partiküllerin İnsan Aort Damar Düz Kası Üzerine Olan Sitotoksik Etkisinin İn-Vitro Değerlendirilmesi”, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2023.

**Giriş ve Amaç:** Sağlık alanında kullanılmak amacıyla erken teşhis ve tedavi yararlı olan birçok yeni nanomalzeme geliştirilmiştir. Seryum oksit duruma göre oksidan ve antioksidan olarak etki etme yeteneği ile araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Seryum iyonu, hem  $Ce^{3+}$  hem de  $Ce^{4+}$  olmak üzere iki farklı değerlik durumu alabilir. Bu kararsızlık, seryum oksitlerin çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalar için önemli hale gelmesini sağlar. Seryum, içerdiği oksijen boşlukları veya eksiklikler sayesinde oksijen depolayabilen bir yapıya sahiptir. Bu oksijen depolama ve serbest bırakma süreci, seryum nanopartiküllerin çevresine bağlı olarak antioksidan olarak hareket etme yeteneğini sağlar ve kendini yenileme özelliğine sahiptir. Nanoteknoloji, tıp alanında birçok yenilikçi uygulama potansiyeli sunsa da nanomalzemelerin biyolojik sistemlere olan etkilerini anlamak, güvenliklerini ve etkinliklerini değerlendirmek önemlidir. Bu nedenle, seryum oksit nanomalzemelerin aort damar düz kası üzerindeki etkisinin incelenmesi, potansiyel toksisitesini değerlendirmek ve potansiyel tıbbi uygulamalarda güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmalarını sağlamak açısından önemlidir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda insan aort damar düz hası hücre hattında (T/G HA VSMC) mikro ve nano seryum oksit partiküllerinin 24 ve 48 saat maruz kalmaya bağlı sitotoksitesini MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücrelere alınan seryum miktarı ICP-MS ile belirlenmiştir. qRT-PCR ile antioksidan sistem ilişkili süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon (GSH) mRNA ifade düzeyleri ve apoptoz ilişkili TNF $\alpha$ , Kaspaz 9, Kaspaz 3 mRNA ifade düzeyleri değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** MTT testi sonuçları seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin insan aort damarı düz kasları üzerindeki sitotoksik etkisi, partikül büyüklüklerine ve uygulanma süresine bağlı olarak farklılık gösterir hipotezimizin doğruluğunu seryum oksit mikropartikül grubunda canlılık ile doz arasında negatif korelasyon ve canlılık ile zaman arasında pozitif korelasyon olmasına ek olarak seryum oksit nanopartikül grubunda canlılık ile doz arasında negatif korelasyon olması ile desteklemektedir. ICP-MS analiz sonuçları seryum oksit nanopartikülü uygulamasının hücrelere daha fazla seryum alınmasına neden olduğunu ve 24 saatteki insan aort damar düz kası hücrelerine alınımın daha fazla olduğunu göstermektedir. Seryum oksit mikro partikülleri 24 ve 48 saatte antioksidan sistem ilişkili mRNA ifadelerini artırırken, seryum oksit nanopartikülleri ise 24 saatte sadece SOD ifadesinde sınırlı artış yaparken 48 saatte değerlendirdiğimiz antioksidan sistem ilişkili mRNA ifadelerini artırmamıştır.

Çalışmamızda apoptoz ilişkili mRNA ifadeleri ise seryum oksit nanopartikül 48 saat grubu haricindeki gruplarda apoptozun tetiklendiği şeklinde yorumlanabilir.

**Sonuç:** Bu sonuçlar, seryum oksitin hücre düzeyindeki etkilerinin hem boyut hem de maruziyet süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Apoptoz, seryum oksit mikropartikül, seryum oksit nanopartikül, Seryum oksit, sitotoksisite

**Destekleyen Kurum:** Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TÜBAP-2022/220



## ABSTRACT

“In-vitro evaluation of the cytotoxic effect of cerium oxide particles with different particle sizes on human aortic vascular smooth muscle”, Trakya University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Nanotechnology Department, Master Thesis, Edirne, 2023.

**Background and Aim:** Many new nanomaterials have been developed for use in healthcare, useful for early diagnosis and treatment. Cerium oxide has attracted the attention of researchers with its ability to act as an oxidant and antioxidant depending on the situation. The cerium ion can take two different valence states, both  $Ce^{3+}$  and  $Ce^{4+}$ . This instability makes cerium oxides important for various industrial and medical applications. Cerium is capable of storing oxygen thanks to its oxygen vacancies or deficiencies. This process of oxygen storage and release provides the ability of cerium nanoparticles to act as antioxidants depending on their environment and has the ability to self-renew. Although nanotechnology offers the potential for many innovative applications in the medical field, it is important to understand the effects of nanomaterials on biological systems and to evaluate their safety and efficacy. Therefore, studying the effect of cerium oxide nanomaterials on aortic vascular smooth muscle is important to evaluate their potential toxicity and to ensure their safe and effective use in potential medical applications.

**Material and Methods:** In our study, the cytotoxicity of micro and nano cerium oxide particles in human aortic vascular smooth muscle cell line (T/G HA VSMC) exposed for 24 and 48 hours was evaluated by MTT assay. The amount of cerium uptake into the cells was determined by ICP-MS. Antioxidant system related SOD, CAT, GSH mRNA expression levels and apoptosis related TNF $\alpha$ , Caspase 9, Caspase 3 mRNA expression levels were evaluated by qRT-PCR.

**Results:** MTT assay results support our hypothesis that the cytotoxic effect of cerium oxide microparticles and nanoparticles on human aortic vascular smooth muscle cells differs depending on particle size and time of administration, with a negative correlation between viability and dose in the cerium oxide microparticle group and a positive correlation between viability and time, as well as a negative correlation between viability and dose in the cerium oxide nanoparticle group. The results of ICP-MS analysis show that cerium oxide nanoparticle treatment caused more cerium uptake into the cells and the uptake into human aortic vascular smooth muscle cells at 24 hours was higher. Cerium oxide microparticles increased the expression of antioxidant system-associated mRNAs at 24 and 48 hours, whereas cerium oxide nanoparticles increased only SOD expression at 24 hours, but not the antioxidant system-associated mRNAs we evaluated at 48 hours. In our study, apoptosis-related mRNA expressions can be interpreted as apoptosis was triggered in the groups except for the cerium oxide nanoparticle 48 hours group.

**Conclusion:** These results suggest that the effects of cerium oxide at the cellular level may vary depending on both size and duration of exposure.

**Keywords:** Apoptosis, cerium oxide nanoparticles, cerium oxide microparticles, Cerium oxide, cytotoxicity

**Financial Support:** The present study was supported by the Research Fund of Trakya University. Project No: TUBAP-2022/220



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji, son yıllarda hayatımıza hızla giren ve büyük potansiyele sahip olan bir alandır. Nanopartiküllerin boyutlarının nanometre ölçeğinde olmasına bağlı olarak benzersiz özelliklere sahiptirler ve tıp, elektronik, enerji, gıda ve çevre gibi çeşitli sektörlerde önemli yenilikler sağlayabilirler (1). Örneğin, nanoteknoloji sayesinde ilaçların daha etkili hedefe ulaşması, su ve hava kalitesinin iyileştirilmesi gibi faydalar elde edilebilir.

Ancak, nanoteknolojinin hızla gelişimiyle birlikte bunlara maruz kalmanın kaçınılmaz olma olasılığı nedeniyle nanopartiküllerin toksisite potansiyeli dikkate alınması gereken bir konu haline gelmiştir. Nanopartiküllerin boyut ve yüzey özellikleri, bazı durumlarda istenmeyen etkiler yaratabilir ve çevre ve insan sağlığı üzerinde potansiyel riskler taşıyabilir. Bu nedenle, nanoteknolojik ürünlerin ve uygulamaların toksisitesi dikkatle değerlendirilmelidir.

Sağlık alanında kullanılmak amacıyla hastalıkların erken teşhis ve tedavisi için yararlı olan nanopartiküller gibi birçok yeni nanomalzeme geliştirilmiştir (1). Nanopartiküller, küçük boyutları sayesinde hücreler, dokular ve biyolojik sistemlerle daha iyi etkileşime girebilme, ilaçları daha etkili bir şekilde hedefleyebilme, hedeflenen bölgede ilacı serbest bırakabilme ve yan etkileri azaltabilme gibi özellikleri ile faydalı olabilir.

Seryum oksit gibi inorganik nanopartiküllerin rejeneratif özelliklere, yüksek redoks aktivite ve yüzey bileşimine sahip olduğu bilinmektedir (2). Seryum oksit nanopartiküllerinin hemostatik sistem bileşenlerini etkileyebildiği, kanın pıhtılaşmasını, kan hücrelerinin değişimini ve endotel hücre fonksiyonlarını indükleyebildiği gösterilmiştir (3).

Nanoteknoloji, tıp alanında birçok yenilikçi uygulama potansiyeli sunsa da nanomalzemelerin biyolojik sistemlere olan etkilerini anlamak, güvenliklerini ve etkinliklerini değerlendirmek önemlidir. Bu nedenle, seryum oksit nanomalzemelerin aort damar düz kası üzerindeki etkisinin incelenmesi, potansiyel toksisitesini değerlendirmek ve potansiyel tıbbi uygulamalarda güvenli ve etkili bir şekilde

kullanılmalarını sağlamak için lazımdır. Ayrıca, olası yan etkilerin önlenmesi için de gereklidir.

Çalışmamızın hipotezleri:

H<sub>1</sub>: Seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin insan aort damarı düz kasları üzerindeki sitotoksik etkisi, partikül büyüklüklerine ve uygulama süresine bağlı olarak farklılık gösterir.

H<sub>2</sub>: Seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin insan aort damar düz kasları üzerindeki sitotoksik etkisi, intrinsik veya ekstrinsik yolak aracılığı apoptozun tetikleyerek gerçekleşir.

H<sub>3</sub>: Mikro ve nano partiküllerin insan aort damarı düz kaslarına alım miktarının partikül büyüklüğü ve uygulanma süresine göre değişir.

Çalışmamızda mikro ve nano seryum oksit partiküllerinin parçacık büyüklüğü ile ilişkili, insan aort damarı düz kası üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Sitotoksisite değerlendirmesi mitokondriyal aktivite ölçüm testiyle yapılmıştır. Aort düz damar kasına 24 ve 48 saat süre ile IC<sub>50</sub> değerinde seryum mikro ve nano partiküllerinin uygulanması sonunda kuantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile hücrelerin kaspaz 3, TNF- $\alpha$ , kaspaz 9, SOD, GSH, katalaz mRNA ifadeleri belirlenmiştir. ICP-MS ile hücreler alınan serum miktarları tespit edilmiştir. Seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin toksik etki mekanizması hakkında elde edilen bu bilgiler, daha güvenli nanopartiküllerin tasarlanmasına katkıda bulunacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Nanoteknoloji, son yıllarda üretimi hızla büyümekte olan bir endüstridir. Nano cüce anlamına gelen eski yunanca bir kelimedir ve  $10^{-9}$  metre ifade etmektedir. Nano kelimelerin başına gelerek onun nano boyutta olduğunu gösterir. Örneğin nano-çomak, nano-tel, nanopartikül. Nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre boyutunda parçacıklarla ilgilenen bir bilim dalıdır. Bu nanometre boyut aralığı, biyolojik sistemler için idealdir çünkü kan akışında dolaşabilir, dokuları geçebilir, spesifik doku ve hücreleri hedefleyerek etkileşimde bulunabilir. Doğada bol miktarda nanomalzemelere örnek bulunmaktadır. Bunlardan birisi Manyetotaktik bakterilerin manyetik alanları algılamak için demir oksit nanoparçacıklarını kullanmasıdır (4). Doğadaki nanoyapılara başka bir örnekte morpheus kelebeğinin kanatlarının benzersiz renklerinin boyalardan veya pigmentlerden değil, kompleks nano yapılarla ışık etkileşiminden kaynaklanmasıdır (5). Nanomalzemeler geçmişte de insanlar tarafından kullanılmıştır. Örneğin, Lycurgus Kupası'nın iletilen veya yansıtılan ışıkta sırasıyla kırmızı veya yeşil görünmesi metalik nano parçacıklardan kaynaklanmaktadır. Bu metalik nanoparçacıkların benzersiz özellikleri vardır. 1857'de Michael Faraday altının küçük boyutlarda olağandışı renkler üreteceğini bildirmiştir. 1908'de yapılan başka bir çalışmada ise altının küçük boyutlardaki optik özelliklerinin kitle özelliklerinden farklı olacağını göstermiştir (4). Bununla birlikte, nanometre ölçeğinde bilinçli olarak maddeyi manipüle etme kavramı, 1959'da Amerikan Fizik Derneği'nde Richard Feynman tarafından "There is Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics" adlı konferansta bildirilmiştir (4). Günümüzde nanoteknoloji alanı hızla gelişmektedir ve hayatımızda daha fazla yer almaktadır.

Nanoteknoloji içerikli ilk rapor (nanoteknoloji terimi kullanılmadan) 1959 yılında Richard Feynman'ın Amerikan Fizik Topluluğu'nun bir toplantısında yaptığı konuşma sırasında kullanılmıştır (6). Feynman bu konuşmasında, daha gelişmiş materyaller ve araçlar üretmek için atomlar ve moleküller tek tek düzenlenirse yeni özellikler kazandırılabilirdiğinden bahsetmiştir.

