



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRİPTOFAN GRAFT-POLY (HEMA) POLİMERİK
NANOPARTİKÜLÜNÜN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, TOKSİSİTESİ VE
BİYODAĞILIMI**

Cem GÜLER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 15.08.2018

Bornova-İZMİR

2018

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TRİPTOFAN GRAFT-POLY (HEMA) POLİMERİK
NANOPARTİKÜLÜNÜN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, TOKSİSİTESİ VE
BİYODAĞILIMI**

Cem GÜLER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 15.08.2018

Bornova – İZMİR

2018

Cem GÜLER tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan “**Triptofan Graft-Poly (HEMA) polimerik nanopartikülünün sentezi, karakterizasyonu, toksisitesi ve biyodağılımı**” başlıklı bu çalışma E.Ü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğuyla başarılı bulunmuştur.

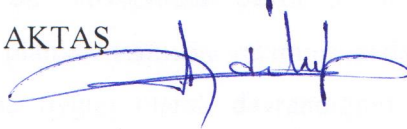
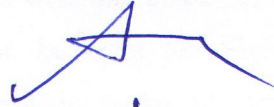
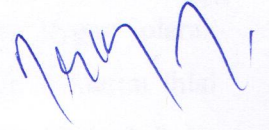
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Raportör Üye: Prof. Dr. Levent ŞIK

Üye : Doç. Dr. Lale AKTAŞ



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Triptofan Graft-Poly (HEMA) polimerik nanopartikülünün sentezi, karakterizasyonu, toksisitesi ve biyodağılımı”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15.08.2018



Cem GÜLER

ÖZET**TRİPTOFAN GRAFT-POLY (HEMA) POLİMERİK
NANOPARTİKÜLÜNÜN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU,
TOKSİSİTESİ VE BİYODAĞILIMI**

GÜLER, Cem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Ağustos 2018, 84 Sayfa

Nanoteknoloji, son yıllarda yoğun ilgi duyulan ve birçok ürün geliştiren bir alandır. Polimerler sahip olduğu avantajları nedeniyle biyomateryal olarak kullanımı dikkat çekicidir. Polimerik nanopartiküller hastalık tanısı, görüntüleme ve tedavisi gibi biyoteknolojik ve biyomedikal alanlardaki kullanımıyla nanoteknolojide önemli bir yere sahiptir. Bu tez çalışmasında, ilaç taşınımında kullanılması planlanan Triptofan-graft-poli(HEMA) polimerik nanopartikülünün [Trp-graft-p(HEMA)] sentezi, karakterizasyonu, *in vitro* ve *in vivo* toksisite potansiyelinin araştırılması ve biyodağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

p(HEMA) sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiş ve ardından Trp ile graflanarak Trp-graft-p(HEMA) elde edilmiştir. Polimerik nanopartikülün karakterizasyonunda, FTIR, Zeta potansiyel ve boyut analizi, SEM ve şişme testi kullanılmıştır. Ortalama partikül boyutu 164.1 nm, polidispersite değeri 0.501 ve nanopolimerin yüzey yükü değeri -19.6 mV'dir. Sıcaklık artışıyla birlikte nanopolimerin şişme miktarı düşmektedir. Nanopolimerin *in vitro* toksisite potansiyelinin belirlenmesi için MTT testi, hemoliz testi, HET-CAM testi ve AMES testi yapılmış ve bu testler sonucunda, nanopolimerin sitotoksik ve hemolitik aktivitesinin olmadığı, antianjiyogenik etki gösterdiği ve genotoksik potansiyelinin belirlenmesi adına çalışmaların sürdürülmesi gerektiği tespit edilmiştir. Balb/c albino deney fareleriyle yürütülen *in vivo* toksisite çalışması sonucunda nanopolimerin akut dozda toksisite

göstermediği belirlenmiştir. Nanopolimerin fizikokimyasal özellikleri nedeniyle PBS’de disperse olamamasından ötürü biyodağılım çalışması gerçekleştirilememiştir.

Anahtar sözcükler: Anjiyogenez, Biyodağılım, Genotoksisite, HEMA, Hemoliz, Karakterizasyon, Nanopartikül, Polimer, Sentez, Sitotoksisite, Toksisite, Trp-graft-p(HEMA)



ABSTRACT**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, TOXICITY AND
BIODISTRIBUTION OF TRYPTOPHAN GRAFT-POLY (HEMA)
POLYMERIC NANOPARTICLE**

GÜLER, Cem

M.Sc. in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

2018 August, 84 pages

Nanotechnology is a field that has attracted a lot of interest in recent years and has developed many products. Because of the advantages of polymers, their use as biomaterials is remarkable. Polymeric nanoparticles have an important position in nanotechnology with their use in biotechnological and biomedical fields such as disease diagnosis, imaging and therapy. In this thesis study, synthesis, characterization, investigation of *in vitro* and *in vivo* toxicity potential and determination of biodistribution of Tryptophan-graft-poly(HEMA) polymeric nanoparticle [Trp-graft-p(HEMA)].

p(HEMA) was synthesized by surfactant free emulsion polymerization method and then Trp-graft-p(HEMA) was obtained by grafting with Trp. In the characterization of the polymeric nanoparticle, FTIR, Zeta potential and size analysis, SEM and swelling test were used. The average particle size is 164.1 nm, the polydispersity index is 0.501 and the surface charge of the nanopolymer is negative -19.6 mV. The amount of swelling of the nanopolymer decreases with increasing temperature. MTT test, hemolysis test, HET-CAM test and AMES test were performed to determine the *in vitro* toxicity potential of the nanopolymer, and it has been determined that the nanopolymer has no cytotoxic and hemolytic activity, has antiangiogenic effect and should continue its studies in order to determine the genotoxic potential. *In vivo* toxicity studies conducted with Balb/c

albino experimental mice indicated that the nanopolymer did not show toxicity in acute doses. Because of the physicochemical properties of the nanopolymer, the biodistribution study could not be performed because of the non-dispersibility in PBS.

Key words: Angiogenesis, Biodistribution, Characterization, Cytotoxicity, Genotoxicity, HEMA, Hemolysis, Nanoparticle, Polymer, Synthesis, Toxicity, Trp-graft-p(HEMA)



TEŞEKKÜR

Bilimsel bakış açısı ve insani ilişkilerini örnek aldığım değerli danışmanım Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na yüksek lisans eğitimim süresince sağladığı rehberlik ve teşviklerinin yanı sıra her zaman daha iyisini hedefleyen bilimsel yaklaşımı, disiplinli çalışması ve hoşgörülü tutumu için sonsuz teşekkürler...

Akademik ve laboratuvar sürecindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e, Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a, Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, Doç. Dr. Süleyman GÜLCEMAL'e, Dr. Günnur GÜLER'e, Dr. Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM'a ve Dr. Ayberk M. OKTAY'a,

Çalışmalarımın çeşitli aşamalarında katkıları bulunan aynı laboratuvarı paylaştığım Araş. Gör. Melih DAĞDEVİREN'e, Araş. Gör. Adem GÜNER'e, Buket BAKAN'a, Ebru ŞANCI'ya ve Ceyda ALDAĞ'a,

Emeklerinden ötürü Cenk Serhan ÖZVEREL'e, Hasan SAYAN'a, Özge SARI'ya ve Halil BAYHAN'a

Eğitim sürecimin hem daha bilimsel hem de daha keyifli geçmesini sağlayan biyolog arkadaşlarım Ramiz DEMİR'e, Dilek EROĞLU'na, Arzu KORKUTAN'a, Melisa AYIŞIĞI'na, Ecem SÜRGEÇ'e, Ahmet KAYA'ya ve Melike Merve AYHAN'a,

Yüksek lisans çalışmalarımın gerçekleşmesinde maddi katkılarından dolayı 2017/FEN/028 nolu proje ile Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na,

Hayatım boyunca sevgi ve destekleri için annem Nazife GÜLER'e, babam Sabri GÜLER'e ve kardeşim Gizem GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji nedir?.....	1
1.2. Nanopartiküllerin tanımlanması ve sınıflandırılması.....	2
1.3. Nanopartiküllerin uygulama alanları	5
1.4. Akıllı ilaç/ilaç salım sistemi/ilaç taşıyıcı sistem olarak polimerik nanopartiküller	7
1.5. Nanopartiküller ve toksisite	9
1.6. 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA)	14
1.7. Amaç	15
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Triptofan (Trp)	17
2.1.2. Deney hayvanları	18
2.2. Metot	21
2.2.1. Trp-graft-p(HEMA) Polimerik Nanopartikülünün Hazırlanması.....	21
2.2.1.1. p(HEMA) polimerik nanopartikülünün hazırlanması	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.1.2. Triptofan'ın p(HEMA) ile graftlanması.....	22
2.2.2. Trp-graft-p(HEMA)'nın Karakterizasyonu.....	22
2.2.2.1. FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopi.....	23
2.2.2.2. Zeta potansiyeli ve partikül boyutunun belirlenmesi	24
2.2.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	24
2.2.2.4. Şişme testi (Swelling test)	24
2.2.3. <i>In vitro</i> Toksisite Denemeleri.....	25
2.2.3.1. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi (MTT Yöntemi).....	25
2.2.3.2. Hemoliz testi	27
2.2.3.3. Koryoallantoik membran testi (HET-CAM).....	28
2.2.3.4. Genotoksik potansiyelin belirlenmesi (AMES Testi)	30
2.2.4. <i>In vivo</i> Toksisite Denemeleri.....	36
2.2.4.1. Tek doz akut toksisite denemesi (Limit test)	36
2.2.5. <i>In vivo</i> Biyodağılım Çalışması (IVIS Spektrum)	37
2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	38
3. BULGULAR	39
3.1. Graftlama Verimi Bulguları	39
3.2. Trp-graft-p(HEMA)'nın Karakterizasyon Bulguları.....	40
3.2.1. FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopi bulguları	40
3.2.2. Zeta potansiyeli ve boyut ölçümü bulguları.....	42
3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) bulguları.....	42
3.2.4. Şişme testi (Swelling test) bulguları.....	43
3.3. <i>In vitro</i> Toksisite Bulguları	45

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.1. Sitotoksisite bulguları (MTT Testi)	45
3.3.2. Hemoliz testi bulguları.....	47
3.3.3. HET-CAM testi bulguları	48
3.3.4. Genotoksisite bulguları (Ames Testi)	51
3.4. <i>In vivo</i> Toksisite Bulguları	51
3.4.1. Tek doz akut toksisite deneme bulguları	51
3.5. <i>In vivo</i> Biyodağılım Bulguları	52
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ	66
KAYNAKLAR DİZİNİ	67
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1	Nanopartikül ve diğer nesnelerin boyutlarının karşılaştırılması.....3
1.2	Yaygın olarak kullanılan bazı nanopartiküller.....4
1.3	Hidroksietil Metakrilat (HEMA) kimyasal yapısı.....14
2.1	Triptofan'ın kimyasal yapısı.....17
2.2	Toksisite ve biyodağılım denemelerinde kullanılan Balb/c albino deney fareleri.....18
2.3	Balb/c albino deney farelerinin barındığı kafes sistemi.....19
2.4	Yeni Zelanda Tavşanı'nın barındığı kafes sistemi.....20
2.5	Hemoliz testinde kullanılan Yeni Zelanda Tavşanı.....21
2.6	FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopi cihazı.....23
2.7	Biyodağılım görüntülemelerinin elde edildiği IVIS Spektrum cihazı.....38
3.1	Trp ile p(HEMA)'nın grafitlanması.....39
3.2	Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün liyofilize görünümü.....39
3.3	Trp, p(HEMA) ve Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün FTIR spektrumu.....41
3.4	Trp-graft-p(HEMA)'nın SEM görüntüsü.....42
3.5	25 °C'de Trp-graft-p(HEMA)'nın zamana bağlı şişme yüzdesi değişimi.....44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6	37 °C’de Trp-graft-p(HEMA)’nın zamana bağlı şişme yüzdesi değişimi.....44
3.7	Farklı Trp-graft-p(HEMA) dozları için HEK 293 hücrelerinin zamana bağlı yüzde canlılık değişimi.....45
3.8	Pozitif kontrol olarak kullanılan farklı Doksorubisin dozları için HEK 293 hücrelerinin zamana bağlı yüzde canlılık değişimi.....46
3.9	HEK 293 hücre hattı morfolojik inceleme. Hücre kontrol (üstte). Trp-graft-p(HEMA) uygulama (altta).....46
3.10	Trp-graft-p(HEMA) ile muamele edilmiş tavşan kanı eritrositleri. PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol.....47
3.11	HET-CAM testinde kullanılan negatif ve pozitif kontroller ve çözgen. A: DMSO uygulama öncesi; B: DMSO uygulama sonrası; C: NaCl uygulaması (Negatif kontrol) D: NaOH uygulaması (Pozitif kontrol).....48
3.12	1 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim.....49
3.13	2,5 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim.....49
3.14	5 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim.....50
3.15	IRDye 800 RS NHS Ester boyanmış Trp-graft-p(HEMA).....52
3.16	Balb/c albino deney farelerinde biyodağılım. A: erkek B: dişi.....53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Nanopartiküllerin sınıflandırılması	5
1.2 Polimerik nanopartikül sentez yöntemleri	8
1.3 Nanopartiküller için karakterizasyon teknikleri	11
1.4 Yanma kökenli nanopartiküllerin sağlık üzerine etkileri	13
2.1 MTT testinde kullanılan nanopartikül dozları.....	27
2.2 Hemoliz testinde kullanılan nanopartikül dozları	28
2.3 HET-CAM değerlendirilmesinde kullanılan skor değerleri.....	29
2.4 <i>Salmonella typhimurium</i> suşlarının genotipleri ve özellikleri.....	30
3.1 Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün graftlama hesabı.....	40
3.2 Trp-graft-p(HEMA)'nın distile suda ve PBS'deki sıcaklığa ve zamana bağlı ağırlık değişimi.....	43
3.3 Hemoliz testi absorbands değerleri ve hemoliz yüzdeleri.....	47
3.4 Trp-graft-p(HEMA)'nın HET-CAM skorlaması ve etkisi.....	50
3.5 Trp-graft-p(HEMA)'nın <i>Salmonella typhimurium</i> suşlarında oluşturduğu revertant koloni sayıları	51

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
C	Karbon
CDNP	Yanma kökenli nanopartiküller
cm	Santimetre
CNT	Karbon nanotüp
CO ₂	Karbondiyoksit
CPI	Nanoteknoloji Tüketici Ürün Envanteri
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetik sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
ESP	Avrupa Bilim Kurumu
FBS	Fetal sıgır serum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier-transform infrared spektroskopisi

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Gram
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HEMA	Hidroksietil Metakrilat
His	Histidin
IC ₅₀	% 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
KPS	Potasyum persülfat
L	Litre
L929	Fare fibroblastik hücre hattı
LD ₅₀	Letal Doz ₅₀
M	Molar
m	Metre
mM	Milimolar
mg	Miligram
MGA	Minimal Glukoz Agar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MPS	Mononükleer fagositik sistem
NaCl	Sodyum klorür
NaH	Sodyum hidrür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PBS	Fosfat tuz tamponu
PdI	Polidispersite değeri
PEG	Poli(etilen glikol)
pH	Hidrojenin potansiyeli
p(HEMA)	Poli(hidroksietil metakrilat)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik asit-glutamik asit)
RES	Retikulo endotelyal sistem
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SiO ₂	Silisyum dioksit
STM	Taramalı tünelleme mikroskobu
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
TiO ₂	Titanyum dioksit
Trp	Triptofan
Trp-graft-p(HEMA)	Triptofan graflanmış poli(hidroksietil metakrilat)



1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji nedir?

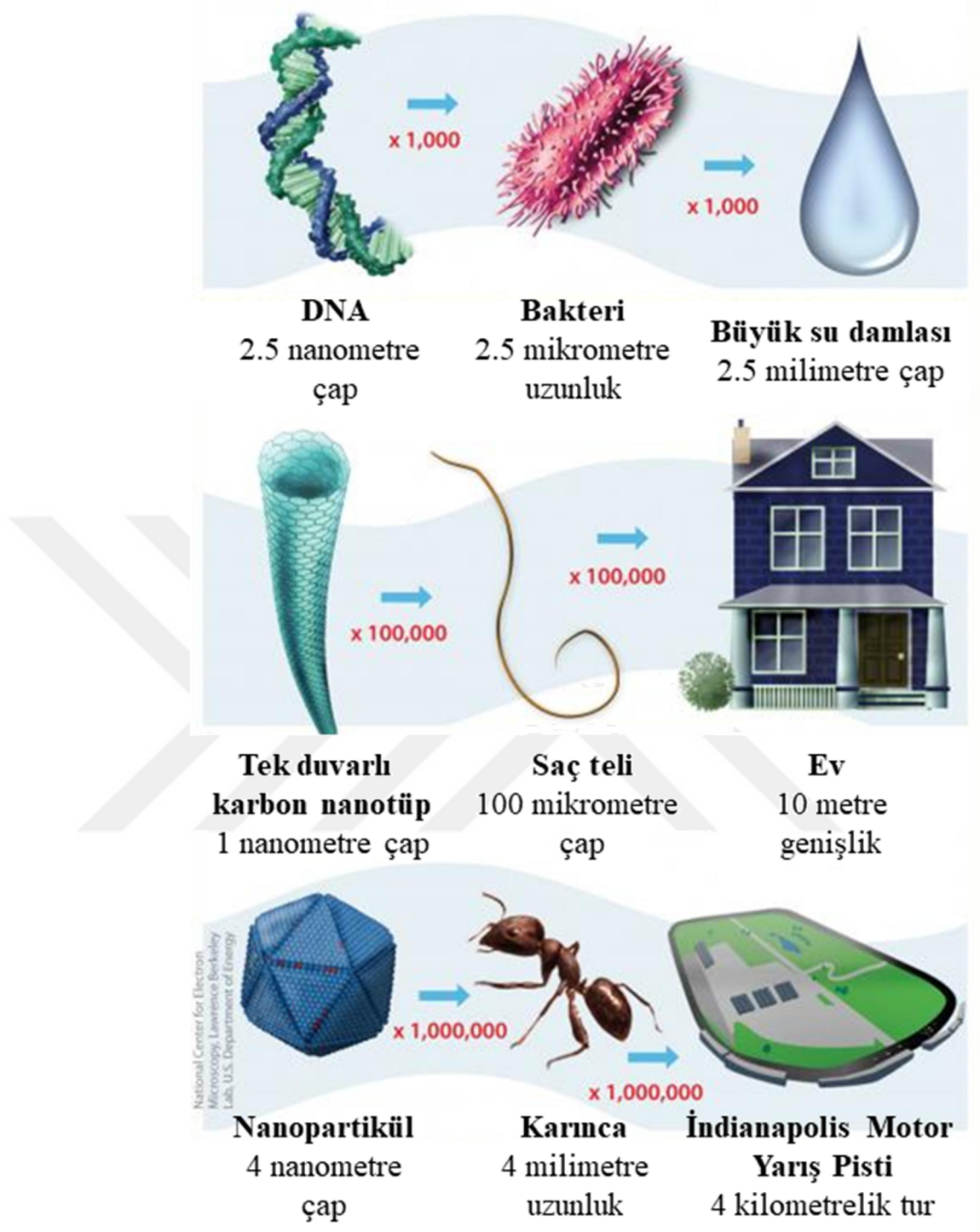
“Nano” ön eki Yunanca’da “cüce” anlamına gelmekte olup, fiziksel anlamda herhangi bir şeyin milyarda biri anlamını taşır. Nanoteknoloji, nano boyutlardaki materyallerin teknolojide kullanılması olarak tanımlanabilir. Nanoteknolojinin temelleri şaşırtıcı bir şekilde 4. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Romalılar bu yüzyılda kolloidal altın ve gümüşten yapılmış olan dikroik camdan Lycurgus Kadehleri’ni kullanıyordu. Bu camın özelliği aydınlatma koşullarına bağlı olarak iki farklı renkte görülebilmesidir. Buna benzer şekilde, sanatçılar tarafından ortaçağda katedrallerin vitray pencerelerinin renklendirilmesi için altın ve gümüş nanopartiküller kullanılmıştır. Bu partiküller, camlara turuncu, kırmızı, mor ve yeşilimsi renkler verebilir. Modern anlamdaki nanoteknolojinin temelleriyse ünlü fizikçi Richard Feynman’ın 29 Aralık 1959’da Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü’ndeki (CalTech) Amerikan Fizik Cemiyeti’nin toplantısında gerçekleştirdiği “There’s Plenty of Room at the Bottom” (Dipte Çok Yer Var) adlı konuşmasıyla atılmıştır (www.nano.gov). “24 ciltlik Britannica Ansiklopedisi’ni neden iğne başı kadar yere yazamayalım?” diye sorarak atomların ve moleküllerin bilim insanlarınca tek tek manipüle edilebileceğini belirtmiştir (Feynman, 1960). Feynman’ın tüm nanoboyutu kontrol etme vizyonu, bilim insanlarının moleküler üretimi gerçekleştirmeleri için büyük bir motivasyon kaynağı olmuştur (Drexler, 2004). Örneğin, K.E. Drexler (1981) protein mühendisliği için ilk makaleyi yazmıştır. 1980’lerde gerçekleşen gelişmeler nanoteknolojinin gelişimine büyük katkılar sağlamıştır. Nano boyutlardaki parçacıkları, atomları ve küçük molekülleri görüntüleme ve bunları manipüle etmeyi sağlayan Taramalı Tünelleme Mikroskobu (Scanning Tunelling Microscope) (STM) 1981’de Gerd Binig ve Heinrich Rohrer tarafından geliştirilmiştir. 1986’da bu araştırmacılar Nobel Fizik Ödülü’ne layık görülmüştür. 1985’te Richard Smalley öncülüğünde 60 karbon (C) atomunu simetrik sıralanışıyla futbol topuna benzer (‘Buckyball’ olarak da bilinir) fulleren molekülünü keşfetmiştir. Fulleren 1 nm çapında, çelikten daha güçlü, plastikten daha hafif olma gibi özelliklere sahipti. 1986’da Gerd Binig, Calvin Quate ve Christoh Gerber mekanik bir prob yardımıyla yüzey hakkında bilgi toplayan Atomik Kuvvet Mikroskobu’nu (Atomic Force

Microscope) (AFM) geliştirmiştir. “Nanoteknoloji” terimi ilk kez K. E. Drexler tarafından “Engines of Creation” kitabında 1986’da kullanılmıştır. 1990’ın başında çelikten çok daha gl ve hafif olan karbon nanotüpler (CNT), fullerenin esnetilmesiyle, geliştirilmiştir. 2000’de Amerika Başkanı Clinton “Ulusal Nanoteknoloji Girişimi”ni (National Nanotechnology Initiative) başlatmıştır. Bu gelişmelerden sonra nanoteknoloji hızla gelişip günümüzdeki kullanımına ulaşmıştır (Hochella et al., 2015; www.nano.gov).

Nanoteknoloji, 1-100 nm boyutlarındaki malzemelerin sentezi ve manipülasyonuyla ilgilenen, içerisinde bilim, mühendislik ve teknolojinin kullanıldığı, geçtiğimiz 20 yıla damgasını vuran oldukça ilgi çekici bir çalışma alanıdır. Nanoboyut, malzemelere eşsiz fizikokimyasal özellikler sunmaktadır. Bu da nanoteknolojiyi bir cazibe merkezi haline getirmekte ve yaygın bir şekilde araştırılıp kullanılmasını sağlamaktadır. Günümüzde nanoteknolojinin kullanım yelpazesi oldukça geniş olup, tarımdan gıda sanayisine, mühendislik materyallerinden biyomedikal alanlara kadar uzanır. Bilim insanları ve mühendisler, insan hayatını kolaylaştıracak, malzeme ve enerji kullanımını azaltacak nanornleri tasarlamaya çalışmaktadır.

