



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**SİLİSYUM DİOKSİT NANOPARÇACIKLARININ İNSAN
RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE HÜMEYRA KAYNAR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**MERSİN
AĞUSTOS-2021**

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**SİLİSYUM DİOKSİT NANOPARÇACIKLARININ İNSAN
RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE HÜMEYRA KAYNAR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU**

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**MERSİN
AĞUSTOS- 2021**

ÖZET

SİLİSYUM DİOKSİT NANOPARÇACIKLARININ İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nanoparçacıklar sahip oldukları eşsiz fizikokimyasal özellikler nedeniyle başta sağlık olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak nanoparçacıkların giderek artan kullanımları toksisite sorunlarını da beraberinde getirmiştir. Bu çalışmada Silisyum dioksit (SiO_2) nanoparçacıklarının retinal pigment epitel hücreleri üzerine olası toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için insan retinal pigment epitel kültür hücreleri (ARPE 19) kullanıldı. SiO_2 NP'lerinin karakterizasyonu alan emisyon taramalı elektron mikroskop (FE-SEM) ve X ışını kırınım yöntemi (XRD) ile yapıldı. SiO_2 NP'lerinin sitotoksik etkisini belirlemek için 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında SiO_2 NP'leri ARPE 19 hücrelerine uygulanarak xCELLinge hücre analizi sistemiyle hücre indeksi belirlendi. Çıkan sonuçlar doğrultusunda kontrol (SiO_2 eklenmeyen), düşük (50 $\mu\text{g/mL}$), orta (100 $\mu\text{g/mL}$) ve yüksek (150 $\mu\text{g/mL}$) doz olmak üzere toplam 4 grup belirlendi. Her grupta akım sitometri yöntemiyle apoptotik aktivite, oksidatif stres göstergesi olan katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) seviyesi ölçüldü. Tüm hücre patch clamp tekniği kullanılarak kullanılarak transient reseptör potansiyel (TRP) kanal kaydedildi. SiO_2 nanoparçacıklarının hücre döngüsündeki etkisini belirlemek için akım sitometrik hücre döngüsü analizi, hücre içi Ca^{+2} derişimini belirlemek için de Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop kullanıldı. SiO_2 NP'lerinin ARPE 19 hücrelerinde hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği, apoptozu indüklediği, G_0 fazında hücre siklusu arrestine yol açtığı gözlemlendi. Hücre içi Ca^{+2} derişimi, CAT, GSH ve SOD düzeylerini azaltırken, MDA düzeyi arttı. ($p < 0.05$). TRP kanal akımlarında ise akım değeri kontrol grubu değerlerine göre önemli oranda azaldı. Ancak doza bağlı bir değişiklik gözlenmedi.

Bu çalışma sonucunda SiO_2 nanoparçacıklarının retinal pigment epitel hücrelerinde doza bağlı sitotoksik etkisinin olduğu ve bu etkinin çeşitli retinal dejenarasyonlara neden olarak yaşam kalitesini olumsuz etkileyebileceği düşünüldü. Ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: nanoparçacık; SiO_2 ; nanotoksosite; retinal pigment epiteli; TRP kanalları; hücre kültürü

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SILICON DIOXIDE NANOPARTICLES ON HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

Nanoparticles are widely used in many fields, especially in health, due to their unique physicochemical properties. However, the increasing use of nanoparticles has brought about toxicity problems. In this study, it was aimed to investigate the possible toxic effects of silicon dioxide (SiO₂) nanoparticles on retinal pigment epithelial cells. Human retinal pigment epithelial culture cells (ARPE 19) were used for this purpose. Characterization of SiO₂ NPs was done by field emission scanning electron microscope (FE-SEM) and X-ray diffraction method (XRD). In order to determine the cytotoxic effect of SiO₂ NPs, SiO₂ NPs at 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 µg/mL concentrations were applied to ARPE 19 cells and the cell index was determined by xCELLInge cell analysis system. In line with the results, a total of 4 groups were determined as control (no SiO₂ added), low (50 µg/mL), medium (100 µg/mL) and high (150 µg/mL) dose. Apoptotic activity, oxidative stress indicator catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH) activities and malondialdehyde (MDA) levels were measured in each group by flow cytometry method. The transient receptor potential (TRP) channel was recorded using the whole-cell patch clamp technique. Flow cytometric cell cycle analysis was used to determine the effect of SiO₂ NPs on the cell cycle, and Confocal Laser Scanning Microscope was used to determine the intracellular Ca²⁺ concentration. It was observed that SiO₂ NPs dose-dependently inhibited cell proliferation in ARPE 19 cells, induced apoptosis, and caused cell cycle arrest in G₀ phase. While intracellular Ca²⁺ concentration decreased CAT, GSH and SOD levels, MDA level increased (p<0.05). In TRP channel flows, the flow value decreased significantly compared to the control group values. However, no dose-related change was observed.

As a result of this study, it was thought that SiO₂ NPs had a dose-dependent cytotoxic effect on retinal pigment epithelial cells and that this effect might adversely affect the quality of life by causing various retinal degenerations. However, more comprehensive studies are needed in this regard.

Keywords: nanoparticles; SiO₂; nanotoxicity; retinal pigment epithelium; TRP channels; cell culture.

Advisor: Prof. Dr. Ulku COMELEKOGLU, Department of Biophysics, University of Mersin, Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim öğretim sürem boyunca bana her aşamada destek olan, yol gösteren, yetiştiren, gösterdiği titizlik ve özverilerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Anabilim dalının değerli hocaları; Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI ve Prof. Dr. Nurten ERDAL'a yüksek lisans eğitimimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmasının hemen hemen her aşamasında büyük katkı sunan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ 'a, Araş. Gör. Deniz KİBAR'a,

İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki çalışmalarda katkılarından dolayı MEİTAM merkez müdürü Prof. Dr. Selma ERAT'a, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma Ve Uygulama Merkezi'nde farklı birimlerden yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Saadet YILDIRIMCAN'a, Öğr. Gör. Seher KURU' ya, Öğr. Gör. Ezgi Şule KARAGÖZ'e ve Dr. Öğr. Gör. Derya YETKİN'e,

Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndan Dr. Öğr. Üyesi Fatma SÖĞÜT'e Tarsus Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndan Dr. Öğr. Üyesi Metin YILDIRIM'a, teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olduklarını hissettiğim Biyofizik Ailem'in bütün doktora ve yüksek lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Attığım her adımda, verdiğim her kararda, arkamda duran maddi manevi destek olan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

A.Hümeýra KAYNAR

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2019-1-TR2-3470

Bu çalışma, ARDEB 1002 Hızlı Destek Projeleri kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No:119S076

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
1. GİRİŞ	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Göz Anatomisi	3
2.2.Retina	3
2.3.Retina Pigment Epiteli	5
2.3.1.Retina Pigment Epitelinin Fizyolojik Fonksiyonları	7
2.3.2.Retina Pigment Epitelinin Pompa Fonksiyonu	8
2.3.3.Retina Pigment Epitelinin Pigmentleri	9
2.3.4.Kan –Retina Bariyeri	9
2.4.Nanoparçacıklar	9
2.4.1. Nanoparçacıkların Genel (Fiziko Kimyasal Özl.) Özellikleri	10
2.4.3.Nanoparçacıkların Tıpta Uygulama Alanları	12
2.4.4.NP'ler ve Toksisiteleri	14
3.MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. SiO ₂ NP'lerin Karakterizasyonu	19
3.1.1.Zeta Potansiyeli	19
3.1.2.FESEM İncelemesi	19
3.1.3.XRD İncelemesi	19
3.2.Hücre Kültürü	20
3.2.1.ARPE 19 Hücre Hattı	20
3.2.2.Medyum Hazırlanması	20
3.2.3.Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması	20
3.3.Sitotoksisite Analizi	21
3.4.Deney Grupları	23
3.5.Apoptoz	23
3.6.Hücre Döngüsü	24
3.7.Biyokimyasal Yöntemler	25
3.7.1.Protein Miktarının Ölçümü (Lowry yöntemi)	25
3.7.2.Malondialdehit Ölçümü	26
3.7.3.Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	27
3.7.4.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü	28
3.7.4.1.Deney Prensipleri:	28
3.7.5.Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	29
3.8. Elektrobiyofiziksel Yöntem	30
Patch Clamp Yöntemiyle TRP Kanal Akımlarının Ölçülmesi	30
3.9.Konfokal Mikroskop Fluo 4-AM ile Hücre İçi Ca ⁺² Derişiminin Ölçülmesi	31
3.10.İstatistiksel Değerlendirme	32
4. BULGULAR	33
4.1. SiO ₂ NP'lerinin Karakterizasyonu	33
4.1.1. Zeta potansiyeli, FE-SEM ve XRD İncelemesi	33