Yirmi yıldan uzun bir süre sonra, Profesör Norio Taniguchi'nin, ultra hassas işlemeyi keşfetmesiyle "nanoteknoloji" terimini ortaya atılmıştır. 1981 yılında, tek tek

atomları “görebilen” taramalı tünelleme mikroskopunun geliştirilmesiyle, modern nanoteknolojinin temel taşları kuruldu (7).

Nanoteknolojinin uygulama alanları güneş koruyucular, kozmetikte ürünler, biyogörüntüleme problemleri, elektronik, kataliz, ilaç hedefleme, doku mühendisliği ve tıbbi yer almaktadır. Tıbbi alanında uygulanan nanopartiküller, 500 nm'den büyük partiküllerle kıyaslandığında aynı kimyasal bileşime sahip olsalar bile, farklı terapötik etkiler ve toksik etki göstermektedir ve bu benzersiz özellikleri, çevresel ve insan güvenliği değerlendirmesinde karmaşıklık yaratmaktadır (8). Nanomalzemelerin toksik etkileri, parçacık boyutu, yüzey özellikleri, kimyasal bileşimi, dağılımı, doku ve hücre etkileşimleri gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir. Nanotoksikoloji çalışmaları, nanomalzemelerin güvenli kullanımını değerlendirmek ve insan sağlığı ile çevresel etkilerini anlamak için önemlidir (8).

## **2.1. Nanopartikül Türleri**

Nanopartikülleri farklı türleri olsa da 0 ila 100 nm arasında olmaları, boyutlarına yüzey alanlarının geniş olması ve buna bağlı olarak daha reaktif olmaları ortak özellikleridir (9). Farklı Nanopartiküller kaynakları, bileşimi, morfolojine göre sınıflandırılabilirler. Kaynaklarına göre doğal kaynaklı ve insan kaynaklı olarak ayrılırlar. İnsan kaynaklı olanlarda kasıtlı olarak insanlar tarafından üretilenler ve tasarlanmış nanopartiküller olarak ayrılır. Bileşimlerine göre organik, inorganik, karbon tabanlılar olarak ayrılırlar. Karbon tabanlılar karbon nanotüp, fulleren, grafen gibi nanopartiküllerdir. Organik nanopartiküller polimerik ve lipid tabanlı olarak ayrılırlar. Polimerik nanopartiküllerden en bilinenleri polietilen glikol (PEG), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ve polilaktik asittir (PLA) (9). Lipid tabanlı nanopartiküllere katı lipid nanopartikülleri niozomlar, lipozomlar örnek verilebilir. İnorganik nanopartiküllere örnek olarak metaller ve metal oksitlerdir (9). Çalışmamızda metal oksit nanopartiküllerden seryum oksit nanopartiküllerinin mikro partikül ve nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi karşılaştırılacaktır.

## 2.2. Nanotoksikoloji

Nanoteknoloji, farklı nanoparçacık türlerinin geliştirilmesiyle beraber paralel olarak nanotoksikoloji alanı da büyümüştür. Nanotoksikoloji, nano ölçekli yapıların toksik etkileriyle ilgilenen ve toksik etkilere yol açan koşulları sınıflandırmak ve bunları önlemenin ve tedavi etmenin yollarını bulmayı amaçlar. Daha büyük boyutlu malzemelere göre nanoparçacıkların, hücresel zarlara, biyolojik bariyerlere ve dokulara daha verimli bir şekilde nüfuz ettiği varsayılmaktadır. Toksisitenin indüklenme derecesi, nanopartikülün doğası ve boyutu, yüzey alanı, şekli, en-boy oranı, yüzey kaplaması, kristallik, çözünme ve topaklanma gibi bazı özelliklere bağlıdır (10). Nanoparçacık boyutu küçüldükçe, yüzey alanının hacme oranı katlanarak artar ve bu da biyolojik ve kimyasal reaktiviteleri artırır.

Nanopartiküllerin yüzeyi ile hücre yapılarının etkileşimi sonucu sitotoksisite meydana gelir. Nanopartiküllere doğrudan ürünlerle maruz kalma yanı sıra çevresel maruziyet meydana gelebilir (11). Nanopartiküllere maruz kalma nanoteknoloji ürünü implant biyosensör, ilaç, kozmetik, gıda katkısı, gıda ambalajı ve her geçen gün artan miktarda hayatımıza giren yeni bir nanoteknoloji ürünü ile meydana gelebilir. Maruz kalma yolları dermal, inhalasyon, yutulma ve tıbbi amaçlı olduğu zaman doğrudan kan yolundan uygulama şeklinde olabilir.

## 2.3. Sitotoksisite Testleri ve Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin değerlendirmesinde in-vivo hayvan çalışmaları ve in-vitro çalışmaların tercih edilmesinde avantajlar ve dezavantajlar bulunmaktadır. İn-vivo çalışmalar daha gerçekçi ve sistemler arası etkileşimi de yansıtmaları avantajlarıdır. İn-vitro testlerde hayvan ölümünün önlenmesi, kontrolünün ve üretiminin kolay olması avantajlarıdır. Sitotoksisite çalışmaları çevresel koşullardan etkilenir. Sitotoksisite çalışması stabil ani ısı değişimleri, ortam pH'ı, besin ve atık konsantrasyonu olmayan hücre koşullarından etkilenemez. Test edilen nanopartiküllerin sitotoksisite analizinde kullanılan boya gibi test bileşenleri ile etkileşime girmesi sonuçların hatalı çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle birden fazla sitotoksisite yönteminin çalışmada kullanılması sonuçların güvenilirliğini artıracaktır.

Nanopartikülün toksisite değerlendirilmesinde seçilecek hücre tipi çeşitli faktörlere göre seçilmektedir. Nanopartiküllerin kullanılacağı uygulama alanı, hedef organ veya dokuları belirlemede önemli bir faktördür. Örneğin, akciğerlerle ilgili bir çalışmada, akciğer hücre hatları tercih edilebilir. Nanopartiküllerin hedeflenen etkisine bağlı olarak, uygun hücre tipi seçilmektedir. Örneğin, bir kanser tedavisi çalışmasında kanser hücre hatları kullanılabilir. İnsanlarda veya hayvanlarda ortaya çıkabilecek etkileri anlamak için, çalışmada kullanılan hücrelerin, hedef organizma ile mümkün olduğunca uyumlu olması tercih edilir. İnsan kaynaklı hücre hatları veya primat hücreleri bu açıdan kullanışlı olabilir. Bazı hücre tipleri, özellikle belirli organlarda, nanopartiküllere daha duyarlı olabilir. Bu nedenle, çalışmada nanopartikül toksisitesini daha iyi yansıtabilmek için, duyarlı hücre hatları tercih edilebilir. Belirli hücre hatları, literatürde yaygın olarak kullanılan ve nanopartikül toksisitesini değerlendirmede standartlar sağlayan hatlar olabilir. Bu hatlar, sonuçların karşılaştırılabilirliğini artırmak için tercih edilebilir.

Nanopartikül toksisite değerlendirilmesinde kullanılacak dozun seçimi önemlidir. İncelenen nanopartiküllerin belirli bir toksisite hedefi varsa, bu hedefe ulaşmak için uygun bir doz seçilebilir. Örneğin, hücre ölümü veya hücre hasarı gibi belirli bir etkiyi incelemek isteniyorsa, doz seçimi bu etkiyi elde etmek için yeterli olacak şekilde yapılabilir. Bazı durumlarda, nanopartikülün toksisite etkisini değerlendirmek için tolere edilebilen en yüksek doz seçilebilir. Bu doz, hücrelerin veya dokunun maruz kalabileceği en yüksek doz olabilir ve toksisite üzerinde belirgin bir etki gözlenebilir. Nanopartiküllerin gerçek hayatta maruz kalınan düzeylere benzer bir doz seçmek gerçekçi sonuçlar elde etmek için önemlidir. Önceki çalışmalarda kullanılan doz seviyeleri literatürde mevcutsa, bu verilere dayanarak benzer dozlar seçilebilir. Bu, sonuçların karşılaştırılabilirliğini ve verilerin daha geniş bir bağlama yerleştirilmesini sağlar.

Sitotoksosite değerlendirilmesinde kullanılacak yöntem seçiminde dikkate alınması gereken bazı faktörler vardır. İncelenen nanopartiküllerin etkilerini değerlendirmek için hangi parametrelerin ölçüleceği belirlenmelidir. Örneğin, hücre canlılığı, hücre ölümü, hücre hasarı, oksidatif stres gibi parametreler incelenebilir. Yöntem seçimi, belirlenen parametrelere uygun ölçüm ve analiz tekniklerini içermelidir. Literatürde yaygın olarak kullanılan ve kabul görmüş standart yöntemler mevcutsa, bu

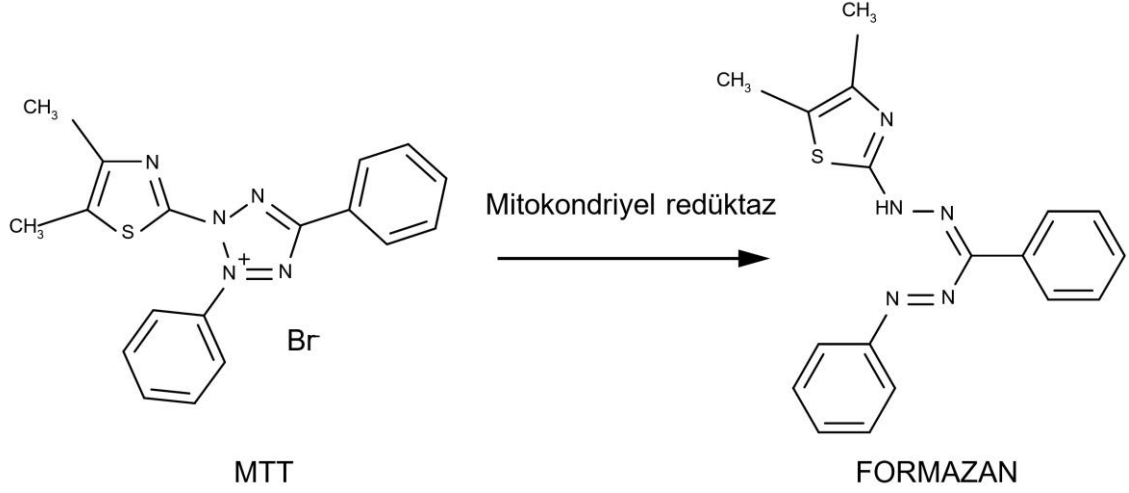
yöntemler tercih edilebilir. Standart yöntemler, sonuçların karşılaştırılabilirliğini sağlar ve verilerin daha geniş bir bağlama yerleştirilmesini kolaylaştırır.

Yöntem seçimi, nanopartikülün beklenen etkilerini duyarlı bir şekilde ölçebilecek ve incelenecek ölçekle uyumlu olmalıdır. Bazı yöntemler daha duyarlı olabilirken, diğerleri daha geniş bir etki spektrumunu kapsayabilir. İncelenen nanopartikülün özellikleri ve hedeflenen etkiler, yöntem seçimini etkileyen faktörlerdir. Yöntemin maliyeti ve uygulanabilirliği, araştırma kaynakları ve laboratuvar koşulları göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. Bazı yöntemler daha pahalı veya teknik olarak zorlayıcı olabilirken, diğerleri daha erişilebilir ve kullanımı kolay olabilir.

Sitotoksitenin yani test edilen maddenin hücreye zarar verme yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan birçok yöntem vardır (12). Hücresel morfolojinin mikroskop ile belirlenmesi ile sitotoksik değişimlerin değerlendirilmesi yöntemlerden birisidir. Nötral kırmızı hücre membranından geçebilen daha çok lizozomlarda biriken ve canlı hücreleri boyayan katyonik bir boyadır. Tripan mavisi sadece ölü hücrelerin maviye boyanmasına neden olurken canlı hücreler renksiz olarak ışık mikroskopunda sayılabilir. LIVE/DEAD testi kalsein asetoksimetil ile etidyum homodimer boyaları ile hücre canlılığın belirlenmesinde kullanılır. Kalsein asetoksimetil hücrelere difüzyon ile girer ve hücre içi esterazlar tarafından yeşil floresan renkli kalseine dönüştürülür. Etidyum homodimer canlı membranı sağlam hücrelere giremez fakat hasarlı hücrelere girerek nükleik asitlere bağlanıp kırmızı floresan renk olur. Diğer bir sitotoksite ise hasarlı hücrelerden salınan laktat dehidrojenaz laktatı piruvata dönüştürerek tetrazolyum tuzu olan iyodonitrotetrazoliumun formazamana dönüşümünü destekler ve miktarı hasar gören hücre sayısı ile orantılı olduğundan canlılık değerlendirmesinde kullanılır (13).

Sadece canlı hücrelerin mitokondrilerinde dehidrojenaz enzimleri bulunur. Bu enzim tetrazolyum halkasını bölebildiğinden canlılık testlerinde kullanılırlar. Bu testlerden en yaygını şekil 1'de gösterilmiş olan açık sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından mor formazana dönüştürülmesi prensibine dayanan MTT testidir (14). Benzer prensibe sahip birçok test bulunmaktadır. Alamar mavisi testi, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için oksidasyon-indirgeme (redoks) göstergesi resazurin'i kullanan bir hücre canlılığı testidir. Resazurin, oksitlenmiş formunda floresan olmayan mavi renkli bir boyadır. Hücrelerin metabolik aktivitesi ile azaldığında,

resorufin adı verilen floresan pembe renkli bir boyaya dönüşür. Resorufin'in floresansının yoğunluğu, numunedeki canlı hücrelerin sayısı ile orantılıdır.