1.2. Nanopartiküllerin tanımlanması ve sınıflandırılması

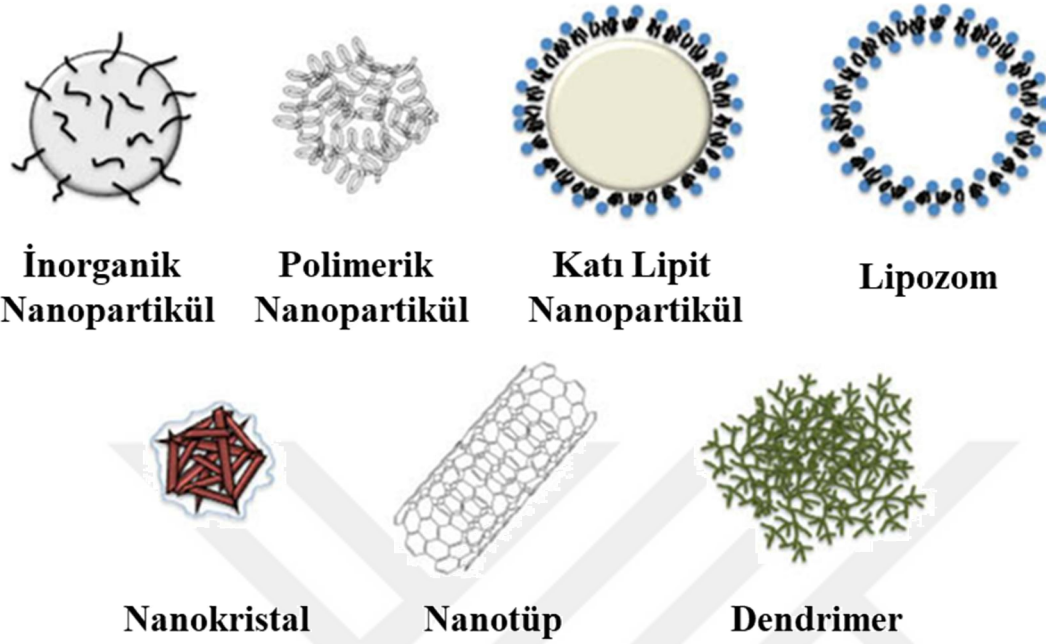
Nanotoknoloji ürünü olarak çeşitli nanomatemeryaller, nanoobjeler ve nanopartiküller üretilir. Üç boyutlu tüm bu nanoteknoloji ürünleri farklı boyut uzunluklarından dolayı farklı şekilde isimlendirilir. Nanomatemeryallerin bir, nanoobjelerin iki, nanopartiküllerin ise üç boyutu da 100 nm’den küçüktür (British Standards, BSI, 2007; SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2007). Genelde nanopartiküller 100 nm ve daha küçük yapılar olarak kabul edilmektedir. Bir nanometre, metrenin milyarda birine eşittir ve bu 10^{-9} m olarak da ifade edilebilir. Yani nanoteknolojinin ilgi alanı oldukça küçük yapılar üzerinedir. Bu yapılar çıplak gözle görülemezler ve onları hayal etmek oldukça güçtür (şekil 1.1). Örneğin, tek duvarlı karbon nanotüpün çapı bir sa telinin çapının 100.000’de biri kadardır.



Şekil 1.1 Nanopartikül ve diğer nesnelerin boyutlarının karşılaştırılması (www.nano.gov)

Nanopartiküllerin sınıflandırılması için kullanılan tek bir sistem yoktur. Çünkü sınıflandırmada kullanılabilecek farklı parametreler bulunmaktadır. Nanopartikülleri; orijinine, kimyasal kompozisyonuna, oluşumuna (formasyon), şekline, boyutuna, karakteristiğine ve araştırma ve endüstrideki uygulamalarına

göre sınıflandırmak mümkündür (Lopez-Serrano et al., 2014). Kullanılacak alana uygun farklı nanopartikül tipleri bulunur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Yaygın olarak kullanılan bazı nanopartiküller (Faraji and Wipf, 2009)

Nanopartiküller genel anlamda doğal ve antropojenik yani insan yapımı olarak sınıflandırılır. Kimyasal bileşimlerine göre ise C atomu içeren ve inorganik olarak ikiye ayrılırlar (Çizelge 1.1). C-içeren doğal nanopartiküller oluşumlarına göre; biyojenik, jeojenik, atmosferik ve pirojenik olarak ayrılır. Doğal inorganik nanopartiküller oluşumlarına göre; biyojenik, jeojenik ve atmosferik olarak ayrılır. Antropojenik nanopartiküller de tıpkı doğal nanopartiküller gibi C-içeren ve inorganik olarak ikiye ayrılır. Antropojenik nanopartiküller, yan ürün olarak tesadüfi üretilmiş ya da partikülün karakteristiğinden dolayı isteyerek üretilmiş olabilir. Üretilen bu partiküllere ‘tasarlanmış nanopartiküller’ de denir. Fullerenler ve CNT (Karbon nanotüpler) doğal nanopartiküllere örnek olarak verilebilirken, TiO_2 ve SiO_2 antropojenik nanopartiküllere örnektir (Nowack and Bucheli, 2007).

Çizelge 1.1 Nanopartiküllerin sınıflandırılması (Nowack and Bucheli, 2007)

		Formasyon		Örnek
Doğal (Natürel)	C-içeren	Biyojenik	Organik kolloidler	Humik, fulvik asit
			Organizmalar	Virüsler
		Jeojenik	Kurum	Fullerenler
		Atmosferik	Aerosoller	Organik asitler
		Pirojenik	Kurum	CNT
				Fullerenler
				Nanoglobüller, soğan şekilli nanoküreler
	İnorganik	Biyojenik	Oksitler	Magnetit
			Metaller	Ag, Au
		Jeojenik	Oksitler	Fe-oksit
			Killer	Allofan
Atmosferik		Aerosoller	Deniz tuzu	
Antropojenik (üretilmiş, tasarlanmış)	C-içeren	Yan ürün	Yanma yan ürünü	CNT
				Nanoglobüller, soğan şekilli nanoküreler
		Tasarlanmış	Kurum	Karbon karası
				Fullerenler
				Fonksiyonlaştırıl-mış CNT, fullerenler
				Polimerik NP
	İnorganik	Yan ürün	Yanma yan ürünü	Platin grup metaller
		Tasarlanmış	Oksitler	TiO ₂ , SiO ₂
			Metaller	Ag, Demir
			Tuzlar	Metal fosfatlar
			Aluminoslikatlar	Zeolitler, killer, seramikler

1.3. Nanopartiküllerin uygulama alanları

Nanoteknolojinin gelişimi ve dolayısıyla ortaya koyduğu ürünler 2000'den sonra giderek artmaktadır. Woodrow Wilson International Center for Scholars ve Project on Emerging Nanotechnology, 2005 yılında, nanoteknolojinin tüketici piyasasındaki yerini gösteren bir çalışma yayınlamıştır. Nanotechnology Consumer Product Inventory (Nanoteknoloji Tüketici Ürün Envanteri) (CPI) adındaki bu envantere 54 ürün listelenmiştir. CPI'nın sonraki yıllardaki verilerine göre; 2010'da 1012 ürün listelenirken bu sayı 2014'te 1814'e yükselmiştir. İsteyen herkesin kolaylıkla ulaşabileceği CPI, ürünleri; sağlık ve fitness, ev ve bahçe, otomatik, kesişen ürünler, elektronik, yiyecek ve içecek, cihaz ve çocuk ürünleri olarak sekiz ana sınıfta toplamıştır. Sağlık ve fitness, tüm ürünlerin %42'sini oluşturan en büyük sınıftır. Araştırmacılar bu sınıfı da kendi içerisinde altıya ayırmıştır. Diş fırçaları, losyonlar ve saç şekillendirici araçların

yer aldığı kişisel bakım ürünleri %39'la sağlık ve fitness sınıfının en büyük alt sınıfıdır (Vance et al., 2015).

Nanoteknolojinin uygulama alanları üç ana kategoride incelenebilir: çevre, endüstri ve biyoloji (Lopez-Serrano et al., 2014). Nanoteknolojinin çevresel uygulamaları oldukça ilgi çekicidir. Örneğin, kirletilmiş toprakların ve su kaynaklarının tespiti (Baruah and Dutta, 2009) ve remediasyonu için nanoteknolojik çözümler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Biswas and Wu, 2005; Duran, 2008; Savage and Diallo, 2005; Tungittiaplakorn et al., 2004). Bitkilerde fotosentetik verimin artırılması (Giraldo et al., 2014; Qi et al., 2013), bitkilerin daha hızlı büyümesi ve korunması, pestisit kalıntılarının ve bitkisel patojenlerin tespitinde kullanılmaktadır (Khot et al., 2012). Nanoteknolojinin endüstriyel uygulamaları oldukça geniş bir alandır. Gıdalar için güvenlik ve kalite analizlerinde, patojen tespitinde ve paketlenme gibi birçok işlemde kullanılmaktadır (Sozer and Kokini, 2009). Kişisel bakım ürünleri olarak örneğin güneş kremleri ve yaşlanmayı engelleyen 'antiaging' kremlerde de kullanılmaktadır (Mu and Sprando, 2010). Yapı ve inşaat malzemesi için çimento temelli materyallerle nanomühendislik örneği verilebilir (Sanchez and Sobolev, 2010). Nanoteknolojinin biyoloji alanındaki uygulamaları için nanopartikül üretimi ve kullanımı oldukça fazladır. Biyolojik belirteçlerde, ilaç ve gen yönlendirmede, proteinlerin ultra hassas elektrokimyasal tespitinde, DNA yapısının belirlenmesinde ve *in vitro* ve *in vivo* yöntemlere alternatif olarak mikrobiyal izleme ve tespitte kullanılır (Lopez-Serrano et al., 2014).

Nanoteknolojinin biyolojik uygulamaları içerisinde nanotıp büyük önem arz eder. Avrupa Bilim Kurumu'na göre (The European Science Foundation) (ESP) nanotıp; hastalıkları ve travmatik yaralanmaları tanılama, tedavi etme ve önleme, ağrıyı hafifletme ve insan sağlığını insan vücudunun moleküler araçları ve moleküler bilgisiyle koruyan bilim ve teknolojidir (Foundation, 2004). Basitçe tanımlamak gerekirse nanotıp, nanoteknolojinin tıpta kullanımıdır (Freitas, 2005). Nanomateryaller tıpta; görüntüleme ve tanılama, hedefli ilaç salınımı (drug delivery system), nano-etkin terapi ve doku mühendisliğinde kullanılır (Gupta, 2011; Zhao and Castranova, 2011).

Son 30 yılda nanopartikül temelli terapötik ve tanılama ajanı, kanser ve diyabet gibi birçok hastalık tedavisi için geliştirilmiştir. Akıllı ilaçlar olarak adlandırılan bu nanopartikül temelli ilaçlar, konvansiyonel ilaçlara göre birçok avantaja sahiptir. Sistemik dolaşımda daha uzun süre kalır, istenilen oranda salınım yapar, yan etkileri minimuma indirger ve iki veya daha fazla ilaçla sinerjistik etki yaratarak kombine terapi sağlar ve ilaç direncini baskılar. Klinik kullanımları için onay almış 20’den fazla nanopartikül temelli terapötik ilaç bulunur; bunların çoğunluğunu lipozomal ilaç ve polimer ilaç konjugatları oluşturur (Zhang et al., 2008).

Sonuç olarak, nanoteknolojinin kişiselleştirilmiş tedaviye olanak sağlayacağı (Jain, 2005a; 2005b) ve tıp için yeni bir devrim sağlayabileceği (Zhao and Castranova, 2011) düşünülmektedir.

1.4. Akıllı ilaç/ilaç salım sistemi/ilaç taşıyıcı sistem olarak polimerik nanopartiküller

Polimerler sahip oldukları karakteristiğinden ötürü biyomateryal olarak yaygın şekilde kullanılır. Tıpkı tüm nanopartiküller gibi “top-down” ve “bottom-up” yani yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya olarak iki ana sentez yöntemiyle üretilirler. Yukarıdan aşağıya sentezde büyük boyutlardan nano boyutlar elde edilirken, aşağıdan yukarıya sentezde atomik boyutlardaki maddeler birleştirilerek nano boyuta doğru sentez gerçekleştirilir (Bennet and Kim, 2014). Polimerik nanopartikül sentezi için genel metotlar ve ileri teknikler Çizelge 1.2’de gösterilmektedir.

Polimer terapötikler; polimer ilaçlar, polimer-ilac konjugatları, polimerik miseller ve multikomponent poliplekslerden oluşturur (Duncan, 2003). Polimerik nanopartiküller doğal ve sentetik (biyouyumlu) olarak ikiye ayrılır. Kitosan, albümin ve heparin doğal polimerik nanopartiküllere örnek olarak gösterilebilir; poli(etilen glikol) (PEG), poli(laktik asit-glutamik asit) (PLGA) ve poli(laktik asit) (PLA) sentetik polimerik nanopartiküllere örnektir (Moreno-Vega et al., 2012).

Çizelge 1.2 Polimerik nanopartikül sentez yöntemleri (Bennet and Kim, 2014)

Klasik Metotlar	Modern Metotlar
Polimerizasyon	Sonikasyon temelli sistem
Süperkritik sıvı teknoloji	
Nanopresipitasyon	
Çözücü evaporasyonu	Çekirdek-kabuk partikülat sistem
Emülsifikasyon / Çözücü difüzyon	
Tuzla çökeltme	
Diyaliz	
Elektrosprey	Mikrosivisal sistem
Islak öğütme	
Yüksek basınç homojenizasyon	
Yarı-emülsiyon çözücü difüzyon	
Emülsiyon faz ayrımı	Elektrodamlatma sistem
Spontan emülsiyon çözücü difüzyon	
Süperkritik anti-çözücü presipitasyon	

Polimerik nanopartiküller biyogörüntüleme (bioimaging) ve biyotalayma (biosensing) çalışmalarının yanı sıra esas olarak ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır. İlaç salınım sistemi olarak kullanılmalarında biyoyaygunluk, biyoparçalanabilirlik, çevresel yanıt ve yüksek etkinlik polimerlere büyük avantaj sağlar. Ayrıca, polimerik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarının kolaylıkla yapılabilmesi kullanımlarını arttırmaktadır. İlaç salınım sistemi yani akıllı ilaçların tasarımı; ilaç salınımının mekanizması, uygulama yolu, ilaç özellikleri, biyoyaygunluğu, salınım süresi, salınım aracının doğası ve hedefleme yeteneği dikkat edilmesi gereken faktörlerdir (Bennet and Kim, 2014). Güvenilir, kolay uygulanabilir olmalı ve herhangi bir toksik yanıtı neden olmamalıdır (Moreno-Vega et al., 2012). Salınım yapacak terapötik ajanlar, nanopartiküle enkapsüle edilmiş ya da nanopartikül yüzeyine konjuge edilmiş şekildedir (Moghimi, 2006; Pridgen et al., 2007). Terapötik ajanı enkapsüle etme “Truva Atı Stratejisi” olarak da adlandırılır (Faraji and Wipf, 2009).

Polimerik nanopartiküllerin biyouyumlu, biyoparçalanabilir olması ve yüksek ilaç taşıma kapasitesinden faydalanarak diyabetik ilaçlar, hormonlar, psikotik ilaçlar, antifungal ilaçlar (Kumari et al., 2010) ve özellikle de yaygın şekilde antikanser ilaçlar (Kumari et al., 2010; Lin et al., 2015; Masood, 2016; Naahidi et al., 2013) gibi akıllı ilaç çalışmaları yürütülmektedir.

Akıllı ilaçlar vücuda girdiğinde yalnızca hedef bölgeye doğru konsantrasyonda ilaç yükünü salmalıdır. Bu nanotaşıyıcılar, vücutta birçok protein ve karbohidrat gibi moleküllerle etkileşim haline girer ve hedefe giderken çeşitli bariyerleri geçmelidir. Yüzey modifikasyonları yapılmamış olan, savunmasız nanopartiküller, vücudun savunmada rol oynayan mononükleer fagositik sistem (MPS) elemanları tarafından hedefine ulaşmadan parçalanır. Nanopartiküller, MPS tarafından direkt tanınmaz. Oponizasyon denilen işlemle, opsonin proteinleriyle işaretlenen nanopartiküller görünür hale gelip fagositik hücrelerce tanınıp fagosite edilir (Owens and Peppas, 2006). Nanopartiküllerin boyutu, kompozisyonu (içeriği), çekirdek özellikleri, yüzey modifikasyonları ve hedefleme yüzey işlevselleştirmesi, partikülün akıbetini belirleyecek son derece önemli özelliklerdir. Bu özellikler nanopartikülün biyodağılımını ve kan sirkülasyonundaki yarı ömrünü etkiler. Bilim insanları nanopartiküllerin sistemik dolaşımda kalım süresini arttırmayı ve spesifik dokularda birikmesini sağlamaya çalışmaktadır. Bu stratejilerden çok yaygın olanlarından biri; nanopartikül yüzeyini FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından sağlıkta kullanımı onaylanmış bir polimer olan polietilen glikol (PEG) ile kaplamaktır. Bu sayede nanopartikül oponizasyondan kaçarak sistemik sirkülasyonda daha uzun süre kalabilir (Alexis et al., 2008). *In vivo*'da daha ağır PEG polimerlerin, partikülün retikulo endotelial sistem (RES) hücreleri tarafından yakalanmasını azalttığı ve bu sayede partiküllerin kandaki sirkülasyon süresini uzattığı belirtilmiştir (Gref et al., 1995).

1.5. Nanopartiküller ve toksisite

Nanomarteryaller; ultra küçük boyut, kütesine oranla büyük yüzey alanı ve yüksek reaktivite gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Bu nedenle normal/büyük (bulk, inert) formlarına göre farklı özellikler gösterebilirler (Oberdörster et al., 2005a, b; Zhang et al., 2008). Partikülün boyutu küçüldükçe

yüzey alanı artacaktır. Artan yüzey alanıyla birlikte yüzeyde bulunan atomlar doyurulmamış enerji bağları eğilimi gösterecek ve bu da katalitik aktivitenin artmasına neden olacaktır. Stabilesini sürdürmek isteyen partiküller, diğer moleküllerle etkileşime girme potansiyeli gösterecektir. Bu etkileşimler toksik yanıtın oluşmasına neden olabilir (Lopez-Serrano et al., 2014; Singh et al., 2009).

Nanomateriyallerin sahip olduğu eşsiz özellikler kullanımlarında büyük avantaj sağlamaktadır. Nanoteknolojideki kullanımları gün geçtikçe artmaktadır. Artan bu kullanımları, olumsuz etkiler gösterme yani toksisite endişesini beraberinde getirmektedir. Bu endişelerin haklı olduğu durumlar mevcuttur. Bazen bu endişeler toplum tarafından distopya derecesinde abartılmaktadır. Bilimsel bakış açısıyla nanoteknolojinin getirdiği avantajların yanı sıra risk değerlendirmesinin yapılması gerekir (Maynard, 2006a, b; Nel et al., 2006). Risk değerlendirmesinin yapılması nanotoksikolojinin ilgi alanıdır. Nanotoksikoloji, nanomateriyallere maruz kalımla oluşabilecek potansiyel zararı araştıran bilim dalı olarak tanımlanabilir (Donaldson et al., 2004). Toplumda nanotoksikolojiyle ilgili olan tartışmalar 2004 yılından itibaren daha ilgi çekici hale gelmiştir ve ilerleyen yıllarda bu tartışmalar artmıştır (Kuzma and Priest, 2010; Nowack and Bucheli, 2007; Singh et al., 2009). Bunun üzerine özellikle sitotoksisite çalışmaları artan bir ivme kazanmıştır (Singh et al., 2009).

Kimyasal kompozisyon, yapı, boyut ve şekil, nanopartiküllerin çevreye ve sağlığa etki eden önemli etmenleridir (Lopez-Serrano et al., 2014). Mikroskopi, spektroskopi ve kromatografi bu fizikokimyasal özellikleri belirlemede yani nanopartikülün karakterizasyonunda kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Karakterizasyon; boyut, şekil, agregasyon statüsü gibi fiziksel özellikler ve yüzey kaplama ve çözünübilirlik gibi kimyasal özellikler hakkında toksisite üzerine fikir verecek önemli veriler sağlamaktadır (Sayes and Warheit, 2009) (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3 Nanopartiküller için karakterizasyon teknikleri

Özellik	Teknik
Partikül boyut dağılımı	- Dinamik ışık saçılımı (Dynamic light scattering) (DLS) - Elektron mikroskopisi (TEM ve SEM) - Görsel referanslar/raf ömrü - Spesifik yüzey alanı (SSA BET)
Morfoloji	- X ışını kırılımı (X-ray diffraction) (XRD) - Elektron kırılımı (Electron diffraction) (ED) - X ışını fotoemiyon spektroskopisi (X-Ray Photoemission Spectroscopy) (XPS)
Kimyasal kompozisyon	- X ışını fotoelektrik spektroskopisi (X-ray photoelectric spectroscopy) (XPS) - Raman spektroskopisi - İndükleyici çiftleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) (ICP-AES) - Sıcaklık farkı analizi (Differential thermal analysis) (DTA) - X ışını kırılımı (X-ray diffraction) (XRD) - X ışını fotoemiyon spektroskopisi (X-Ray Photoemission Spectroscopy) (XPS) - Ultraviyole-görünür spektroskopi (Ultraviolet-visible spectroscopy) (UV-Vis) - Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (Fourier-transform infrared spectroscopy) (FTIR)
Çözünürlük	- Zamanla görsel yapı - İletkenlik ölçümü
Yüzey kimyası ve reaktivite	- Congo Red sıvının ışık parçalanması (Photodegradation of aqueous Congo Red) - Zeta potansiyeli - İzoelektrik noktası (IEP) - C vitamini testi - Hemolitik potansiyel - Elektron dönüş rezonansı (ESR) ya da elektron eşleşme rezonansı (EPR)

Nanomateriyaller, bulk formlarına göre farklı özellikler gösterebilmektedir. Örnek olarak Oberdörster et al. (1995), nanoboyuttaki TiO_2 partikülleri konvansiyonel boyuta göre sıçanlarda daha fazla pulmoner toksisiteye neden olduğunu belirtmiştir. Bir başka örnekte ise, normal boyutlarda toksik etkisi olmayan altın, nanoboyutlara inildiğinde toksisiteye sebep olmaktadır (Goodman et al., 2004). Tasarlanan nanopartiküllerin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi onun biyolojik sistemler üzerine olabilecek etkilerini öngörmemizi sağlar. Yalnızca karakterizasyon işlemleri, maddenin toksisitesini yorumlamak için yeterli değildir. Bunu tamamlayacak olan *in vitro* ve *in vivo* toksisite çalışmalarıdır. Kısacası, toksisite değerlendirmesi için gerekli olan yaklaşımlar: partikülün karakterizasyonu, *in vitro* testler ve *in vivo* markerlerdir (Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005a).

Nanopartiküller vücuda primer olarak inhalasyon veya dermal temasla, sekonder olarak ise enjeksiyon veya oral olarak (ilaçlar ve yiyeceklerle) alınır (McAuliffe and Perry, 2007). Deri, akciğer ve intestinal yolla vücuda girebilen bu partiküller çeşitli dokularda depolanabilir ve toksik yanıtı sebep olabilir (Medina et al., 2007). Maruziyet yolu, dozu ve nanopartikülün karakteristiği, toksisitede rol oynayan temel faktörlerdir (Oberdörster et al., 2005a).

Nanomateriyaller son yıllarda giderek artan kullanıma sahiptir ve bu kullanım akıllara bu materyalleri üreten işçilerin toksisiteye maruz kalıp kalmadığı sorusunu getirmektedir. Bilindiği üzere; asbeste solunum yoluyla (inhalasyon) maruz kalan işçi vakalarında ölümler gözlenebilmektedir. Bu nedenle en büyük risk grubunu nanomateriyallerin üretimini yapan işçiler oluşturmaktadır (Savolainen et al., 2010). İn hale alınan nanopartiküller akciğere ulaşmakta ve partikül boyutuna bağlı olarak orada birikim yapabilmektedir. Nanopartikül boyutu küçüldükçe akciğer için taşıdığı risk artmaktadır (Donaldson et al., 2006; Oberdörster et al., 2005b). Mesleki maruziyette, dizel dumanıyla akciğer kanseri arasındaki ilişki belirlenmiştir (Donaldson et al., 2005). Ayrıca Shvedova et al., (2003), gerçekleştirdikleri *in vitro* çalışmada, SWCNT (Tek Duvarlı Karbon Nanotüp) maruziyeti sonucunda insan epidermal keratinositlerinde oksidatif stres oluştuğu ve hücresel toksisite gözlendiğini belirtmiştir.

Doğal çevredeki petrol, kömür ve odunun yanması sonucu ve otomobil egzozu kaynaklı birçok nanoparçacık bulunmaktadır. Ayrıca, artan nanopartikül üretimi nedeniyle bu partiküller çevreye bilerek ya da kazara salınabilir ve bunlar su, toprak ve havaya dağılabilir. Biyoorganizmaların bu partiküllere maruz kalımıyla birlikte, biyoakümülyasyon gerçekleşebilir ve gıda zinciri vasıtasıyla diğer canlılar da bu durumdan etkilenebilir. Nanopartiküllerin salınımı ekotoksik bir riski beraberinde getirmektedir (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). Literatüre göre iki çeşit maruz kalım bulunmaktadır: dışsal (external) ve içsel (internal) maruz kalım. Dışsal maruz kalım, organizmanın çevresini saran nanopartiküllerin biyobulunurluğudur. İçsel maruz kalımda organizmalar nanopartikülü alıp metabolize edebilir ardından çeşitli doku ve organlara transfer edebilir (Lopez-Serrano et al., 2014). Dizel dumanı (kurumlar), kaynak dumanı, karbon karası ve uçucu killer, yanma kökenli nanopartikülleri (Combustion Derived Nanoparticles) (CDNP) oluşturur. Beyne ve kana transloke olarak karaciğer ve dalak gibi organlara yayılabilirler. Oksidatif strese neden olan bu partiküller sonucunda inflamasyon tetiklenebilir ve kanser gözlenebilir (Çizelge 1.4) (Donaldson et al., 2005).