4.2.Sitotoksosite Analiz Sonuçları	36
4.3.Apoptoz (Hücre Yüzeyinde Annexin-V-FITC ile) Sonuçları	37
4.4.Biyokimyasal Yöntemler	40
4.4.1.ARPE 19 Hücreleri Üzerinde SiO ₂ NP'lerinin Etkilerinin Biyokimyasal Değerlendirilmesi	40
4.5.Elektrobiyofiziksel Kayıtlar	43
Patch Clamp Yöntemiyle TRP Kanal Akımlarının Kayıtlanması	43
4.6.Hücre Döngüsü Sonuçları	45
4.6.1. SiO ₂ NP Uygulamasından 24 Saat Sonra Hücre Döngüsü Analizi ile DNA Hasarının Gösterilmesi	45
4.7. Konfokal Mikroskop Fluo 4 AM ile Hücre İçi Ca ⁺² Değişimi Sonuçları	47
5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	49
5.1. Öneriler	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Gözün Anatomik Yapısı [13].	3
Şekil 2.2. Retina Yerleşimi [15].	4
Şekil 2.3. Retina 'da Hücrelerin Yerleşimi [17].	5
Şekil 2.4. RPE Kesiti [15].	5
Şekil 2.5. Retina Pigment Epitelinin Fizyolojik Fonksiyonlarının Bazıları [32].	7
Şekil 2.6. RPE fonksiyonunun Ca^{2+} bağımlı regülasyonu: Transeptilyal taşınmanın düzenlenmesi, salgı ve fagositozun düzenlenmesi [3].	8
Şekil 2.7. Farklı Ca^{2+} iyon kanallarını ve RPE hücrelerinde Ca^{2+} homeostazı [33].	8
Şekil 2.8. Bruch membran ve fotoreseptörler arasında sıvı birikimi [15].	9
Şekil 2.9. Nanometre Boyutundaki Nanoyapılar [41].	10
Şekil 2.10. NP maruziyeti sonrasında Oksidatif stres ve Etkileri [110].	17
Şekil 3.1. Stublar (A), kaplama cihazı (B), FESEM Cihazında SiO_2 NP'lerin Görüntülenmesi (C)	20
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlardaki SiO_2 nanoparçacıklarının E-Plate Üzerine Yerleşimi	22
Şekil 3.3. Kontrol ve SiO_2 konsantrasyonlarına ait gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri. Mor: kontrol, koyu yeşil: kontrol, kırmızı: 1 $\mu g/mL$ SiO_2 , açık yeşil: 5 $\mu g/mL$ SiO_2 , mavi: 10 $\mu g/mL$ SiO_2 , pembe: 25 $\mu g/mL$ SiO_2 , turkuaz: 50 $\mu g/mL$ SiO_2 , mor: 100 $\mu g/mL$ SiO_2 ve turuncu: 150 $\mu g/mL$ SiO_2 yi temsil etmektedir. Hücre çoğalma eğrileri 24 saat boyunca izlenmiş ve tüm SiO_2 konsantrasyonları 24. saatte eklenmiştir.	23
Şekil 3.4. Patch Clamp Düzenegi	30
Şekil 4.1. Zetasizer Ölçüm Sonucu NP Büyüklüğü Diagramı	33
Şekil 4.2. Agromela Olan SiO_2 NP'lerin Boyut Ölçümleri	34
Şekil 4.3. Agromela Olmadan Önceki SiO_2 NP'lerin Boyut Ölçümleri	34
Şekil 4.4. Farklı Büyütme Oranlarıyla SiO_2 NP'lerin FESEM Görüntüleri. (A, B)	35
Şekil 4.5. SiO_2 nanoparçacıklarının kristal yapısının XRD ile analizi. $2\theta=20^\circ$ civarında olması SiO_2 nanoparçacıklarının amorf yapısına işaret etmektedir.	36
Şekil 4.6. SiO_2 NP'lerinin ARPE 19 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik etkisi (A) kontrol, (B) 50 $\mu g/mL$ (C), 100 $\mu g/mL$ ve (D) 150 $\mu g/mL$ SiO_2 NP grubu Q1: Nekrotik hücreler; Q2: Geç apoptoz; Q3: Canlı hücreler; Q4: Erken apoptoz. Şekilden de görüldüğü gibi SiO_2 NP'leri ARPE-19 insan retinal pigment epitel hücrelerinde apoptoza giren hücre oranını arttırmıştır.	37
Şekil 4.7. Akım sitometride Annexin V (+) ve PI (+) boyanan geç apoptoza giren hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Geç apoptoza giren hücre oranı tüm dozlarda kontrole göre artmıştır. Ancak bu artış doza bağlı değildir. (*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).	38
Şekil 4.8. Akım sitometride Annexin V (-) ve PI (-) boyanan canlı hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi canlı hücre oranı SiO_2 konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. (*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$; ^b 50 $\mu g/mL$ grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ ve ^c 100 $\mu g/mL$ ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).	39
Şekil 4.9. Akım sitometride Annexin V (+) ve PI (-) boyanan erken apoptoza giren hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi erken apoptoza giren hücre oranı SiO_2 konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. (*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$. ^b 50 $\mu g/mL$ grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$. ^c 100 $\mu g/mL$ grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).	40
Şekil 4.10. Ortalama CAT Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, c: 100 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, d; 150 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı ($p<0.05$)	41
Şekil 4.11. Ortalama SOD Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, c: 100 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, d; 150 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı ($p<0.05$)	42
Şekil 4.12. Ortalama MDA Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, c: 100 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı, d; 150 $\mu g/mL$ SiO_2 'den farklı ($p<0.05$)	42

Şekil 4.13. Ortalama GSH Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 µg/mL SiO ₂ 'den farklı, c: 100 µg/mL SiO ₂ 'den farklı, d; 150 µg/mL SiO ₂ 'den farklı (p<0.05)	43
Şekil 4.14. Kontrol Grubu İçin TRP Kanal Akım Kayıt Örneği	44
Şekil 4.15. 50 µg/ mL SiO ₂ Grubu için TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek	44
Şekil 4.16. 100 µg/ mL SiO ₂ Grubu için TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek	44
Şekil 4.17. 150 µg/mL SiO ₂ Grubu İçin TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek	45
Şekil 4.18. SiO ₂ uygulandıktan 24 saat sonra akım sitometri ile hücre döngüsü analizi. Şekilde G ₀ , G ₁ , S ve G ₂ hücre döngüsünün fazlarını göstermektedir. (A) kontrol grubu, (B) 50 µg/ mL SiO ₂ , (C) 100 µg/ mL SiO ₂ ve (D) 150 µg/ mL SiO ₂ grubu için hücre döngüsünü temsil etmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi kontrol grubunda hücrelerin büyük çoğunluğu G ₁ fazında iken SiO ₂ uygulanmış hücrelerde hücrelerin en büyük kısmının G ₀ fazındadır. A=Kontrol grubu, B=50 µg/ mL SiO ₂ NP doz grubu, C=100 µg/ mL SiO ₂ NP doz grubu, D=150 µg/ mL SiO ₂ NP doz grubu.	46
Şekil 4.19. Hücre döngüsü G ₀ , G ₁ , S ve G ₂ fazlarındaki ortalama hücre oranı.	47
^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05.	47
Şekil 4.20. Hücre İçi Ca ⁺² Derişiminin Doza Bağlı Değişimi. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli (p<0.05).	48

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Hücre Canlılığının SiO ₂ NP Öncesi ve SiO ₂ NP uygulanmasından 24 Saat Sonraki Değerlerinin Değişimi ^a kontrol grubu ile ^b 50 µg/mL grubuyla karşılaştırıldığında ve ^c 100 µg/mL grubuyla karşılaştırıldığında p<0.05.	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Np'lerin Genel Bazı Özellikler	11
Çizelge 2.2. NP'lerin Uygulama Yolları, Avantajları, Dezavantajları ve Sadece SiO ₂ NP'lerinin Etkilediği Örnekler	12
Çizelge 3.1. SiO ₂ NP'lerin Kataloğ Özellikleri	19
Çizelge 3.2. Protein (Lowry Metodu) Ölçüm Protokolü	25
Çizelge 3.3. Malondialdehit (MDA) Ölçüm Protokolü	26
Çizelge 3.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçüm Protokolü	27
Çizelge 3.5. ARPE 19 Hücre Hattı Üzerindeki SiO ₂ NP'lerinin Fluo 4AM ile Görüntüleme-Zaman Aralıkları	32

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltmalar	Tanım
ARPE 19	:İnsan Retinal Pigment Epiteli Hücre Hattı
°C	:Santigrat
CsCl	:Sezyum Klorür
Ca ⁺²	:Kalsiyum
CaCl ₂	:KalsiyumKlorür
EDTA	:Etilendiamin Tetra Asetik Asit
DMEM - F12	:Dulbecco'nun Modifiye Eagle's Medyum
HEPES	:4-(2-hidroksietil)-1-Piperazinetanesulfonik Asit
ISO	:Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
IC ₅₀	:Verilen Parametrede %50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
mL	:Mililitre
mV	:Milivolt
NaCl	:Sodyum klorür
NP	:Nanopartikül
nm	:Nanometre
ort	:Ortalama
pA	:Pikoamper, 10 ⁻¹² Amper
pH	:Bir Çözeltinin Asitlik ve Bazlık Derecesini Tarif Eden Ölçü Birimi
RPE	:Retina Pigment Epiteli
RTCA	:Realtime Cell Analyzer
Ss	:Standart Sapma
SiO ₂	:Silisyum Dioksit
TRP	:Geçici Reseptör Potansiyeli Kanalları
TiO ₂	:Titanyum Dioksit
ZnO	:Çinko Oksit

1. GİRİŞ

Oküler hastalıklar dünyada canlıları ve yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkileyen ciddi hastalıklar arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2017 yılında dünyada görme bozukluklarının en az 2,2 milyar bireyi etkilediği ve içlerinden yalnızca 1 milyarının engellenebilir görme bozukluğu yada henüz daha ele alınmamış sorunlardan dolayı olumsuz etkilendiğini belirtmiştir [1]. Görme bozukluklarının sebepleri arasında çeşitli genetik faktörler ve çevresel etkilerin yanı sıra toksik maddelere maruziyetler de yer almaktadır. Giderek artan görme bozuklukları göz hastalıklarının tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu yöntemlerden biri de nano tabanlı yöntemlerdir. Yöntemin en önemli parçasından biri; nanopartiküllerin (NP) ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması ve geliştirilmesidir [2].