**Şekil 2.3. MTT testinde MTT maddesinin renkli formazan ürününe dönüşümü**  
(15).

#### 2.4. Oksidatif Stres

Sitotoksik etki her zaman hücreyi öldürecek seviyeye ulaşamaz. Bu durumda sitotoksisite değerlendirmesinde hücre içi değişimler değerlendirilebilir. Hücrede zararlı kimyasallar, fiziksel etkenler gibi stres oluşturan durumlar dışında oksidatif fosforilasyon gibi metabolik faaliyetler yürütülürken de hücrede sürekli reaktif oksijen türleri ortaya çıkar.

Serbest radikal, eşleşmemiş bir elektrona sahip bir atom veya moleküldür. Bu eşleştirilmemiş elektron, serbest radikali kararsız ve oldukça reaktif hale getirir, yani ikinci bir elektron kazanmak ve kararlı hale gelmek için diğer moleküllerle reaksiyona girmeye isteklidir. Hücrelerde serbest radikallerin doğal olarak oluştuğu bazı süreçler bulunmaktadır. Örneğin, hücresel solunum, bağışıklık sistemi tarafından enfeksiyonlara karşı kullanılan beyaz kan hücrelerinin faaliyetleri ve bazı metabolik reaksiyonlar serbest radikallerin üretilmesine yol açabilir (16).

Hücrelerde birçok reaktif oksijen türü bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olanları süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ), peroksil radikali ( $ROO\bullet$ ) ve

oksidlenmiş nitrojen bileşikleri olarak adlandırılan türlerdir. Oksitlenmiş nitrojen bileşikleri, nitrik oksit (NO•), azot dioksit (NO<sub>2</sub>•) ve peroksinitrit (ONOO-) gibi bileşiklerden oluşur (16). Bu reaktif oksijen türleri, reaktif özellikleri nedeniyle hücrelerde oksidatif stres ve sitotoksositeye neden olabilirler. Oksidatif stres hücrelerde serbest radikallerin aşırı üretimi veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz olması sonucunda oluşur. Oksidatif stres, serbest radikallerin hücre bileşenlerine (lipitler, proteinler, nükleik asitler) saldırarak hasar vermesiyle gerçekleşir.

Hücreler, serbest radikallerin zararlı etkilerini sınırlamak ve oksidatif stresle başa çıkmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Antioksidan savunma sistemleri, hücrelerin serbest radikalleri etkisiz hale getirmek ve hasarlarını en aza indirmek için kullandıkları önemli mekanizmalardır. Bu sistemler, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar içerir. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler bulunurken, non-enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon, C vitamini, E vitamini, beta-karoten ve tiyol bileşikleri yer alır. Bu antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek veya onları stabilize ederek oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olurlar.

#### **2.4.1. Süperoksit dismutaz**

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalinin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) daha az tepkimeye girme olasılığı olan hidrojen peroksit ve de oksijene dönüştürerek enzimatik antioksidan savunmada görev alır (16, 17). İnsanlarda SOD enziminin 3 farklı izoformu vardır; Sitozolik SOD (SOD1), mitokondriyal SOD (SOD2), ekstraselüler SOD (SOD3) (17). SOD1 ve SOD3 yapısında bakır çinko metallerini bulundururken, SOD2 yapısında manganez bulundurur. Vasküler düz kas hücreleri tarafında SOD3 salgılandığı bildirilmiştir (18).

#### **2.4.2. Katalaz**

Katalaz, hücre için toksik olan hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) moleküllerini parçalayarak su ve oksijen üretir. Katalaz, oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynayan antioksidan enzimlerden biridir. Katalaz, peroksizom adı verilen hücresel organellerde yoğun olarak bulunur.

### **2.4.3. Glutasyon**

Glutasyon, düşük molekül ağırlığa sahip, çözünebilir önemli bir antioksidandır. Glutamik asit, sistein, ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH, hücre metabolizmasında ve hücre yapısının korunmasında rol oynayan esansiyel bir bileşiktir. Glutasyon hücreyi oksidatif hasara ve serbest radikallere karşı korur ve sonuç olarak serbest radikallerin toksik etkilerini azaltır. Glutasyon, oksidatif strese karşı temel hücre içi antioksidan tampondur ve esas olarak indirgenmiş glutasyon ve oksitlenmiş glutasyon formlarında bulunur. Hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde fonksiyon yapar (19). Glutasyon, hücrelerde DNA ve protein sentezinde, aminoasitlerin taşınmasında, E ve C vitaminleri gibi önemli antioksidanların aktif formlarının korunmasında rol oynar (19).

### **2.5. Apoptoz**

Hücre ölümü otofaji, apoptoz, nekroz olmak üzere başlıca 3 şekilde meydana gelebilir. Hücrelerin programlanmış hücre ölümü sürecidir. Normal bir fizyolojik süreç olan apoptoz, birçok hücreyel olayın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Doku yapısının sürdürülmesi ve sağlıklı bir gelişim için apoptoz süreci gereklidir. Otofaji, hücre içindeki zararlı veya gereksiz bileşenlerin parçalanması ve geri dönüşümü için bir süreçtir. Hücrenin kendi kendini sindirmesi olarak da bilinir. Otofaji, hücrenin açlık, enfeksiyon, stres gibi koşullar altında enerji ve besin kaynakları elde etmesine yardımcı olur. Otofaji, hücre içinde oluşan zararlı maddelerin ortadan kaldırılması ve hücrenin sağlığının korunması için önemlidir. Nekroz, hücrenin travma, hasar veya enfeksiyon gibi ciddi zararlar sonucu anormal şekilde ölmesidir. Nekroz, hücre zarının yırtılması, hücre içindeki yapıların dağılması ve çevredeki dokulara zarar verme eğilimi gösterir. Nekroz, inflamasyona yol açabilir ve çevredeki dokulara yayılan hücre içeriğinin inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir, yani patolojik bir hücre ölüm tipidir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Bu süreçte hücre, belirli sinyallerle tetiklenen genetik programlama sonucu kontrollü bir şekilde ölür. Apoptoz, hücrenin kendini küçültmesi, hücre zarının kıvrılması, çekirdek parçalanması gibi karakteristik özellikler gösterir.

Hücre içindeki moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenir ve genellikle hücrelerin sağlıklı bir şekilde gelişimi, doku homeostazı ve hastalıkların önlenmesi için önemlidir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Bu enerji gerektiren süreçte hücre, belirli sinyallerle tetiklenen genetik programlama sonucu kontrollü bir şekilde ölür (20). Apoptoz, hücrenin kendini küçültmesi, hücre zarının bütünlüğünü koruyarak kıvrılması ile blebler oluşturması, çekirdek parçalanması, kromatinin yoğunlaşarak çekirdek membranı çevresinde toplanması gibi karakteristik özellikler gösterir. Morfolojik incelemede apoptoz ile membranla kaplı apoptotik cisimler oluşur (20). Hücre içindeki moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenir ve genellikle hücrelerin sağlıklı bir şekilde gelişimi, doku homeostazı ve hastalıkların önlenmesi için önemlidir.

Başlıca 2 apoptoz mekanizması vardır. Hücre içinde meydana gelen stres faktörleri veya hasarlar sonucunda mitokondriyal yoldan tetiklenen apoptoz başlatılır. Örneğin, DNA hasarı, oksidatif stres, hücre zarının hasarı veya besin eksikliği gibi faktörler, mitokondri hasarına neden olabilir. Bax, Bcl-2 ailesine ait bir proteindir ve apoptozun başlatılmasında önemli bir rol oynar. Normalde, Bcl-2 proteinleri hücrenin yaşamasını sağlayan anti-apoptotik etkiye sahiptir. Ancak, hücre stres altında olduğunda veya apoptoz sinyalleri alındığında, Bax proteinleri aktive olur ve mitokondri zarına geçer. Bax, mitokondri zarı geçirgenliğini artırarak sitokrom c serbestleşmesine neden olur. Serbest sitokrom c, apoptoz kompleksi olan apoptozis aktivasyon faktörü (Apaf-1) ile etkileşime girer ve Apaf-1'in aktive olmasını sağlar. Aktive olan Apaf-1, kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3'ü aktive ederek yürütücü kaspazların aktivasyonu ile apoptozun ilerlemesini tetikler. Aktive olan kaspaz-3, hücre içindeki hedef proteinlere bağlanıp parçalar ve hücrenin yapısal bütünlüğü bozulur.

Dışsal apoptoz yolu, hücre dışından gelen ölüm sinyalleriyle aktive olan ölüm reseptörleri aracılığıyla başlar. Bu sinyaller, ölüm reseptörlerine bağlanarak hücre içindeki apoptotik süreci başlatır. Ölüm reseptörleri, TNF $\alpha$  (tümör nekroz faktörü alfa) ve Fas ligandı gibi ölüm bağlanıcılarıyla etkileşime girer. Ölüm reseptörleri aktive olduktan sonra, iç kısımlarında bulunan ölüm etki bölgeleri de aktive olur. Bu etki bölgeleri, adaptör proteinlerin bağlanmasına izin verir. Adaptör proteinler, ölüm etki bölgelerine bağlandıklarında sinyal iletimi için bir ara bağlantı görevi görür. Aktive olan adaptör proteinler, kaspaz-8 enziminin aktivasyonunu tetikler. Kaspaz-8, ölüm reseptörlerinin iç kısmında bulunan bir inaktif proenzimdir. Adaptör proteinlerin etkisiyle aktive olan kaspaz-8, aktif hale gelir ve diğer kaspaz enzimlerini aktive ederek

kaspaz kaskadını başlatır. Kaspaz kaskadı, hücre içinde çeşitli substratları hedef alır. Özellikle, kaspaz-3 enzimi apoptozis sürecinde önemli bir rol oynar. Aktive olan kaspaz-3, hücre içindeki proteinleri ve diğer önemli yapıları parçalar ve hücrenin yapısının bozulmasına neden olur.

## 2.6. Seryum Oksit

Seryum (Ce), 58 atom numarasına sahip bir lantanid metalidir. Seryum oksit ( $CeO_2$ ) ve di-seryum trioksit ( $Ce_2O_3$ ), seryum (Ce) iyonlarının farklı değerlik durumlarını yansıtan oksit bileşikleridir. Seryum iyonu, hem  $Ce^{3+}$  hem de  $Ce^{4+}$  olmak üzere iki farklı değerlik durumu alabilir. Bu kararsızlık, seryum oksitlerin çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalar için önemli hale gelmesini sağlar (21).

Seryum oksit nanoyapılarının benzersiz fizikokimyasal özellikleri, çeşitli alanlarda gelişen kullanımları göz önüne alındığında, birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. “Nanoceria” olarak da bilinen seryum oksit nanoparçacıkları yanma artırıcı, katı oksit yakıt hücreleri, biyosensörler, UV emiciler, parlaticı maddeler ve diğerleri gibi çeşitli uygulamalar için kullanılan metal oksit nanomalzeme sınıfına aittir (22).

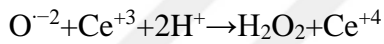
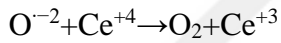
Seryum oksit, biyomedikal uygulamalar için önemli bir madde haline gelmiştir ve ilginç kılan temel özelliklerden biri oksijen depolama yeteneğidir. Seryum, içerdiği oksijen boşlukları veya eksiklikler sayesinde oksijen depolayabilen bir yapıya sahiptir. Oksijen atomu, bu boşluklara yerleşerek seryum iyonlarının redoks dengesini korur. Oksijen atomu serbest bırakıldığında ise dört komşu seryum iyonu  $Ce^{4+}$  durumundan  $Ce^{3+}$  durumuna indirgenir, böylece yük dengesi sağlanır. Bu oksijen depolama ve serbest bırakma süreci, seryum nanopartiküllerin çevresine bağlı olarak antioksidan olarak hareket etme yeteneğini sağlar.

Bu özellik, seryum nanopartiküllerin kendini yenileme yeteneği olarak da bilinir. Serum iyonları arasında otomatik olarak geçiş yapabilen redoks yetenekleri sayesinde, seryum oksit çevredeki oksidatif ortama karşı koruyucu bir etki gösterebilir. Seryum iyonları, antioksidan olarak davranarak serbest radikalleri etkisiz hale getirebilir ve oksidatif stresi azaltabilir. Seryum oksit nanopartikülleri, nano ölçekli boyutu nedeniyle hem  $Ce^{4+}/Ce^{3+}$  redoks döngüsü hem de oksijen değişimi önemli ölçüde artar (23). Bu

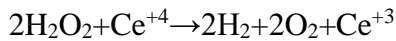
nedenle, ceria nanopartiküller biyomedikal uygulamalarda kullanıldığında, hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasına yardımcı olabilirler.

Seryum oksitin redoks özellikleri ve kendini yenileme yeteneği, biyomedikal alanda önemli bir potansiyele sahip olmasını sağlar. Antioksidan etkileri, doku rejenerasyonu, anti-inflamatuar etkiler, kanser tedavisi ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılabilir (24-28). Serum oksitin etki mekanizması süperoksit dismutaz ve katalaz davranışına benzer (23). Ayrıca, seryum oksit nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra, yakıt hücreleri, katalizörler ve güneş enerjisi dönüşümü gibi enerji alanlarında da potansiyel uygulamaları bulunmaktadır (22).