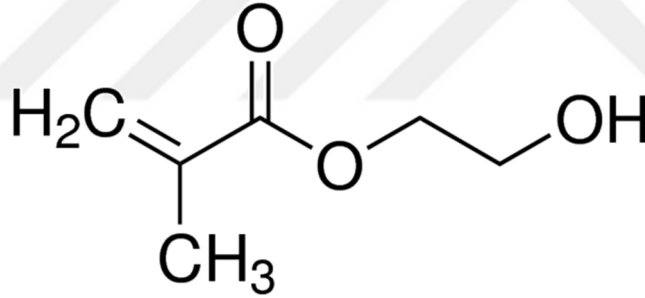
Çizelge 1.4 Yanma kökenli nanopartiküllerin sağlık üzerine etkileri

CDNP	Orijin	Rapor edilmiş sağlık etkileri	
		Hayvan	İnsan
Dizel egzoz partiküller	Dizel yağın yanması	İnflamasyon, Fibrosis, Kanser	İnflamasyon, Kanser?
Kaynak dumanı	Kaynak süreçleri	İnflamasyon; metalin beyne translokasyonu	Metal duman ateşi, Fibrosis, Kanser, Bronşit
Uçucu kül	Kömür ya da yağın yanması	İnflamasyon	Veri yok
NP Karbon karası	Ağır akaryakıt yanması	İnflamasyon, akciğer kanseri; partiküllerin beyne translokasyonu	Veri yok

Biyoteknoloji ortaya çıktığında yaşanan endişeler nanoteknolojide de yaşanmaktadır (Kuzma and Priest, 2010). Günümüzde nanopartiküllerin toksik etkileri hakkında bildiklerimiz sınırlıdır (Hossain et al., 2011; Kuzma and Priest, 2010; Lanone and Boczkowski, 2006; Lopez-Serrano et al., 2014). Kullanımları için kesin karara varılması adına toksisite çalışmalarının kapsamlı bir şekilde devam etmesi gerekmektedir.

1.6. 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA)

Ticari öneme sahip olan hidroksietil metakrilat (HEMA) (Şekil 1.3), biyomedikal uygulamalarda kullanılan, biyouyumlu, suda çözünebilir özellikte ve polimerleşebilen bir monomerdur. Metil metakrilat ya da metakrilik asitten hazırlanabilir ve metakrilik türevleriyle polimer halini alır (Montheard et al., 1992). Bu monomer 1936'da ilk kez sentezlenmiş (E. I. du Pont de Nemours Co., 1936a) ve polimerizasyonu yapılmıştır (E. I. du Pont de Nemours Co., 1936b).



Şekil 1.3 Hidroksietil Metakrilat (HEMA) kimyasal yapısı

Wichterle and Lim (1960), potansiyel biyomedikal kullanım özelliği gösteren ilk p(HEMA) hidrojelini sentezlemiştir. p(HEMA)'nın mükemmel optik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Bunun üzerine bu hidrofilik jeller biyomateryal olarak tanımlanmıştır. 1961'de p(HEMA)'nın yumuşak kontakt lens preparasyonu için bir proses keşfedilmiştir.

p(HEMA)'nın tıpta biyomateryal olarak kullanımı dikkat çekicidir (Chappard et al., 1982; Chappard et al., 1986). Elektron mikroskobu ve ışık mikroskobunda görüntülenecek dokular için gömme ortamı çalışmaları

yürütülmüştür (Montheard et al., 1992). Biyouyumluluk özelliğinden yararlanılarak yumuşak kontakt lens yapımında (Ratner, 2004; Singh et al., 1992), dişçilikte dental adeziv olarak (Van Landuyt, 2007) ve doku mühendisliğinde (Slaughter et al., 2009) kullanılmaktadır. p(HEMA)'nın taşıyıcı olarak kullanıldığı, oftalmik ilaçların (Xinming et al., 2008) ve kanser ilaçlarının (Denizli et al., 1988; Ma et al., 2012; Johnson et al., 2012) taşınım araştırmaları mevcuttur. Ayrıca, enzim ve proteinler için adsorpsiyon, seperasyon ve immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Akgöl et al., 2009; Köse and Denizli, 2013; Öztürk et al., 2008).

HEMA biyoparçalanabilir (14 günde %92-100), düşük biyobirikim potansiyeline sahip (25 °C'de Log Pow 0.42), pH 4-7 arasında stabil olan ve pH 9'da yarılanma ömrü yaklaşık olarak 11 gündür. Yürütülen toksisite çalışmaları sonucunda; *in vitro*'da bakteriler için mutajenik olmadığı ve *in vivo*'da kemik iliği için mikronukleus oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir. Rodentlerle yürütülen çalışmalar sonucunda akut toksisite potansiyelinin düşük olduğu belirlenmiştir. Oral LD₅₀ değeri 4000 mg/kg'den büyük olarak tespit edilirken dermal LD₅₀ değeri 3000 mg/kg'nin üzerindedir. Ginepig derisi için zayıf sensitizerdir. Ayrıca, sınırlı sayıdaki akuatik (sucul) organizma üzerine gerçekleştirilen akut toksisite çalışmaları sonucunda en hassas organizmanın *Oryzias latipes* (Japon Pirinç Balığı) olduğu belirlenmiştir (SIDS Initial Assessment Report For SIAM 13, 2001).

1.7. Amaç

Nanoteknoloji, nanoboyuttaki ürünlerin sentezi ve manipülasyonu ile ilgilenen bilim dalıdır. Bilim, mühendislik ve teknolojinin kullanıldığı son derece dinamik ve ilgi çekici bir alandır. Günümüzde hastalıkların görüntülenmesi ve tedavisinde, tarımda ürün veriminin artırılmasında, kozmetikte, elektronik vb. alanlarda kullanılır. Polimerler sahip olduğu biyouyumluluk, biyoparçalanabilirlik ve kolay yüzey modifikasyonu özellikleri nedeniyle nanoteknolojide biyomateryal olarak yaygın kullanıma sahiptir. Hızla gelişen ve yaygın kullanılan nanoteknolojinin olumsuz etkileri üzerine bilim insanları ve halkta çeşitli endişeler mevcuttur. Bu endişelerin giderilmesi ve gerekli yasal düzenlemelerin

yapılması adına nanoürünler için çeşitli karakterizasyon işlemleri ve toksisite testleri uygulanmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, ilaç taşıyıcı olarak kullanılması planlanan Triptofan-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün sentezinin gerçekleştirilmesi, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi adına karakterizasyonunun yapılması, olası toksisite potansiyelinin belirlenmesi için *in vitro* ve *in vivo* toksisite çalışmasının yürütülmesi ve nanopolimerin *in vivo*'daki dağılımının belirlenmesidir.

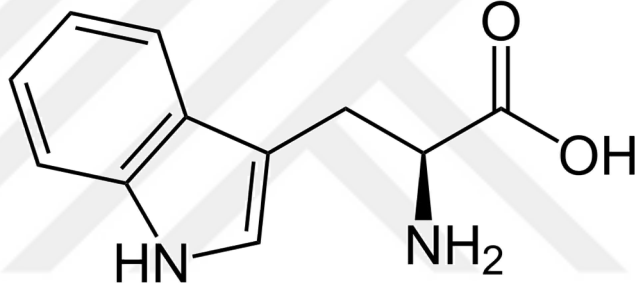


2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Triptofan (Trp)

Triptofan, aromatik ve polar olmayan özelliğe sahip, 22 temel amino asitten biridir (Şekil 2.1). Bebeklik döneminde normal büyüme için, yetişkinlerde nitrojen dengesi için gereklidir. Vücutta protein, enzim ve kas doku üretimi için önemlidir. Ayrıca, serotonin ve melatoninin öncü maddesidir (prekürsör). Bilindiği üzere serotonin; uyku, açlık, acı ve ruh halini (mood) düzenler. Melatonin, uyku ve uyanıklığı düzenler (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Şekil 2.1 Triptofan'ın kimyasal yapısı

Triptofan, kokusuz, beyaz veya hafif sarımsı beyaz renktedir (Reynolds and Prasad, 1982a). Suda (25 °C'de 13400 mg/L), asetik asitte ve etanolde hafif çözünme gösterirken (Lide, 2007) kloroformda ve etil eterde çözünmez. Sudaki %1'lik çözeltisi pH 5.5 ile 7 arasındadır (Reynolds and Prasad, 1982a).

Triptofanın anksiyeteyi, depresyonu ve migren baş ağrısını azalttığı düşünülmektedir. Uykuya dalış süresini kısalttığı, uyku süresini ve kalitesini arttırdığı belirtilmiştir (Hartmann et al., 1971). Ayrıca, romatoid artrit hastalarına antidepresan olarak verildiğinde hastalığa ait romatik semptomlarda azalmaların meydana geldiği rapor edilmiştir (Reynolds and Prasad, 1982b).

57 şirketten biri GHS Hazard Statements'a (GHS Tehlike Beyanları) deri ve göz için irritant olduğu, solunum için irritant olabileceği yönünde uyarıda

bulunmuştur. Ayrıca, ilaçlarla birlikte triptofan kullanımıyla serotoninin yeniden alımının inhibe edildiği belirtilmiştir (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Sıçanlar için LD₅₀ değeri oral uygulamada 16 mg/kg'nin üzerinde olup (www.drugbank.ca) intraperitoneal uygulamada 1634 mg/kg'dir. Fareler için intraperitoneal uygulamadaki LD₅₀ değeri 4800 mg/kg'dir (toxnet.nlm.nih.gov).

2.1.2. Deney hayvanları

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31.08.2016 tarihli 2016-072 no'lu onayıyla gerçekleştirilmiştir.

In vivo toksisite denemesi olarak gerçekleştirilen tek doz akut toksisite denemesi, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 20-25 g aralığındaki ağırlığa sahip, erkek (n=2) ve dişi (n=2) Balb/c albino deney fareleri (Şekil 2.2) ile gerçekleştirilmiştir. Biyodağılım çalışmasında erkek (n=4) ve dişi (n=4) Balb/c albino deney faresi kullanılmıştır.



Şekil 2.2 Toksisite ve biyodağılım denemelerinde kullanılan Balb/c albino deney fareleri

Çalışmada kullanılacak olan hayvanlar deneyden 15 gün önce Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'ne (ARGEFAR) alınarak deney için hazırlanmıştır. Deney gruplarında kullanılan fareler tesadüfi olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan hayvanlar bireysel havalandırılmalı kafeslerde tutulmuştur (Şekil 2.3). Deney ortamı için laboratuvar sıcaklığı 20-24 °C ve % 45-65 nem koşulları sağlanmıştır ve bu kriterler günde 3 kez kontrol edilmiştir. Laboratuvarda 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyodu uygulanmıştır. Ayrıca, deney hayvanlarının beslenmeleri *ad libitum* olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3 Balb/c albino deney farelerinin barındığı kafes sistemi

Hemoliz testinde kullanılan tavşan kanı, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 3-4 kg ağırlığa sahip, 3-4 aylık erkek ($n = 1$) Yeni Zelanda Tavşanından elde edilmiştir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5). Çalışmada kullanılan hayvan, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyodunun uygulandığı 21-24 °C ve % 50-55 nem koşullarına sahip laboratuvarda *ad libitum* olarak beslenmiştir.

HET-CAM testinde kullanılan Leghron beyaz tavuk yumurtaları Abalıoğlu AŞ'den satın alınmıştır.



Şekil 2.4 Yeni Zelanda Tavşanı'nın barındığı kafes sistemi



Şekil 2.5 Hemoliz testinde kullanılan Yeni Zelanda Tavşanı

2.2. Metot

2.2.1. Trp-graft-p(HEMA) Polimerik Nanopartikülünün Hazırlanması

2.2.1.1. p(HEMA) polimerik nanopartikülünün hazırlanması

p(HEMA) polimerik nanopartikülünün sentezi sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve triptofan, p(HEMA)'nın hidroksil gruplarıyla bağlanmıştır. Stabilizer olan poli(vinil alkol) (0.5 g) devam eden aşamalarda kullanılmak üzere 100 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. 0.6 mL/0.3 mL monomer karışımı olan HEMA/EGDMA, çözeltiye eklenmiş ve yaklaşık olarak yarım saat boyunca ultrasonik küvette karıştırılmıştır. Monomer fazdaki başlatıcı olan potasyum persülfat (KPS) konsantrasyonu 20 mg/mL'dir. Polimerizasyondan önce, başlatıcı solüsyona eklenmiştir ve çözünmüş oksijeni gidermek amacıyla 1-2 dk boyunca nitrojen gazından geçirilmiştir. Polimerizasyon işlemi nitrojen atmosferi altında 70 °C sabit sıcaklıklı çalkalamalı küvette 7 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyondan sonra, reaksiyona girmemiş olan monomerleri gidermek amacıyla nanoküreler, etanol ve distile suyla birkaç kez yıkanmıştır (Türkcan et al., 2013).

2.2.1.2. Triptofan'ın p(HEMA) ile graftlanması

Triptofan amino asidinin p(HEMA) polimeriyle graftlanması (aşılması) Akgöl et al., (2001)'e göre minör modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. 20 g kuru p(HEMA) membran disk, katalist olarak 1,4 g NaH içeren triptofan solüsyon karışımına (tetrahidrofuranın 50 cm³'ünde 3 g triptofan) transfer edilmiştir. Graftlama reaksiyonu 40 °C sabit sıcaklıktaki manyetik karıştırıcıda 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Graftlama reaksiyonunun sonunda, triptofan graftlanmış p(HEMA) zayıf bağlanan triptofanın giderilmesi adına metanol ve suyla yıkanmış ve 24 saat boyunca vakumla kurutulmuştur. Bu işlemlerin ardından hazırlanan örneğimiz kullanılabilecek kadar 4 °C'de saklanmıştır.

Graftlama ürününün ve veriminin hesaplanması Pathania and Sharma (2012)'ye göre yapılmıştır ve formül aşağıdaki gibidir:

$$\text{Graftlama ürünü (Grafting yield)} = [(W_3 - W_1) / W_1] \times 100$$

$$\text{Graftlama verimi (Grafting efficiency) (\%)} = [(W_3 - W_1) / (W_2 - W_1)] \times 100$$

Graftlanacak maddenin başlangıç ağırlığı “W₁”, graftlanmış örneğin graftlama işlemi öncesi ağırlığı “W₂” ve graftlama sonrası elde edilen ürün “W₃” olarak sembolize edilmiştir.

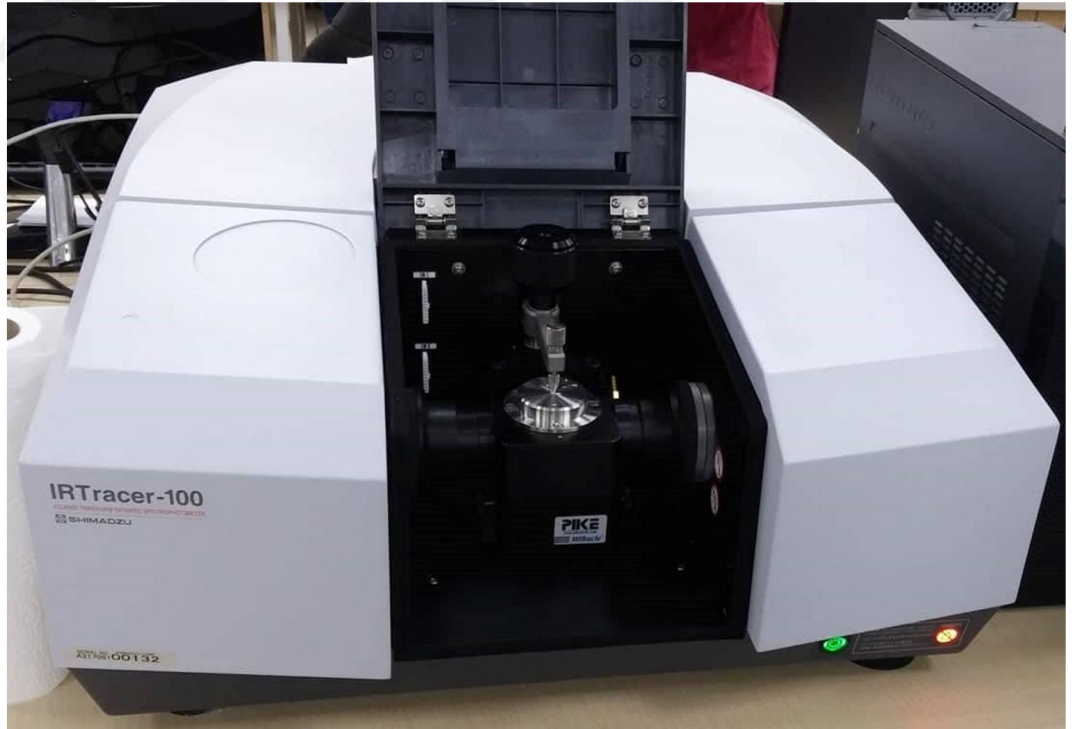
2.2.2. Trp-graft-p(HEMA)'nın Karakterizasyonu

Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün karakterizasyonunda, yapıya Trp katıldığı için FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopisi yapılmıştır; yük, boyut ve dağılımını belirlemek adına Zeta Potansiyel Analizi gerçekleştirilmiştir; morfolojisi ve boyutu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir ve su tutma kapasitesi şişme testi yardımıyla belirlenmiştir.

2.2.2.1. FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopisi

FTIR spektroskopisi, çeşitli birçok örneğin analizinde kullanılan bir karakterizasyon cihazıdır. Bu cihaz yardımıyla küçük moleküllerin, moleküler komplekslerin, hücrelerin ve dokuların analizini gerçekleştirmek mümkündür. Cihazın sahip olduğu prob, örneğin moleküler titreşimini kızılötesi spektroskopisiyle algılar. Her bir maddedeki fonksiyonel grubunun karakteristik bir kızılötesi absorpsiyon bandı bulunmaktadır ve bu fonksiyonel gruplar için özel bir titreşimle ilişkilidir (Berthomieu and Hienerwadel, 2009).

Çalışmada sentezlenen Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün sentez öncesi ve sonrası spektrumları FTIR spektroskopisiyle belirlenmiştir. Trp, p(HEMA) ve Trp-graft-p(HEMA) kuru örneklerinden 1'er mg tartılmıştır. Örnekler $750 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ aralığında FTIR spektrofotometreyle (Shimadzu, IRTracer-100) (Şekil 2.6) oda sıcaklığında (25°C) taranarak FTIR spektrumları elde edilmiştir.



Şekil 2.6 FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopisi cihazı

2.2.2.2. Zeta potansiyeli ve partikül boyutunun belirlenmesi

Nanopartiküller kendine ait bir yüzey yüküne sahiptir. Zeta potansiyel ölçümü bu yükün ve özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yaygın bir tekniktir (Chouhan and Bajpai, 2010). Zeta Sizer cihazının çalışma prensibi, partiküllerin sıvı içerisinde yaptığı ‘brownian hareketi’ne dayanır. Partiküllerin sıvıyı hareket ettirme özelliği kullanılarak boyut ölçümü yapılır. Küçük partiküller büyük olanlara göre daha hızlı hareket etmektedir. Cihaz tarafından gönderilen dinamik ışık ile partiküllerin hareketlerinin büyüklüğüne bakılır ve böylece partikül boyutu hakkında bilgi edinilir (Malvern Instruments Ltd, 2004). Sentezlemiş olduğumuz nanopolimerin boyut ve dağılımı Zeta Sizer ile belirlenmiştir. Nanopolimer 0.1 mg/mL tris tamponu (pH 10) olacak şekilde hazırlanmış ve ardından 25 °C’de ölçüm alınmıştır.

2.2.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

SEM, maddelerin ve biyolojik örneklerin üç boyutlu yapısını ortaya koyan bir elektron mikroskobu çeşididir (Denk and Horstmann, 2004). Nanopartiküllerin boyut ve dağılımı, yüzey yapısı, yüzey alanı gibi özellikler hakkında bilgi edinmek için yaygın kullanıma sahiptir (Lopez-Serrano et al., 2014; Sayes and Warheit, 2009). SEM görüntüleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde (İYTE) bulunan Quanta 250 S FEG cihazı ile elde edilmiştir. Hazırlanmış olan nanopolimer liyofilizasyonla kurutulup sonrasında polimer iletkenliğin artırılması amacıyla yüzey altın kaplanmıştır. Bu işlemlerin ardından nanopolimerin morfolojisi ve boyut dağılımı SEM ile incelenmiştir.

2.2.2.4. Şişme testi (Swelling test)

Şişme testi, nanopartiküllerin su absorpsiyon kapasitesinin ölçümü için kullanılan bir tekniktir (Bajpai and Saini, 2005). Nanopolimerin şişme özellikleri oda sıcaklığında (25 °C) ve 37 °C’de 0 - 48 saat aralığında distile su ve pH 7.4 PBS’de incelenmiştir. Nanopartiküller distile su ve PBS içeren ependorflara eklenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında spatül yardımıyla alınarak filtre kağıdında yavaşça kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından hassas teraziyle

ağırlık ölçümü yapılmıştır. Ölçümün ardından alındıkları ependorflara tekrar aktarılmış ve belirlenen zamanlarda işlem tekrarlanmıştır. Şişme oranını aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Dai et al., 2007):

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_d) / (W_d)] \times 100$$

Bu formülde “Ws” şiş ağırlığı, “Wd” kuru ağırlığı simgelemektedir.

2.2.3. *In vitro* Toksisite Denemeleri

2.2.3.1. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi (MTT Yöntemi)

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan HEK 293 (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiş ve çalışmalar Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı’nda yürütülmüştür.

Hücreler, %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Biological Industries, Cat: 04-121-1), %1 L-glutamin (Biological Industries, Cat: 41-218-100), %1 gentamisin (Biological Industries, Cat: 03-035-1C), %2 NaHCO₃ (%5,5) (Sigma, CAS Number: 144-55-8), 1mM HEPES (Biological Industries, Cat: 03-025-1B), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) Ham’s F12 besiyeri ortamı (Biological Industries, Cat: 01-170-1B) içerisinde CO₂’li inkübatörde (37 °C) inkübe edilmiştir. Kültür kabının %80’ini dolduran hücrelerin canlılığının ve çoğalmasının devam edebilmesi adına flasklara pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

DMEM F12 besi ortamında aktif çoğalan hücrelerin sitotoksikite testi için uygun sayıda olup olmadıklarının sayımı Inverted Research Mikroskop (Olympus Ix71, Japan) ile yapılmıştır.

Hücrelerin hemositometrik sayımı için besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve flasklara Trypsin (Biological Industries, Cat: 03-051-5C) (75 cm²’lik flask yüzeyi için 1 mL, 25 cm²’lik için 0,5 mL) eklenerek flasklar 37 °C ayarlı CO₂’li

inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası süspanse hale geçen hücreleri içeren flasklara uygun konsantrasyonda DMEM F12 besi ortamı eklenmiştir ve flask içeriği 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri 1000 rpm'de 4 °C'de 5 dk (Eppendorf, 5810 R, Hamburg, Germany) santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırılarak hücre sayımı için %10'luk dilüsyonda 100 µL hücre / 900 µL DMEM oranında 0,2 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Hemositometrik lama (Neubauer) %10 dilüsyonda 50 µL'lik hücresel süspanسیون eklenerek mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve mililitredeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

MTT testi, hücre canlılığını, büyümesini ve aktivasyonunu ölçen, hassas, güvenilir ve nicel özelliklere sahip kolorimetrik bir testtir. Test ortamında yaşayan hücreler, mitokondriyal dehidrogenaz enzim kapasitesine bağlı olarak suda çözünen açık sarı renkli MTT substratını suda çözünmeyen koyu mavi formazan substratına dönüştürür. Üretilen formazan miktarı spektrofotometre ile tayin edilebilir ve bu miktar canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. MTT testi, bölünmeyen ancak hala aktif olan hücrelerin belirlenmesi için kullanışlı bir metottur (Mosmann, 1983).

96 gözlü hücre kültürü kaplarına 1×10^5 hücre/mL konsantrasyondaki hücreler, 100'er µL'lik hacimlerde ekilmiştir (1×10^4 hücre/kuyucuk). Bu kap, 24 saat boyunca 37 °C, %85 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ortam uzaklaştırılarak test maddesi olan Çizelge 2.1'deki farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküller 2 mg/mL stoktan verilen konsantrasyonlarda eklenmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesi için inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatinde 5 mg/mL konsantrasyonunda MTT (30 µL/kuyucuk) (Ambresco, CAS Number: 298-93-1) solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bunun ardından formozan kristalleri DMSO (200 mL) ile çözülüp spektrofotometrede 570 nm'de ölçülmüştür. 96 kuyucuklu hücre kabındaki hücre canlılığının belirlenmesi Thermo Scientific Multiscan Spectrum (Waltham, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan tüm dozlarla kontrol grubu karşılaştırılmış ve maddenin IC₅₀ değeri GraphPad Prism 5 programı ile hesaplanmıştır. Hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak gerçekleştirilir:

$\% \text{ Canlılık} = 100 \times \text{Uygulanan dozdaki ortalama absorbans} / \text{Kontrol hücre absorbansı}$

Farklı konsantrasyonlar uygulanmış hücrelerin morfolojik incelemeleri için Olympus Ix71 Inverted Research Mikroskop kullanılmış ve bu görüntülerin fotoğrafları DP71 Camera Instruction ile çekilmiştir.