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) tarafından 1-100 nm aralığındaki boyutlara sahip parçacıklar 'nano' olarak tanımlanmaktadır. NP'ler sahip oldukları özellikler nedeniyle başta tıp, gıda, elektronik, sanayi ve kozmetik olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak NP'ler organizmaya girebilmekte ve istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Literatürde çeşitli NP'lerin farklı doku, organ veya hücrede uygulama miktarı, dozu, etki süresi ve oluşturabileceği toksisite ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Retina pigment epiteli (RPE), fotoreseptör hücreleri ile birlikte koryopakillaris tabakası arasında bulunan, fotoreseptörlerin fonksiyonunu sürdürmesinde yaşamsal dokuyu oluşturan, görme sisteminin bütünlüğünün korunmasında besin kontrolünü (dış kan-retina bariyerinin oluşturulması) sağlar. Büyüme faktörü ve bazı metabolitlerin sentezi, retinal adhezyonun devam ettirilmesi, fagositoz-fotoreseptör atıklarının sindirilmesi, elektriksel homeostazının sağlanması, herhangi bir hasar sonrasında rejenerasyon onarımı gibi çok sayıda önemli görevleri bulunan özelleşmiş hücrelerdir [3]. Fotoreseptörlerle yakın ilişkili olan RPE gözün arka bölümünde bulunan oküler bariyerlerden biridir. Oküler bariyerler sıvıların, partiküllerin ve ilaç moleküllerinin içeri ve dışarı taşınmasında önemli rol oynar. Bu nedenle, uygulanan ilacın, etki sahasına ulaşmadan önce oküler bariyerleri aşması gerekir [4].

Son yıllarda nanoparçacıkların oküler hastalıkların tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar yoğunlaşırken bu NP'ların oluşturabileceği olası toksik etkilere de ilgi artmaktadır. Yapılan bir çalışmada titanyum dioksit NP'lerinin gözde, lens, retina ve RPE'ye zarar verebileceği ve bunun da zaman içinde katarakta veya retinadaki fotoreseptör kaybına yol açabileceği bildirilmiştir [5]. Bir başka çalışmada titanyum bazlı NP'ların nekroz, apoptoz, inflamasyon, oksidatif hasar, reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olduğu rapor edilmiştir [6]. Gümüş NP'ların sitotoksik ve genotoksik etki ile apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyona sebep olduğu, nörotoksik, hepatotoksik etkiler yanı sıra embriyoda morfolojik malformasyon riskinin olabileceği rapor edilmiştir [6]. In vitro çalışmalarda kobalt NP'ların genotoksisite, sitotoksisite, oksidatif hasar ve apoptoza neden olduğu saptanmıştır [6]. Ayrıca

bakır, nikel ve altın gibi farklı NP'ların gözde sitotoksik ve genotoksik etkiler yol açtığı bildirilmiştir [6, 7]. SiO₂ NP'larının gözdeki toksik etkilerine ilişkin ise sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde SiO₂ NP'ların retinal endotelial hücrelerde ve retinal nöral dokuda doğrudan sitotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir [8].

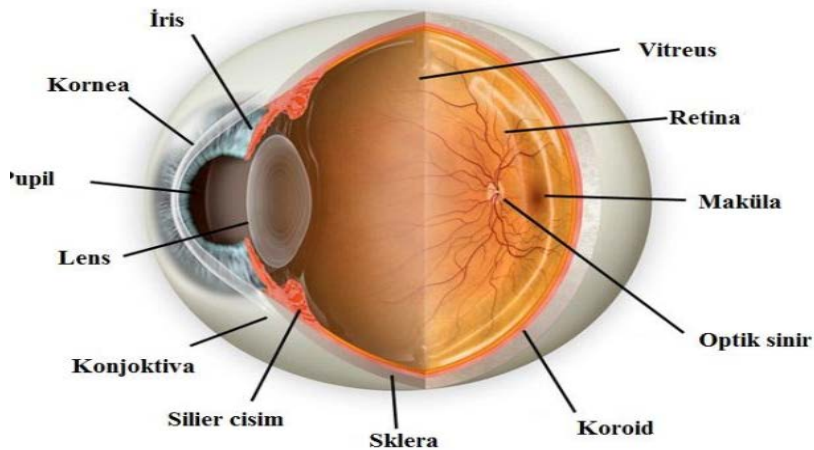
Literatürdeki bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında SiO₂ NP'larının retinal pigment epiteli üzerine etkilerinin elektrobiyofiziksel, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılarak *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın SiO₂ NP'lerinin insan sağlığına ve ekolojik sisteme olumsuz etkilerinin belirlenmesi ve kullanımları sırasında gerekli önlemlerin alınması konusunda yapılacak çalışmalara katkı sunması hedeflenmiştir.

2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Göz Anatomisi

Göz; orbitada yer alan, içi sıvı dolu küre şeklindeki organdır. Işığı kırmaya ve ışığı geçirmeye elverişli 3 tabakanın Tunica Fibrosa (Externa) Bulbi, Tunica Vasculosa (Media) Bulbi ve Tunica Nervosa (İnterna) Bulbi'nin birleşmesinden oluşmaktadır [9]. Duyu organlarımızdan biri olan göz; temel olarak ön ve arka segmentler olmak üzere iki ana parçaya bölünmüştür. Ön segment kornea, göz bebeği, konjonktiva, iris, siliyer cisim, aköz hüner velensten oluşmuştur. Arka segment ise sklera, koroid, retina ve vitröz hüner'dan meydana gelir [4]. Karmaşık, gelişmiş, işlemi çok olmasına rağmen küçük bir bölgeyi kaplayan, tüm canlı türünde bulunan canlılık özelliklerine göre farklılık gösteren (sayı, boyut) vücudun dışında olup biten olayları kavramakla görevli fotosensitif organımızdır. Gelişmiş bir canlı olan insanda 2 adet göz bulunur. Yaklaşık 22-26 mm çapında, ortalama ağırlığı 7,5 g, hacmi ise 6,5 mL'dir. Çeşitli omurgalı türlerinde sayı ve yapısı değişiklik göstermektedir [10]. Dış dünyayı algılamamızda beynin bir uzantısını oluşturan, aynı zamanda beyinden çıkan 12 çift sinir olan Kraniyal sinirden 6'sı (N. Opticus, N. Oculomotorius, N. Trochlearis, N. Abducens, N. Trigemini, N. Olfactorius) gözlerle ilgilidir. Görme yolunda optik sinir aracılığı ile beyindeki görme korteksine iletilen bilgilerin yarısından fazlasını göz oluşturmaktadır [11]. Görme sistemi beynin dışarıdan toplamış olduğu bilgilerin %80'ninin elde edilmesini sağlamaktadır. İnsan gözünde bulunan yaklaşık 100 milyon fotoreseptörün işlevleri ile 1 dakikalık açı (derecenin 1/60'ı) duyarlılığında yön tayini yapabilmektedir [12].

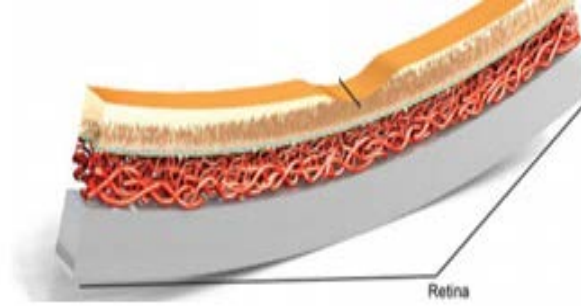


Şekil 2.1. Gözün Anatomik Yapısı [13].

2.2. Retina

Retina, göz küresinin en içteki nöral, duyu ve ışığa en duyarlı sinir liflerinden oluşan tabakasıdır. Gözdeki embriyolojik gelişim sırasında optik vezikülün göze invajinasyonu ile

birlikte oluşan iki katlı tabakadır. Arka kısım fotosensitifken, ön kısım ise corpus ciliare ve iris'in iç yüzünü kapsar. İçte nörosensöryel tabaka, dışta RPE tabakası bulunur. Nörosensöryel tabaka ile RPE arasında anatomik bir yapışıklık yoktur. Bu 2 tabaka arasındaki potansiyel fizyolojik boşluğa, "subretinal alan" olarak tanımlanır. İki tabaka patolojik durumlarda birbirinden koparak, dekolmanlara neden olabilir [14].

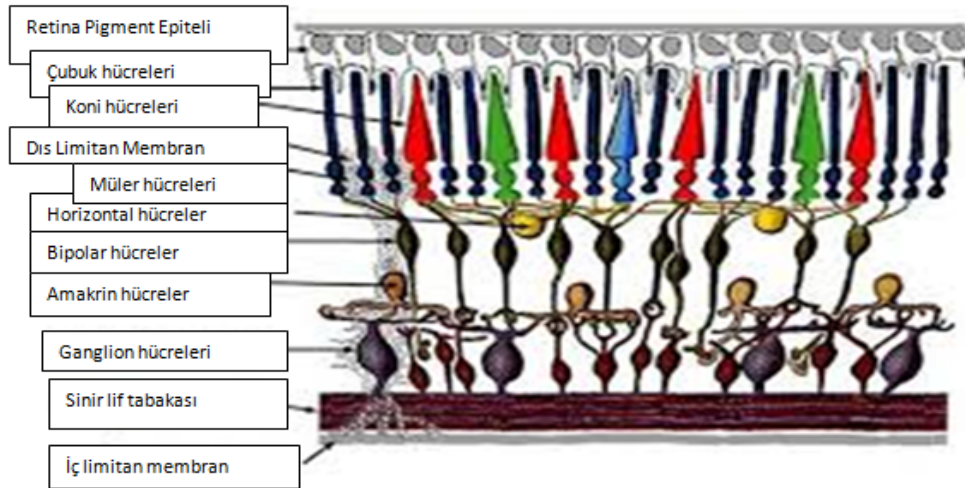


Şekil 2.2. Retina Yerleşimi[15].