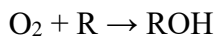
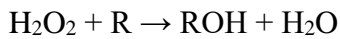
Seryum oksit nanopartikülleri SOD enzimi gibi süperoksit anyon radikallerinin oksijene ve hidrojen peroksitine dismutasyonunu katalize edebilir. Bu reaksiyon, hücreleri oldukça reaktif olan ve DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar verebilen süperoksit anyon radikallerinin neden olduğu hasardan korumak için önemlidir. Seryum oksit nanopartiküllerinin SOD benzeri reaksiyonu;



Serum oksit nanopartikülleri, katalaz benzeri bir aktivite gösterebilir. Bu reaksiyonda, serum oksit nanopartikülleri hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürebilir. Bu şekilde, serum oksit nanopartikülleri oksidatif stresi azaltabilir ve hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasına yardımcı olabilir. Seryum oksit nanopartiküllerinin katalaz benzeri reaksiyonu;



Serum oksit nanopartikülleri, peroksidaz benzeri bir aktivite sergileyebilir. Bu reaksiyonda, serum oksit nanopartikülleri hidrojen peroksitini oksitleyerek oksijen ve su oluşumunu sağlayabilir. Seryum oksit nanopartiküllerin oksidaz benzeri reaksiyonu aşağıdaki denklemle temsil edilebilir:



Bu reaksiyonda, seryum oksit nanopartikülleri bir katalizör görevi görür, yani reaksiyonda tüketilmezler, bunun yerine O<sub>2</sub> ile R arasındaki reaksiyonu kolaylaştırırlar. R, glikoz, lipitler, proteinler gibi herhangi bir sayıda farklı molekül olabilen organik bir bileşiktir.

Seryum oksit nanopartiküller  $O_2$  ile temasa geçtiklerinde,  $O_2$ 'ye elektron bağışladıkları bir redoks reaksiyonuna girerler. Bu, Seryum oksit nanopartikülleri  $Ce^{4+}$ 'dan  $Ce^{3+}$ 'ya düşürürken,  $O_2$ 'yi süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) olarak adlandırılan bir reaktif oksijen türü oluşturmak üzere oksitler.  $O_2^{\bullet-}$  daha sonra R ile reaksiyona girerek onu oksitler ve yeni bir ürün olan ROH üretir.

Seryum oksit nanopartiküllerin oksidaz benzeri reaksiyonu pH bağımlıdır ve pH 4'te yani asidik ortamda maksimum aktivitesi olması nedeniyle bir dizi potansiyel uygulamaya sahiptir (29). Örneğin, kanser ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tespiti ve tedavisi için yeni yöntemler geliştirmek için kullanılabilir (28, 29).

Kanser hücrelerinde, enerji üretimi süreci olan glikoliz hızlanır ve bu süreç sonucunda laktik asit oluşur (29). Bu durum, hücrelerin çevresinde asidik bir ortam oluşmasına neden olur. Seryum oksit nanopartiküllerinin, asidik ortamda antioksidan özelliklerini kaybedip pro-oksidan olarak hareket etme yeteneği vardır (29). Bu durum, nanopartiküllerin reaktif oksijen türleri (ROS) salarak hücre organellerine zarar vermesine yol açar. Bir çalışmada seryum oksit nanopartiküllerine maruz kalan sağlıklı insan pankreas hücre hattına (hTERT-HPNE) ve insan pankreas kanseri hücre hattına (L3.6pl) radyoterapi uygulanmıştır (30). Radyo terapi uygulamasının pankreas hücre hattında adjuvan etki göstererek asidik olan kanser hücre ortamında hücredeki serbest oksijen türlerinin oluşumunu 2 kat artırırken sağlıklı hücrede radyo terapi sonucu oluşan serbest oksijen türlerinin oluşumunu %50 azalttığı bildirilmiştir (30). Aynı çalışmada kanser hücre hattı fareye enjekte edilerek pankreas tümör modeli oluşturularak in vivo olarak da seryum oksit nanopartiküllerinin radyo terapi uygulamasıyla kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğunu, sağlıklı hücrelerde ise zararlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (30). Başka bir çalışmada ise 20 nm boyutundaki seryum oksit nanopartiküllerinin 3,5 ila 23,3  $\mu\text{g/ml}$  doz aralığında insan akciğer kanser hücre hattında (A549) serbest oksijen türlerinin ile lipid peroksidasyonu oluşumunda artışa neden olduğu, GSH seviyesindeki düşüş tespit edilerek hücredeki oksidatif hasar gösterilmiştir (31).

Seryum oksit nanopartikülleri ilaç hedeflemede de umut vadetmektedir. Yapılan bir çalışmada negatif yüklü seryum oksit nanopartikülleri ile pozitif yüklü deoksirubisinden fizyolojik koşullarda elektrostatik bağlanmış olarak doksirubisin yüklü seryum oksit nanopartikülleri oluşturulduğunda yüksek doksirubisin içeriği (%22,41) ve yüklenme verimliliği (%99,51) sergilemiştir. Serbest doksirubisine göre yüksek

hücre içine alınma belirlenmiştir. Oluşturulan doksurubisin yüklü seryum nanopartikülleri ovaryum kanseri hücre hattına (A2780) uygulandığında ilk 24 saatte serbest doksirubisin grubunda hücre içi doksirubisin olsada kısa sürede %25 seviyesine düşmüş, doksirubisin yüklü seryum nanopartikül grubunda ise 72 saate kadar yüksek hücre içi doksurubisin seviyesi belirlenmiştir (32). Serbest doksirubisine göre doksirubisin yüklü seryum oksit nanopartikülleri kanser hücre proliferasyonunu daha fazla inhibe etmiştir ve apoptozu daha fazla indüklemiştir (32).

Seryum oksit hakkında yürütülen çalışmalarda biriside MRI görüntüleme kontrast artırıcı olarak kullanılan gadolinium hakkındaki toksisite endişelerini azaltmak için seryum oksit nanopartikülleri ile kullanımı yapılmıştır ve sonuçların gelecek için umut vadettiği belirtilmiştir (33).

Seryum oksit nanopartiküllerin oksidaz benzeri reaksiyonu nispeten yavaş bir reaksiyondur, ancak glikoz oksidaz gibi bazı enzimlerin varlığı ile hızlandırılabilir (34). Glikoz oksidaz, glikozun  $O_2$  ile oksidasyonunu katalize eden bir enzimdir. Glikoz oksidaz mevcut olduğunda, Seryum oksit nanopartiküllerle reaksiyona girerek glikozun oksidasyonunu daha da verimli bir şekilde katalize eden bir kompleks oluşturabilir (34). Glukoz seviyesi tespiti için ürün geliştirmesi araştırmalarında kullanılmaktadır (34).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada T/G HA VSMC insan aort damar düz kası hücre hattı kullanıldı. Hücre kültüründe yapılan işlemler steril ortamda laminar flow kabininde yapıldı. Hücre kültüründe hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması %95 nemli 37°C'da %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde yapıldı. Hücreler %5 yeni doğan sığır serumu, %1 L-glutamin, 10 mg/mL streptomisin ve 100 IU/ml penisilin içeren HAMS F12: EMEM: DMEM besin ortamında 75 cm<sup>2</sup> flasklara ekildi. Hücrelerin yapışması ve özellikleri mikroskopta kontrol edildi. Flaskların tabanına yapışan hücreler hücre kültürü ile aynı ısıdaki Tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Tipte kalan hücreler uygun besi yeri eklenerek pasajlandı ve 3'er gün ara ile 5. pasaja kadar çoğaltıldı. 5. pasajda hücreler DMSO medyumlu kryotüplerde sıvı azot içinde donduruldu ve -150 °C'de depolandı. Çalışmaların tümünde hücre hatlarının 5. pasajlarından başlandı.

İnsan aort düz kası hücre hattı (T/G HA VSMC) %95 nemli bir ortamda ve %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 37°C'de çoğaltılması ve pasajlandı. Hücre kültürü işlemleri, steril ortamda bulunan bir laminar flow kabininde gerçekleştirildi. Hücreler, HAMS F12: EMEM: DMEM besin ortamına %5 yeni doğan sığır serumu, %1 L-glutamin, 10 mg/mL streptomisin ve 100 IU/ml penisilin ilave edilerek 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekildi. Hücrelerin yapışması ve özellikleri mikroskop altında kontrol edildi. Flasklara yapışmış olan hücreler Tripsin-EDTA ile aynı sıcaklıkta olan hücre kültürü ile çıkarılarak santrifüj tüpüne transfer edildi. 2000g'de 3 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücreler uygun besi ortamı ile pasajlanarak 3 gün aralıklarla 5. pasaja kadar çoğaltıldı. 5. pasajda hücreler DMSO içeren bir ortamla kryotüplerde sıvı azot içinde donduruldu ve -150 °C'de depolandı. Çalışmanın tüm aşamalarında hücre hatlarının 5. pasajlarından başlandı.

#### 3.2. MTT Testi ile IC<sub>50</sub> Dozunun Belirlenmesi

MTT testi, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid adı verilen sarı renkli bir tetrazolyum tuzunun suda

çözünmeyen mor renkli kristallere dönüştürülmesi prensibine dayanan bir kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntemde, hücreler üzerine eklenen sarı renkli MTT çözeltisi, hücre içindeki mitokondrilerdeki redüktaz enzimleri tarafından indirgenerek mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Spektrofotometre kullanılarak ölçülen renk değişimi ve hücrelerin canlılığını, proliferasyonunu veya sitotoksitesini belirlemek için kullanılır. MTT testi, hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir ve hücre tabanlı deneylerde kullanılan yaygın bir yöntemdir

96 kuyucuklu plakalara  $1 \times 10^5$  olacak şekilde hücre ekimi yapıp 24 saat süre ile %95 nemli  $37^\circ\text{C}$ 'da %5  $\text{CO}_2$  ortamda inkübe edilmiştir. Ardından 0  $\mu\text{M}$ , 4,8  $\mu\text{M}$ , 9,6  $\mu\text{M}$ , 19,25  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  dozlarında 20  $\mu\text{l}$  nano ve mikro seryum oksit partikülleri 24 ve 48 saat için uygulanmıştır. 5 mg/mL MTT çözeltisi 20  $\mu\text{l}$ /kuyucuk olarak uygulanarak 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından plakalar ters çevrilerek medyum uzaklaştırılmıştır. 200  $\mu\text{l}$  DMSO eklenerek Tetrazolyum tuzunun çözünmesi sağlandıktan sonra 492 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuyla (Multiskan GO) hücrelerin optik yoğunlukları okunmuştur. Elde edilen verileri probit analizi SPSS 20 yazılımıyla değerlendirilerek hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz olan  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Hücre canlılığı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı: } \frac{\text{Örnek absorbands değeri}}{\text{Kontrol absorbands değeri}} * 100$$

### **3.3. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi ile Seryum Miktar Tayini**

Hücrelere 24 ve 48 saat  $\text{IC}_{50}$  değerlerinde mikro ve nano partiküllere maruz kaldıktan sonra ICP-MS analizi ile hücre içindeki seryum miktarları belirlenmiştir. Hücre kültüründe medyum uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücrelere 1 mL %65 nitrik asit eklenip 24 saat beklenerek hücreler sindirilmiştir. Ardından üzerine 9 mL ultra saf su eklenerek Agilent 7700 model indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) (Agilent Teknolojileri, Waldbronn, Almanya) ile okunmuştur. Sigma 16734 seryum tespiti için standart olarak kullanılmıştır.

### 3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

T/G HA VSMC hücreleri, her bir kuyuda  $3 \times 10^6$  hücre olacak şekilde kültür tabakalarına ekildi. 24 saat sonra, deneysel gruplara MTT testi sonucuna göre belirlenmiş olan seryum oksit nanopartikülleri ve mikropartikülleri  $IC_{50}$  dozunda 24 ve 48 saat uygulandı. Tüm gruplardaki hücrelerden RNA izolasyonu, PureLink RNA Mini Kit kullanılarak üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri nanodrop (NaNoQ OPTIZEN) ile belirlendi. cDNA sentezi, yüksek kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti kullanılarak RNA örneklerinden üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. 3 tekrarlı çalışıldı.

Kaspaz 3, Kaspaz 9, TNF- $\alpha$ , SOD, CAT, GSH antioksidan enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonları düzeyleri Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve Endojen gen olarak  $\beta$ -aktin kullanılacaktır. qRT-PCR yönteminde, gen ekspresyon çalışmalarında izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanılacaktır.

Sentezlenilecek olan cDNA'lar qRT-PCR'da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak, primerler ile qRT-PCR'da PCR program: 1 döngü 2 dakika  $50^{\circ}C$  ve 10 dakika  $95^{\circ}C$ , bunu takiben, 40 döngü denaturasyon ( $95^{\circ}C$  15 s) ve annealing, uzama ( $60^{\circ}C$  'de 1 dakika) ile çoğaltıldı. cDNA'yı boyayan SYBR Green boyası kullanıldı. mRNA ifade düzeyleri,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemiyle analiz edildi ve kat değişimi olarak hesaplandı.