Sitotoksitenin belirlenmesi için; herhangi bir ajan uygulanmamış kontrol $\pm \text{SD}$ 'yle ilişkili yüzde artışı kullanılmıştır. Kontrolün sitotoksite değeri “%0” olarak alınmıştır. Herhangi bir madde uygulaması gerçekleştirilmemiş olan kontrol grubuna göre hücrelerin %50'sinin inhibisyonuna sebep olan maddenin konsantrasyon değeri olan IC_{50} değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC_{50} değeri, birbirinden bağımsız ve tekrarlanabilir olan istatistiksel olarak anlamlı en az üç değer ortalamasıdır. Analiz, GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmış ve güven aralığı $\% \pm 95$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2.1 MTT testinde kullanılan nanopartikül dozları

Uygulama Dozları ($\mu\text{g/mL}$)	I. Doz	II. Doz	III. Doz	IV. Doz	V. Doz
	100	50	25	12,5	6,25

2.2.3.2. Hemoliz testi

Hemoliz testi, kırmızı kan hücreleri olarak da bilinen eritrositlerin, nanopartiküle maruz kalımı sonrasında hemoliz yüzdesinin belirlendiği kolorimetrik bir *in vitro* sitotoksite testidir (Neun and Dobrovolskaia, 2011). Nanopolimerin hemolitik aktivitesinin belirlenmesi Parnham and Wetzig (1993)'e göre gerçekleştirilmiştir. Deney, nanopolimer ile tavşan kanı eritrositlerinin muamele edilmesi esasına dayanır. Anestezi altındaki Yeni Zelanda tavşanının ($n = 1 \text{ ♂}$) marjinal kulak veninden 3 mL kan lityum heparinli tüplere alınmıştır. Kanın pıhtılaşmasının engellenmesi adına tüpler hafifçe karıştırılmıştır. Sonrasında lityum heparinli tüplerdeki kan falkon tüpe alınıp 700 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından pellet alınmış ve pH 7.4 olan soğuk PBS

ile yıkanarak 700 g'de 10'ar dk olacak şekilde üç kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemlerinden sonra pellet alınarak total hacmin %20'si kan olacak şekilde pH 7.4 PBS ile resüspanse edilmiştir. Ependorflara 200'er µL kan ve 1000 µl PBS içinde disperse olan Çizelge 2.2'deki nanopolimer konsantrasyonları eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 kullanılmıştır. Ardından ependorflar 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı sıcak su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında ependorflar 700 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatanttan 1'er mL alınıp küvete aktarılmış ve spektrofotometrede 540 nm'de spektrofotometrik ölçüm alınmıştır.

Çizelge 2.2 Hemoliz testinde kullanılan nanopartikül dozları

Uygulama Dozları (µg/mL)	I. Doz	II. Doz	III. Doz	IV. Doz
	160	80	40	20

Hemoliz yüzdesi Lin and Haynes (2010)'a göre hesaplanmıştır:

$$\text{Hemoliz Yüzdesi} = \frac{[(\text{Örnek absorbansı} - \text{Negatif kontrol absorbansı}) / (\text{Pozitif kontrol absorbansı} - \text{Negatif kontrol absorbansı})] \times 100}$$

Hesaplamalar sonucu eğer hemoliz yüzdesi %10'un altındaysa, maddenin toksik olmadığı anlamını taşır (Fischer et al., 2003). Deney triplicate olarak gerçekleştirilmiş ve iki kez yapılmıştır.

2.2.3.3. Koryoallantoik membran testi (HET-CAM)

Draize et al. (1944) tarafından geliştirilen “Draize tavşan göz testi”, gözde hasar veya görme bozulmalarına neden olabilecek potansiyel risk taşıyan maddelerin test edilmesi için tanımlanan *in vivo* bir metottur. Bu maddelerin *in vitro* olarak test edilmesi için Luepke (1985) HET-CAM testini tanımlamıştır. HET-CAM testi, koryon ve allantoisin birleşiminden oluşan, maddelerin hemoraj, vasküler lizis ve koagülasyon kriterlerini zamana bağımlı şekilde inceleyen, Draize testine alternatif olarak geliştirilmiş *in vitro* göz irritasyon testidir (Araújo et al., 2009).

Nanopolimerin antianjiyogenik etki potansiyelinin belirlenmesi adına Leghron beyaz tavuk yumurtaları üzerinde HET-CAM Testi gerçekleştirilmiştir.

HET-CAM Testi, 50-60 g ağırlığındaki Leghron beyaz tavuk yumurtalarıyla gerçekleştirilmiştir. Dölleniş olan 0. gün tavuk yumurtaları, 37 ± 1 °C ve $\%58 \pm 2$ neme ayarlanmış Çimuka-Prodi marka kuluçka makinesinde 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yumurtalar 5. gün kuluçka makinesinden alınarak hava boşluğuna (künt) sahip oldukları yerden 25 mm'lik disk şeklinde yumurta kabuğu, zarın yırtılmamasına dikkat edilerek, kaldırılmıştır. %9'luk NaCl yardımıyla membran temizlenmiştir, ardından yumurtalar 30 dk boyunca tekrardan inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra yumurtalar alınarak saf DMSO'da çözünen nanopartikül dozları (5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1 mg/mL) 0,1 mL hacminde direkt olarak uygulanmıştır. Yumurta kabuğunda bulunan açıklık laboratuvar filmiyle kapatılmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3'er yumurtaya uygulama yapılmıştır ve bu test iki kez tekrarlanmıştır. Uygulama sonrası yumurtaların 30. saniye, 2. ve 5. dk fotoğrafları çekilmiştir. Hemoraj, vasküler lizis ve koagülasyon kriterleri incelenmiş ve Çizelge 2.3'teki değerlendirmelere göre skorlamalar yapılmıştır. Skorumla yardımıyla nanopolimer konsantrasyonlarının anti-anjiyogenik etki potansiyeli belirlenmiştir. Deney sonrası embriyolar kurban edilmiştir.

Çizelge 2.3 HET-CAM değerlendirmesinde kullanılan skor değerleri

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0,5	Yok	- Normal embriyo oluşumu gözlenmektedir. - Çevre kapillere göre değişiklik yoktur. - Hemoraj, vasküler lizis veya koagülasyon tespit edilmemiştir.
0,5 – 0,75	Zayıf	- Kapiller damarsız alan yoktur. - Kapillerin yoğunluğu azalmıştır.
0,75 – 1	Orta	Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmıştır. Etkiler madde alanının 2 katından fazla değildir.
>1	Kuvvetli	- Kapillersiz alan mevcuttur. - Normal embriyo oluşumu gözlenmemektedir.

$$\text{Ortalama skor} = [\text{Yumurta Sayısı (Skor 2)} \times 2 + \text{Yumurta Sayısı (Skor 1)} \times 1] / [\text{Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)}]$$

Bu ortalama skorlara göre;

Skor < 0,5: antianjiyogenik etki yok

Skor 0,5 – 0,75: zayıf düzeyde antianjiyogenik etki

Skor 0,75 – 1: orta düzeyde antianjiyogenik etki

Skor > 1: Kuvvetli antianjiyogenik etki olarak değerlendirilir.

2.2.3.4. Genotoksik potansiyelin belirlenmesi (AMES Testi)

Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan Ames Testi, mutajen ve karsinojenlerle geçerliliği kanıtlanmış olan, *Salmonella typhimurium* suşlarıyla maddelerin genotoksik potansiyelinin belirlendiği, yaygın olarak kullanılan standardize genotoksisite testidir. Yapay olarak mutasyona uğratılıp histidin adlı proteini sentezleme yeteneğini kaybeden (*His⁻* oksotrofik) *Salmonella typhimurium* suşlarının, test maddesinin uygulanmasının ardından ikinci kez mutasyon geçirerek yeniden histidin sentezleme yeteneği kazanması (*His⁺* prototrofik) yani yabanıl tipe dönüş özelliğinin araştırılması esasına dayanır (Maron and Ames, 1983; OECD Guideline 471).

Nanopolimerin genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100 ve TA 1535 suşları kullanılmıştır. Bu bakterilerin genotipleri ve özellikleri Çizelge 2.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.4 *Salmonella typhimurium* suşlarının genotipleri ve özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	Mutasyon Tipi	Hedef	Hücre Çeperi	Onarım	pKm101	R- Faktör
98	His D3052	Çerçeve kayması	GCGCGCGC GC yanından -1	Rfa	Δ uvr B	+	+
100	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	+	+
1535	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	-	+

His D 3052: His D⁺ geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlar. His D 3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotid eksikliği his D- geni içinde 8 kere tekrarlanan –GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla His⁺ hale dönüştürülmektedir.

His G 46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösün kodunu (GAG) yerine prolin kodunu (GGG) gelmesine neden olmaktadır.

Rfa: Bu mutasyon hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit örtüsünü zayıflatarak normal hücrelere giremeyen benzopiren gibi büyük moleküllerin test bakterilerine girebilmelerini sağlamaktadır.

Δ: Delesyon, Uvr B geni “excision repair” de görevi olan bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapmaktadır.

+R: pKM101, Ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmittir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve bu nedenle de kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olmaktadır.

Test Organizma ve Genotip Özelliklerinin Kontrol Edilmesi: Salmonella typhimurium test bakterilerinin stok kültür içeriği olarak Xenometrix (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları Maron ve Ames (1983) tarafından geliştirilen yöntemle uygun olarak Xenometrix tarafından yapılmış ve sertifikalandırılmıştır.

Bakterilerin spontan geriye dönüş sıklığı: Bakteri suşlarındaki His⁻ fenotipin His⁺ fenotipe spontan dönüşümünde belli sınırlama vardır. Bu sayılar, TA 98 için 30-50, TA 100 için 120-200 ve TA 1535 için 10-50 revertant / plaktır.

37 °C'deki çalkalamalı inkübatörde 12-14 saat Xenometrix (PMM-GMOO, LOT: K05672P) besiyerinde büyütülen bakterilerden 100 µL alınarak 45 °C'deki histidin-biyotinli (0,05 mM) top agara eklenmiştir. Tüp çalkalanıp, içeriği 37 °C'de yarım saat tutularak ısıtılmış Minimal Glukoz Agar (MGA) plaklarına ekilmiştir. Plaklar 37 °C'de inkübe edilmiş ve ardından 48 ve 72 saat sonunda His⁺ revertant sayısı belirlenmiştir.

Metabolik Aktivasyon Sağlayıcı Sistemin (S9 Karışımı) Hazırlanması:

Memelilerdeki detoksifikasyon / biyoaktivasyon enzim sistemi bakterilerde yoktur. Bunun yapay olarak sağlanması adına, sıçanların enzim aktivasyonu kimyasal maddeyle uyarılarak karaciğer dokularından S9 fraksiyonu yani mikrozomal enzim fraksiyonu homojenize edilir. Hücre homojenizasyonu sırasında endoplazmik retikulum membranı, biyotransformasyonda rol alan enzimlerin önemli kısmını içeren “mikrozom” adlı küreciklere dönüşür.

Promutajen / prekanserojen maddelerin tespiti Ames testi ile sağlanmaktadır. Bunların belirlenmesi adına, farede metabolik aktivasyonunun arttırılması gerekir. 12 haftalık farenin metabolik aktivasyonunun artışı Araclor 1254 (CAS 48586) Sigma Aldrich (Germany) ile sağlanmıştır. Ex yapılmadan önceki 5 günlük sürede 80 mg/kg olacak şekilde, mısır yağında 200 mg/mL konsantrasyonda Araclor, fareye oral yoldan verilmiştir.

a. Fareden karaciğerin çıkartılması: Hayvan servikal dislokasyonla öldürülerek, steril makas ve bistüri yardımıyla karaciğer aseptik olarak çıkarılmıştır.

b. Karaciğer S9 homojenatının hazırlanması: Fareden çıkartılmış olan karaciğer tartılmıştır. 0-4 °C'deki 0,15 M KCl solüsyonuna, 1 g karaciğer / 1 mL KCl olacak şekilde konulmuştur. Birkaç kez soğuk KCl ile yıkanarak 3 mL 0,15 M KCl / 1 g karaciğer oranı korunacak şekilde KCl eklenmiştir. Karaciğer steril bir makasla parçalanmış ve doku parçaları homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 8700 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. S9'u içeren süpernatant alınarak -20 °C'de saklanmıştır. Bu işlemler 0-4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

c. S9 karışımı: S9 fraksiyonunda bulunan mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gereken kofaktörler S9'a eklenmelidir. Bu nedenle deneye başlamadan önce S9 karışımı hazırlanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanımı: S9 karışımı

KCl 61,5 g

MgCl₂ 6H₂O 40,7 g

Distile su 500 mL

121 °C'de 20 dk otoklavda steril edilmiştir.

0,2 M Fosfat Tamponu pH 7,4

Kullanımı: S9 karışımı

0,2 M NaH₂PO₄. H₂O (13,8 g/500 ml) 60 mL

0,2 M Na₂HPO₄ (14,2 g/500 ml) 440 mL

121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

1 M NADP Çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımı

NADP (FW 765,4) 383 mg

Steril distile su 5 mL

0,22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

1 M Glukoz 6 fosfat

Kullanımı: S9 karışımı

Glukoz-6-fosfat 2,82 g

Steril distile su 10 mL

0,22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

S9 Karışımı

Kullanımı: Mutasyon deneyi

S9 2 mL

MgCl₂ – KCl tuzları 1 mL

1 M Glukoz-6-fosfat 0,25 mL
 0,1 M NADP 2 mL
 0,2 M fosfat tamponu, pH 7,4 25 mL
 Steril distile su 19,75 mL

Bu karışım taze olarak hazırlanmalı, içerikler soğukta tutulmalıdır.

Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması: Bakteriler 10 mL besiyeri içerecek şekilde 50'şer mL'lik falkon tüplere konulmuştur. Negatif kontrol olan falkon tüpündeyse 5 mL besiyeri vardır. -20 °C'den çıkartılan bakteriler oda sıcaklığında çözülerek ampsilin çözeltisinden % 0,1 (10 µL) eklenmiştir. -80 °C'de saklanan bakteri kültürleri oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra üzerine 200 µL besiyeri eklenmiştir. Yarı katı pellet durumundaki bakteriler steril pipet ucu yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Bu homojen karışımın 25 µL'si ampsilinli falkon tüplere eklenmiştir. Falkon tüpler 37 °C'deki inkübatörde 250 rpm'de 14 – 16 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürlerin OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin optik yoğunluğu en az 2,0 olmalı ve negatif kontrol ise ≤0,05 olmalıdır.

Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması: Test ortamında S9'lu ve S9'suz durumlar için farklı pozitif kontroller kullanılmıştır.

Mutajenik Aktivitenin Belirlenmesi: Mutasyon deneyi için "Spot Test" kullanılmıştır. 45 °C'lik su banyosunda 2 mL'lik histidin ve biyotin eklenmiş top agar bulunduran tüplere, 12 – 14 saatlik 100 µL bakteri kültürü ve 0,5 mL S9 karışımı konmuş ve bu karışım MGA plaklara dökülüp agarın donması beklenmiştir. Plaklara 3 mg/mL nanopolimer uygulanmıştır. 37 °C'de 48 saat inkübasyonun ardından His⁺ kolonileri sayılmıştır.

Ames testinde kullanılan ortamlar aşağıdaki gibidir.

Kullanılan ortamların içerikleri;

Vogel-Bonner Medium E (50x)

Kullanımı: Minimal Glukoz Agar

Distile su (45 °C) 670 mL

MgSO₄.7 H₂O 10 g

Sitrik asit monohidrat 100 g

K_2HPO_4 500 g

$NaH_2PO_4 \cdot 4 H_2O$ 175 g

Maddeler sırasıyla sıcak suya eklenmiştir. Daha sonra hacim 1 L'ye tamamlanmış ve 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

0,5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi

Kullanımı: Mutasyon deneyi (100 mL top agara 10 mL)

D-Biyotin (FW 247,3) 30,9 mg

L-Histidin. HCl (FW 191,7) 24,0 mg

Distile su 250 mL

121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

Top agar

Kullanımı: Mutasyon deneyi

Agar 6 g

NaCl 5 g

Distile su 1000 mL

121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

Minimal glukoz agar plakları

Kullanımı: Mutasyon deneyi

Agar 15 g

Distile su 930 mL

50x VB tuzları 20 mL

%40 glukoz 50 mL

Agar distile suya eklenerek 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Çözeltinin soğumasının ardından 50x VB tuzları ve %40 glukoz eklenmiştir.

Histidin/Biyotin Plakları

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

Agar 15 g

Distile su 914 mL

50x VB tuzları 20 mL

% 40 glukoz 50 mL

Steril Histidin HCl H₂O (2 g / 400 mL H₂O) 10 mL

Steril 0,5 mM Biotin 6 mL

Agar, distile suya eklenerek 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Çözelti soğuduktan sonra içine 50x VB tuzları, % 40 glukoz ve histidin eklenmiştir. Çözelti tamamen soğuduktan sonra biyotin eklenmiştir.

2.2.4. *In vivo* Toksisite Denemeleri

2.2.4.1. Tek doz akut toksisite denemesi (Limit test)

Bir maddenin toksik özelliğinin tespitinde, LD₅₀ değerinin belirlenmesiyle birlikte akut toksisitenin ölçülmesi son derece önemlidir ve bu işlem toksik özelliğinin tespitinin ilk basamağını oluşturur. LD₅₀ değeri, maddenin uygulandığı test hayvanlarının yarısını öldürecek doz anlamına gelir (Food and Drug Administration, 1988).

Nanopolimerin tek doz akut toksisitesinin belirlenmesinde limit test uygulanmıştır. Madde 2000 mg/kg dozda ayarlanarak 1 erkek ve 1 dişi Balb/c albino fareye oral yolla verilmiş ve ardından 48 saat gözlem yapılmıştır. Hayvanların yaşamlarını sürdürmelerinin gözlenmesinin ardından, diğer 1 erkek ve 1 dişi fareye aynı uygulama yapılmıştır. Hayvanların hayatta kalması durumunda maddenin toksik olmadığı kabul edilir (OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals No: 425, 2008). Hayvanların ölmesi durumunda OECD Guideline No: 425 “Up and Down Testi” referans alınacaktır. “Up and Down Testi” Dixon and Mood (1948) tarafından tanımlanmış ve kimyasalların akut toksisitesinin belirlenmesi için kullanımı Robert D. Bruce tarafından önerilmiştir. Klasik metoda göre, bu metod kullanılan hayvan sayısını azaltmaktadır (Bruce, 1985). Bu teste göre öncelikle bir hayvana tek doz uygulama yapılacaktır. Eğer hayvan 48 saat yaşamını sürdürürse, diğer bir hayvana bir üst doz uygulama yapılır. Eğer hayvan ölürse, bir alt doz uygulama yapılır. Uygulamadan sonra hayvanlar 14 gün boyunca gözlemlenir.

2.2.5. *In vivo* Biyodağılım Çalışması (IVIS Spektrum)

Nanopolimerin *in vivo* biyodağılımının belirlenmesi IRDye 800 RS NHS Ester (Li-Cor, Lot: C60719-03) boyası ile gerçekleştirilmiştir. 5 mg toz halindeki boya, 2 mL PBS’de (pH 7.4) çözülmüştür. PBS’de (pH 7.4) 33 mg/5 mL konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmış nanopolimer, boya stoğundan 200 µL çekilen boyayla birlikte karıştırıcı ile oda sıcaklığında bir gece reaksiyona sokulmuştur. Boya stoğu -20 °C’de saklanmıştır. Reaksiyonun ardından, bağlanmayan boyanın giderilmesi adına 25 mm’lik genişlikteki diyaliz tüp selüloz membran (Sigma-Aldrich, CAT No: D9777-100FT) ile PBS’ye karşı diyaliz edilmiştir.

IRDye 800 RS NHS Ester’le boyanmış Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülü, Balb/c albino deney farelerinin kuyruk veninden 100’er µL enjekte edilmiştir. Farelerin 0., 1., 3., 6., 12., 24. ve 72. saatte IVIS Spektrum cihazı (Şekil 2.7) ile görüntüleri 780 nm’de alınmıştır. Ayrıca, nanopartikül uygulaması olmayan diğer farelere, kuyruk veninden 100 µL yalnızca boya verilerek görüntü alınmıştır.



Şekil 2.7 Biyodağılım görüntülemelerinin elde edildiği IVIS Spektrum cihazı

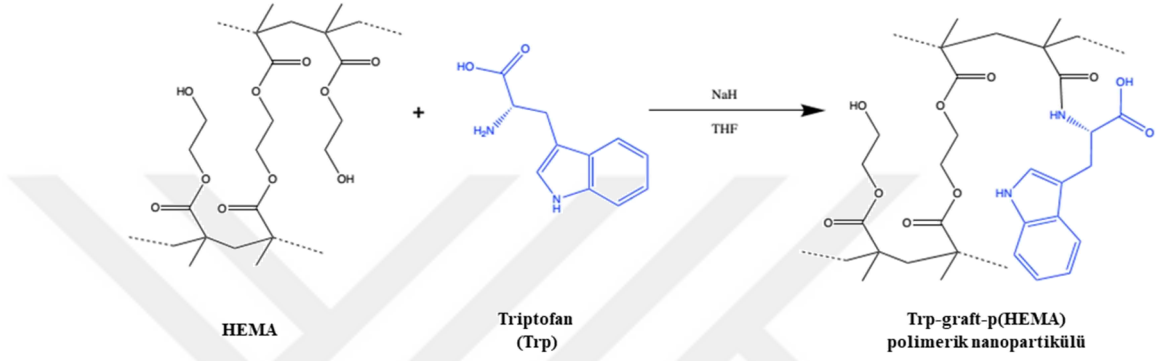
2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızdaki istatistiksel değerlendirmelerde ‘SPSS for Windows 10.0’ istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Deney sonunda farelere ait total ağırlıkların ortalamaları ve standart sapmaları ‘One-Way ANOVA’ ile kıyaslanmıştır. İstatistiksel açıdan önem kontrolü $p < 0.05$ olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Graftlama Verimi Bulguları

Esansiyel amino asit triptofan ile p(HEMA) polimerinin graftlanarak elde edilmiş Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün kimyasal yapısı (Şekil 3.1) ve görünümü Şekil 3.2'deki gibidir.



Şekil 3.1 Trp ile p(HEMA)'nın graftlanması



Şekil 3.2 Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün liyofilize görünümü

Trp ile p(HEMA)'nın graflama sonuçları Çizelge 3.1'deki gibidir. Sonuç olarak nanopolimerin graflama ürünü % 4,456 ve graflama verimi % 78,65'tir.