Retinanın iç katmanları santral retinal arterden, dış katmanları koroidden beslenir. Vitreus boşluğunu çevreleyen retinanın dışta tek sıralı pigment epitelyum tabakası, içte 9 katmanlı duyu retina (nöral retina) tabakası yer alır.

Bu tabakalar;

1. İç (limitan) sınırlayıcı membran (ganglion hücre aksonları)
2. İç nükleer tabaka (amakrin, horizontal, bipolar ve Müller hücre çekirdekleri)
3. Fotoreseptörler
4. İç pleksiform tabaka (amakrin, bipolar ve ganglion hücreleri sinaptik bağlantıları)
5. Dış (limitan) sınırlayıcı membran (Müller hücrelerinin radyal çıkıntıları ve fotoreseptörler arası zonula adherensler)
6. Dış pleksiform tabaka (bipolar, fotoreseptör ve horizontal hücreleri sinaptik bağlantıları)
7. Ganglion hücre tabakası (ganglion hücre çekirdekleri)
8. Dış nükleer tabaka (fotoreseptör çekirdekleri)
9. Sinir lifi tabakası (ganglion hücre aksonları)
10. RPE tabaka'sıdır [16].

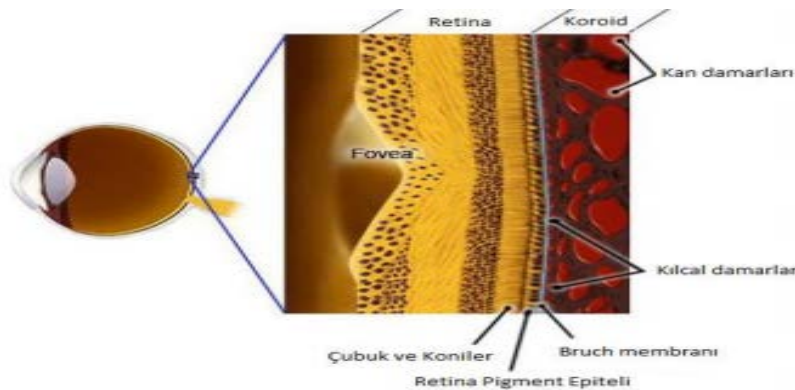


Şekil 2.3. Retina 'da Hücrelerin Yerleşimi [17].

Retinanın iç yüzeyinde görme hücrelerini besleyen damarlar bulunur. Göz iç duvarının arka kısmının yarısını kaplayan ince bir film olan retina, görüntüyü alan ve optik sinir yoluyla beyindeki görsel merkezlere ulaştırmak üzere kodlayan hücreleri barındırır [18]. Retina üzerine düşen ışık, burada fotoreseptör hücrelerinde sinir sinyallerine dönüşür. Bu impulslar nöron zinciri oluşturarak nervus opticus ile beyne iletilir [19].

2.3.Retina Pigment Epiteli

Retinanın son tabakasıdır. RPE nöral retina ile koroid arasında, tek katlı hücre tabakası ve ön segmentinde siliyer epitelin pigmentli yapısı ile devam eder. Dışta choroideanın bruch membranı, içte basil ve koni hücrelerinin uzantıları ile ilişkilidir [20]. Tek sıralı 4-6 milyon hücre içerir, hücreler koroidin bruch membranına bağlı, altıgen şekilli, küboid yapıda melanin pigmenti içeren hücrelerdir.



Şekil 2.4. RPE Kesiti [15].

Hücreler arasında zonula okludens sıkı bağlantıları bulunur. Bu bağlantı ile ışığın koroide geçmesi engellenir. Aynı zamanda su ve iyonların serbest geçişini engellediğinden

dolayı subretinal alana sıvının pompalanması için metabolik enerji kullanılır [21]. Hücrelerin tepe bölümleri zonula okludens ve zonula adherenslerle sıkıca bağlıdır. Retina damarlarıyla birlikte pigment epitelinin kan-retina bariyerinin oluşmasına katkı sağlar. Gövde kısmında lipofusin granülleri bulunmaktadır. Lipofusin granülleri fundus floressein anjiografilerde koroid floresansını engeller [21].

Zengin damar ağları ile RPE; görme sisteminin bütünlüğünü koruma açısından önemlidir.

Retina-RPE bütünlüğünü sağlayan iki faktör vardır.

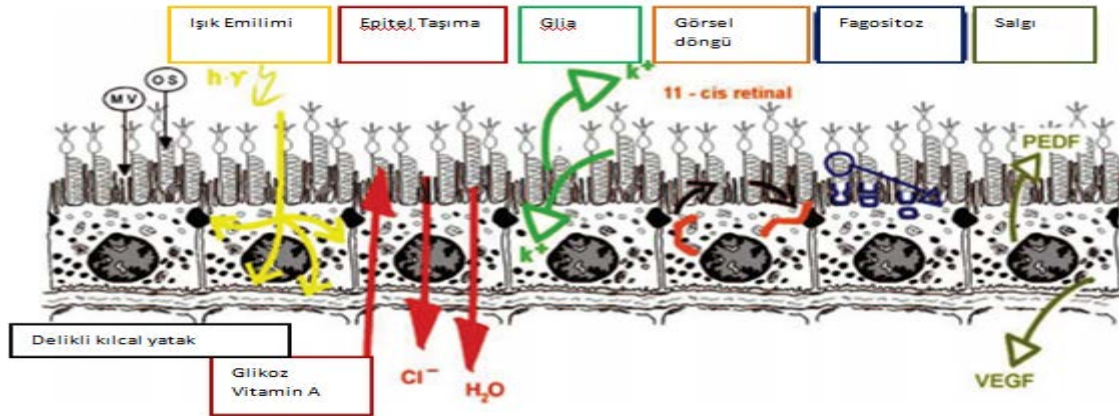
- RPE hücrelerde apikal yüzeyden salınan nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM) ve
- Ekstrasellüler matriks'tir.

Embriyonik gelişim ile RPE'nin kusursuz bir gelişim göstermesi gerekir. RPE hücresi infant gözünde 4.2-6.1 milyon kadar bulunduğu bilinmektedir. Erişkin gözünde RPE içinde mitotik aktivite yer almaz. Yaş arttıkça gözün yüzey alanı artmasına rağmen hücre sayısında büyük bir artma görülmez. Hücre büyüklüğü; 10 µm ile 60 µm arasında değişmektedir. RPE hücreleri makulada (12-18 µm genişliğinde) ince ve (~10-14 µm yüksekliğinde) uzundur. Hücreler yaşlandıkça genişlikleri azalır ve boyları uzar. Perifer retinada ise çift çekirdekli, kısa ve geniştir. RPE hücresinin her biri 30-45 fotoreseptör hücresi ile temas halindedir. Pigment hücrelerinin apikal mikrovillüsleri ve fotoreseptör dış segmentleri arasında gap junctions sıkı kavşak bağlantıları yoktur [22].

RPE hücrelerinin fotoreseptör dış segmentleri ve mikrovillüsleri arasında parmaklı iç içe geçişler ile retinanın RPE ile olan yapışıklığı sağlanırken aktif ve pasif güçler ile bu geçişler devam ettirilir. RPE yaş ağırlığının ~%3'ünü lipitler ile fosfolipitler (%80'inden fazlasını fosfatidilkolin ile fosfatidiletanolamin) oluşturmaktadır. Proteinler RPE'nin %8'i oluşturmaktadır. Proteinlerin içeriğinde plazma membran reseptörleri, hücre iskelet proteinleri ve hidrolitik enzimleri bulunur. RPE içinde protein devir hızı aktiftir. RPE içinde ~850 proteinin bulunduğu bilinmekte ve bunlardan ~200'ü asidik proteindir. Plazma membranlarındaki reseptör proteinleri hücre fonksiyonlarında yer almaktadır. Protein yapısındaki hidrolitik enzimler arasında süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi detoksifiye edici enzimler yer alır [22]. RPE hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, glial hücreler, müller hücreleri ve ganglion hücreleri tarafından üretilir. Hücre migrasyonunu kolaylaştırır, apoptozu inhibe eder, endotel hücrelerinde proliferasyon yapar, koriyokapillaris için bir büyüme faktörü gibi davranarak faktör koroidal endotelial tüp oluşumunun bir bölümünden sorumlu tutulur. RPE ile koriyokapillaris arasında parakrin sinyal ile endotelial fenestrasyonu sağlar [23]. RPE hücreleri hassas fizyolojisi ile retinaya destek oluşturan önemli yapıyı meydana getirmektedir [24].