**Tablo 3.1. RT-qPCR için kullanılan gen sekansları**

Gen	Primer sekansı (5'-3')
<b>SOD</b>	F: GTTCGGTGACAACACCAATG R: GGAGTCGGTGATGTTGACCT
<b>CAT</b>	F: TACGAGCAGGCCAAGAAGTT R: ACCTTGTACGGGCAGTTCAC
<b>GSH</b>	F: TGGGACCAGCAAGTAAAACC R: TCGCGAATG TAGAACTCGTG
<b>Tnfa</b>	F: AGGCGCTCCCCAAGAAGACA R: TCCTTGGCAAACTGCACCT
<b>Cas9</b>	F: AGCCAGATGCTGTCCCATAC R: CAGGAACCGCTCTTCTTGTC
<b>Cas3</b>	F: AGTTGGACCCACCTTGTGAG R: AGTCTGCAGCTCCTCCACAT
<b>B-Actin</b>	F: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC R: AGCACTGTGTTGGGCGTACAG

**Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri**

Adı	Markası	Kodu
T/G HA VSMC	ATCC	CRL-1999
Seryum ICP standart	Sigma	16734
Serium(IV) oksit, <25nm	Sigma	544841
Seryum(IV) oksit, <5 mikron	Sigma	211575
MTT	Biomatik	A3338
Etanol	Merck	603-002-00-5
DMSO	Merck	67-68-5
Ham's F-12	Multicell	318-010-CL
EMEM	Multicell	320-026-CL
DMEM	Multicell	319-020-CL
Tripsin-EDTA	Multicell	352-542-EL
L-Glutamin	Multicell	609-065-EL
FBS	Multicell	FBS-HI-IIA
Penisilin-Streptomisin	Multicell	450-201-ZL
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	K182002

**Tablo 3.3 Kullanılan cihazlar**

Kullanılan Cihazların Adı	Kullanılan Cihazların Markası
Laminar Kabin	Safe Fast Elite
Etüv (%5 CO <sub>2</sub> )	Panasonic
Santrifüj	Hermle
Mikro plaka spektrofotometre	Multiskan go-Thermo Fisher Scientific
Mikro hacim spektrofotometre	Nanoq Optizen
Vorteks	WiseMix
ICP kütle spektrometresi	Agilent 7700

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, SPSS 20.0 versiyonunda (Lisans no: 10240642) (IBM Corporation, Armonk, NY) gerçekleştirildi. Tüm veriler için normal dağılımın doğrulanması için Shapiro-Wilk ve varyans homojenliği için Levene istatistikleri uygulandı. Tek yönlü ANOVA için varsayımları karşılayan veriler, ANOVA analizi ve sonrasında Tukey yöntemi ile post hoc analiz edildi. Gruplar arasındaki farklar  $p < 0,05$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veriler, aksi belirtilmedikçe ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde sunulmuştur.  $IC_{50}$  değeri probit analizi ile hesaplanmıştır. Hücre yüzde canlılık değerlerinin doz ve zamana göre değişimi korelasyon analizi ile yapılmıştır.



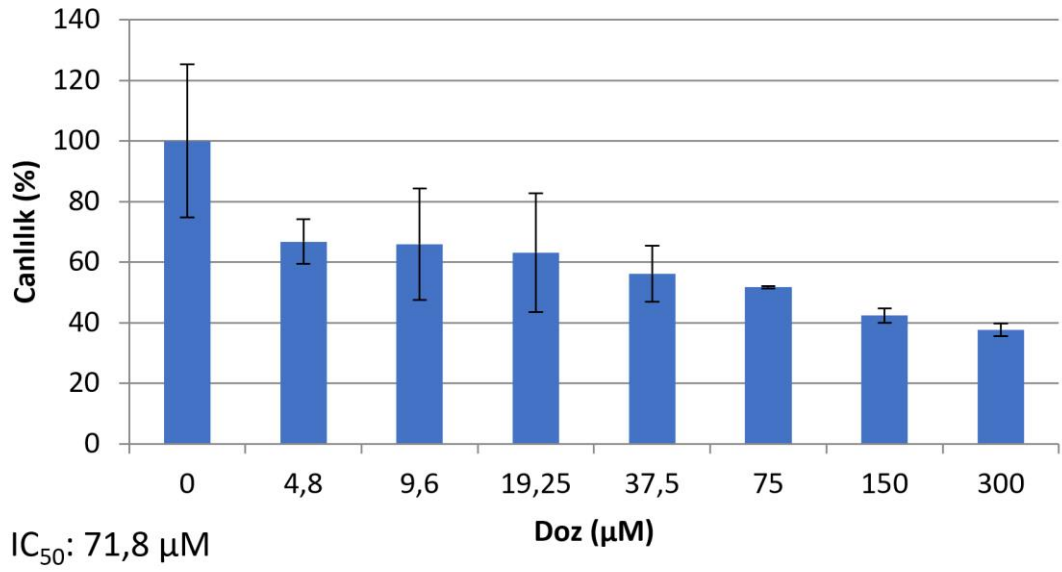
## 4. BULGULAR

### 4.1. MTT Testi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

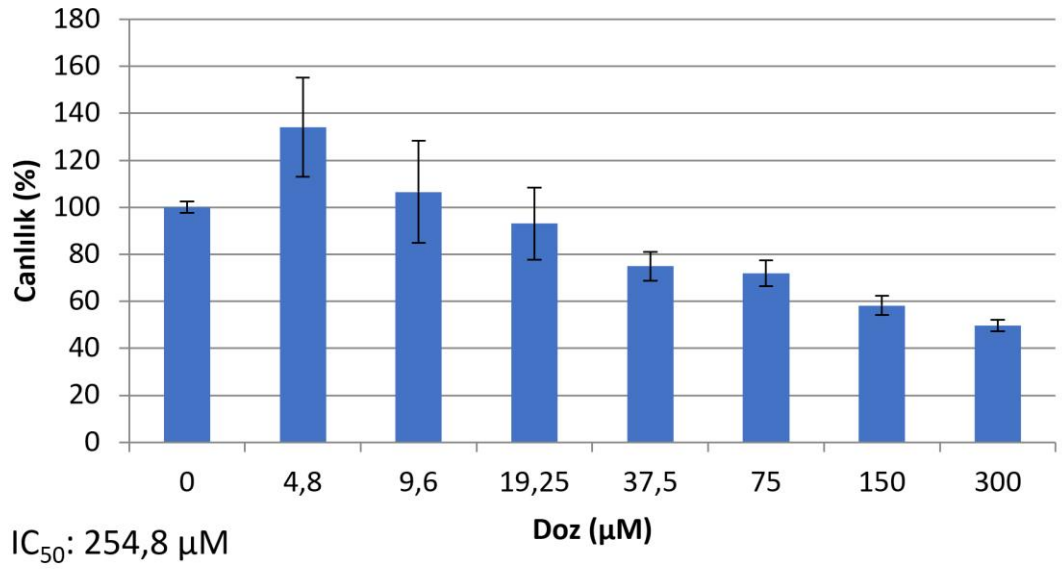
İnsan aort damar düz kası hücre hattına (T/G HA VSMC) 24 ve 48 saat sürelerle 4,9  $\mu\text{M}$  ila 300  $\mu\text{M}$  doz aralığında seryum oksit mikro ve nano partiküller uygulanmıştır. Gereç ve yöntemler kısmında belirtildiği şekilde gerçekleştirilen MTT testi ile elde edilen verilere probit analizi uygulanarak  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanmıştır.

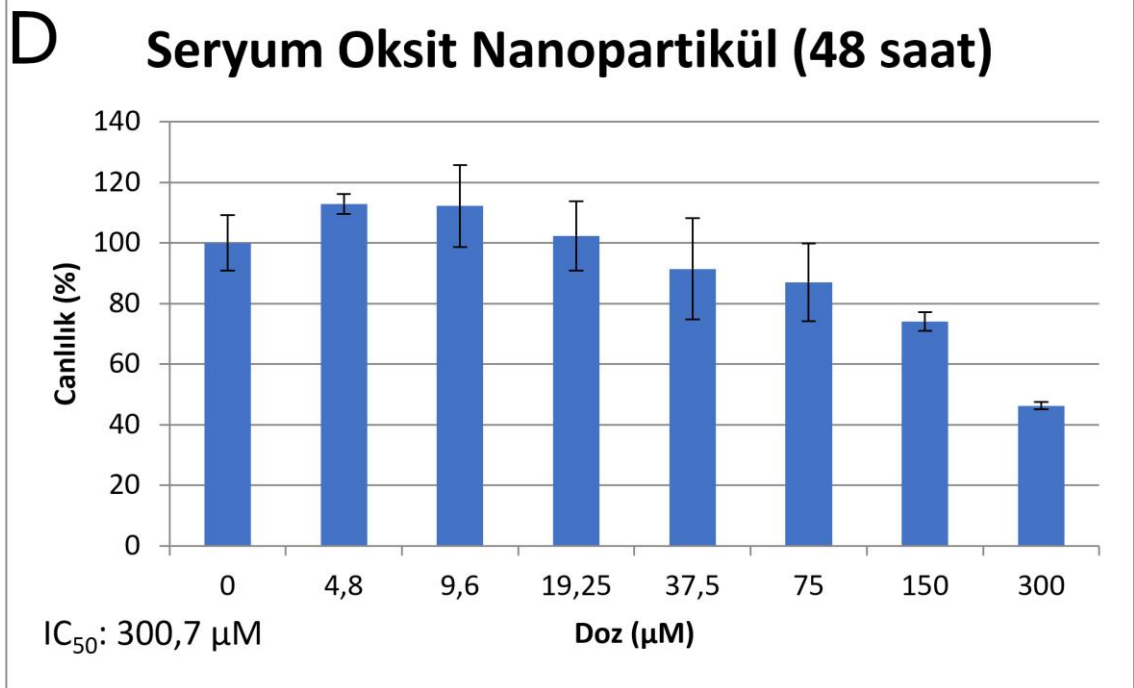
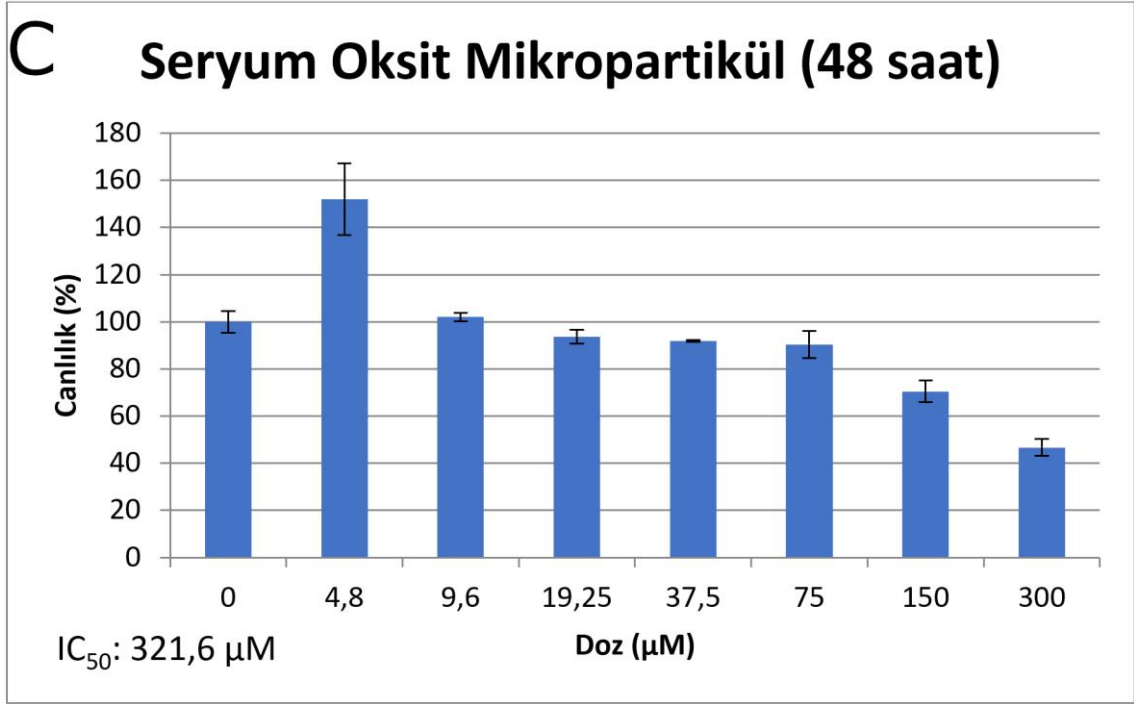


## A Seryum Oksit Mikropartikül (24 saat)



## B Seryum Oksit Nanopartikül (24 saat)



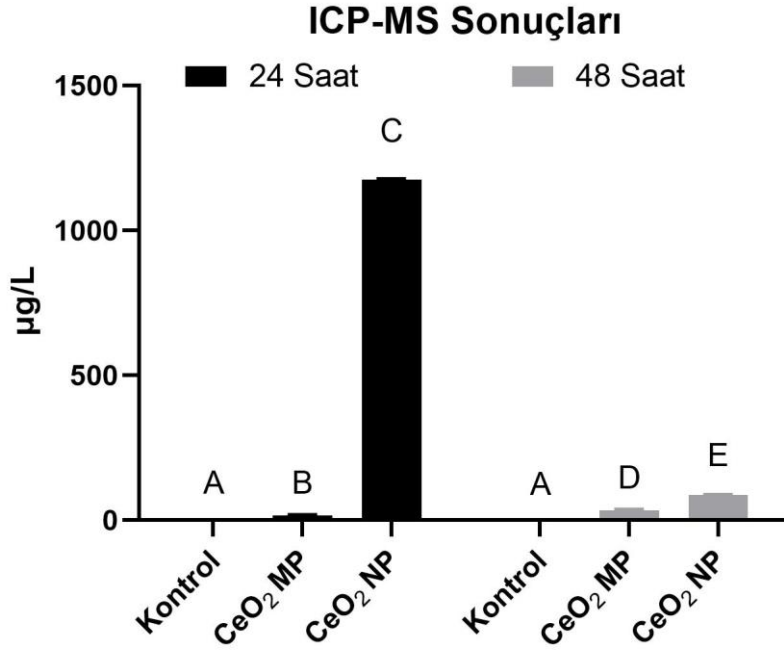


**Şekil 4.1.** T/G HA VSMC hücre hattına 24 saat mikro (A) ve nano (B) seryum oksit partikülleri uygulanması ve 48 saat mikro (C) ve nano (D) seryum oksit partikülleri uygulanması sonucu MTT testi ile elde edilen Doz, %Canlılık grafiği. Dikey barlar standart sapmayı ifade etmektedir.