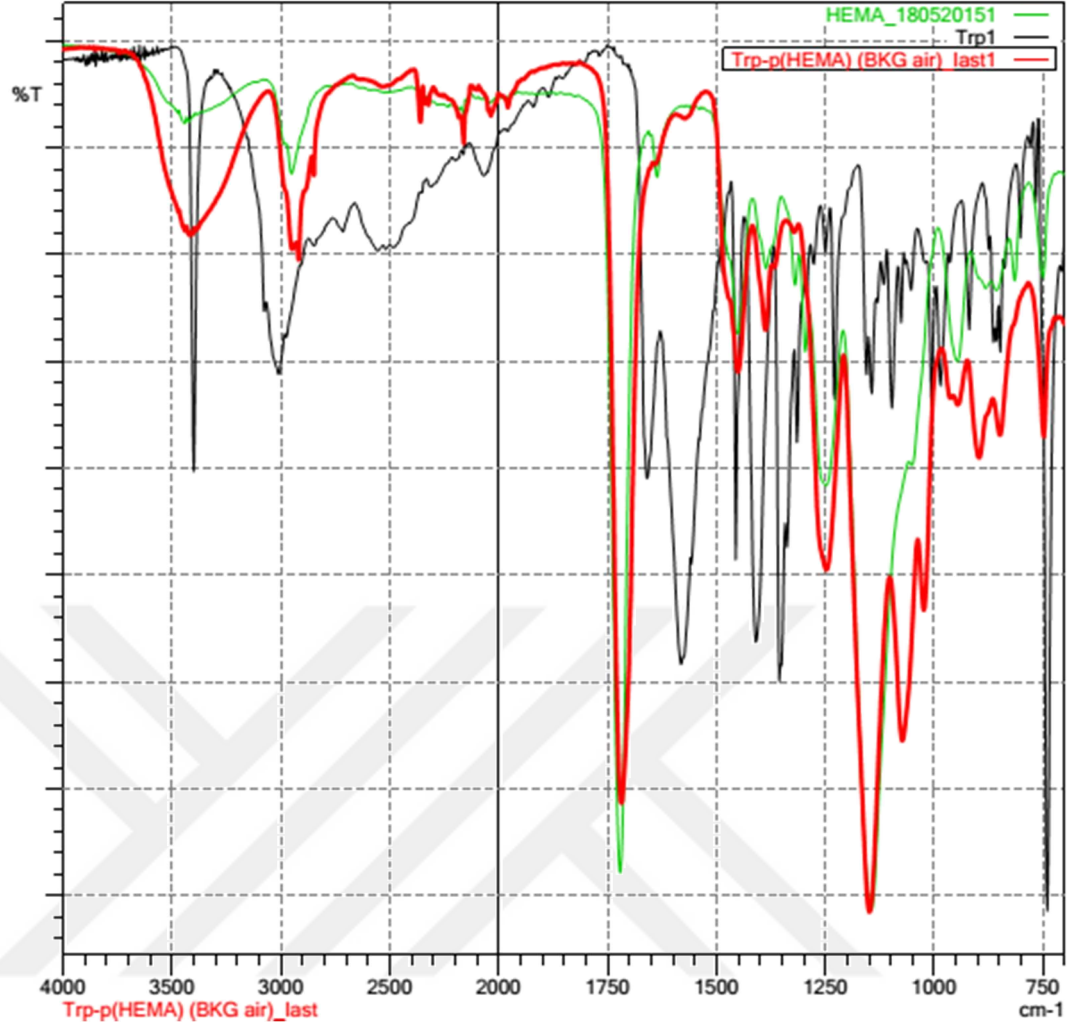
Çizelge 3.1 Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün graflama hesabı

Graflama Maddeleri	Miktar
Triptofan	88,95 mg
p(HEMA)	593 mg
Trp-graft-p(HEMA)	485,4 mg
Graflama ürünü (Grafting yield)	% 4,456
Graflama verimi (Grafting efficiency)	% 78,65

3.2. Trp-graft-p(HEMA)'nın Karakterizasyon Bulguları

3.2.1. FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopi bulguları

Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün sentezinin doğru şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi adına; Trp, p(HEMA) ve son ürün olan Trp-graft-p(HEMA)'nın FTIR spektrumları oda sıcaklığında (25 °C) 750 – 4000 cm⁻¹ aralığında ölçülmüştür. Spektrum sonuçları Şekil 3.3'te görülmektedir. Siyah çizgi Trp'nin, yeşil çizgi p(HEMA)'nın ve kırmızı çizgi Trp-graft-p(HEMA)'nın spektrumunu temsil etmektedir.



Şekil 3.3 Trp, p(HEMA) ve Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün FTIR spektrumu

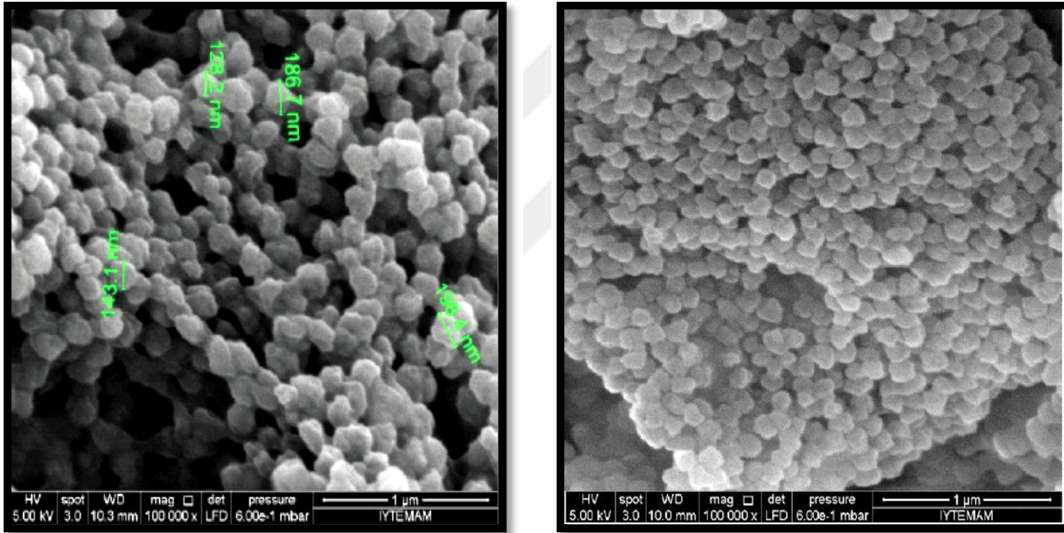
Şekil 3.3'te görüldüğü üzere p(HEMA) için 3440 cm^{-1} 'de O-H bant titreşimi, 2951 cm^{-1} 'de CH_3 'ten kaynaklanan C-H bandı, 1722 cm^{-1} 'de C=O nedeniyle kuvvetli bir bant, 1251 cm^{-1} 'de C-O bant titreşimi, 1143 cm^{-1} 'de C-O-H bandı gözlenmektedir. 3401 cm^{-1} 'de Trp için NH bandı görülmektedir. Trp-graft-p(HEMA)'nın 3417 cm^{-1} 'de OH ve NH bandı, 2949 cm^{-1} 'de CH_3 bandı, 1718 cm^{-1} 'de bant genişlemiş ve düşük dalga sayısına kaymış, 1251 cm^{-1} 'de C-O artmış, 1150 cm^{-1} 'de C-O-C bantları görülmektedir. Trp'nin p(HEMA) ile bağlandığını piklerde görülen bu değişimler açıkça ortaya koymaktadır.

3.2.2. Zeta potansiyeli ve boyut ölçümü bulguları

Sentezlediğimiz nanopolimerin boyut ve dağılımı 25 °C’de Zeta Sizer ile ölçüm alınarak belirlenmiştir. Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün ortalama partikül boyutu 299,8 nm ve polidispersite değeri (PDI) 0,501’dir. Nanopolimerin zeta potansiyel değeri -19,6 mV olup nanopolimer negatif yüzey yüküne sahiptir.

3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) bulguları

Nanopolimerin morfolojisi ve dağılımı SEM ile incelenmiştir. SEM görüntüsü Şekil 3.4’te görülmektedir.



Şekil 3.4 Trp-graft-p(HEMA)’nın SEM görüntüsü

Şekil 3.4’te partikülün küresel morfolojide, dar bir boyut aralığında (128,2 nm – 198,4 nm) ve hemen hemen eş boyutlu olduğu görülmektedir. Ortalama partikül boyutu 164,1 nm’dir. Ayrıca, partiküllerin düzgün yüzeyli olduğu belirlenmiştir.

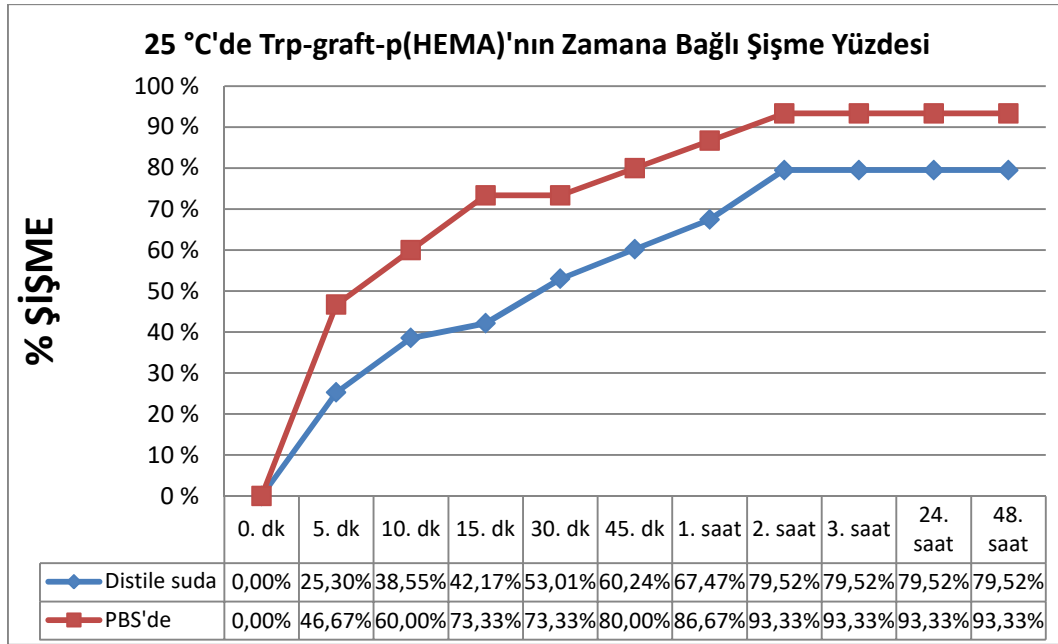
3.2.4. Şişme testi (Swelling test) bulguları

Nanopolimerin şişme miktarı distile su ve pH 7.4 PBS’de 25 °C’de ve 37 °C’de 0 – 48 saat boyunca ağırlık ölçümü yapılarak Çizelge 3.2’deki gibi belirlenmiştir.

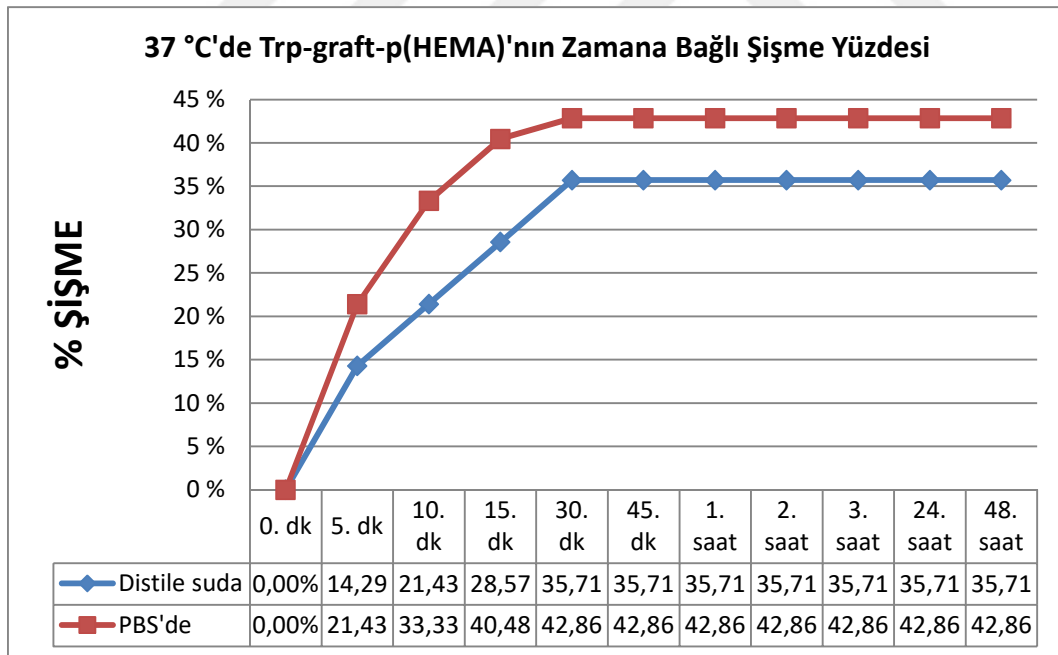
Çizelge 3.2 Trp-graft-p(HEMA)’nın distile suda ve PBS’deki sıcaklığa ve zamana bağlı ağırlık değişimi

	25 °C’de		37 °C’de	
Zaman	Distile Suda (mg)	PBS’de (pH 7.4) (mg)	Distile Suda (mg)	PBS’de (pH 7.4) (mg)
0. dk	8.3	1.5	1.4	4.2
5. dk	10.4	2.2	1.6	5.1
10. dk	11.5	2.4	1.7	5.6
15. dk	11.8	2.6	1.8	5.9
30. dk	12.7	2.6	1.9	6.0
45. dk	13.3	2.7	1.9	6.0
1. saat	13.9	2.8	1.9	6.0
2. saat	14.9	2.9	1.9	6.0
3. saat	14.9	2.9	1.9	6.0
24. saat	14.9	2.9	1.9	6.0
48. saat	14.9	2.9	1.9	6.0

Nanopolimer 25 °C’de distile suda ve PBS’de 2 saat sonunda maksimum şişme miktarına ulaşmış ve ağırlıkları sabitlenmiştir. 25 °C’deki şişme yüzdesi suda % 79.5 ve PBS’de (pH 7.4) % 93.3’tür (Şekil 3.5). Nanopolimer 37 °C’de 30 dk sonunda maksimum şişme miktarına ulaşmıştır. 37 °C’deki şişme yüzdesi distile suda % 35.7 ve PBS’de % 42.8’dir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5 25 °C'de Trp-graft-p(HEMA)'nın zamana bağlı şişme yüzdesi değişimi

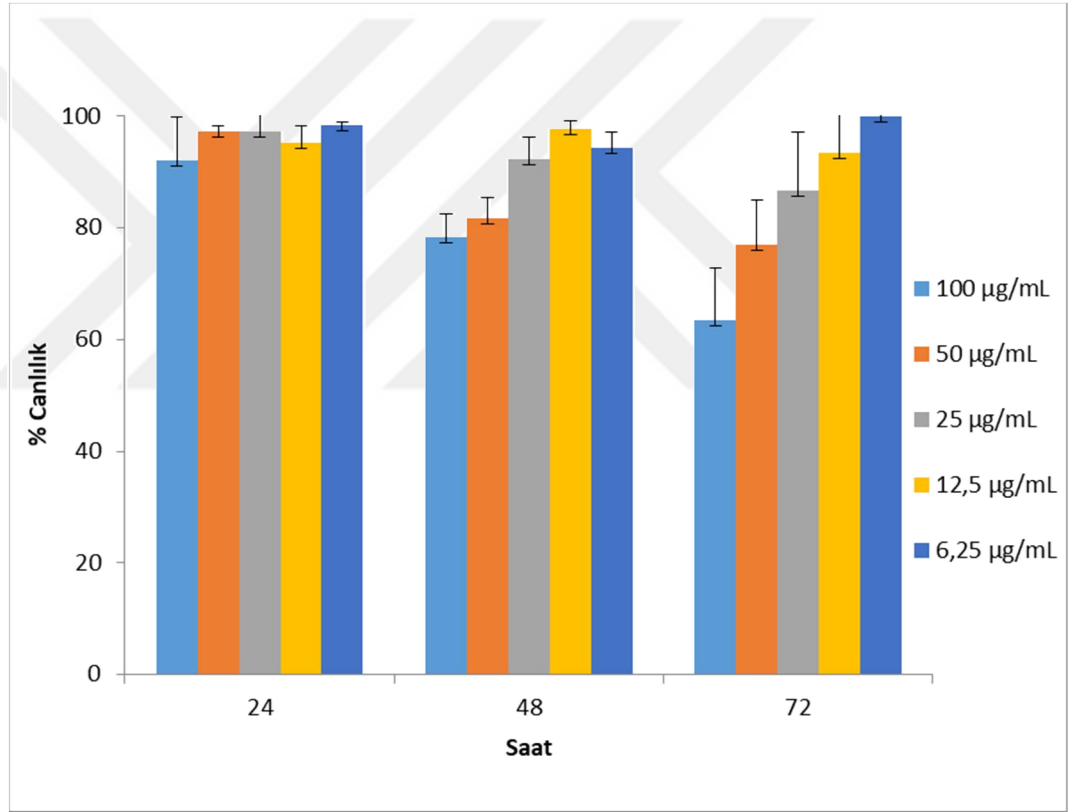


Şekil 3.6 37 °C'de Trp-graft-p(HEMA)'nın zamana bağlı şişme yüzdesi değişimi

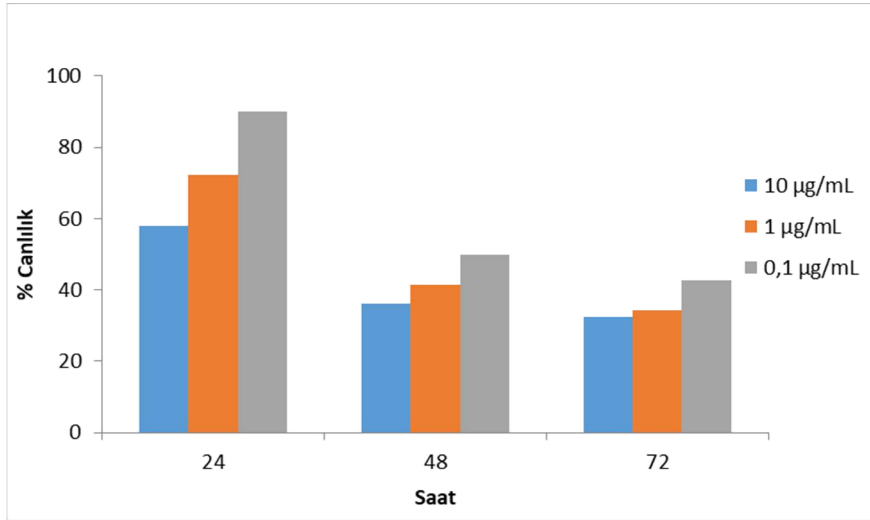
3.3. *In vitro* Toksisite Bulguları

3.3.1. Sitotoksosite bulguları (MTT Testi)

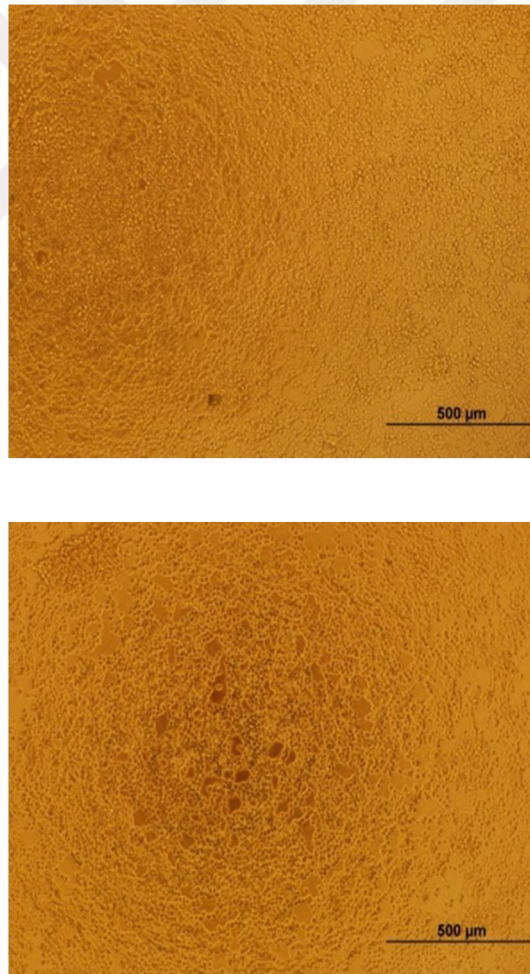
100 – 6,25 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki beş farklı konsantrasyondaki nanopolimer ve pozitif kontrol olarak üç farklı konsantrasyondaki Doksorubisin, HEK 293 hücre hattı üzerine uygulandıktan sonra 24. 48. ve 72. saatler için hücre canlılığında meydana gelen değişimler Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da görülmektedir. Herhangi bir saatte, uygulanan hiçbir nanopolimer dozu için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 3.7 Farklı Trp-graft-p(HEMA) dozları için HEK 293 hücrelerinin zamana bağlı yüzde canlılık değişimi



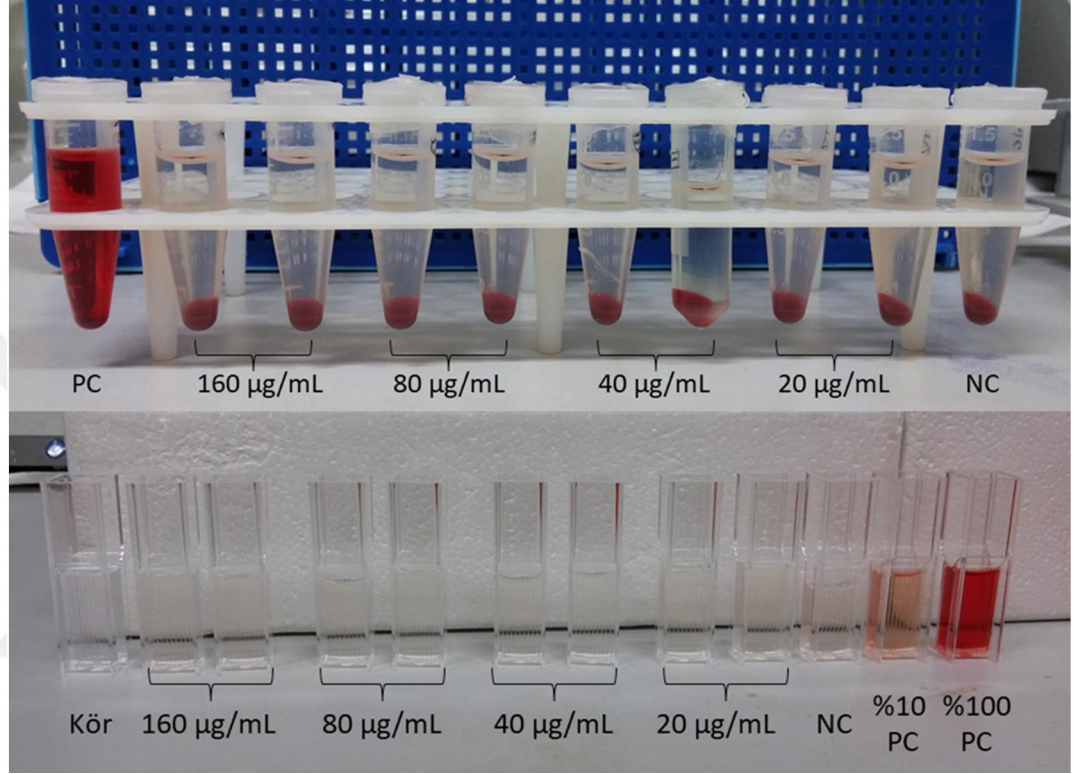
Şekil 3.8 Pozitif kontrol olarak kullanılan farklı Doksorubisin dozları için HEK 293 hücrelerinin zamana bağlı yüzde canlılık değişimi



Şekil 3.9 HEK 293 hücre hattı morfolojik inceleme. Hücre kontrol (üstte). Trp-graft-p(HEMA) uygulama (altta).

3.3.2. Hemoliz testi bulguları

Tavşan kanı eritrositleriyle muamele edilen 160 – 20 $\mu\text{g/mL}$ nanopolimer dozları (Şekil 3.10) için spektrofotometrede ölçülen absorbans ve yüzde hemoliz değerleri Çizelge 3.3'teki gibidir.



Şekil 3.10 Trp-graft-p(HEMA) ile muamele edilmiş tavşan kanı eritrositleri. PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

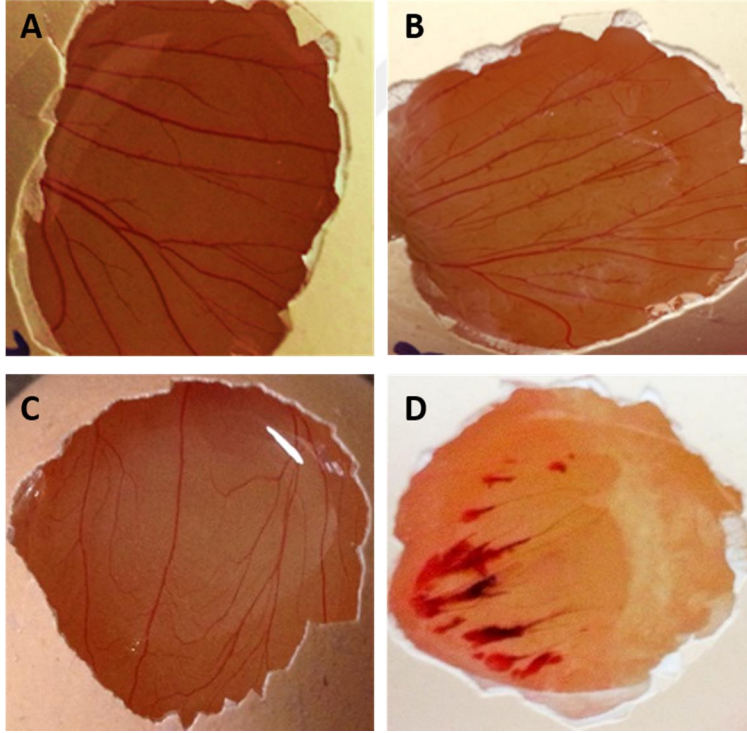
Çizelge 3.3 Hemoliz testi absorbans değerleri ve hemoliz yüzdeleri.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbans	% Hemoliz
160	0.0385	% 0,078
80	0.032	% 0
40	0.033	% 0
20	0.0365	% 0,016
Pozitif Kontrol (PC)	3.252	% 100
%10 Pozitif Kontrol	0.487	% 13,868
Negatif Kontrol (NC)	0.036	% 0

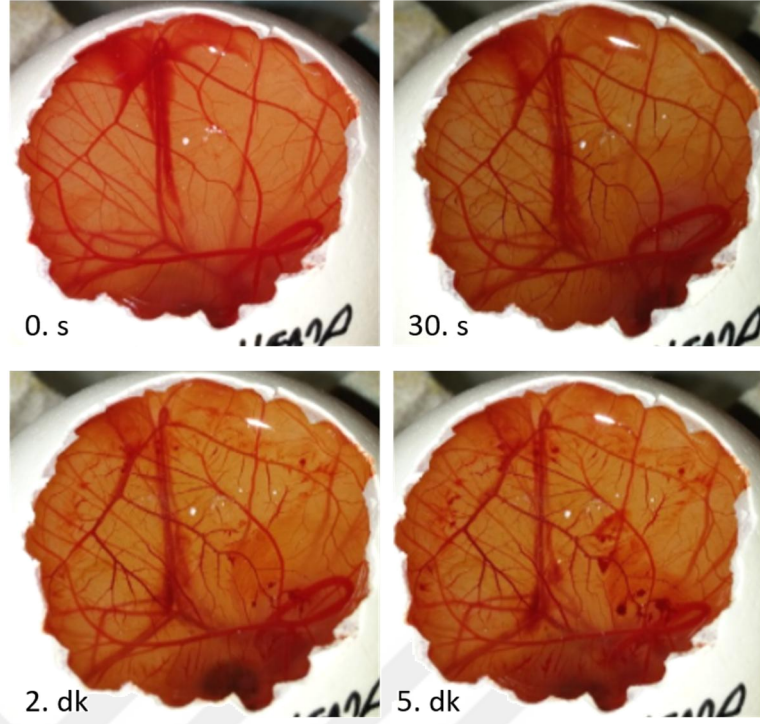
Uygulanan tüm dozlarda hemoliz yüzdesinin %10'dan küçük olmasından dolayı nanopolimer hemolitik özelliğe sahip değildir.