2.3.1. Retina Pigment Epitelinin Fizyolojik Fonksiyonları

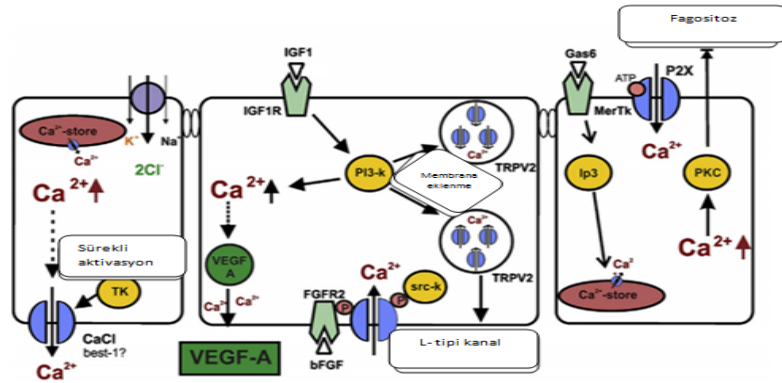
RPE fiziksel, fonksiyonel, dış kan-retina bariyer özellikleri ve optik özelliklerinin yanı sıra birçok metabolik aktivitesi nedeniyle retinanın önemli bir bileşenini oluşturmaktadır [25]. RPE göz gelişimi, gözün fonksiyonu, gözün bakımı ve göz hastalıklarında önemli olan hücre tabakasıdır. Retinanın yapısal bütünlüğü için sitokin ve büyüme faktörünün salınmasında görevlidir. Retinada fotokimyasal oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olur. Subretinal boşlukta su, iyon dengesini ve besinlerin transportunu gerçekleştirir. Atık olan fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozunu sağlar. Dış segmentleri kapsayan mukopolisakkarit matris üretimini gerçekleştirir. RPE hücrelerindeki sınırlı kan akımından dolayı fotoreseptör dış segmentlerinin yıkımı, oksidatif fagositoz ile retinaya düşen ışığın meydana getirdiği hasarda nöral retinanın korunmasını sağlar. Bazal laminanın oluşmasında rol oynar. Lokal immün yanıtın düzenlenmesinden, ısı transferinden ve bağışıklık sisteminde korumadan sorumludur. Retina ve koryopakillarisin yapısal bütünlüğü için sekresyonunu ve görme siklusun temeli olan all-trans retinal 11 cis retinal izomerilasyonunu oluşturur. Işığın emiliminde ve ışığın oluşturduğu oksidasyona karşı savunma ve korunma da görevlidir. Dış kan-retina bariyerlerinden, fotoreseptör işlevlerini desteklemesinden ve vizüel siklus için A vitamininin metabolizmasından sorumludur. RPE'deki melanin ışığı emer ve saçılmayı azaltarak görüş kalitesinin artmasını sağlar. Çoklu fonksiyonları olan önemli kanalları barındırması ve iyonik homeostazıyı korumak gibi pek çok işlevi bulunmaktadır [26, 27, 28, 29, 30, 31].



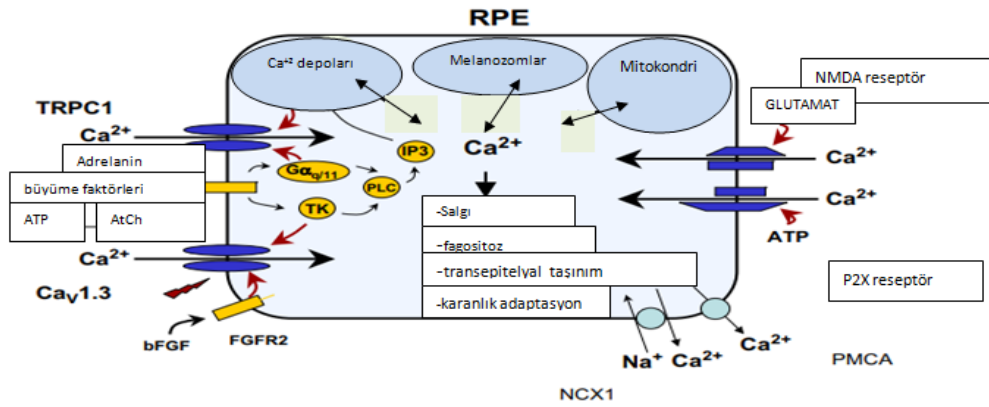
Şekil 2.5. Retina Pigment Epitelinin Fizyolojik Fonksiyonlarının Bazıları [32].

RPE'nde bulunan iyon kanalları ve iyon taşıyıcıları önemli fonksiyonlarda rol oynamaktadır. İyon kanalları RPE'nin farklılaşmasında önemli belirteç olarak yer alırken, iyon taşıyıcıları ise pH ve hacim regülasyonunda, transepitelyal (K⁺ ve Cl⁻ kanalları) iyon akılarının plazma membranı boyunca üretilmesinde, hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde, zarlar arası

potansiyelleri belirleyerek hücre içi serbest Ca^{2+} nin ikincil haberci olarak kullanılmasında itici güçleri oluşturmaktadır [3].



Şekil 2.6. RPE fonksiyonunun Ca^{2+} bağımlı regülasyonu: Transepitelyal taşınmanın düzenlenmesi, salgı ve fagositozun düzenlenmesi [3].

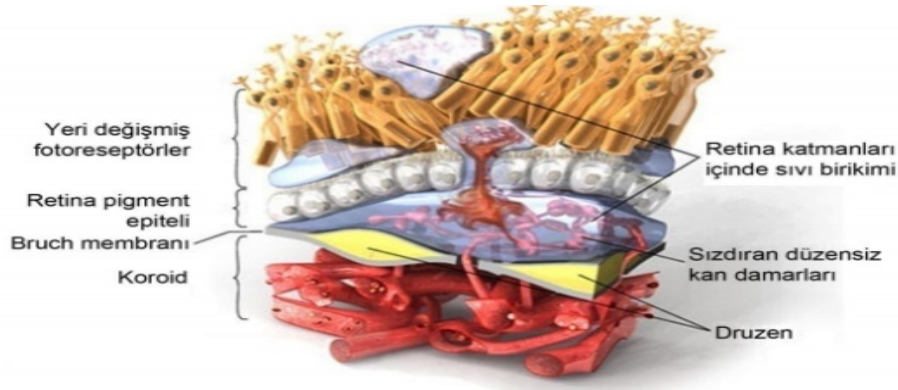


Şekil 2.7. Farklı Ca^{2+} iyon kanallarını ve RPE hücrelerinde Ca^{2+} homeostazı [33].

RPE diğer hücelere göre; 15 mmol/L daha yüksek miktarlarda Ca^{2+} içermekte ve büyük bir miktarı melanozomlarda depolanmaktadır. RPE, Ca^{2+} taşıma proteini ile işlevsellik ve homeostaziyi sağlar. Patch clamp çalışmaları hücre içi serbest Ca^{2+} daki değişimleri, farklı Ca^{2+} kanallarının ekspresyonunu ve RPE hücre fonksiyonunun Ca^{2+} bağımlı regülasyonunu açıklayabilmektedir [33].

2.3.2. Retina Pigment Epitelinin Pompa Fonksiyonu

RPE'nin pompa fonksiyonu RPE hücre duvarında yer alan sodyum-potasyum (N-K) pompası retinanın altında kalan alandan düzenli olarak sıvının dışarı atılmasını sağlayarak, bu alanda sıvı birikimine izin vermez. Hücreler arasında bulunan sıkı bağlantılar sıvı geçişini engeller. Ancak RPE'nin metabolik sağlığı yapışma için önemlidir [34].



Şekil 2.8. Bruch membran ve fotoreseptörler arasında sıvı birikimi [15].

2.3.3. Retina Pigment Epitelinin Pigmentleri

Melanin: Melanozom sitoplazmik granüllerde yer alan pigmenttir. Melanin pigmenti ilerleyen yaş ile lizozomlarla bütünleşerek yıkılır. Melanin pigmenti yayılan ışığı absorbe ederek gözde minimal dağılmasını sağlar. Serbest radikalleri melanin pigmenti stabilize eder. Melanin pigmenti ayrıca toksinleri bağlar.

Lipofuksin: RPE'nde yaşla birlikte yavaş yavaş biriken pigmenttir. Birikim devam ettikçe RPE tabakasının epiteli yıkılabilir. Drusen (RPE'i altında ekstraselüler madde birikimleri), RPE atrofisi, koroidal neovaskülarizasyonlar oluşabilir [29].

2.3.4. Kan -Retina Bariyeri

Kan-retina bariyeri, RPE ile retina kan damarları tarafından oluşmaktadır. Bariyer; endotel hücrelerindeki sıkı bağlantılar ile oluşurken, partiküllerin ve hücre zarından daha büyük moleküllerin (serum proteinleri) geçişini engellemekle görevlidir.

Retinal dokuyu sistemik dolaşımdan farklı tutan bariyerler;

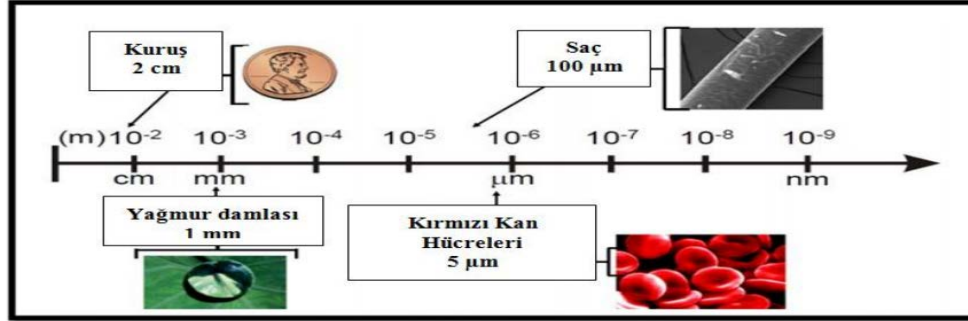
1- Dış bariyer: RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan meydana gelir.

2-İç bariyer: Retinal kapiller içerisinde yer alan endotelial hücrelerindeki sıkı bağlantılar ile oluşur [35].

2.4. Nanoparçacıklar

Nano temeli ilk olarak 1959 yılında fizikçi Richard Feynman ile "Aşağıda bol miktarda yer var" dersi ile ortaya çıkmıştır [36]. 2 önemli problem vardır. Birinci problem bir nanomotor yapımı, ikinci problem ise bir çivinin tepesine bütün Encyclopedia Britannica'yı yazmaya elverecek derecede harflerin küçültülmesidir. Problemler başarılı bir şekilde çözülmüştür [37]. İlk kez nanoteknolojiden Norio Taniguchi (Tokyo Bilim Üniversitesi) 1974 yılında bahsetmiştir [38]. 1981'de Taramalı Tünelleme Mikroskopi (Scanning Tunneling Microscopy) keşfedilmiştir [39]. Mikroskop ile iletken yüzeydeki atomların yerleri değiştirilebiliyordu. 1986'da Nobel Fizik

Ödüllerini Binnig G. ve Rohrer H. 1981'deki buluşlarıyla kazanmışlardır. Aynı yıl karbon nanotüplerin keşfi gerçekleşmiştir. 2000'de ABD'nin nanoteknolojiye ilgisi ile nanoteknoloji çalışmaları başlamıştır [40].