Şekil 4.1.'de 24 ve 48 saat seryum oksit mikropartikül ve nanopartiküllerine maruz kalma sonucu elde edilen doz canlılık grafiği verilmiştir. Seryum oksit mikropartikül

grubunda da canlılık ile doz arasında negatif bir korelasyon ( $r = -0,594$ ,  $p < 0,0001$ ) ve canlılık ile zaman arasında pozitif bir korelasyon ( $r = 0,551$ ,  $p > 0,0001$ ) bulunmuştur. Seryum oksit nanopartikül grubunda ise canlılık ile doz arasında negatif bir korelasyon ( $r = -0,816$ ,  $p < 0,0001$ ) saptanmıştır.

#### 4.2. ICP-MS ile Seryum Miktar Tayini

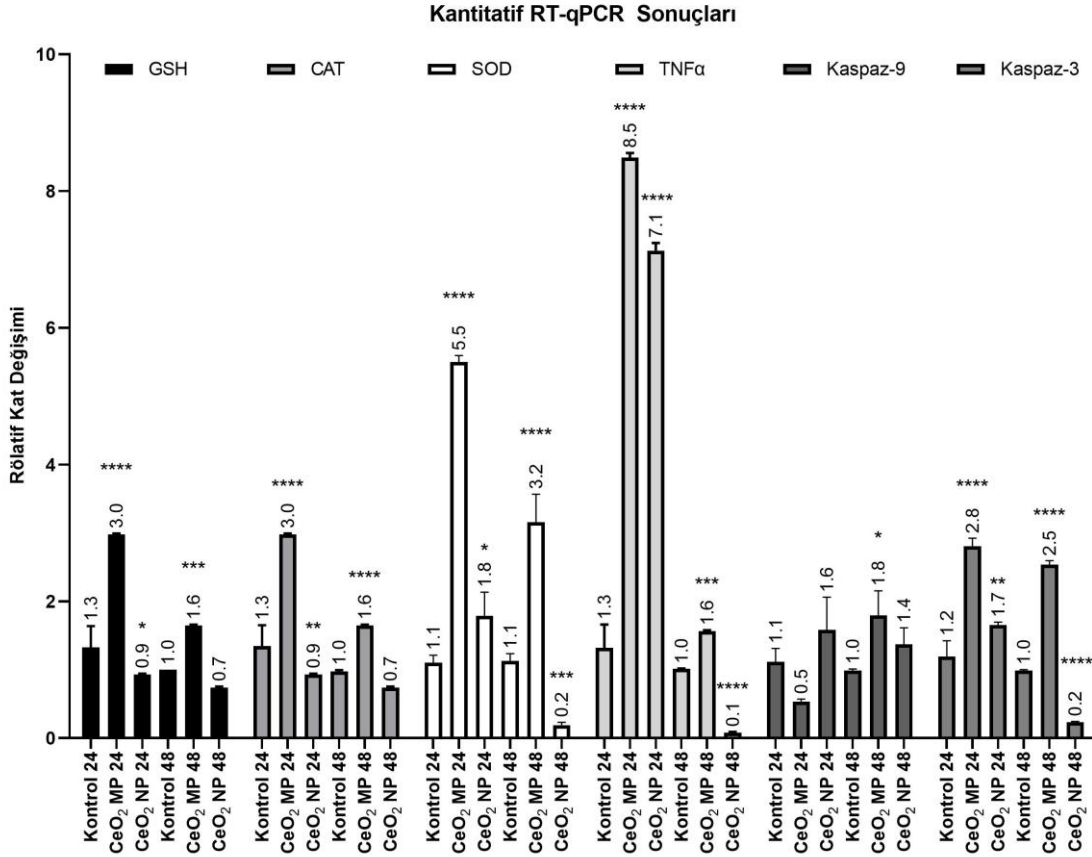


**Şekil 4.2. ICP MS ile seryum oksit miktar tayini sonuçları. Dikey barlar standart sapmayı ifade etmektedir.**

**CeO<sub>2</sub> MP:** Seryum oksit mikropartikül; **CeO<sub>2</sub> NP:** Seryum oksit nanopartikül. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey,  $n=3$ . Farklı harfle gösterilen ortalamalar istatistiksel anlamlı farklıdır ( $p<0,0001$ ).

ICP-MS analizi sonuçlarına göre, gruplar arasında seryum miktarlarında belirgin farklılıklar gözlemlendi (Şekil 4.2.). Seryum uygulanmamış kontrol gruplarında seryum miktarı oldukça düşüktü (24 saat 0,049 µg/L ve 48 saat 0,054 µg/L). Seryum oksit mikropartikül maruziyet gruplarında ise 24 saatte 15,76 µg/L, 48 saatte ise 34,46 µg/L saptandı. Ancak seryum oksit nanopartikül gruplarında 24 saat maruziyette 1175,32 µg/L, 48 saatte ise 86,34 µg/L tespit edildi. Seryum oksit uygulaması hücrelerde istatistiksel anlamlı seryum miktarı artışına neden olmuştur ( $p<0,0001$ ). Bu bulgular, seryum nanopartiküllerinin hücrelerde daha fazla seryum birikimine neden olabileceğini ve maruziyet süresine bağlı olarak farklı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

### 4.3. qRT-PCR Sonuçları



**Şekil 4.3. 24 ve 48 saat seryum oksit nano ve mikropartiküllerinin uygulanması sonucu qRT-PCR ile belirlenen antioksidan sistem ilişkili GSH, SOD, CAT ve apoptoz ilişkili TNFα, CAS9, CAS3 mRNA ifade düzeyleri.**

**CeO<sub>2</sub> MP:** Seryum oksit mikropartikül; **CeO<sub>2</sub> NP:** Seryum oksit nanopartikül. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey, n=3. Kontrol grubuna göre \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; \*\*\*\*: p<0,0001.

CeO<sub>2</sub> Nanopartikül grubu, 24 saat maruziyet süresinde Kaspaz 3 ve TNFα gen ifadelerinde anlamlı bir artış gösterdi (sırasıyla 1,7 kat, p<0,01 ve 7,1 kat, p<0,0001) (Şekil 4.3.). CAT ve GSH gen ifadeleri azaldı (sırasıyla 0,9 kat, p<0,01 ve 0,9 kat, p<0,05). Kaspaz 9 gen ifadesi artışı anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (1,6 kat).

CeO<sub>2</sub> mikropartikül grubu, 24 saat maruziyet süresinde Kaspaz 3, TNFα ve SOD gen ifadelerinde anlamlı bir artış gösterdi (sırasıyla 2,8 kat, p<0,0001; 8,5 kat, p<0,0001; ve 5,5 kat, p<0,0001). CAT gen ifadesi anlamlı bir azalma gösterdi (0,9 kat, p<0,01), ancak GSH gen ifadesi anlamlı bir artış gösterdi (3 kat, p<0,0001). Kaspaz 9 gen ifadesi ise anlamlı seviyede olmayan bir azalma gösterdi (0,5 kat).

CeO<sub>2</sub> nanopartikül grubu, 48 saat maruziyet süresinde Kaspaz 3 ve TNF $\alpha$  gen ifadelerinde azalma gözlemlendi (sırasıyla 0,2 kat, p<0,0001 ve 0,1 kat, p<0,0001). CAT gen ifadesi artış gösterdi (1,2 kat), ancak SOD ve GSH gen ifadelerinde anlamlı bir azalma görülmedi. Kaspaz 9 gen ifadesi artışı ise anlamlı değildi (1,4 kat).

CeO<sub>2</sub> mikropartikül grubu, 48 saat maruziyet süresinde Kaspaz 3, TNF alfa, SOD, CAT, GSH ve Kaspaz 9 gen ifadelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla 2,5 kat, p<0,0001; 1,6 kat, p<0,01; 3,2 kat, p<0,0001; 2,7 kat, p<0,0001; 1,6 kat, p<0,001; 1,8 kat, p<0,05).



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin aort düz damar kası hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir. MTT testi ile IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri 24 ve 48 saat süresince hücrelere uygulanmıştır. Ardından hücrelere alınan seryum iyon miktarları ICP-MS analizi ile belirlenmiştir. Apoptoz ve antioksidan sistem ilişkili mRNA ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bulgularımız, CeO<sub>2</sub> nanopartikül ve mikropartiküllerin farklı maruziyet sürelerinde hücre yanıtlarını farklı şekillerde etkilediğini ortaya koymaktadır. CeO<sub>2</sub> nanopartikül grubu, 24 saat maruziyette hücrelerde apoptotik etkiler gösterirken, 48 saat maruziyette apoptoz kaspaz 3 yolağını inhibe etmiştir. Bununla birlikte, CeO<sub>2</sub> mikropartikül grubu hem 24 saat hem de 48 saat maruziyette hücre apoptozunu uyarıcı etkiler sergilemiştir. Bu sonuçlar, seryum oksit hücre düzeyindeki etkilerinin hem boyut hem de maruziyet süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Seryum oksit nanopartikülleri çeşitli biyomedikal uygulamalarda umut vaat etmektedir. Nanotıp, rejeneratif tıp, doku rejenerasyonu, ilaç dağıtımı, gen terapisi, teranostik, tıbbi görüntüleme ve antibakteriyel ajanlar olarak potansiyelleri araştırılmıştır (35-37). Ek olarak, peptit modifiye seryum oksit nanopartikülleri geliştirilmiş, çoklu biyolojik özellikler sergileyerek biyomedikal uygulamalardaki potansiyellerini daha da vurgulamıştır (38). Ayrıca, seryum oksit nanopartikülleri, gastrointestinal sistemi ve inflamatuvar bağırsak hastalığını görüntülemek için bilgisayarlı tomografi kontrast maddesi yetenekleri açısından araştırılmıştır (39). Seryum oksit nanopartikülleri, radyasyondan korunma ve hedefli ilaç dağıtım sistemlerindeki potansiyellerini gösteren radyoprotektif etkinlikleri ve gelişmiş hücresel içselleştirmeleri için araştırılmıştır (40). Buna ek olarak, seryum oksit nanopartikülleri etkili biyolojik antioksidan özellikleriyle tanınmıştır ve bu da onu çeşitli biyomedikal uygulamalar için umut verici bir aday haline getirmektedir (41).

Seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin insan aort damarı düz kasları üzerindeki sitotoksik etkisi, partikül büyüklüklerine ve uygulanma süresine bağlı olarak farklılık gösterir hipotezimizin doğruluğunu seryum oksit mikropartikül grubunda da canlılık ile doz arasında negatif korelasyon ve canlılık ile zaman arasında pozitif

korelasyon olmasına ek olarak seryum oksit nanopartikül grubunda canlılık ile doz arasında negatif korelasyon olması desteklemektedir.

Seryum oksit nanopartikül grubunda da doz ve canlılık arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır. Yani nanopartikül konsantrasyonunun artması, hücre canlılığının azalmasına yol açmıştır. CeO<sub>2</sub> nanopartikül grubu, 24 saat maruziyette hücre içi seryum miktarı 1175.32 µg/L seviyesine ulaşarak Kaspaz 3 ve TNFα mRNA ifadelerinde artışa neden olurken, katalaz ve GSH gen ifadelerinde azalmaya neden olmuştur. Bu CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin hücreye alındığını gösterir. Araştırdığımız mRNA ifadeleri apoptoz, inflamasyon ve antioksidan savunma sistemini düzenlemekle görevlidir. 24 saat maruziyet hücre içinde seryum birikimine, inflamasyona ve apoptoza neden olduğu şeklinde yorumlanabilir. Katalaz ve GSH gen ifadelerindeki azalmalar, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin antioksidan savunma mekanizmasını bozduğu anlamına gelebilir.

CeO<sub>2</sub> nanopartikül grubunun 48 saat maruziyetinde hücre içi seryum miktarının 86,34 µg/L seviyesine ulaşması, seryumun hala hücre içinde etkili olduğunu göstermektedir. Ancak, bu süre boyunca Kaspaz 3 ve TNFα gen ifadelerinde azalma gözlenmesi, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin apoptoz ve inflamasyon süreçlerini baskıladığını düşündürülebilir. Kaspaz 3, hücrelerde apoptozu tetikleyen bir enzimdir, TNFα ise inflamasyonu düzenleyen bir sitokin olarak bilinir ve apoptozun dışsal yolağında görev alır. Bu gen ifadelerindeki azalmalar, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin bu süre zarfında bu süreçleri baskıladığını gösterir ve MTT testindeki IC<sub>50</sub> dozunun 48 saatte 24 saate göre yükselmesi bununla uyumludur. Katalaz gen ifadesindeki artış, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin oksidatif stresin etkilerini hafiflettiğini gösterebilir. Katalaz, hücrelerde bulunan bir enzimdir ve oksidatif stresin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynar. Bu artış, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin hücrelerin antioksidan savunmasını güçlendirdiğini ve oksidatif stresi azalttığını düşündürülebilir. SOD ve GSH gen ifadelerindeki değişimlerin anlamlı olmaması, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin bu süre zarfında bu genlerin ifadesini etkilemediğini gösterir. SOD, hücrelerde bulunan bir enzimdir ve oksidatif stresin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynar. GSH ise hücrelerde bulunan bir antioksidan moleküldür. Bu bulgular, CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin bu süre zarfında bu antioksidan bileşiklerin seviyelerini etkilemediğini göstermektedir. Düşük yerçekimine bağlı kas hasarının hücre kültüründe değerlendirdiği bir çalışmada İnsan iskelet miyoblast hücre hattında 48 saat maruz kalma sonucu seryum oksit

nanopartiküllerinin antioksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiştir ve bu sonuç çalışmamızdaki 48 saat maruz kalma sonucu ile uyumludur (42).