3.3.3. HET-CAM testi bulguları

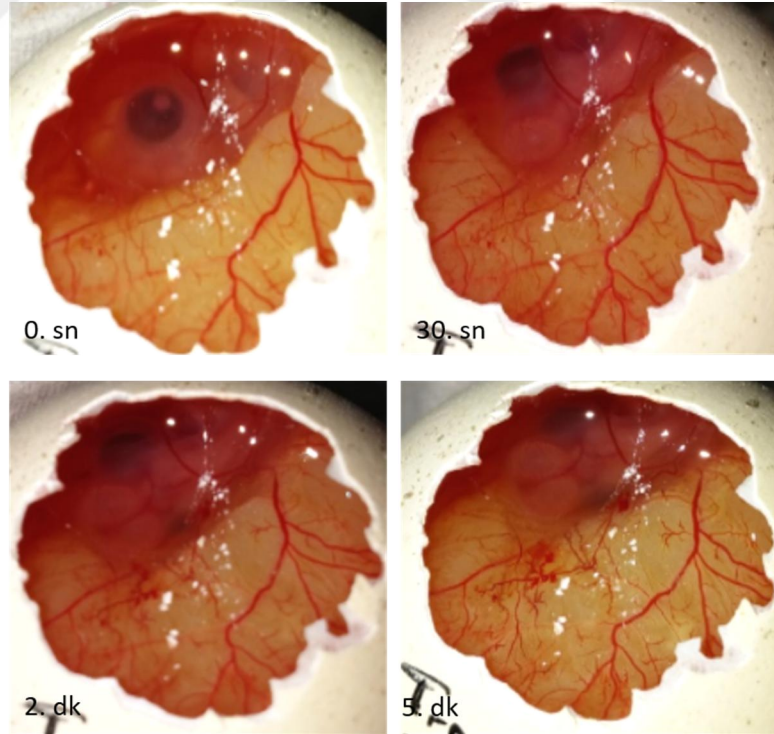
Nanopolimerin *in vitro* antianjiyogenik etkisinin belirlenmesi için HET-CAM testi yapılmış ve hemoraj, vasküler lizis ve koagülasyon kriterleri incelenmiştir ve gerekli hesaplamalar yapılarak skorlama ve antianjiyogenik etkileri Çizelge 3.4'te görülmektedir. Pozitif kontrol olarak NaOH, negatif kontrol olarak ise NaCl kullanılmıştır. Ayrıca, çözügen olarak kullanılan DMSO'nun anjiyogenik etkisi gözlenmemiştir (Şekil 3.11). Beyaz tavuk Leghron yumurtalarına uygulanan üç farklı nanopolimer dozunun (5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1 mg/mL) koryoallantois üzerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te görülmektedir.



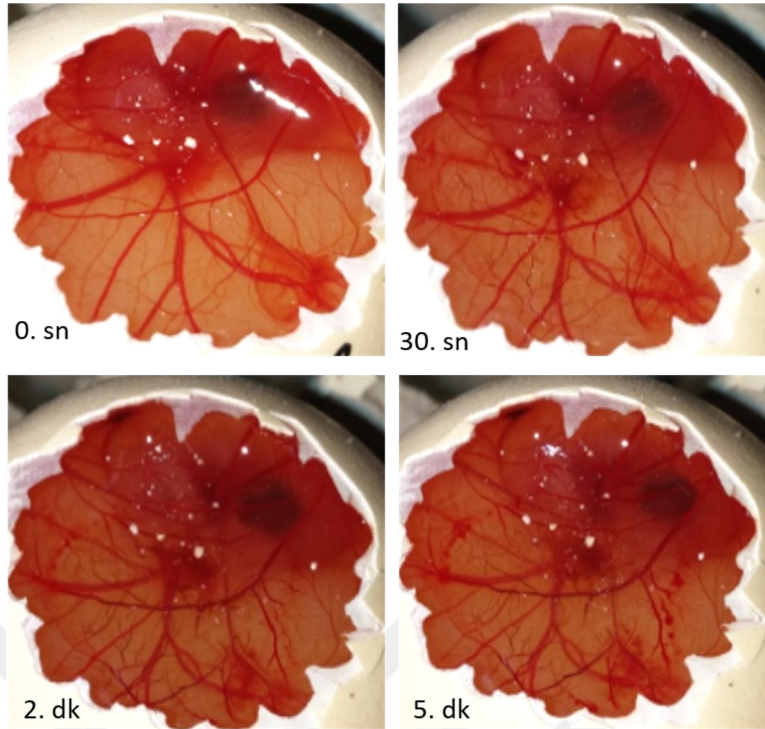
Şekil 3.11 HET-CAM testinde kullanılan negatif ve pozitif kontroller ve çözügen. A: DMSO uygulama öncesi; B: DMSO uygulama sonrası; C: NaCl uygulaması (Negatif kontrol) D: NaOH uygulaması (Pozitif kontrol)



Şekil 3.12 1 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim



Şekil 3.13 2,5 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim



Şekil 3.14 5 mg/mL Trp-graft-p(HEMA) uygulamasıyla koryoallantoik membrandaki zamana bağlı değişim

Çizelge 3.4 Trp-graft-p(HEMA)'nın HET-CAM skorlaması ve etkisi

Konsantrasyon (mg/mL)	Skor	Etki
5	$2,38 \pm 0,1$	Kuvvetli
2,5	$2,21 \pm 0,3$	Kuvvetli
1	$2,6 \pm 0,1$	Kuvvetli
NaOH	$1,89 \pm 0,04$	Kuvvetli
NaCl	$0,01 \pm 0,01$	Yok
DMSO	$0,03 \pm 0,01$	Yok

Çizelge 3.4'te görüldüğü üzere tüm dozlar için skorlar 2'nin üzerinde olup polimerimiz irritasyon göstermektedir, ayrıca antianjiyogenik etkiye sahiptir.

3.3.4. Genotoksisite bulguları (Ames Testi)

Nanopolimerin, *S. typhimurium* suşları üzerine olan revertant koloni sayısı Çizelge 3.5’te görülmektedir.

Çizelge 3.5 Trp-graft-p(HEMA)’nın *Salmonella typhimurium* suşlarında oluşturduğu revertant koloni sayıları

Konsantrasyon (µg/ plate)	Ort. his + revertant / petri (X±SEM)					
	TA 98		TA 100		TA 1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
Distile su	40 ± 3.2	35 ± 4.6	130 ± 28	116 ± 15	19 ± 1	12 ± 6
Trp-graft-p(HEMA) (3000 µg)	269 ± 12*	253 ± 13*	143 ± 15	132 ± 8	104 ± 8*	205 ± 10*
Benzo[a]piren (5 µg)	672 ± 15*	-	764 ± 42*	-	358 ± 24*	446 ± 21*
Sodyum azid (10 µg)	-	935 ± 25*	-	1157 ± 28*	-	-

Nanopolimer, TA 98 ve TA 1535 suşları için referans revertant koloni sayılarını aşmaktadır. TA 100 suşu için belirlenmiş sınırın içindedir.

3.4. *In vivo* Toksisite Bulguları

3.4.1. Tek doz akut toksisite deneme bulguları

Nanopolimerin akut doz toksisite denemesi 2 erkek ve 2 dişi Balb/c albino deney faresi ile gerçekleştirilmiştir. EPA/OECD’nin belirlediği 2000 mg/kg akut doz, hayvan ağırlıklarına göre hesaplanarak 1 erkek ve 1 dişi fareye oral olarak uygulanmıştır. 24 ve 48’inci saatlerde gözlem yapılmıştır. Bu uygulamanın ardından hayvanlar hayatta kalmıştır. Bu nedenle diğer 1 erkek ve 1 dişiye de aynı şekilde uygulama yapılmış ve yine 24 ve 48’inci saatlerde hayvanlar gözlenmiştir. Deney hayvanları uygulamadan sonraki 14 gün boyunca takip edilmiştir. Bu süre zarfında hayvanlarda herhangi bir negatif etki, hastalık belirtisi veya ölüm gözlenmemiştir; hayvanların kendi ağırlıkları, organ ve rölatif organ ağırlıklarında

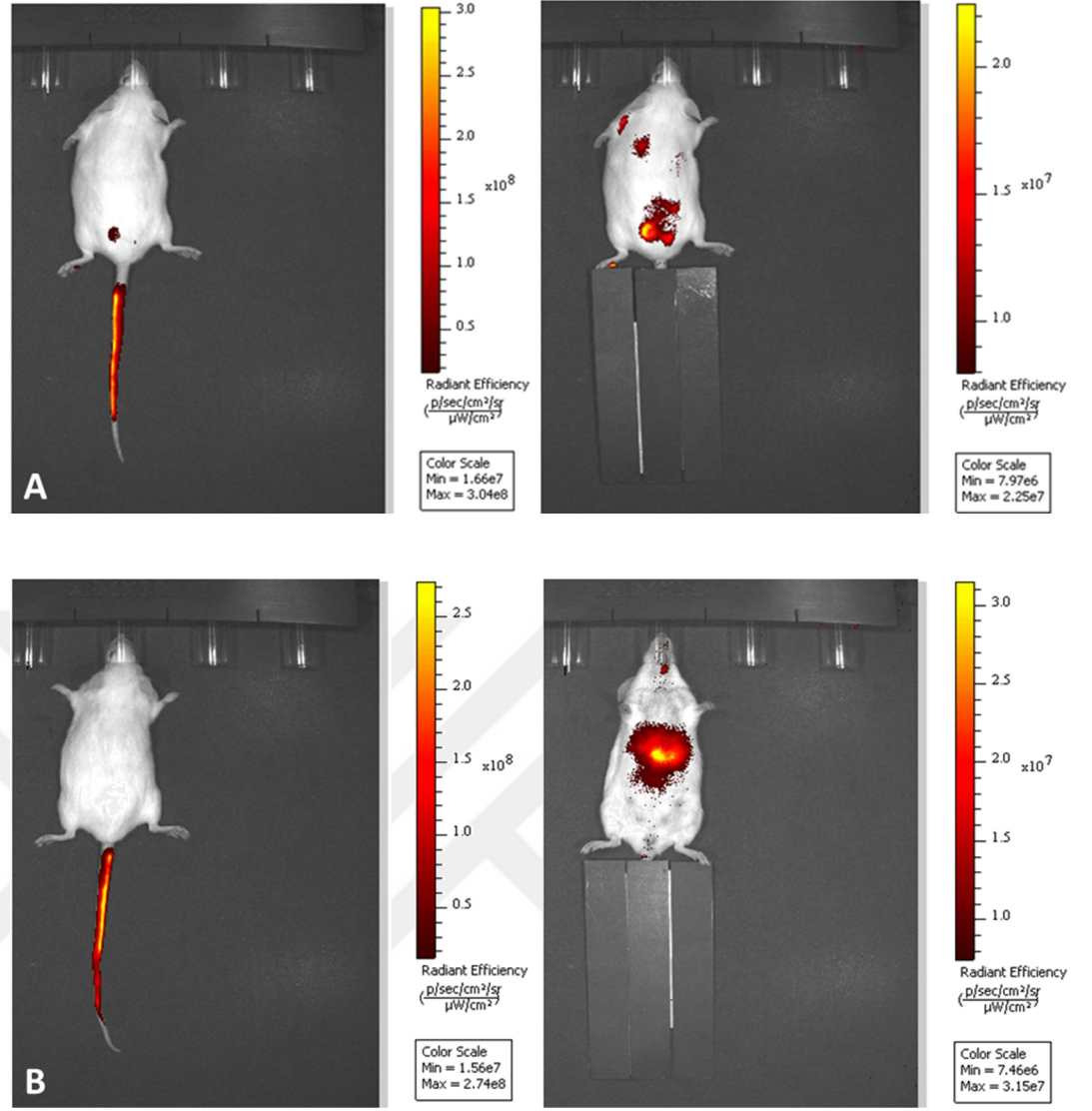
değişim yoktur. Bu gözlemler ışığında, tek doz akut toksisite denemesi ile nanopolimerin akut olarak toksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

3.5. *In vivo* Biyodağılım Bulguları

In vivo biyodağılım çalışması için yüksek konsantrasyonda (33 mg/5 mL) PBS’de (pH 7.4) hazırlanan Trp-graft-p(HEMA)’nın IRDye 800 RS NHS Ester boyasıyla boyanmasına rağmen disperse olmayarak dibe çöktüğü görülmektedir (Şekil 3.15). Bu nedenle farelere yalnızca PBS içerisinde dağıtılan boya uygulaması gerçekleştirilebilmiş ve Şekil 3.16’daki görüntüler elde edilmiştir.



Şekil 3.15 IRDye 800 RS NHS Ester boyanmış Trp-graft-p(HEMA)



Şekil 3.16 Balb/c albino deney farelerinde biyodağılım. A: erkek B: dişi

4. TARTIŞMA

Nanoboyut, malzemelere eşsiz fizikokimyasal özellikler sunmakta, bu özelliklerden faydalanılarak her geçen gün çeşitli nanoteknolojik ürünler geliştirilmektedir. Nanoteknoloji, tarımdan gıda sanayine, mühendislik materyallerinden biyomedikal alanlara kadar geniş bir kullanım spektrumuna sahiptir. Nanoteknoloji ürünü olan nanopartiküller, biyoteknolojik ve biyomedikal alanda; hastalık tanısı, görüntüleme ve tedavisi gibi konularda yoğun olarak çalışılmaktadır (Lopez-Serrano et al., 2014). Polimerler sahip olduğu biyoyumluluk, biyoparçalanabilirlik ve kolay yüzey modifikasyonu özellikleri nedeniyle nanoteknolojide biyomateryal olarak yaygın kullanıma sahiptir (Bennet and Kim, 2014). Hızla gelişen ve yaygın kullanılan nanoteknolojinin olumsuz etkileri üzerine bilim insanları ve halkta çeşitli endişeler mevcuttur. Bu endişelerin giderilmesi ve gerekli yasal düzenlemelerin yapılması adına nanoürünler için çeşitli karakterizasyon işlemleri ve toksisite testleri uygulanmaktadır (Nel et al., 2006).

Bu tez çalışmasının amacı, ilaç taşıyıcı olarak kullanılması planlanan Triptofan-graft-poli(HEMA) polimerik nanopartikülünün [Trp-graft-p(HEMA)] sentezinin gerçekleştirilmesi, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi adına karakterizasyonunun yapılması, olası toksisite potansiyelinin belirlenmesi için *in vitro* ve *in vivo* toksisite çalışmasının yürütülmesi ve nanopolimerin *in vivo*'daki dağılımının belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda sentezlenen nanopartikülün karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve toksisite testleri ile olası toksisite potansiyeli ortaya konmuştur.

Birçok tipte nanopartikül vardır ve tüm nanopartiküller kendine özgü farklı özelliklere sahiptir. Nanopartiküller kullanım amacına yönelik olarak sentezlenebilmektedir. Nanopartiküllerin sentezlenmesinde iki temel yaklaşım görülmektedir, bunlar; büyük boyutlardan nano boyutların eldesi “top-down” ve atomik boyutların birleştirilerek nano boyutların elde edildiği “bottom-up” sentez yöntemleridir. Polimerik nanopartiküllerin sentezinde de bu yaklaşımlar görülmektedir (Bennet and Kim, 2014). Ticari değere sahip, biyoyumlu bir polimer olan HEMA, polimerleşebilen bir monomerdır (Montheard et al., 1992).

Bununla birlikte, p(HEMA) sahip olduğu biyouyumluluk özelliğiyle biyomateryal olarak yaygın kullanıma sahiptir (Atyabi et al., 2008; Chappard et al., 1982; Chappard et al., 1986; Mithila et al., 2013). p(HEMA)'yla ilgili literatürler incelendiğinde doku mühendisliğinde (Slaughter et al., 2009), optik alanda kontakt lens yapımında (Ratner, 2004; Singh et al., 1992) ve dişçilikte adeziv madde olarak (Van Landuyt, 2007) kullanıma sahip olduğu olduğu, ayrıca, karşımıza son yıllarda oftalmik ilaçların (Xinming et al., 2008) ve kanser ilaçlarının taşınım çalışmalarının (Chouhan and Bajpai, 2009; Davaran et al., 2018; Johnson et al., 2012; Kumar et al., 2014a, b; Ma et al., 2012) yürütüldüğü görülmektedir. Bu çalışmada, p(HEMA) polimeriyle, esansiyel amino asit triptofanın (Trp) graflanmasıyla, Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün ilk kez sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Sentez tekniği olarak sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. Literatürde sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon sentez tekniğinin p(HEMA) nanopartikülünün sentezlenmesi için yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Baydemir et al., 2013; Köse and Denizli, 2013; Öztürk et al., 2008; Türkcan et al., 2013). Ayrıca, bu tekniğin p(HEMA) temelli olan nanokürelerin (nanospheres) (Akgöl et al., 2009; Öztürk et al., 2007), nanoboncukların (nanobeads) (Aktaş Uygun et al., 2009) ve nanopolimerlerin (Türkcan Kayhan et al., 2017) sentezinde de kullanıldığı görülmektedir. Öte yandan, p(HEMA) nanopartikülünün sentezinde farklı polimerizasyon teknikleri de karşımıza çıkmaktadır bunlar; radikal polimerizasyon (Atyabi et al., 2008), emülsiyon radikal kopolimerizasyon (Wu et al., 2009) ve modifiye süspansiyon polimerizasyon tekniği (Chouhan and Bajpai, 2009, 2010) gibi tekniklerdir.

Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün eldesi için Trp ile p(HEMA)'nın graflanması Akgöl et al. (2001)'e göre minör modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Bu metot dikkate alınarak 593 mg p(HEMA) polimeriyle 88,95 mg Trp graflama işlemine tutulmuştur. Bu işlemin ardından 485,4 mg Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülü elde edilmiştir. Graflama ürünü ve veriminin hesaplanması Pathania and Sharma (2012)'ye göre gerçekleştirilmiştir. Graflama ürünü % 4,456 olarak bulunurken, graflama verimi % 78,65 olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık, monomer ve başlatıcı konsantrasyonu gibi faktörlerin nanopartiküllerin graflama verimini etkilediği bilinmektedir (Pathania and

Sharma, 2012). Bu nedenle, bu faktörler üzerinde yapılacak değişikliklerle birlikte, ileri çalışmalarda Trp-graft-p(HEMA)'nın graftlama veriminin artırılması sağlanabilir.

Nanoteknolojik ürünlerin üretimi ve kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Vance et al., 2015). Nanoboyutlardaki maddeler ultra küçük boyut, kütesine oranla büyük yüzey alanı ve yüksek reaktivite gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Bu nedenle bulk (normal/büyük) formlarına göre farklı özellikler gösterebilirler, örneğin toksisiteye neden olabilirler (Oberdörster et al., 2005a, b; Zhang et al., 2008). Artan kullanımları ve öngörülemez özellikleri nedeniyle nanoboyuttaki malzemelerin risk değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir (Maynard, 2006a, b; Nel et al., 2006). Bunun için partiküllerin karakterizasyonunun yapılması, *in vitro* ve *in vivo* toksisite çalışmaları yürütülmesi gerekmektedir (Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005a).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemede yani karakterizasyonunda kullanılan geleneksel yöntemler mikroskopi, spektroskopi ve kromatografidir. Bu yöntemler sayesinde partiküllerin fiziksel özellikleri olan boyut, şekil ve agregasyon statüsü hakkında ve kimyasal özellikleri olan çözünübilirlik ve yüzey kaplama gibi özellikleri hakkında bilgi edinilir. Ayrıca bu veriler bize toksisitenin tahmini için fikir sağlamaktadır. Karakterizasyon değerlendirmesi üç başlık altında toplanabilir: primer, sekonder ve tersiyer karakterizasyon. Tersiyer karakterizasyon karmaşık ve anlaması zor olmasına rağmen toksisite yorumlaması için en yol gösterici olanıdır. Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan birçok farklı metot bulunmaktadır (Çizelge 1.3) (Sayes and Warheit, 2009). Karakterizasyonu gerçekleştirmek için birden fazla metot uygulanmalı ve bu metotlar amaca uygun olmalıdır (Fadeel et al., 2015). Çalışmamızda sentezlenen Trp-graft-p(HEMA)'nın karakterizasyonu için FTIR spektroskopisiyle Trp'nin, p(HEMA)'nın ve Trp-graft-p(HEMA)'nın spektrumlar belirlenmiş, nanopolimerin Zeta potansiyeli ve boyut ölçümü gerçekleştirilmiş, SEM ile nanopolimerin üç boyutlu görüntüsü elde edilmiş ayrıca boyutu ölçülmüş ve şişme testi (Swelling Test) ile su tutma kapasitesi belirlenmiştir.

Sentezlenen Trp-graft-p(HEMA)'nın doğru şekilde grafitlanıp grafitlanmadığının belirlenmesi adına Trp, p(HEMA) ve son ürün olduğu düşünülen Trp-graft-p(HEMA)'nın FTIR spektrumları FTIR (Fourier-transform infrared) spektroskopisiyle elde edilip yorumlanmıştır. Şekil 3.3'te görüldüğü üzere p(HEMA) için 3440 cm^{-1} 'de O-H kaynaklı gerilme titreşim bandı ve 1722 cm^{-1} 'de karbonilden (C=O) kaynaklanan güçlü bir titreşim bandı vardır. Bu bantlar p(HEMA) için karakteristiktir (Baydemir et al., 2013; Mithila et al., 2013). 2951 cm^{-1} 'de CH_3 'ten kaynaklanan C-H bandı, 1251 cm^{-1} 'de C-O bant titreşimi, 1143 cm^{-1} 'de C-O-H bandı gözlenmektedir. Trp için 3401 cm^{-1} 'de NH bandı görülmektedir. Bu bant, Wagner and Baran (2004)'te yaptığı çalışmada da bizim sonucumuza paralel olarak oldukça kuvvetli şekilde görülmektedir. Trp-graft-p(HEMA)'nın 3417 cm^{-1} 'de OH ve NH bandı, 2949 cm^{-1} 'de CH_3 bandı, 1718 cm^{-1} 'de bant genişlemiş ve düşük dalga sayısına kaymış, 1251 cm^{-1} 'de C-O artmış, 1150 cm^{-1} 'de C-O-C bantları görülmektedir. Piklerde görülen bu değişimlerle, Trp'nin p(HEMA) ile grafitlandığı açıkça ortaya konulmuştur.