Şekil 2.9. Nanometre Boyutundaki Nanoyapılar [41].

Nano; Yunanca "cüce" ifadesinden türetilmiştir. Bir nanometre, metrenin milyarda birine yani 10⁻⁹'a eşittir [42]. Nano ile gelişen teknoloji aynı zamanda yeni araştırma dalların oluşmasına ve kullanım alanlarının genişlemesine neden olmuştur. Tıp, medikal, ilaç uygulamaları, optik, elektronik, haberleşme, bilgi işlem uygulamaları, çevresel uygulamalar, enerji kaynakları, tarım, tekstil ürünleri, havacılık endüstrisi, dolgu, opaklaştırıcı, katalizör, yarı iletken, mikroelettronik ve son zamanlarda sigara kullananların maruz kaldığı toksik bileşenleri azaltmanın yolu gibi çeşitli kullanım alanları ile yaygınlaşmaktadır [43, 44, 45]. Günlük hayatımızda ise NP'ler kullandığımız tatlandırıcıların, gıda katkı maddelerinin, hazır paket ürünlerinin (hazır çorba, makarna kahve vs.), kir tutmaz ve su geçirmeyen ürünlerin, kirlenmez boyaların, losyonların, güneş kremlerinin içeriğinde bulunmaktadır [46, 47].

2.4.1. Nanoparçacıkların Genel (Fiziko Kimyasal Özl.) Özellikleri

NP'LERİN GENEL ÖZELLİKLER		
ÖZELLİK	ETKİ DURUMLARI	REFERANS
Partikülün Büyüklüğü	Çözünürlük, saydamlık, renk, ışığı soğurma-yayma, kaynama noktası NP'nin büyüklüğü ile ilişkilendirilir.	[48], [49]
Partikülün İçeriği	İçeriklerin farklı olması farklı fiziki ve kimyasal davranışlar oluşturur.	[48]
Yüzey Etkisi	Çözünürlük, katalitik davranışlar, optik özellikler yüzeyin özelliğiyle değişir.	[48], [57]
Boyut	Boyut küçüldükçe yüzey alanı artar, toksik etkileşimlerde önemli özelliktir.	[50]

Yüzey/Kitle Endeksi	Aktif bölgeleri yüzeyleridir. Yüzeyleri yüksek enerjili çekim kuvveti ile kaplıdır. Böyle yüksek yüzey çekim kuvvetine sahip olmaları ya komşu NP'lerle bir araya gelerek yığın oluşturmalarına ya da bulundukları ortamın yüzeyine yapışmalarına neden olmaktadır.	[51]
Reaktivite Artışı	Son derece reaktif maddelerdir. Biyolojik sistem içerisinde yararlı (antioksidan ve farmakolojik ajanları taşıma kapasitesi ve hücrel bariyerden geçebilme yeteneği gibi) biyolojik sistem içerisinde zararlı (toksikite, oksidatif stresin artışı, hücrel yapı ve fonksiyonların bozulması gibi) yönde etki etmesi konusunda aktif rol oynar.	[52]
Şekil	Şekil farklılıkları penetrasyonlarını etkilemektedir.	[50], [57]
Zeta potansiyel (Zp)	Zeta potansiyeli tanecikler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Bir taneciğin dispersiyonda kazandığı net yük ve kararlılıktır.	[50],[51]
Toksik metal grupları olup olmaması	ZnO, TiO ₂ , SiO ₂ gibi toksik metal gruplarını barındırması aktivasyonu etkiler.	[50]
Kimyasal içeriği	NP'lerin başka moleküller ile temaslı yüzeylerinde fonksiyonel grup içerip içermemesidir.	[50]
Yüzeyel yük	NP yükü elektrostatik etkileşim düzeyini oluşturur.	[50], [55]
Enzimatik etki düzeyi	NP'lerin biyomoleküller ile aktivasyonunda enzim aktivite inhibisyonu için gereklidir.	[50]
Hidrofobik olma	NP'ların su ile temasıdır.	[50],[56]
Elektronik Ve Optik Özellikler	Lokalize yüzey plazma rezonansı (LSPR) uyarması, büyük molar uyarma katsayısı rezonansı ile dalga boyu seçiminin absorpsiyonunu oluşturur.	[58]
Mekanik özellikler	NP'lerin belirgin mekanik özellikleri, elastik modül, sertlik, gerilme, yapışma ve sürtünme gibi farklı mekanik parametrelere bağlıdır.	[59]
Termal özellikleri	Metal NP'lerinin katı haldeki akışkanlardan daha yüksek ısı iletkenliğine sahip olması ve ısı transferi partiküllerin yüzeyinde olduğundan, partiküllerin geniş toplam yüzey alanı ve bu toplam yüzey aktif madde de stabilite süspansiyonunu artırır.	[60],[61]
Biyouyumluluk (biyokompatibilite), biyodağılım, biyolojik parçalanma (biyodegradasyonu), inflamasyon gibi özellikler bulunmaktadır [53], [54]		

Çizelge 2.1. Np'lerin Genel Bazı Özellikler

2.4.2. Nanoparçacıkların Vücuda Giriş Yolları

Uygulama Yöntemi	Uygulamanın Avantajları	Uygulamanın Dezavantajları	Literatürden Birkaç Çalışma
Oral	NP alımının invaziv olması	Karaciğerde ilk geçiş potansiyeli olarak hepatotoksik etki Sistemik dolaşıma translokasyon potansiyeli Np alımı için güçlü bir bağırsak mukozası gerektirmesi	SiO ₂ NP'lerin oral uygulanması ile gözenekli ve küçük boyutlu mikro yapıya sahip olmaları ve yüzeyleri üzerindeki insülini kolayca emebilir ve ilgili kanallara insülin yükleyebilirler [62].
Pulmoner	NP alımının invaziv olması Geniş yüzey alanına sahip olması Bölgesel etki oluşturmaması Karaciğer ilk geçiş metabolizmasının önlenmesi	Bölgesel toksisite Sistemik dolaşıma translokasyon potansiyeli	Silika parçacıkları solunduğunda, alveoler makrofajlar ile fagositoz yapıldıktan sonra, ROS üretimi ile karakterize edilen bir enflamatuvar süreci sonra tetikleyebilecekleri alt solunum sistemine ve gaz değişim bölgelerine ulaşabilirler. ROS tarafından oluşturulan iltihap pulmoner parankimaya zarar verir daha sonraki onarım/rejenerasyon süreci fibrojenez ve karsinogeneze yol açmıştır [63].
Transdermal	Np alımının invaziv olması Geniş yüzey alanına sahip olması Bölgesel etki oluşturmaması	Bölgesel tahriş Sistemik dolaşıma translokasyon potansiyeli	SiO ₂ NP'lerinin trans dermal uygulamasında alanin aminotransferaz seviyeleri azalmış, nekropsi analizlerinde renk değişimleri oluşmuş, NP birikmesi olmamış ve çok büyük doku bozulmasına neden olmayarak ciddi hasara sebep olmamıştır [64].
İntravenöz	Np sistemik teslimi Sistemik eylem	Sistemik toksisite Karaciğerde ilk geçiş potansiyeli olarak hepatotoksik etki	SiO ₂ NP'lerinin intravenöz uygulamasında kanda lenfosit, monosit, nötrofil hücre sayıları artmış, karaciğerde ROD, GSH, SOD analiz sonuçları artmış KC hiperplazi, karaciğer enflamasyonu gözlenmiştir [65].

Çizelge 2.2. NP'lerin Uygulama Yolları, Avantajları, Dezavantajları ve Sadece SiO₂ NP'lerinin Etkilediği Örnekler

2.4.3. Nanoparçacıkların Tıpta Uygulama Alanları

Son yıllarda NP'ler çeşitli tıbbi uygulamalarda en sık kullanılan nanomalzemelerden biri olup; kanser terapisi [66] lösemi hücreleri için biyobelirteçler [67] DNA dağıtımı [68] biyoloji ve tıbbi uygulamalar [69] ve ilaç dağıtımı [70] ile birlikte tıpta kullanımı her geçen gün hızla artmaktadır [66]. Nanotani, Nanoteknoloji Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler, Rejeneratif Tıp Uygulamaları, Transplantasyon Tıbbi, Nanorobotik Uygulamalar, Implantlar, Minimum İnvaziv Ameliyatlara Yönelik Kateterler olmak üzere kullanımı alanı genişlemektedir [71]. Kanser çalışmalarında; NP'ler intravenöz uygulama ile fagositik sistem hücreleri olan "RES" tarafından

tutulurlar, ilgili organ yada dokuya dağılım gösterirler, tümörlü bölgede birikerek antitümöral ilaçların uygulamasında önemli rol oynarlar. Uzun süreli ilaç tutulumu nedeniyle toksisitesi söz konusudur. Tanı çalışmalarında; nükleer tıpta radyoizotopların taşıyıcısı olarak, koloidal sistemlerde işaretleyici olarak kullanılırken doku veya organda birikme oluşturabilir. Aşı ve enzimlere yardımcı nitelikte NP'ler adjuvan olarak kullanılabilir. Parazit türevi hastalıklarda; NP'lerin uygulama yollarından dozları ve çözünürlükleri gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır. İnsülin preparatı olarak insülin hormonları NP'ler halinde enjeksiyon uygulama ile yavaş ama etkili sonuçlar oluşturmuştur. Göz hastalıklarında nanopartiküller yararlılığının düşük etki gösterdiği düşünülen göz damlaları için yeni ve önemli bir alternatif ortaya koymaktadır [72].