Şekil, boyut, yüzey kaplaması gibi farklılıklar nanopartiküllerin etkilerinde farklılıklara neden olabilir. Yapılan bir çalışmada 8 nm kübik şekilli floresanla etiketlenmiş CeO<sub>2</sub> nanopartikülleri, BEAS-2B ve RAW 264.7 hücrelerinde sırasıyla kaveolin-1 ve LAMP-1 pozitif endozomal bölgelere zarar vermeden alınmıştır. Bunun sonucunda herhangi bir iltihaplanma veya sitotoksosite meydana gelmemiştir. Bunun yerine, bizim çalışmamızdaki 48 saat nanopartikül uygulaması grubuna ile benzer şekilde CeO<sub>2</sub> nanopartikülleri, ROS üretimini baskılamıştır ve hücrelere dış kaynaklı bir oksidatif strese karşı direnç oluşturmuştur (43). Başka bir çalışmada PC12 nöron benzeri hücreler, bizim çalışmamızdaki seryum oksit nanopartiküllerinin aynısı ile inkübe edildiğinde, PC12 hücrelerinin metabolik aktivitelerinde herhangi azalma göstermediği ve hücre farklılaşma yeteneklerinin korunduğu bildirilmiştir (24). Ayrıca, hücreler seryum oksit nanopartiküllerine 72 saat maruz kaldığında nöronal uzunlukta bir artış olmuştur ve hidrojen peroksit ile uyarıldıktan sonra 72 saat seryum oksit nanopartiküllerine maruz kalındığında ROS üretiminde bir azalma olmuş, ek olarak dopamin üretiminde de bir artış görülmüştür (24). Bu sonuç bizim çalışmamızla uyumludur. HepG2 hücre hattına H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin 4 nm boyutunda 100 µg/mL dozunda seryum oksit nano partikülleri uygulanması ile inhibe edildiği bildirilmiştir (44). 5-7 nm boyutundaki seryum oksit nano partikülleri 5 µg/kg dozunda uygulanmış sıçanların iskelet kaslarında yapılan seryum miktar tayininde 90 günde %90'ın üzerinde kaslardan temizlendiğini ve enflamasyona neden olmadığı gösterilmiştir ve bu bizim sonuçlarımızla birlikte değerlendirildiğinde farklı boyutlardaki seryum oksit nanopartiküllerin kas hücreleri üzerine olan etkisinin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir (45).

Asati ve ark. yaptığı çalışma, seryum oksit nanopartiküllerin yüzey yüküne bağlı hücre içi yerleşimi ve sitotoksitesini araştırmıştır (25). Bu çalışma, nanopartiküllerin biyolojik sistemlerle etkileşimi üzerinde yüzey yükünün önemini vurgulamıştır. Çalışmada, farklı yüzey yüklerine sahip polimer kaplı seryum oksit nanopartikülleri kullanılmıştır. Bu nanopartiküller, çeşitli hücre hatlarında hücreye alınması ve sitotoksosite açısından incelenmiştir. Nanopartiküllerin boyutları Geçirimli Elektron Mikroskobu ile 3-4 nm olarak belirlenmiş, dinamik ışık saçılımı deneyleriyle yüzey yükleri ve hidrodinamik çapları (dekstran kaplı nanopartikül için 14 nm, poliakrilik asit

kaplı nanopartikül ve aminlenmiş poliakrilik asit kaplı seryum oksit nanopartikül için 5 nm) ölçülmüştür. Sonuçta Pozitif ve nötr yüklü seryum oksit nanopartiküllerinin çoğu hücre hattında internalize olduğu, negatif yüklü nanopartiküllerin ise özellikle kanser hücre hatlarında (A549 akciğer kanseri hücreleri) internalize olduğu gözlemlenmiştir. Negatif yüzey yüklü poliakrilik asit kaplı seryum oksit nanopartiküllerinin normal hücrelerde (HEK293 ve H9c2) minimum internalizasyon gösterdiği, ancak A549 hücrelerinde lizozomlara yerleşerek toksisite gösterdiği bulunmuştur. Pozitif yüklü aminlenmiş poliakrilik asit kaplı seryum oksit nanopartiküllerinin hem kanser hem de normal hücre hatlarında lizozomlara yerleştiği ve toksisite gösterdiği saptanmıştır. Nötr yüklü dekstran kaplı seryum oksit nanopartiküllerinin ise hücrelerin sitoplazmasında dağıldığı ve herhangi bir hücre hattında toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışma, nanopartiküllerin yüzey yükü ve hücre içi yerleşim yerlerinin, bu materyallerin sitotoksitesisi üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçlar nanopartiküllerin kanser tedavisinde potansiyel kullanımı için önemli bilgiler sağlamaktadır. Nanopartiküllerin farklı hücre hatlarına olan etkisinin anlaşılması, hedeflenen tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir adımdır. Ancak bu nanopartiküllerin uzun vadeli etkileri ve canlı organizmalar üzerindeki etkileri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini de unutmamak gerekir (25).

Dong Hyuk Youn ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, seryum oksit nanopartiküllerin farklı morfolojilerinin hafif travmatik beyin hasarı üzerindeki terapötik etkilerini araştırılmıştır (46). Çalışmada seryum oksit nanopartikülleri  $84.3 \pm 29.6$  nm uzunluk ve  $5.5 \pm 1.2$  nm çap boyutunda A grubu nanorodlar ve  $127.2 \pm 39.9$  nm uzunluk ve  $9.3 \pm 1.9$  nm çap boyutunda B grubu nanorodlar olmak üzere 2 boyutta nanorodlar ile buna ek olarak nanoküpler ve nanopolidrahedronlar olarak sentezlenmiştir. Seryum oksit nanopartiküllerinin lipopolisakkarit ile uyarılmış U937 ve RAW264.7 hücrelerinde SOD ve nitrik oksit salınımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. İn vitro deneyde A grubu nanorodlar oksidatif stresi azaltmada ve iltihaplanmayı kontrol etmede diğer nanopartiküllerden daha etkili bulunmuştur (46). Aynı çalışmada C57BL/6J erkek fareler üzerinde yapılan deneylerde, A ve B grubu nanorodların beyin ödemi ve iltihaplanma üzerindeki etkileri incelenmiştir. A grubu nanorodlar hasarlı beyin bölgesinde daha iyi dağılım göstermiş ve hafif travmatik beyin hasarı sonrası kognitif bozuklukları azaltmada diğer nanopartiküllerden daha üstün bulunmuştur. Yapılan çalışmada nanopartiküllerin morfolojisinin, biyomedikal

performans üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle A grubu nanorodlar, yüzeyinde daha yüksek  $Ce^{3+}/Ce^{4+}$  oranına sahip olması ve daha küçük boyutları nedeniyle, hedeflenen terapötik etkileri sağlamada diğer nanopartikül formlarından daha başarılı bulunmuştur. Bu bulgular, nanopartiküllerin morfolojisinin, beyin hasarı gibi spesifik tıbbi durumlar için tedavi geliştirme üzerindeki etkisini anlamada önemli bir adımı temsil etmektedir (46).

İnsan nöroblastom hücre hattında (IMR32) yapılan bir çalışmada nano seryum oksit nano partiküllerinin genotoksisiteye ve oksidatif strese neden oluşan sitotoksisitenin doza bağımlı olduğunu ve seryum oksit nanopartiküllerinin mikropartiküllerine göre daha sitotoksik olduğu bildirilmiştir (47). Bunun nedeni nanopartiküllerin daha reaktif olması ve nöroblastom IMR32 hücre hattı kanser hücre hattı olduğundan asidik pH'a bağlı olarak seryum oksit nanopartiküllerinin oksidan etki göstermesidir.

İn vivo bir çalışmada  $CeO_2$  nanopartiküllerine akciğerlerden maruz kalmanın, vasküler yaralanma hayvan modelinde oksidatif stres, inflamasyon ve DNA hasarı gibi mekanizmalar aracılığıyla vasküler toksisiteyi şiddetlendirdiği bildirilmiştir (48). Sıçanlarda 28 gün oral yoldan yüksek doz seryum oksit nanopartiküllerine maruz kalma genetik hasara, histoloji ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (49). Bu in vivo çalışmalar in vitro verilerin in vivo olarak da değerlendirilmesi gerektiğinin önemini göstermektedir.

İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinde yapılan in vitro bir çalışmada seryum (IV) oksit nanopartiküllerinin ve bulk boyutlu seryum oksit partiküllerinin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. bulk ve nano boyutlu seryum oksit partiküllerinin boyutları sırasıyla ortalama 231,61 nm ve 27,15 nm olarak hesaplanmıştır. Araştırma, 0,001 ila 200 ppm konsantrasyon aralığındaki seryum oksitin sitotoksisitesini MTT yöntemiyle değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm konsantrasyonlarda hem bulk partikül hem de nanopartiküllerin lenfosit hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkileri gözlemlenmiştir. Özellikle 100 ve 200 ppm konsantrasyonlarında hücre canlılığı %25'in altına düşmüş, bu konsantrasyonlarda bulk partiküllerin nano partiküllere göre daha güçlü toksik etkisi olduğu belirlenmiştir. Çalışmada hem bulk hem de nano boyutlu seryum oksitin özellikle yüksek konsantrasyonlarda, insan lenfosit hücrelerinde belirgin sitotoksisiteye neden olduğunu gösterilmiştir. Nano boyutlu seryum oksitin belirli konsantrasyonlarda bulk formundan daha toksik olabileceğini

ortaya koymakta ve bu bulgular seryum oksitin biyomedikal kullanımıyla ilgili önemli düşünceleri gündeme getirmektedir. Çalışmanın sonuçları serum oksitin biyomateryal olarak kullanımının yan etkilerini daha iyi anlamak için detaylı in vivo çalışmalar gerektirdiğini vurgulamaktadır (50).

Seryum oksit mikropartikül grubunda, doz ve canlılık arasında negatif bir korelasyon bulunması, mikropartikül konsantrasyonunun artmasıyla hücre canlılığının azaldığını göstermektedir. CeO<sub>2</sub> mikropartikül grubu 24 saat maruziyette hücre içi seryum miktarı 15,76 µg/L seviyesine ulaşırken Kaspaz 3, TNF alfa, GSH ve SOD gen ifadelerinde artışa, katalaz gen ifadesinde ise azalışa neden olmuştur. Bu 24 saat maruziyette CeO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin hücredeki oksidatif stres ve inflamasyon yanıtını tetiklediğini işaret eder. Öte yandan, katalaz gen ifadesindeki azalma, CeO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin antioksidan enzim katalazın aktivitesini inhibe ettiğini gösterir. Katalaz, hücrelerde hidrojen peroksidin parçalanmasından sorumlu olan bir enzimdir ve oksidatif stresin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynar. CeO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin katalaz aktivitesini azaltması, oksidatif stresin artmasına ve hücrelerin antioksidan savunma mekanizmasının zayıflamasına neden olabilir.

CeO<sub>2</sub> mikropartikül grubunun 48 saat maruziyet süresinde hücre içi seryum miktarının 34.46 µg/L seviyesine yükselmesi, bu partiküllerin süreklilik gösteren bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu süre zarfında tüm gen ifadelerinde anlamlı artışlar gözlenmesi, CeO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin apoptozis, inflamasyon, antioksidan savunma ve hücrel stres mekanizmalarını etkilediğini düşündürülebilir.

Hipotezlerimizden birisi de seryum oksit mikro ve nano partiküllerinin insan aort damar düz kasları üzerindeki sitotoksik etkisi, intrinsik veya ekstrinsik yolak aracılığı apoptozun tetikleyerek gerçekleştiğidir. Apoptoz ilişkili mRNA ifadeleri değerlendirildiğinde seryum oksit nanopartikül 48 saat grubu dışındaki gruplarda apoptozun tetiklendiği şeklinde sonuçlarımız yorumlanabilir.

Seryum oksit nano ve mikro partiküllere yanıtta tür farkı da önemlidir. Çevresel toksisite araştırmalarında kullanılan *Allium cepa*'nın kök meristem hücrelerinde yapılan değerlendirmede mikro ve nano partiküllerin kromozomal bozukluklarına ve DNA hasarına neden olduğu genotoksik ve sitotoksik olduğu gösterilmiştir (51).