Nanopartiküller kendine ait bir yüzey yüküne sahiptir. Zeta potansiyel ölçümü bu yükün ve özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yaygın bir tekniktir (Chouhan and Bajpai, 2010). Trp-graft-p(HEMA)'nın boyut ve dağılımı Zeta Sizer cihazıyla $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ölçüm alınarak belirlenmiştir. Ortalama partikül boyutu $299,8\text{ nm}$ ve polidispersite değeri (PDI) $0,501$ 'dir. Zeta potansiyel değeri $-19,6\text{ mV}$ olup nanopolimer negatif yüzey yüküne sahiptir. Fizikokimyasal özellikler nanopartiküllerin hücrel alımında ve devamında meydana gelen fizyolojik olaylarda çok önemli rol oynamaktadır. Partikülün boyutunun küçülmesi yüzey alanı artmaktadır. Artan yüzey alanıyla birlikte yüzeyde bulunan atomlar doyurulmamış enerji bağları eğilimi göstermekte ve bu da katalitik aktivitenin artmasına neden olacaktır. Stabilesini sürdürmek isteyen partiküller, diğer moleküllerle etkileşime girme potansiyeli gösterecektir. Bu etkileşimler toksik yanıtın oluşmasına neden olabilir (Lopez-Serrano et al., 2014; Singh et al., 2009). Partikül boyutunun partikülün dağılımını ve giderimini etkilediği bilinmektedir (Owens and Peppas, 2006). Genelde küçük nanopartiküllerin büyük olanlara göre dokularda daha fazla bulunmaktadır. Örneğin, küçük olanlar akciğer, böbrek ve dalakta bulunurken büyük olanlar gastrointestinal yolda daha çok kalmaktadır (Bergin et al., 2015). Nanopartikülün boyutunun küçülmesi ise

akciğer için riskin artması anlamını taşımaktadır (Donaldson et al., 2006; Oberdörster et al., 2005b). Polimerik nanopartiküllerin boyutunun nispeten büyük olması onların toksik reaksiyonlar göstermelerini sınırlandıran bir faktördür. Buna paralel olarak polimerik nanopartikül Trp-graft-p(HEMA)'nın da çok küçük bir boyuta sahip olmaması toksisite beklentisini düşürmektedir. Yüzey yükü nanopartiküllerin hücre alımında önemli rol oynamaktadır. Bilindiği üzere hücre membranı fosfolipitlerden dolayı (-) yüklüdür. Bu nedenle (-) yüklü nanopartiküller (+) yüklü olanlara göre daha hızlı alınmaktadır (Singh et al., 2009). Bunun yanı sıra, yüksüz (nötral) ve (-) yüklü nanopartiküller hücrelerin spesifik olmayan alımlarını azaltmaktadır. Ayrıca, (+) yüklü nanopartiküllerin fagositlerce hızlı alınmasından dolayı kandaki yarıömürlerinin kısa olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, nanopartiküllerin, boyutu ve çekirdek özellikleri de kanda kalım süresini etkilemektedir. (Alexis et al., 2008). Ayrıca, opsonin proteinlerinin, nanopartiküllerin fagositik hücrelerce tanınmasında rol aldığı opsonizasyonda, yüksüz nanopartiküllerin (-) yüklü olanlara göre daha yavaş alındığı tespit edilmiştir (Owens and Peppas, 2006). He et al., (2010), boyut ve yüzey yükünün polimerik nanopartiküllerin hücre alımı ve biyodağılımı üzerine yürüttükleri bir çalışmada, fagositik ve fagositik olmayan hücre hatlarını karşılaştırmışlardır. Nanopartikülün (-) ve (+) yükü ne kadar artarsa makrofaj hücrelerince o kadar çok alındıklarını ve aynı sayısal değere sahip (-) ve (+) yüklü nanopartiküller için (+) olanın daha çok alındığını saptamışlardır. Bununla birlikte daha büyük boyuttaki partiküller de makrofajlarca daha çok alınmaktadır. Fagositik olmayan hücrelerin ise daha küçük boyutlu nanopartikülleri aldıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, polimerik nanopartiküllerin alımının hücre hattına bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak makrofajlarda alımın boyut ve yüke; fagositik olmayan hücrelerdeyse boyut, yük ve nanopartikül kompozisyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, fagositozdaki dominant faktörün yüzey yükü olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Wing and Feng, (2005), antikanser ilaç taşıyıcı olarak kullandıkları polimerik tabanlı bir nanopartikülün, insan kolon adenokarsinoma hücre hattınca (Caco-2) farklı nanopartikül boyutlarının alım hızını karşılaştırdıkları çalışma sonucunda 100-200 nm boyut aralığındaki partiküllerin en iyi alımı gösterdiğini belirtmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak, Trp-graft-p(HEMA)'nın boyutunun ilaç taşıma için ideal olabileceği (SEM'deki ortalama partikül boyutuna göre) ve çok yüksek olmayan

negatif yüzey yükünün fagositik hücrelere yakalanmadan ilacı hedefe taşımak için avantajlı olduğu düşünülmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), maddelerin ve biyolojik örneklerin üç boyutlu yapısını ortaya koyan bir elektron mikroskobu çeşididir (Denk and Horstmann, 2004). Nanopartiküllerin boyut ve dağılımı, yüzey yapısı, yüzey alanı gibi özellikler hakkında bilgi edinmek için yaygın kullanıma sahiptir (Lopez-Serrano et al., 2014; Sayes and Warheit, 2009). Trp-graft-p(HEMA)'nın morfolojisi ve boyutu SEM ile incelenmiştir. Liyofilizasyonla kurutulup sonrasında altın kaplanarak SEM görüntüsü alınan Trp-graft-p(HEMA)'nın, küresel morfolojide ve düzgün yüzeyli olduğu görülmektedir. Boyut dağılımı 128,2 – 198,4 nm arasındaki değişmektedir yani hemen hemen eş boyutlu olduğu söylenebilir (Şekil 3.4). Nanopartikülün ortalama boyutu 164,1 nm'dir. SEM ve Zeta Sizer ile elde edilen Trp-graft-p(HEMA)'daki boyut farklılığının nedeni, zeta ölçümünün sıvı içerisinde gerçekleştirilmesinden dolayı nanopartiküllerin sıvıda agregasyonu olabilir.

Şişme testi (Swelling test), nanopartiküllerin su absorpsiyon kapasitesinin ölçümü için kullanılan bir tekniktir (Bajpai and Saini, 2005). Trp-graft-p(HEMA)'nın şişme özelliği 25 °C'de ve 37 °C'de distile su ve PBS'de (pH 7.4) belirlenmiştir. Nanopartikülün şişme oranı Dai et al., (2007)'ye göre hesaplanmıştır. 25 °C'de nanopartikülün şişme yüzdesi distile suda %79.5 ve PBS'de (pH 7.4) %93.3'tür. 37 °C'de nanopartikülün şişme yüzdesi distile suda %35.7 ve PBS'de (pH 7.4) %42.8'dir. Görüldüğü üzere nanopartikülün şişme miktarı sıcaklık artışıyla birlikte azalmaktadır. Dobić et al., (2012), benzer yürüttükleri bir çalışmada, p(HEMA) temelli bir hidrojelin şişme özelliğini pH 7.4 tamponda farklı sıcaklıklarda incelemiş ve 25 °C'den 37 °C'ye gidildikçe şişme miktarının azaldığını rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada, Gupta et al., (2014), p(HEMA) nanopartikülünün şişme özelliğinin aynı şekilde 25 °C'den 37 °C'ye gidildikçe azaldığını belirtmiştir. Bunun nedenini, artan sıcaklığın su molekülü ve ilişkili olduğu zincirler arasındaki hidrojen bağı kırarak suyu serbest bıraktığını ve böylece su absorplama derecesinin düşmesi olarak yorumlamıştır. Bu özelliğin p(HEMA) temelli manyetik nanokompozit için, aynı sıcaklık artışıyla birlikte arttığını bildirmiştir. Trp-graft-p(HEMA)'nın üç boyutlu yapısındaki p(HEMA)

kaynaklı hidroksil grupları, nanopartikülün su absorpsiyonunu sağlamaktadır. Bu çalışmalara paralel olarak, Trp-graft-p(HEMA)'nın da artan sıcaklıkla beraber su molekülü ve ilişkili olduğu zincirlerdeki kırılan hidrojen bağları sebebiyle şişme miktarının azaldığı düşünülmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda partikülün şişme miktarı üzerine; nanopartikülün kimyasal kompozisyonu (içeriği), fizyolojik sıvılar ve pH'nin de etkili olduğu görülmektedir (Bajpai and Likhitar, 2013; Dai et al., 2007; Gupta et al., 2014; Mahobia et al., 2016; Shu et al., 2009). Bajpai and Likhitar (2013), fizyolojik sıvıların süperparamanyetik nişasta partikülü üzerindeki şişme etkisini incelediği çalışma sonucunda, partikülün PBS'deki (pH 7.4) şişme miktarının distile sudaki şişme miktarına göre daha fazla olduğunu rapor etmiştir. Buna paralel olarak, Trp-graft-p(HEMA)'nın PBS'deki şişme miktarları da distile sudakine göre daha fazladır. Partikülün hidrofilik özelliği arttıkça şişme miktarı da artmaktadır (Mahobia et al., 2016). Su içeriği, sentetik biyomateriyallerin biyoyumluluğuna katkıda bulunan temel faktörlerdendir (Ganji et al., 2010; Gupta and Bajpai, 2011). Polimerik nanopartikülün şişme özellikleri biyomateriyal olarak kullanımını etkilemekte ve bu özelliklerin belirlenmesinin ilaç salınım çalışmaları için yol gösterici olacağı düşünülmektedir (Bajpai and Likhitar, 2013).

In vitro testler, sentezlenen nanopartiküllerin toksisite potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Nanopartikülün *in vitro* ortamdaki olası toksik etkileri belirlenerek *in vivo* ortamda herhangi bir toksik etkiye sebep olup olmayacağının öngörülmesi amacıyla kullanılmaktadır. *In vivo* testler, yüksek maliyetli olup uzun zaman almakta ve testlerde hayvanların kullanılmasından ötürü etik kaygıları beraberinde getirmektedir. Buna karşılık, *in vitro* testler ucuzdur, hızlı sonuç verir, daha az kaynak kullanımı sağlar ve etik kaygılar barındırmamaktadır (Dobrovolskaia and McNeil, 2013). Bu çalışmada, ilk kez sentezlenen Trp-graft-p(HEMA)'nın toksisite potansiyelinin belirlenmesi adına bir dizi *in vitro* test yapılmıştır. Nanopartikülün sitotoksik potansiyeli MTT testiyle ortaya konulmuştur. Tavşan kanı eritrositlerine nanopartikülün uygulanmasıyla gerçekleştirilen hemoliz testiyle nanopartikülün hemolitik aktivitesi belirlenmiştir. Anjiyogenik/antiangiyojenik etkinin belirlenmesi için Leghron beyaz tavuk yumurtalarına HET-CAM Testi uygulanmıştır. Genotoksik

potansiyelinin incelenmesi için *Salmonella typhimurium*'un çeşitli suşlarıyla AMES Testi yapılmıştır.

Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları kolay uygulanabilir olup *in vivo* çalışma sonuçlarıyla korelasyon halindedir. Bu nedenle, hayvan deneylerine alternatif olarak toksikoloji çalışmalarında yaygın kullanıma sahiptir (Riss and Moravec, 2004). Nanotoksisiteyle ilgili kaygıların toplumda artmasından dolayı sitotoksisite çalışmaları artan bir ivmeyle sürdürülmektedir (Singh et al., 2009). Trp-graft-p(HEMA)'nın sitotoksisite potansiyelinin ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi için çeşitli dozlar (100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL) HEK 293 hücre hattına uygulanmış ve hücreler 24, 48 ve 72'nci saatlerde gözlenerek MTT Testi gerçekleştirilmiştir. Bu saatler için hücreler spektrofotometre ile 570 nm dalga boyu altında ölçülerek hücrelerin canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Doz artışına bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdeleri 24. saatten 72. saate gittikçe düşmüştür. Hücre canlılık yüzdesinin en düşük olduğu zaman tüm dozlar için 72. saattir. Trp-graft-p(HEMA)'nın hiçbir dozu için hücrelerin canlılık yüzdesi % 50'nin altına düşmediğinden IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Bu da uygulanan nanopartikülün sitotoksik olmadığı anlamına gelmektedir. Pozitif kontrol olarak uygulanan Doksorubisin'in IC₅₀ değeri 24, 48 ve 72'nci saatler için sırasıyla 21.48, 4.91 ve 0.03 µg'dir. Zhang et al., (2012), biyomedikal uygulamalarda kullanmak için p(HEMA) temelli bir polimer sentezlemiş ve bunun sitotoksisite potansiyelini belirlemek için fare fibroblastik hücre hattı (L929 hücreleri) ile MTT testi uygulamıştır. p(HEMA) ile 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioksepan (BMDO) kopolimerize edilerek sentezlenen poly(BMDO-co-HEMA), L929 hücreleri üzerine 0.01 - 100 mg/mL dozlarında uygulanmıştır. Gerçekleştirilen MTT testi sonucunda en yüksek doz olan 100 mg/mL doza rağmen hücre canlılığının % 80'den fazla olması nedeniyle, sentezledikleri bu biyoyumlu polimerin çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Zhu et al., (2007), p(HEMA)'nın kopolimer olarak kullanıldığı bir çalışmada, MTT testi sonucunda 1.6 g/L dozun HEK 293 hücrelerinin büyümesini etkilemediğini saptamıştır. Sentezledikleri kopolimerin iyi bir ilaç taşıyıcı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalara paralel olarak, ilk kez sentezlediğimiz Trp-graft-p(HEMA) polimerik nanopartikülünün, hücreler üzerinde yüksek yüzdeyle canlılık göstermesinden ötürü önceden planlandığı gibi ilaç taşıyıcı olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Hemoliz testi, kırmızı kan hücreleri olarak da bilinen eritrositlerin, nanopartiküle maruz kalımı sonrasında hemoliz yüzdesinin belirlendiği kolorimetrik bir *in vitro* sitotoksikite testidir (Neun and Dobrovolskaia, 2011). Ekstraselüler hemoglobinin toksik olduğu bilinmektedir (Liptrott et al., 2016). Eğer test maddesi eritrosit membranına hasar verirse, hücrenin hemoglobini plazmaya salınır. Dolayısıyla test maddesinin kan uygunluğu direkt olarak hemolizle ilişkilidir (Gupta et al., 2014). Trp-graft-p(HEMA)'nın hemolitik aktivitesi, Yeni Zelanda Tavşanı'ndan alınan kanın eritrositlerine 160, 80, 40 ve 20 µg/mL doz uygulanan hemoliz testiyle belirlenmiştir. Deney sonunda spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbanslar elde edilmiş ve dozların hemoliz yüzdeleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.3). Değerlendirmeler Fischer et al., (2003)'e göre hemoliz yüzdesinde % 10'un altının hemolitik olmadığı kabul edilerek yapılmıştır. Uygulanan tüm dozlar için absorbans değerleri negatif kontrole çok yakındır. Hemoliz yüzdesinin tüm dozlar için %10'un altında olması Trp-graft-p(HEMA)'nın kan uyumlu bir madde olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin kan uygunluğu, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için önem taşımaktadır (Rejinold et al., 2011). Trp-graft-p(HEMA), hemoliz testi ve MTT testinde sitotoksik aktivite göstermemiştir ve bu nedenle bu sonuçlar birbiriyle örtüşmektedir. Dolayısıyla hemoliz testi sonucu da nanopartikülümüzün ilaç taşıma sistemi için kullanılabileceğini desteklemektedir.

Çeşitli kimyasalların kazara gözle temas etmesi sonucunda gözde hasar veya görme bozuklukları oluşabilir. HET-CAM testi, koryon ve allantoisin birleşiminden oluşan, maddelerin hemoraj, vasküler lizis ve koagülasyon kriterlerini zamana bağımlı şekilde inceleyen, Draize testine alternatif olarak geliştirilmiş *in vitro* göz irritasyon testidir (Araújo et al., 2009). Test, deney maddesinin anjiyogenik etkinliği hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca, bu test basit, hızlı ve ucuzdur (García-Fernández et al., 2013). Değerlendirmede kullanılan skorlamaya göre; 1'in üzerindeki skora sahip maddeler kuvvetli etkinliğe sahip olarak kabul edilmektedir. Trp-graft-p(HEMA)'nın irritasyon potansiyelini ve dolayısıyla anjiyogenik etkinliğini belirlemek için döllenmiş Leghron beyaz tavuk yumurtalarına 5, 2.5 ve 1 mg/mL dozlar uygulanarak HET-CAM testi gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonucunda tüm dozlar için skorlar 2'nin üzerindedir yani Trp-graft-p(HEMA) kuvvetli antianjiyogeniktir. Anjiyogenez,

mevcut olan damarlardan meydana gelen yeni damarların oluşumudur (Al-Husein et al., 2012). Damarlar, sağlıklı hücreler için besin ve oksijen kaynağı olmasına rağmen kanser hücreleri için de bu işlevi görmesi büyük bir risk oluşturmaktadır. Ayrıca, anjiyogenez, kanser hücrelerinin kan damarlarıyla vücudun farklı organlarına yayılmasında yani metastazında rol oynamaktadır (Nishida et al., 2006). Kanser metastazdan sonra tespit edilmesi, başarılı bir tedavi gerçekleştirilmesini zorlaştırmaktadır (Chambers et al., 2002). Yeni damar oluşumunun engellendiği ve/veya mevcut damarların tahrip edilerek tümör hücrelerinin beslenmesinin engellenmeye çalışıldığı antianjiyogenik stratejiler, geleneksel bir tedavi şekli olarak karşımıza çıkmaktadır (Carmeliet and Jain, 2011). Dolayısıyla, HET-CAM testi sonucunda irritasyon gösterdiği tespit edilen Trp-graft-p(HEMA)'nın antianjiyogenik etkinliği dikkate alınarak, özellikle kanser tedavisi için ilaç taşıyıcı rol üstlenebileceği düşünülmektedir.

Nanotoksikoloji literatürü genellikle hücre kültürü sistemleriyle çalışılan sitotoksikite çalışmaları üzerinedir. Son yıllarda nanopartiküllerin toksisitesine dikkat edilmesine rağmen özellikle insan sağlığı üzerine olan genotoksik potansiyelleri gözden kaçmıştır. Birçok nanomateryalin kromozomal fragmentasyon, DNA ipliğinin kırılması, nokta mutasyonu, oksidatif DNA eklentisi ve gen profilinin değişmesi gibi genotoksik yanıtlara neden olduğu bulunmuştur. Nanomateryaller direkt olarak değil, oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı teşvik ederek yani indirekt olarak DNA hasarına neden olur. Ayrıca, nanomateryal hücre içinde akümüle olursa, nükleusa girmeden mitoz bölünmede membran yapısının dağılmasıyla DNA ile etkileşip DNA aberasyonuna neden olabilir (Singh et al., 2009). AMES testi, kimyasal bileşiklerin mutajenik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılan bakteriyel test sistemidir (Mortelmans and Zeiger, 2000). Trp-graft-p(HEMA)'nın genotoksik potansiyelini belirlemek adına 3 mg/mL doz *Salmonella typhimurium*'un TA 98, 100 ve 1535 suşlarına uygulanarak AMES testi yapılmıştır. *In vivo* ortamın aktivasyonunun taklit edilmesi adına S9 fraksiyonları kullanılmıştır. 48 saat sonunda revertant koloniler sayılmıştır. Uygulama sonucunda TA 98 ve TA 1535 suşları için referans revertant koloni sayılarının aşıldığı ama TA 100 suşunda bu sayının belirlenmiş sınırlarda olduğu görülmekte yani 3 mg/mL dozun mutasyona sebep olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç bize Trp-graft-p(HEMA)'nın çerçeve kayması mutasyonu

(TA 98 suşu nedeniyle) ve baz çifti değişimi mutasyonuna (TA 1535 suşu nedeniyle) neden olduğunu göstermektedir. TA 100 suşu da baz çifti değişimi mutasyonunu simgelemektedir ama aynı etkiyi gösteren TA 1535 suşuna göre referans revertant koloni sayısını aşmamaktadır. pKm101 bir çeşit plazmit olup “error-prone” DNA onarım yolu aktivasyonuna ve bu nedenle kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olmaktadır. TA 1535 suşunun pKm101’e sahip olup TA 100 suşunun sahip olmaması nedeniyle, TA 100 suşunun daha yüksek sayıda revertant oluşturması beklenebilirdi. AMES testi, suda çözünmeyen nanopartiküllerin mutajenik potansiyelinin değerlendirilmesi için uygun değildir (Zhao and Castranova, 2011). Trp-graft-p(HEMA) kimyasal yapısı sahip olduğu indol halkası nedeniyle hidrofobik karakterdedir ve bu nedenle suda çözülmemektedir / disperse olmamaktadır. Bu nedenle maddenin genotoksisite potansiyelinin kesin olarak ortaya konabilmesi adına ilave testlerin yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca, literatürde aynı nanomateryaller için farklı sonuçların elde edildiği görülebilmektedir. Örneğin, TiO₂ nanomateryali üzerine yapılan genotoksisite çalışmalarında, Warheit et al., (2007), TiO₂’nin AMES testi ve kromozom aberasyonu testi sonucunun negatif olduğunu belirtirken, Kang et al., (2008), COMET ve mikronükleus testleri sonucunda TiO₂’nin DNA hasarına neden olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle ve AMES testinin hidrofobik nanopartiküllere uygun olmaması sebebiyle, Trp-graft-p(HEMA)’nın genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi için farklı genotoksisite testlerinin uygulanmasının gerektiği düşünülmektedir. Singh et al., (2009), da nanomateryallerin genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesinde tek bir genotoksisite testinin yeterli olmadığını belirtmiştir.

In vitro test ortamları maddelerin olası etkilerini öngörmemiz için veriler sunmakla beraber *in vivo* ortamın kendine özgü farklılıkları bulunmaktadır. Maddeler, canlı vücuduna uygun yol ve dozda alındığında yan etkisini gösterebilmektedir. Hayvanlarda maddenin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım yani ADME olarak adlandırılan süreç bulunmaktadır. ADME sürecinde maddenin biyolojik sistemle olan herhangi bir etkileşimi sonucunda toksik yanıt oluşabilmektedir (Piperigkou et al., 2016). Trp-graft-p(HEMA)’nın *in vivo* toksisite potansiyelinin araştırılması için Balb/c albino farelere tek doz akut toksisite denemesi yapılmıştır. EPA ve OECD tarafından belirlenmiş 2000 mg/kg

olan limit doz oral olarak uygulanmasına rağmen herhangi bir farklılık gözlenmeksizin hayvanlar yaşamlarını sürdürmüştür. Hiçbir ölüm gözlenmemesi sebebiyle maddenin LD₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Bu gözlemler ışığında, tek doz akut toksisitesi denemesi sonucunda, Trp-graft-p(HEMA)'nın Balb/c albino fareler üzerinde akut olarak toksik olmadığı belirlenmiştir. Bazı nanopartiküller vücuttan hızlı bir atılım gösterirken bazılarıysa birikebilmektedir (Hagens et al., 2007). Toksikolojide maddelerin akut olarak ortaya çıkmayan etkileri, uzun vadede birikim sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, akut olarak toksisite göstermeyen Trp-graft-p(HEMA)'nın uzun vadede toksik etki gösterip göstermediği araştırılmalıdır. Bu sayede, nanopartiküllerin akut ve kronik toksisite verileri üzerine boşluklar bulunan bu alana önemli bilgiler kazandırılabilir.

Trp-graft-p(HEMA)'nın canlıdaki dağılımının izlenmesi için biyodağılım çalışması gerçekleştirilmiştir. Nanopolimer PBS (pH 7.4) tamponunda 33 mg/5 mL olacak şekilde ayarlanmış ve IRDye 800 RS NHS Ester ile boyanmıştır. Ancak, nanopolimer, fizikokimyasal özelliklerinden ötürü PBS solüsyonu içerisinde disperse olamamış ve dibe çökmüştür (Şekil 3.15). Sonrasında, nanopolimeri disperse etmek için kuvvetli bir çözücü olduğu bilinen Dimetil Sülfoksit'in (DMSO) farklı yüzdeleriyle denenmiş ancak biyodağılım çalışmasında hayvanlara uygulamanın intravenöz yolla gerçekleştirilmesi gerektiği ve DMSO'nun yüksek yüzdesinin hayvanlar için toksik etki oluşturma riski taşımasından dolayı uygulama yapılamamıştır. 1 erkek ve 1 dişi Balb/c albino deney faresine PBS'de çözölmüş boya intravenöz olarak uygulanmıştır (Şekil 3.16). Sitotoksik ve hemolitik aktivitesinin bulunmadığı tespit edilmiş olan Trp-graft-p(HEMA)'nın ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilmesi adına disperse olma sorununun sentez ve/veya graftlama prosedüründe modifikasyonlara gidilmesi bu sorun için bir çözüm olabilir.

5. SONUÇ

Araştırmalar sonucu literatürde olmadığını tespit edilen, ilaç taşıyıcı olarak kullanılması planlanan Triptofan-graft-poli(HEMA) polimerik nanopartikülü [Trp-graft-p(HEMA)], sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon tekniğiyle, ilk kez, tarafımızca sentezlenmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon işlemleri; Fourier-transform infrared (FTIR) spektroskopisi ölçümü, Zeta potansiyeli ve boyut analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü ve şişme testi (swelling test) analizleriyle nanopartikülün fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* toksisite testleri sonucunda nanopartikülün sitotoksik ve hemolitik aktivitesinin olmadığı ama irritasyon gösterdiği, bunun yanı sıra antianjiyogenik özelliğinden yararlanılarak özellikle kanser ilaçlarının taşınımında kullanılabileceği saptanmıştır. Genotoksik potansiyelinin ortaya konabilmesi için maddenin COMET assay gibi farklı genotoksisite testleri ile araştırılmasının gerektiği belirlenmiştir. Trp-graft-p(HEMA)'nın Balb/c albino deney faresine oral yolla uygulanması sonucunda tek doz akut toksik etkisinin bulunmadığı açıkça ortaya konmuştur. Biyodağılım çalışması Trp-graft-p(HEMA)'nın fizikokimyasal karakterinin disperse olmasını engellemesinden dolayı gerçekleştirilememiştir.