NP'ler genellikle göz ve beyin cerrahisinde; mikro cerrahi bıçaklar ile mikro-nano cerrahi uygulamalarında, moleküler ve doku hasarlarının tayin edilmesinde ve iyileşme sürecinde, gen terapisi, DNA modifikasyonu, ilaç salınımı, ilaç taşınımı, nanorobotlar özellikle akustik sinyaller aracılığıyla ilgili mesajı ilgili doku yada organa iletip patojenlere karşı savunma veya immün sistemde baskılamada, biyosensörler süreç denetleme, klinik teşhis ve uygulamalarında, ilaç yüklü nanoküreler biyoyumlu kaplama sonucunda hedef bölgeye ulaştırılmasında, biyolojik örneklerin incelenmesinde biyoçipler ve fiziko kimyasal özellikleri nedeni ile bilimsel araştırma çalışmaları gibi pek çok uygulamada kullanılmaktadır [73].

NP'lerin en önemli çalışma parçalarından biri olan ilaç taşıyıcı sistemler, belirlenen hücre grubuna ilaç veya genleri hedefleme odaklı ortaya çıkan bir alandır. Amaç istenilen bölgelere uygun miktarda ilaç taşımak ve istenilen bölgedeki olumsuz etkileri en aza indirebilmektir [74].

NP'ler, nanopartikül sistemlerine dahil edilmeyen diğer ilaçları oluşturan küçük moleküllerden ayırt edilir. NP'ler normal hücrelerde ilaç salım hızını değiştirir. Ve yan etkilerin azalmasına neden olabilir. Biyolojik dağılımını, biyoyararlılığını değiştirerek ve hedef olmayan bölgelerde ilaç salımını önleyerek ilacın yan etkilerini azaltabilir [75]. İlaç taşıyıcı sistem çalışmalarında ilk kullanılan NP ise 1976 yılında 100 nm çapındaki poli metil metakrilat'ın kullanılması olmuştur [76].

Oküler ilaç verme NP' leri için ana hedefler: ilaç geçirgenliğini arttırabilme, ilaçların serbest bırakma mekanizmalarını kontrol edebilme, nano yüzeylerini spesifik hedefleme kısımları ile değiştirebilmesidir. Nano-taşıyıcıların küçük boyutları, ilaç taşıyıcıların vitreus bariyeri boyunca geçirgenliğini artırır aynı zamanda ilaçların arka dokulara dağıtım oranını da arttırır. Ayrıca, NP'ler muko yapışma özellikleriyle hedeflenen dokularda önemli ölçüde tutunma gerçekleştirirler [77].

RPE'nin bütünlüğü ve işlevleri nöral retina homeostazı için çok önemlidir. RPE hücreleri, ilaç verme ve hastalıklara yol açan süreçleri durdurmayı, tersine çevirmeyi amaçlayan gen

aktarımı için potansiyel hedef tabakadır [78]. Yapılan çalışmalarda, epitelyal hücrelerdeki efektif taşıyıcıların, anti-viral ve anti-glokom ilaçları geçirgenliği önlemede uygun olduğu bulunmuştur. İntravenöz enjeksiyon ve oral dozaj, oküler ilaç aktarımı gibi bilinen sistemik uygulama yöntemleridir. Göz koroidinin vasküler koroid pleksus yapısından dolayı, ilaçlar koroid içine kan damarlarından kolayca girebilir ve RPE hücrelerinin dış kan-retinal bariyeri, ilaç geçişini koroidden retina düzenler. RPE hücrelerinin sıkı bağlantıları ilaçların çoğunu engeller. Tatbik edilen ilaçların % 1 -% 2 geçişini retina ve vitroz gövdeye kadar sağlarken, bu değerler yeterli olmayabilir ve daha derin yerlere nanoteknolojik yöntemlerle sağlanabilmesi adına çalışmalar devam etmektedir [2].

2.4.4. NP'ler ve Toksisiteleri

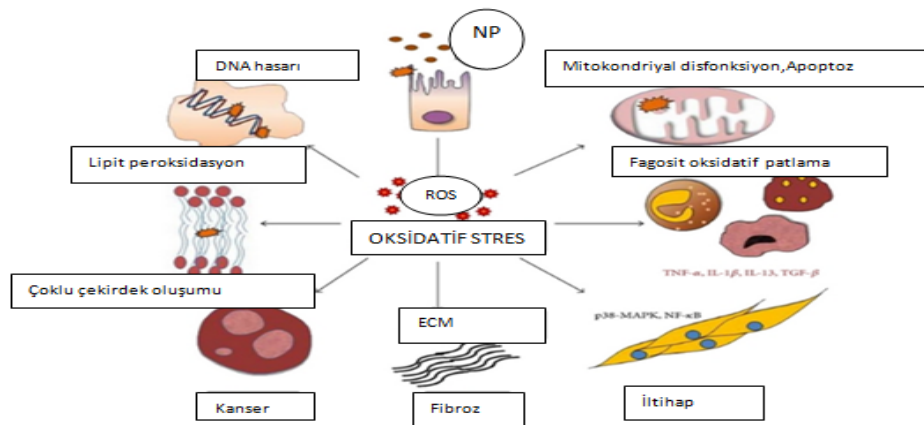
NP'lerin yaygın olarak kullanımı ile maruziyetleri kaçınılmaz bir gerçeklik olup sonucunda nanotoksik etkilerin oluşması da beklenen bir durum olarak ortaya çıkmaktadır. Araştırmacılar bazı nanomalzemelere maruziyetin deri inflamasyona, akciğerlerde fibrosise neden olabileceğini çalışmalarla ortaya çıkarmışlardır [79]. SiO₂ NP'lerinin kullanıldığı alanlardaki çalışanlarda fibrotik akciğer hastalığına, amfizeme, akciğer kanserine ve pulmoner tüberküloza yol açtığı bilinmektedir. Seramik üretiminde çalışan silika tozlarına maruz kalan işçilerde (yaş, sigara, alkol kullanıp kullanmama, çalışma süreleri ve iş güvenliğine uyup uymama ((eldiven, gözlük, maske)) kriterleri de göz önüne alındığında kan ve izole lenfositlerde DNA hasarı, oksidatif DNA hasarının önemli göstergesi olan 8-hidroksideoksiguanozin seviyesinin yükselmesi, glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin ve MDA düzeylerinin artması, CAT, SOD enzim aktivitelerinin anlamlı derecede azalması, Interlökin-1 α , Interlökin-1 β , Interlökin-10, Interlökin-6, Interlökin-4, Interlökin-2 ve tümör nekroze faktör- α düzeylerinin önemli derecede artması gibi olumsuzluklarla sonuçlanmaktadır [80].

SiO₂ NP'ların kullanıldığı ortamlarda çalışan insanlar, dünyadaki en büyük endüstriyel sağlık tehlikelerinden biri olan akciğer hastalığına "silikozis" yakalanabilmektedirler. Çünkü SiO₂ NP'ların akciğerlerde tutulma oranı % 60'ın üstündedir [81]. Solunan silika NP'lerinin pulmoner retansiyonunu ve kardiyo respiratuvar hastalıkların önemli faktörleri olarak bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı toksisite, silika NP'lerin neden olduğu hücre hasarından sorumlu olası bir mekanizma olarak ele alınmıştır. MRC-5 (fetal akciğer fibroblast) hücre hattının SiO₂ NP'leri ile muamelesinden elde edilen sonuçlarda, SOD, CAT, GPX ve GST'nin spesifik aktivitelerinin yükselmesi ile hücre morfolojik modifikasyonlar ve oksidatif stres olduğu gösterilmiştir [82]. Akciğer fibroblastlarında 7 nm çapındaki SiO₂ NP'lere 72 saat maruz bırakılmasında ROS oluşumu, GSH seviyesinin düşmesi, protein oksidasyon artışı görülmüştür [83].