Çalışmamızda CeO<sub>2</sub> nanopartikül ve mikropartiküllerin hücre düzeyindeki etkilerindeki farklılığın nedeni boyut, yüzey özellikleri, biyoaktivite ve hücre içine alınma yeteneklerinin farklı olması olabilir. Bunun yanı sıra, maruziyet süresi de

nanomalzemelerin hücre yanıtlarını etkileyen önemli bir faktördür. 24 saat ve 48 saat maruziyet sürelerinde gözlenen farklı gen ifadeleri ve hücresel yanıtlar, nanomalzemelerin zaman bağımlı etkilerini vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, CeO<sub>2</sub> nanopartikül ve mikropartiküllerin hücre düzeyinde farklı etki mekanizmalarına sahip olduğunu ve bu etkilerin maruziyet süresine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu bulgular, nanomalzemelerin biyolojik etkilerinin anlaşılması ve güvenli kullanımları için önemli bilgiler sağlamaktadır. Gelecekteki çalışmaların, nanomalzemelerin hücre içi etkileşimlerini daha ayrıntılı bir şekilde incelemesi ve olası toksisite mekanizmalarını aydınlatması önemlidir.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre seryum oksit mikro ve nano partiküllere maruz kalan T/G HA VSMC İnsan aort düz kası hücre hattında sitotoksik etkinin araştırıldığı çalışmamızdaki sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

1. Yapılan MTT testinde 24 ve 48 saat IC<sub>50</sub> değerleri değerlendirilmiştir. Seryum oksit mikropartikül grubunda canlılık ile doz arasında negatif bir korelasyon ( $r = -0.594$ ,  $p < 0,0001$ ) ve canlılık ile zaman arasında pozitif bir korelasyon ( $r = 0.551$ ,  $p > 0,0001$ ) bulunmuştur. Seryum oksit nanopartikül grubunda ise canlılık ile doz arasında negatif bir korelasyon ( $r = -0.816$ ,  $p < 0,0001$ ) saptanmıştır.
2. T/G HA VSMC İnsan aort düz kası hücre hattında ICP-MS ile yapılan seryum oksit mikro ve nano partikül miktar tayininde Seryum uygulanmamış kontrol gruplarında düşük miktarı seryum bulunmuştur. Seryum oksit mikropartikül maruziyet gruplarında ise 24 saatte 15,76 µg/L, 48 saatte ise 34,46 µg/L saptandı. Ancak seryum oksit nanopartikül gruplarında 24 saat maruziyette 1175,32 µg/L, 48 saatte ise 86,34 µg/L tespit edildi.
3. Seryum oksit mikro partikülleri 24 ve 48 saatte antioksidan sistem ilişkili mRNA ifadelerini artırırken, seryum oksit nanopartikülleri ise 24 saatte sadece SOD ifadesinde sınırlı artış yaparken 48 saatte değerlendirdiğimiz antioksidan sistem ilişkili mRNA ifadelerini artırmamıştır.
4. Çalışmamızda apoptoz ilişkili mRNA ifadeleri ise seryum oksit nanopartikül 48 saat grubu haricindeki gruplarda apoptozun tetiklendiği şeklinde yorumlanabilir.

5. Bu sonuçlar, nanomalzemelerin hücre düzeyindeki etkilerinin hem boyut hem de maruziyet süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.



## KAYNAKLAR

1. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R. Applications of Nanotechnology in Medical field. *Glob Health J.* 2023;7:70-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>.
2. Pezzini I, Marino A, Del Turco S, Nesti C, Doccini S, Cappello V, et al. Cerium oxide nanoparticles: the regenerative redox machine in bioenergetic imbalance. *Nanomedicine (Lond).* 2017;12:403-16. doi:<https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0342>.
3. Del Turco S, Ciofani G, Cappello V, Parlanti P, Gemmi M, Caselli C, et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on hemostasis: Coagulation, platelets, and vascular endothelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107:1551-62. doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36669>.
4. Leon L, Chung EJ, Rinaldi C. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. Editor: *Nanoparticles for Biomedical Applications.* ed.: Elsevier; 2020. p.1-4.
5. Declair S, Förstner J. Simulation of Planar Photonic Resonators. Editor: Choi A. *Handbook of Optical Microcavities.* 1th ed. USA: CRC Press; 2014. p.27-82.
6. Toumey C. Plenty of room, plenty of history. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:783-4.
7. Toumey C. Probing the history of nanotechnology. *Nat Nanotechnol.* 2012;7:205-6.
8. Pikula K, Zakharenko A, Chaika V, Kirichenko K, Tsatsakis A, Golokhvast K. Risk assessments in nanotoxicology: Bioinformatics and computational approaches. *Curr Opin Toxicol.* 2020;19:1-6.
9. Vassal M, Rebelo S, Pereira MdL. Metal oxide nanoparticles: Evidence of adverse effects on the male reproductive system. *Int J Mol Sci.* 2021;22:8061. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22158061>.
10. Egbuna C, Parmar VK, Jeevanandam J, Ezzat SM, Patrick-Iwuanyanwu KC, Adetunji CO, et al. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *J Toxicol.* 2021;2021:9954443. doi:<https://doi.org/10.1155/2021/9954443>.
11. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut.* 2007;150:5-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>.
12. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small.* 2008;4:26-49. doi:<https://doi.org/10.1002/smll.200700595>.
13. Haslam G, Wyatt D, Kitos PAJC. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology.* 2000;32:63-75.
14. Almutary A, Sanderson B. The MTT and crystal violet assays: potential confounders in nanoparticle toxicity testing. *Int J Toxicol.* 2016;35:454-62. doi:<https://doi.org/10.1177/1091581816648906>.
15. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual [Internet].* 2016.
16. Aslankoç R, Demirci D, Ümmahan İ, YILDIZ M, Öztürk A, Çetin M, et al. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD),

- katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fak Derg.* 2019;26:362-9. doi:<https://doi.org/10.17343/sdutfd.566969>.
17. Sheng L, Zheng X, Tong H, Liu S, Du J, Liu Q. Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu,Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves. *Plant Sci.* 2004;167:1235-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.022>.
  18. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:236-56. doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00275-2).
  19. Chakravarty R, Chakraborty S, Ram R, Dash A, Pillai MRA. Long-Term Evaluation of 'BARC 68Ge/68Ga Generator' Based on the Nanoceria-Polyacrylonitrile Composite Sorbent. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013;28:631-7. doi:<https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1470>.
  20. Celepli S, Bigat İ, Celepli P, Karagin PH. Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi.* 2020;24:103-11.
  21. Miri A, Beiki H, Najafidoust A, Khatami M, Sarani M. Cerium oxide nanoparticles: green synthesis using Banana peel, cytotoxic effect, UV protection and their photocatalytic activity. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2021;44:1891-9.
  22. Saifi MA, Seal S, Godugu C. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications. *J Control Release.* 2021;338:164-89.
  23. Culcasi M, Benameur L, Mercier A, Lucchesi C, Rahmouni H, Asteian A, et al. EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: Evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. *Chem Biol Interact.* 2012;199:161-76.
  24. Ciofani G, Genchi GG, Liakos I, Cappello V, Gemmi M, Athanassiou A, et al. Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on PC12 Neuronal-Like Cells: Proliferation, Differentiation, and Dopamine Secretion. *Pharm Res.* 2013;30:2133-45. doi:<https://doi.org/10.1007/s11095-013-1071-y>.
  25. Asati A, Santra S, Kaittanis C, Perez JM. Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles. *ACS Nano.* 2010;4:5321-31. doi:<https://doi.org/10.1021/nn100816s>.
  26. Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, et al. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor–stroma interactions. *Biomaterials.* 2011;32:2918-29.
  27. Ji P, Wang L, Chen F, Zhang J. Ce<sup>3+</sup>-centric organic pollutant elimination by CeO<sub>2</sub> in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *ChemCatChem.* 2010;2:1552-4.
  28. D'Angelo B, Santucci S, Benedetti E, Di Loreto S, Phani R, Falone S, et al. Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal survival in a human Alzheimer disease model by modulating BDNF pathway. *Curr Nanosci.* 2009;5:167-76.
  29. Yadav N. Cerium oxide nanostructures: properties, biomedical applications and surface coatings. *3 Biotech.* 2022;12:121.
  30. Wason MS, Colon J, Das S, Seal S, Turkson J, Zhao J, et al. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. *Nanomedicine.* 2013;9:558-69.
  31. Lin WS, Huang YW, Zhou XD, Ma YF. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol.* 2006;25:451-7. doi:<https://doi.org/10.1080/10915810600959543>.

32. Das J, Choi Y-J, Han JW, Reza AMMT, Kim J-H. Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis. *Sci Rep.* 2017;7:9513.
33. Eriksson P, Tal AA, Skallberg A, Brommesson C, Hu Z, Boyd RD, et al. Cerium oxide nanoparticles with antioxidant capabilities and gadolinium integration for MRI contrast enhancement. *Sci Rep.* 2018;8:6999.
34. Kim HY, Park KS, Park HG. Glucose oxidase-like activity of cerium oxide nanoparticles: Use for personal glucose meter-based label-free target DNA detection. *Theranostics.* 2020;10:4507.
35. Das S, Dowding JM, Klump KE, McGinnis JF, Self W, Seal S. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8:1483-508. doi:<https://doi.org/10.2217/nmm.13.133>.
36. Shcherbakov AB, Reukov VV, Yakimansky AV, Krasnopeeve EL, Ivanova OS, Popov AL, et al. CeO<sub>2</sub> Nanoparticle-Containing Polymers for Biomedical Applications: A Review. *Polymers.* 2021;13:924. doi:<https://doi.org/10.3390/polym13060924>.
37. Shah V, Shah S, Shah H, Rispoli FJ, McDonnell KT, Workeneh S, et al. Antibacterial Activity of Polymer Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *PLOS ONE.* 2012;7:e47827. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047827>.
38. Wang M, He H, Liu D, Ma M, Zhang Y. Preparation, Characterization and Multiple Biological Properties of Peptide-Modified Cerium Oxide Nanoparticles. *Biomolecules.* 2022;12:1277. doi:<https://doi.org/10.3390/biom12091277>.
39. Naha PC, Hsu JC, Kim J, Shah S, Bouché M, Si-Mohamed S, et al. Dextran-Coated Cerium Oxide Nanoparticles: A Computed Tomography Contrast Agent for Imaging the Gastrointestinal Tract and Inflammatory Bowel Disease. *ACS Nano.* 2020;14:10187-97. doi:<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03457>.
40. Popova NR, Popov AL, Ermakov AM, Reukov VV, Ivanov VK. Ceria-Containing Hybrid Multilayered Microcapsules for Enhanced Cellular Internalisation with High Radioprotection Efficiency. *Molecules.* 2020;25. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25132957>.
41. Kailashiya J, Dash D. Nanoceria and Its Biomedical Relevance. *Ann Natl Acad Med Sci.* 2019;55:014-7. doi:<https://doi.org/10.1055/s-0039-1694081>.
42. Genchi GG, Mollo V, Battaglini M, Gümüs MB, Marino A, Prato M, et al. Effects of Simulated Microgravity on the Internalization of Cerium Oxide Nanoparticles by Proliferating Human Skeletal Myoblasts. *Acs Appl Nano Mater.* 2023. doi:<https://doi.org/10.1021/acsanm.3c02230>.
43. Xia T, Kovochich M, Liong M, Madler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano.* 2008;2:2121-34. doi:<https://doi.org/10.1021/nn800511k>.
44. Oró D, Yudina T, Fernández-Varo G, Casals E, Reichenbach V, Casals G, et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J Hepatol.* 2016;64:691-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.020>.
45. Arya A, Sethy NK, Gangwar A, Bhargava N, Dubey A, Roy M, et al. Cerium oxide nanozyme modulate the 'exercise' redox biology of skeletal muscle. *Mater Res Express.* 2017;4. doi:<https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa6922>.
46. Youn DH, Tran NM, Nguyen TN, Cho SM, Jung H, Lee A, et al. Morphology-controlled therapeutic activity of cerium oxide nanoparticles for mild traumatic brain injury. *J Am Ceram Soc.* 2023;106:7218-29. doi:<https://doi.org/10.1111/jace.19163>.

47. Kumari M, Singh SP, Chinde S, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int J Toxicol*. 2014;33:86-97. doi:<https://doi.org/10.1177/1091581814522305>.
48. Nemmar A, Al-Salam S, Beegam S, Yuvaraju P, Ali BH. Aortic Oxidative Stress, Inflammation and DNA Damage Following Pulmonary Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles in a Rat Model of Vascular Injury. *Biomolecules*. 2019;9. doi:<https://doi.org/10.3390/biom9080376>.
49. Kumari M, Kumari SI, Grover P. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*. 2014;29:467-79.
50. Akbaba GB. Comparison of the cytotoxic effects of bulk and nanosized CeO<sub>2</sub> on lymphocyte cells. *JOTCSA*. 2021;8:1145-52. doi:<https://doi.org/10.18596/jotcsa.974814>.
51. Liman R, Acikbas Y, Ciğerci İH. Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by Allium and Comet tests. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;168:408-14.

# ÖZGEÇMİŞ



## BENZERLİK RAPORU

FARKLI PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜNE SAHİP SERYUM OKSİT  
PARTİKÜLLERİN İNSAN AORT DAMAR DÜZ KASI ÜZERİNE  
OLAN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>5</b>	% <b>4</b>	% <b>2</b>	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>2</b>	AŞKIN, Ayhan. "Ankilozan spondilit hastalarında nötrofil/lenfosit oranı, trombosit/lenfosit oranı ve ortalama trombosit hacminin değerlendirilmesi", Çukurova Üniversitesi, 2016. Yayın	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://pergamos.lib.uoa.gr">pergamos.lib.uoa.gr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://agbiol.congress.gen.tr">agbiol.congress.gen.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://www.acibadem.edu.tr">www.acibadem.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>