Bu bilgiler ışığında, tarafımızca sentezlenen Trp-graft-p(HEMA)'nın disperse olma sorunu aşılsa ilaç taşıyıcı olarak kullanılma potansiyeli taşıdığı ortaya konmuştur. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının, nanomateryallerin toksisitesine yönelik kapsamlı çalışma bulunmayan ülkemizde, ileriye yönelik yapılacak birçok çalışmaya referans olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akgöl, S., Kaçar, Y., Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A. and Arica, M.Y.,** 2001, Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional pHEMA based membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 15:197-206.
- Akgöl, S., Öztürk, N. and Denizli, A.,** 2009, New generation polymeric nanospheres for catalase immobilization, *Journal of Applied Polymer Science*, 114: 962-970.
- Aktaş Uygun, D., Alev Karagözler, A., Akgöl, S. and Denizli, A.,** 2009, Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation, *Materials Science and Engineering C*, 29: 2165–2173.
- Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D.L. and Somanath, P.R.,** 2012, Antiangiogenic therapy for cancer: an update, *Pharmacotherapy*, 32: 1095-1111 pp.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K. and Farokhzad, O.C.,** 2008, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):505-515.
- Araújo, J., Vega, E., Lopes, C., Egea, M.A., Garcia, M.L. and Souto, E.B.,** 2009, Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72:48–56.
- Atyabi, F., Moghaddam, F.A., Dinarvand, R., Zohuriaan-Mehr, M.J. and Ponchel, G.,** 2008, Thiolated chitosan coated poly hydroxyethyl methacrylate nanoparticles: Synthesis and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 74:59-67.
- Bajpai, A. and Saini, R.,** 2005, Preparation and characterization of spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)–casein system: water sorption and blood compatibility study, *Polym Int*, 54:796–806.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bajpai, A.K. and Likhitar, S.**, 2013, Investigation of magnetically enhanced swelling behaviour of superparamagnetic starch nanoparticles, *Bull. Mater. Sci.*, 36(1):15-24.
- Baruah, S. and Dutta, J.**, 2009, Nanotechnology applications in pollution sensing and degradation in agriculture: a review, *Environ Chem Lett*, 7: 191–204.
- Baydemir, G., Andaç, M., Derazshamshir, A., Aktaş Uygun, D., Özçalışkan, E., Akgöl, S. and Denizli, A.**, 2013, Synthesis and characterization of amino acid containing Cu(II) chelated nanoparticles for lysozyme adsorption, *Materials Science and Engineering C*, 33:532-536.
- Bennet, D. and Kim, S.**, 2014, Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery, *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, Chapter 8, 257-310.
- Bergin, I.L., Wilding, L.A., Morishita, M., Walacavage, K., Ault, A.P., Axson, J.L., Stark, D.I., Hashway, S.A., Capracotta, S.S., Leroueil, P.R., Maynard, A.D. and Philbert, M.A.**, 2015, Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model, *Nanotoxicology*, Early Online: 1–9.
- Berthomieu, C. and Hienerwadel, R.**, 2009, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynth Res*, 101:157–170.
- Biswas, P. and Wu, C.Y.**, 2005, Nanoparticles and the environment, *Journal of the Air and Waste Management*, 55: 708–746.
- British Standards (BSI).**, 2007, Terminology for nanomaterials. Public Available Specification No. 1362007. London: British Standards Institution, 16 pp.
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J. and Urban, P.L.**, 2009, Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management, *Waste Management*, 29:2587-2595.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bruce, R.D.**, 1985, An Up and Down Procedure for Acute Toxicity Testing, *Fundamental and Applied Toxicology*, 5:151-157.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K.**, 2011, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10: 417-427.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. and MacDonald, I.C.**, 2002, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nature Reviews Cancer*, 2: 563-572.
- Chappard, D., Alexander, C., Palle, S., Montheard, J.P. and Riffat, G.**, 1986, Improved Stability Of A Purified Glycol Methacrylate Preparation: Commen, *STAIN TECHNOL*, 61 (3): 185-186.
- Chappard, D., Laurent, J.L., Camps, M. and Montheard, J.P.**, 1982, A simple and reliable method for purifying glycol methacrylate for histopathological studies, *Acta histochem.*, 71: 95-102.
- Chouhan, R. and Bajpai, A.K.**, 2009, Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 7:5.
- Chouhan, R. and Bajpai, A.K.**, 2010, Release dynamics of ciprofloxacin from swellable nanocarriers of poly(2-hydroxyethyl methacrylate): an in vitro study, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6: 453-462.
- Dai, Z., Yin, J., Yan, S., Cao, T., Ma, J. and Chen, X.**, 2007, Polyelectrolyte complexes based on chitosan and poly(L-glutamic acid), *Polym Int*, 56:1122–1127.
- Davaran, S., Fazeli, H., Ghamkhari, A., Rahimi, F., Molavi, O., Anzabi, M. and Salehi, R.**, 2018, Synthesis and characterization of novel P(HEMA-LAMADQUAT) micelles for co-delivery of methotrexate and Chrysin in combination cancer chemotherapy, *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 29(11):1265–1286.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Denizli, A., Kiremitçi, M. and Pişkin, E.,** 1988, Subcutaneous polymeric matrix system p(HEMA-BGA) for controlled release of an anticancer drug (5,fluorouracil) II. Release Kinetics, *Biomaterials*, 9: 363-366.
- Denk, W. and Horstmann, H.,** 2004, Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure, *PLoS Biol*, 2(11):1900-1909.
- Dixon, M.J. and Mood, A.M.,** 1948, A Method for Obtaining and Analyzing Sensitivity Data, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 43: 109-126.
- Dobić, S.N., Filipović, J.M. and Tomić, S.Lj.,** 2012, Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/poly(ethylene glycol) dimethacrylate) hydrogels, *Chemical Engineering Journal*, 179:372–380.
- Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E.,** 2013, Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines, *Journal of Controlled Release*, 172: 456–466.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. and Alexander, A.,** 2006, Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety, *Toxicological Sciences*, 92(1):5–22.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L, Kreyling, W. and Borm, P.J.A.,** 2004, A new frontier in particle toxicology relevant to both the workplace and general environment and to consumer safety, *Occupational and Environmental Medicine*, 61:727-727.
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W. and Stone, V.,** 2005, Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure, *Particle and Fibre Toxicology*, 2(10): 1-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Draize, J., Woodard, G., Calvery, H.,** 1944, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J Pharm Exp Ther*, 82:377-390.
- Drexler, K.E.,** 1981, Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation, *Proc. Natd Acad. Sci.*, Vol. 78(9):5275-5278.
- Drexler, K.E.,** 2004, Nanotechnology: From Feynman to Funding, *Bulletin of Science, Technology & Society*, 24(1):21-27.
- Duncan, R.,** 2003, The Dawning Era Of Polymer Therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 347-360.
- Duran, N.,** 2008, Use of Nanoparticles in Soil-Water Bioremediation Processes, 5th International Symposium ISMOM 2008 -November 24th- 28th, 2008 - Pucón, Chile.
- E. I. du Pont de Nemours Co.,** 1936a, Process For The Preparation Of Esters Of Unsaturated Acids, United States Patent Office, 2,028,012.
- E. I. du Pont de Nemours Co.,** 1936b, Methacrylate Resins, 28 (10): 1160-1163.
- Fadeel, B., Fornara, A., Toprak, M.S. and Bhattacharya, K.,** 2015, Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468: 498–503.
- Faraji, A.H. and Wipf, P.,** 2009, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 2950–2962.
- Feynman, R.P.,** 1960, There's Plenty of Room at the Bottom, *Engineering and Science*, 22-36p.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. and Kissel, T.,** 2003, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials*, 24:1121–1131.
- Food and Drug Administration (FDA),** 1988, LD50 Test Policy, Federal Register, 53:39650-39651 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foundation, E.E.S.**, 2004, Nanomedicine, An ESF–European Medical Research Councils (EMRC) forward look report, Strasbourg Cedex, France: ESF.
- Freitas, R.A.**, 2005, What Is Nanomedicine?, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 1: 3-9.
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S. and Vasheghani-Farahani, S.**, 2010, Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, Iranian Polymer Journal, 19(5):375-398.
- García-Fernández, M.J., Tabary, N., Martel, B., Cazaux, F., Oliva, A., Taboada, P., Concheiro, A. and Alvarez-Lorenzo, C.**, 2013, Poly-(cyclo)dextrins as ethoxzolamide carriers in ophthalmic solutions and in contact lenses, Carbohydrate Polymers 98: 1343– 1352.
- Giraldo, J.P., Landry, M.P., Faltermeier, S.M., McNicholas, T.P., Iverson, N.M., Boghossian, A.A., Reuel, N.F., Hilmer, A.J., Sen, F., Brew, J.A. and Strano, M.S.**, 2014, Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing, Nature Materials, 13:400-408.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. and Rotello, V.M.**, 2004, Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains, Bioconjugate Chem., 15:897–900.
- Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R.H., Verbavatz, J.M. and Langer, R.**, 1995, The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres, Advanced Drug Delivery Reviews, 64 (2012):316–326.
- Gupta, J.**, 2011, Nanotechnology applications in medicine and dentistry, Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2: 81-88.
- Gupta, M.K. and Bajpai, A.K.**, 2011, Magnetically Guided Release of Ciprofloxacin from Superparamagnetic Polymer Nanocomposites, Journal of Biomaterials Science, 22:893–918.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gupta, M.K., Bajpai, J. and Bajpai, A.K.,** 2014, The biocompatibility and water uptake behavior of superparamagnetic poly(2-Hydroxyethyl methacrylate) – magnetite nanocomposites as possible nanocarriers for magnetically mediated drug delivery system, *J Polym Res*, 21:518.
- Hagens, W.I., Oomen, A.G., De Jong, W.H., Cassee, F.R. and Sips, A.J.A.M.,** 2007, What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49: 217–229.
- Hartmann, E., Chung, R. and Chien, C.P.,** 1971, L-Tryptophane and Sleep, *Psychopharmacologia*, 19:114-127.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. and Yin, C.,** 2010, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials* 31:3657–3666.
- Hochella Jr., M.F., Spencer, M.G. and Jones, K.L.,** 2015, Nanotechnology: nature's gift or scientists' brainchild?, *Environ. Sci.: Nano*, 2: 114-119.
- Hossain, S., Chowdhury, E.H. and Akaike, T.,** 2011, Nanoparticles and toxicity in therapeutic delivery: the ongoing debate, *Therapeutic Delivery*, 2(2): 125–132.
- Jain, K.K.,** 2005a, Role of Nanobiotechnology in Developing Personalized Medicine for Cancer, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(6): 645-650.
- Jain, K.K.,** 2005b, The role of nanobiotechnology in drug discovery, *DDT*, 10(21): 1435-1442.
- Johnson, R.P., Jeong, Y.I., Choi, E., Chung, C.W., Kang, D.H., Oh, S.O., Suh, H. and Kim, I.,** 2012, Biocompatible Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-b-poly(L-histidine) Hybrid Materials for pH-Sensitive Intracellular Anticancer Drug Delivery, *Adv. Funct. Mater.*, 22:1058–1068.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J. and Chung, H.W.,** 2008, Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger p53-Mediated Damage Response in Peripheral Blood Lymphocytes, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:399-405.
- Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R. and Schuster, E.W.,** 2014, Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review, *Crop Protection* 35:64-70.
- Köse, K. and Denizli, A.,** 2013, Poly(hydroxyethyl methacrylate) based magnetic nanoparticles for lysozyme purification from chicken egg white, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 41:13-20.
- Kumar, S.S.D., Mahadevan, S., Vijayaraghavan, R., Mandal, A.B. and MacFarlane, D.R.,** 2014a, Curcumin loaded poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles from gelled ionic liquid –In vitro cytotoxicity and anti-cancer activity in SKOV-3 cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 51:34-44.
- Kumar, S.S.D., Mahesh, A., Mahadevan, S. and Mandal, A.B.,** 2014b, Synthesis and characterization of curcumin loaded polymer/lipid based nanoparticles and evaluation of their antitumor effects on MCF-7 cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840:1913–1922.
- Kumari, A., Yadav, S.K. and Yadav, S.C.,** 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75:1-18.
- Kuzma, J. and Priest, S.,** 2010, Nanotechnology, Risk, and Oversight: Learning Lessons from Related Emerging Technologies ,*Risk Analysis*, 30: 11, 1688-1698.
- Lanone, S. and Boczkowski, J.,** 2006, Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms, *Current Molecular Medicine*, 6:651-663.
- Lide, D.R.,** 2007, *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 88th Edition 2007-2008, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, 3-514 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, G., Zhang, H. and Huang, L.,** 2015, Smart Polymeric Nanoparticles for Cancer Gene Delivery, *Mol. Pharmaceutics*, 12:314-321.
- Lin, Y.S. and Haynes, C.L.,** 2010, Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity, *J. AM. CHEM. SOC.*, 132:4834-4842.
- Liptrott, N., Roesslein, M. and Roesslein, M.,** 2016, Analysis of haemolytic properties of nanoparticles, *EUNCL-ITA-001*.
- Lopez-Serrano, A., Olivas, R.M., Landaluze, J.S. and Camara, C.,** 2014, Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Anal. Methods*, 6:38-56.
- Luepke, N.,** 1985, Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food Chem Toxicol*, 23:287-291.
- Ma, X., Wang, H., Jin, H., Wu, Y. and Liang, X.J.,** 2012, Construction of paclitaxel-loaded poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-g-poly(lactide)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine copolymer nanoparticle delivery system and evolution of its anticancer activity, *International Journal of Nanomedicine* 7:1313-1328.
- Mahobia, S., Bajpai, J. and Bajpai, A.K.,** 2016, An In-vitro Investigation of Swelling Controlled Delivery of Insulin from Egg Albumin Nanocarriers, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4):695-711.
- Malvern Instruments Ltd.,** 2004, Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317 Issue 1.1 Feb. 2004.
- Maron, D.M. and Ames, B.N.,** 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, 113:173-215.
- Masood, F.,** 2016, Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy, *Materials Science and Engineering C*, 60:569-578.
- Maynard, A.D.,** 2006a, Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk, 1-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maynard, A.D.**, 2006b, Safe handling of nanotechnology, *Nature*, 444(16): 267-269.
- McAuliffe, M.E. and Perry, M.J.**, 2007, Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review, *Nanotoxicology*, 1(3):204-210.
- Medina, C., Santos-Martinez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I. and Radomski, M.W.**, 2007, Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, *British Journal of Pharmacology*, 150:552–558.
- Mithila, B.S., Ravikumara, N.R. and Madhusudhan, B.**, 2013, Preparation, Characterization and Toxicity Evaluation of Monodisperse OxytetracyclineLoaded Poly(hydroxyethylmethacrylate) Nanoparticles for Oral Therapy, *J. Bionanosci.*, 7:403–414.
- Moghim, S.M.**, 2006, Recent Developments in Polymeric Nanoparticle Engineering and Their Applications in Experimental and Clinical Oncology, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 6:553-561.
- Montheard, J.P., Chatzopoulos, M. and Chappard, D.**, 1992, 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields, *J.M.S.-REV. MACROMOL. CHEM. PHYS., C*, 32(1): 1-34 .
- Moreno-Vega, A.I., Gomez-Quintero, T., Nunez-Anita, R.E., Acosta-Torres, L.S. and Castano, V.**, 2012, Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications, *Journal of Nanotechnology*, 10p.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E.**, 2000, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research* 455:29-60.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- Mu, L. and Sprando, R.L.**, 2010, Application of Nanotechnology in Cosmetics, *Pharm Res*, 27:1746-1749.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A. and Chen, P.,** 2013, Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 166: 182-194.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N.,** 2006, Toxic Potential of Materials at the Nanolevel, *Science*, 311:622-627.
- Neun, B.W. and Dobrovolskaia, M.A.,** 2011, Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties In Vitro, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology*, Chapter 23, 697:215-224.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M.,** 2006, Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.*, 2:213-219 pp.
- Nowack, B. and Bucheli, T.D.,** 2007, Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150:5-22.
- Oberdörster, G., Celein, R.M., Ferin, J. and Weiss, B.,** 1995, Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles?, *Inhalation Toxicology*, 7:111-124.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H. and A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group,** 2005a, Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Particle and Fibre Toxicology*, 2(8): 1-35.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J.,** 2005b, Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environmental Health Perspectives*, 113(7):823-839.
- OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals No: 425,** 2008, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), 3 October 2008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Owens, D.E. and Peppas, N.A.,** 2006, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307:93-102.
- Öztürk, N., Akgöl, S., Arısoy, M. and Denizli, A.,** 2007, Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres, *Separation and Purification Technology*, 58:83-90.
- Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S. and Denizli, A.,** 2008, High capacity binding of antibodies by poly(hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67:14-19.
- Parnham, M.J. and Wetzig, H.,** 1993, Toxicity screening of liposomes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 64:263-274.
- Pathania, D. and Sharma, R.,** 2012, Synthesis and characterization of graft copolymers of methacrylic acid onto gelatinized potato starch using chromic acid initiator in presence of air, *Adv. Mat. Lett.* 3(2):136-142.
- Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A.B., Gialeli, C., Docea, A.O., Vynios, D.H., Pavao, S.G., Golokhvast, K.S., Shtilman, M.I., Argiris, A., Shishatskaya, E. and Tsatsakis, A.M.,** 2016, Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: From agriculture and food sector to cancer therapeutics, *Food and Chemical Toxicology*, 91:42-57.
- Pridgen, E.M., Langer, R. and Farokhzad, O.C.,** 2007, Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery system for cancer therapy, *Nanomedicine*, 2(5):669-680.
- Qi, M., Liu, Y. and Li, T.,** 2013, Nano-TiO₂ Improve the Photosynthesis of Tomato Leaves under Mild Heat Stress, *Biol Trace Elem Res*, 156: 323-328.
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. and Lemons, J. E.,** 2004, Classes of Materials Used in Medicine, *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd Edition, Elsevier Academic Press, Chapter 2, 78p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rejinold, N.S., Muthunarayanan, M., Divyarani, V.V., Sreerekha, P.R., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H. and Jayakumar, R.,** 2011, Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery, *Journal of Colloid and Interface Science* 360: 39–51.
- Reynolds, R.E.F. and Prasad, A.B.,** 1982a, Martindale: the extra pharmacopoeia, 28th ed. London, The Pharmaceutical Press, 61 p.
- Reynolds, R.E.F. and Prasad, A.B.,** 1982b, Martindale: the extra pharmacopoeia, 28th ed. London, The Pharmaceutical Press, 62 p.
- Riss, T.L. and Moravec, R.A.,** 2004, Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effect of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays, *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(1):51-62.
- Sanchez, F. and Sobolev, K.,** 2010, Nanotechnology in concrete – A review, *Construction and Building Materials*, 24:2060-2071.
- Savage, N. and Diallo, M.S.,** 2005, Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges, *Journal of Nanoparticle Research*, 7:331–342.
- Savolainen, K., Pyllkkänen, L., Norppa, H., Falck, G., Lindberg, H., Tuomi, T., Vippola, M., Alenius, H., Hämeri, K., Koivisto, J., Brouwer, D., Mark, D., Bard, D., Berges, M., Jankowska, E., Posniak, M., Farmer, P., Singh, R., Krombach, F., Bihari, P., Kasper, G. and Brouwer, D.,** 2010, Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health and safety—A review, *Safety science*, 48(8):957-963.
- Sayes, C.M. and Warheit, D.B.,** 2009, Characterization of nanomaterials for toxicity assessment, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 660-670.
- SCENIHR** (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). Opinion on the scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnologies. 29 November 2007. Brussels, Belgium: European Commission; 2007.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shu, S., Zhang, X., Teng, D., Wang, Z. and Li, C.,** 2009, Polyelectrolyte nanoparticles based on water-soluble chitosan–poly (L-aspartic acid)–polyethylene glycol for controlled protein release, *Carbohydrate Research*, 344: 1197–1204.
- Shvedova, A., Castranova, V., Kisin, E., Schwegler-Berry, D., Murray, A., Gandelsman, V., Maynard, A. and Baron, P.,** 2003, Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 66: 1909–1926.
- SIDS Initial Assessment Report For SIAM 13,** 2001, 2-Hydroxyethyl methacrylate, 868-77-9, Bern, Switzerland, 6-9 November 2001
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G., Wright, C.J. and Doak, S.H.,** 2009, NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*, 30: 3891-3914.
- Singh, J., Agrawal, K., Ray, A.R., Singhal, J.P., Dada, V.K., Mehta, M.R. and Singh, H,** 1992, Polymeric hydrogels for soft contact lenses, *Journal of Biomedical Materials Research*, 26: 1253-1257.
- Slaughter, B.V., Khurshid, S.S., Fisher, O.Z., Khademhosseini, A. and Peppas, N.A.,** 2009, Hydrogels in Regenerative Medicine, *Adv. Mater.*, 21: 3307–3329.
- Sozer, N. and Kokini, J.L.,** 2009, Nanotechnology and its applications in the food sector, *Trends in Biotechnology*, 27(2):82-89.
- toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+73-22-3**
(Erişim tarihi: 21.05.2018)
- Tungittiplakorn, W., Lion, L.W., Cohen, C. and Kim, J.U.,** 2004, Engineered Polymeric Nanoparticles for Soil Remediation, *Environ. Sci. Technol.* 38: 1605-1610.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Türkcan, C., Akgöl, S. and Denizli, A.,** 2013, Silanized polymeric nanoparticles for DNA isolation, *Materials Science and Engineering C* 33: 4498–4503.
- Türkcan Kayhan, C., Ural, F.Z., Koruyucu, M., Gül Salman, Y., Uygun, M., Aktaş Uygun, D., Akgöl, S. and Denizli, A.,** 2017, DNA isolation by galacteoacrylate-based nanopoly(HEMA-co-Gal-OPA) nanopolymers, *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 2017, 28 (14): 1469–1479.
- Van Landuyt, K.L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P. and Van Meerbeek, B.,** 2007, Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives, *Biomaterials*, 28:3757-85p.
- Wagner, C.C. and Baran, E.J.,** 2004, Spectroscopic and Magnetic Behaviour of the Copper (II) Complex of L-Tryptophan, *Acta Farm. Bonaerense* 23(3): 339-42.
- Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L. and Sayes, C.M.,** 2007, Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management, *Toxicology Letters*, 171: 99–110.
- Wichterle, O. and Lim, D.,** 1960, Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature*, 185: 117-118.
- Win, K.Y. and Feng, S.S.,** 2005, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26: 2713–2722.
- Wu, X., Griffin, P., Price, G.J. and Guy, R.H.,** 2009, Preparation and in Vitro Evaluation of Topical Formulations Based on Polystyrene-poly-2-hydroxyl Methacrylate Nanoparticles, *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, 6 (5): 1449–1456.
- www.drugbank.ca/drugs/DB00150** (Erişim tarihi: 21.05.2018)
- www.nano.gov** (Erişim tarihi: 21.05.2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xinming, L., Yingde, C., Lloyd, A.W., Mikhalovsky, S.W., Sandeman, S.R., Howel, C.A. and Liewen, L.,** 2008, Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review, *Contact Lens & Anterior Eye* 31: 57-64.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella Jr, M.F., Rejeski, D. and Hull M.S.,** 2015, Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer productsinventory, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6: 1769-1780.
- Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S. and Farokhzad, O.C.,** 2008, Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(5):761-769.
- Zhang, Y., Chu, D., Zheng, M., Kissel, T. and Agarwal, S.,** 2012, Biocompatible and degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based polymers for biomedical applications, *Polym. Chem.*, 3: 2752–2759.
- Zhao, J. and Castranova, V.,** 2011, Toxicology of Nanomaterials Used in Nanomedicine, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14: 593–632.
- Zhu, J.L., Zhang, X.Z., Cheng, H., Li, Y.Y., Cheng, S.X. and Zhuo, R.X.,** 2007, Synthesis and Characterization of Well-Defined, Amphiphilic Poly(N-isopropylacrylamide)-b-[2-hydroxyethyl methacrylate-poly(ϵ -caprolactone)]_n Graft Copolymers by RAFT Polymerization and Macromonomer Method, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 45: 5354–5364.

ÖZGEÇMİŞ

Ad: Cem

Soyad: GÜLER

Doğum Yeri: İzmir

Doğum Tarihi: 01.01.1992

e-posta adresi: gulercem35@gmail.com

Cep telefonu: 0506 056 21 26

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2015-2018)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2010-2015)

Lise: Konak Kenan Evren Anadolu Lisesi (2006-2010)

Staj

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Omurgasız Hayvanlar Moleküler Sistemik Laboratuvarı (2014)

Yabancı Diller

İngilizce (İyi)

Almanca (Başlangıç)

Sertifikalar

Deney hayvanı kullanım sertifikası (2017)

Pedagojik formasyon eğitim sertifikası

Bilgisayar

MS Office