Yapılan pek çok çalışmada SiO₂ NP'lerinin hücre zarı, plasenta, kan- beyin bariyeri, kan-testis bariyeri gibi seçici geçirgen özellikteki yapıları geçerek hasara neden oldukları gösterilmiştir. SiO₂ NP'lerinin sıçan kalp dokusunda 150 µg/mL/gün (6, 20, 50 nm) dozunda kalp hızını, kasılma frekansını arttırdığı ve kasılma kuvvetini azalttığı bununla beraber kalbin fonksiyonunun değiştiği gösterilmiştir [84]. 6 nm boyutu ve 150 µg/mL/gün dozunda SiO₂ NP'lerinin sıçan kortikal kemiğine intraperitoneal olarak uygulanması ile biyomekanik niteliğini bozarak kırılma riskini arttırabileceği ve osteoporoz gibi değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir [85]. İzole uterus dokusuna 20 nm boyutu ve 250, 500 ve 1000 µg/ mL dozlarında SiO₂ NP'lerinin uygulanması ile uterus spontan aktivitesi frekansını azalttığı, oksidatif stresi arttırdığı ve apoptozisi hızlandırdığı ve bu nedenle uterusun işlevini olumsuz etkilediği gösterilmiştir [86]. SiO₂ NP'lerinin 20 nm boyutunda ve 500 µg/mL dozunun intratimpanik olarak uygulanmasıyla tüy hücrelerini azalttığı ve deformasyon oluşturduğu gösterilmiştir [87]. HaCaT (İnsan epidermal keratinosit hücre hattı) 15 nm-30 nm-mikro boyutlu SiO₂ NP'lerine 10 µg/mL'de 24 saat maruz bırakılması ile doza bağlı olarak morfolojik etkilerinde hücre büyümesinin engellendiği, hücrelerin düzensiz şekillere yönelmesi, hücresel canlılığında azalma, (ölü ve yüzen hücrelerin görülmesi), hücre döngüsü akım sitometrisinde G fazında tutulma ve S fazında ise hücre oranlarında sayıca azalma gösterilmiştir [88]. HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan başka bir çalışmada hücre canlılığı azalmış ve hasarlı hücre membran bütünlüğü sonuçları ile SiO₂ NP sitotoksitesisi belirtilmiştir [89]. A549 (insan alveolar bazal epitelyal hücreleri), EAHY926 (somatik endotel hücreleri) ve J774 (monosit- makrofaj) hücre hatlarında yapılan çalışmalar erken sitotoksitesite, erken yapışma ve hücre kaybı ile sonuçlanmıştır [90]. SiO₂ NP'leri intravenöz olarak uygulanan bir çalışmada sertoli hücrelerinde, sperm çevresinde ve spermatositlerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde spermatojenik hücre hasarı ve spermatogenez sürecini engel olarak spermatojenik hücreler üzerindeki toksitesisi gözlenmiştir [91]. Yapılan başka bir çalışmada GT1-7 (nöroendokrin hücreleri) hücrelerinde SiO₂ NP'lerinin, uzun süreli olarak alınan kayıtlarında elektriksel aktiviteyi geçici olarak arttırdığı gösterilmiştir [92]. SiNP'lerin, epitelyal hücrelerin plazma zarı ile etkileşiminde epitelyal bariyer fonksiyonlarını düzenleyen katyon geçirgen kanal olan Geçici Reseptör Potansiyel Vanilloid 4'ün (TRPV4) işlevinde, Kapsaisin reseptörü ve Vanilloid reseptörü 1 olarak da bilinen ve geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt V üyesi 1 (TRPV1)'in aktivasyonunu arttırdığı, hücre içi Ca²⁺ sinyallerini inhibe ettiği sonuçları gösterilmiştir [93]. HNBEC (İnsan bronş epitel hücreleri) ve 16HBE (SV40 ile dondurulmuş) 10~20nm'lik çapında SiO₂ NP'lerine 40, 80, 120, 160, 200 ug/mL farklı konsantrasyonlarda 24 saat maruziyet sonucunda hücre morfolojisi bozulmuş, hücre canlılığı azalmış, apoptotik analiz sonuçları HNBEC hücrelerinin, 10-20 nm boyutunda SiO₂ NP'lerine maruziyetine karşı 16HBE hücrelerinden daha duyarlı olduğunu göstermiştir [94]. HT-29 (İnsan Epitelyal Bağırsak) hücre hattında 25 nm -100 nm

çaplarına sahip 10, 25, 50, 75 ve 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında SiO_2 NP'lerinin 24 saat uygulaması ile 25 nm SiO_2 NP sitotoksik etkisi az iken DNA çift sarmal kırılma sayısı düşük dozda daha fazla hücre ölümü ile doğrulanmış, 100 nm SiO_2 NP'leri 25 nm kıyasla daha fazla sitotoksik ve genotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir [95]. A549 (İnsan akciğer kanser epitelium) hücre hattında 20 nm SiO_2 NP (amin veya karboksil kaplı) 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ 12- 48 saat uygulamalarında hücre canlılığı 250 $\mu\text{g/mL}$ 'nin üstündeki değerlerde azalmış, hücre morfolojisinde hücre kanaması gözlenmiş, 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ 'de otofaji artmış ve sitotoksik etkiler gözlenmiştir [96]. HFL-1 (İnsan Akciğer Fibroblastı) hücre hattında 250-1500 $\mu\text{g/mL}$, 20nm'lik SiO_2 NP' lerine 48 saat maruziyetinde hücre canlılığı doza bağlı azalmış, apoptoz doza bağlı artmış, morfolojik değişikliklerin yanı sıra NP birikimi de gözlenmiştir [97]. İnsan Periferik Lenfositlerinde 50-100 $\mu\text{g/mL}$ 10-20nm'lik SiO_2 NP'lerine 24 saat maruziyeti ile hücre canlılığı ve SOD düzeylerinin doza bağlı azaldığı, sitotoksikite ROS seviyeleri, genotoksikite ve CAT düzeyleri doza bağlı arttığı gözlenmiştir [98]. Miyokardiyal H9c2 (2-1) hücrelerinde 21 ve 48 nm ile 2 farklı çaptaki silika NP'lerinin (0.1-1.6 mg/mL) doz ve (12, 24, 36 ve 48 saat) zaman maruziyeti sonucunda hücre döngüsü akış sitometrisinde elde edilen sonuçlarda 21 nm'lik gruplarda silika konsantrasyonları arttıkça, G_1 fazındaki hücrelerin yüzdesi % 70'den % 88'e yükselirken, S fazı ve G_2/M fazındaki hücrelerin yüzdesi aynı durumda önemli ölçüde azalmış ve 48 nm'lik gruplarda ise benzer sonuçlar gözlenmiş. Bu veriler ile silika NP'lerinin G_1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olabileceğini doğrulanmıştır [99]. HEK293 (İnsan embriyonik böbrek hücreleri) itriyum oksit NP'lerinin uygulanması ile yapılan çalışmada hücre morfolojide değişiklikler, hücre canlılığında azalma, reaktif oksijen türleri seviyeleri yükselmesi ve mitokondriyal membran potansiyel bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiş. Ve hücre ölümü (apoptoz ve nekroz), DNA iplikçik kopması, mikronükleğin oluşumu, NP'lere maruziyetin büyüklüğüne bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik etkileri de gösterilmiştir [100]. ZnO NP'leri insan kan hücrelerinde mitokondriyal zar hasarı, ROS oluşumu, oksidatif stres, inflamatuvar, immünomodülatör etkisi ve inflamatuvar tepkiye neden olduğu gösterilmiştir [101]. Fare fotoreseptör hücre hattının ZnO NP'leri ile tedavi edilmesinde hücrelerin sitokrom C salgıladığı, aşırı ROS ürettiği, antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı, hücre içi ATP seviyesinin düştüğü, mitokondri homeostazının bozulduğu ve mitokondrilerde işlev bozukluğu gözlenmiştir [102]. ZnO NP'leri cilt hücrelerinde otofajik vakuol birikim, mitokondri disfonksiyon toksisite ve hücre ölümü görülmüştür [103]. ZnO NP'lerin sıçan retinal ganglion hücrelerinde ROS üretimi ile sitotoksikiteyi indüklediği, kaspaz-12'nin aşırı ekspresyonu, ER stresi ve hücre ölümü görülmüştür [104]. ARPE19 hücrelerinde katı lipid nanopartiküllerinin (SLN) transfeksiyon kapasitesinin retina hastalıklarında potansiyel görülmesinin değerlendirildiği bir çalışmada düşük transfeksiyon seviyesi ile karşılaşılmış bu durum hücre alımında gecikme, gen ekspresyonunda farklılıkların olduğu gösterilmiş. ARPE-19

hücrelerindeki klattrin aracılı endositoz, SLN lizozomlara yönlendirir ve bu hücre hattının düşük bölünme oranına, DNA'nın çekirdeğe girişini engellemesine de neden olmaktadır [105]. Yapılan bir başka çalışmanın mikroskopik analizlerinde ARPE 19 hücre hattına 30 µg/mL TiO₂ NP'lerinin 24 saat inkübe edilmesinde düşük konsantrasyonlarda (0,1-0,3 µg/mL) yoğun ışık saçılımı nedeniyle hücre başına 5-10 nanopartikül tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise endoplazmik retikulum civarında çekirdeklerin etrafında konsantre nanopartikül halkalarının gözlemlendiği, hücre canlılığının azaldığı ve sitotoksikite etkisi görülmüştür. Sonuç olarak nanopartikül doz ve hücre toksisite ilişkisi gösterilmiştir [106]. ARPE-19 hücrelerinde TiO₂ NP'leri küçük partiküller (25 nm anataz / rutil ve 31 nm anataz / rutil) ve daha büyük partiküller (214 nm rutil) olmak üzere maruziyet sonucu canlı hücre sayısı azalmıştır. Akış sitometri olarak FSC (ileri saçılım kanal dedektörü) ve SSC (yana saçılma kanal dedektörü) analizlerine göre fototoksik etkilerde doza bağlı artış gözlemlenmiştir [5]. Fulleren NP'leri genellikle göz ve cilt dokusu için fototoksik etken oluşturmaktadır. ARPE 19 hücresi üzerinde fulleren NP'lerinin in vitro değerlendirmeleri ile 50 µM solüsyonda 17 saat inkübe edildiğinde; azalmış metabolik aktivite, artmış laktat dehidrojenaz salımı, erken apoptozu indüklemesi, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonun indüklenmesi gözlenmiştir [107]. ARPE 19 hücrelerinde 5 µg/mL'lik Ag NP'lerine 18 saat maruziyeti sonucunda doza bağlı olarak sitotoksikite, indüklenmiş apoptoz, apoptoz ilişkili protein ekspresyonlarının seviyelerinin zayıflaması ve ER stres tepkisi gösterilmiştir [108]. ARPE 19 hücrelerinde 0,5–10,0 mg/mL'de hibrit ve nano-ZnO partiküllerine 48 ve 72 saat maruziyetleri sonucunda düşük sitotoksikiteye sahip olduğu gözlenmiştir [109].



Şekil 2.10. NP maruziyeti sonrasında Oksidatif stres ve Etkileri [110].

Genel olarak SiO₂ NP'lerin in vitro toksisitesi boyutuna, dozuna, yüzey alanına, hücre tipine oksidatif stresin indüklenmesine, bağlılık göstermektedir. SiO₂ NP'lerin uygulama yolu,

fiziko kimyasal özellikleri toksikokineğini, sitotoksitesinde ise en önemli faktör, yüzeyin kimyasal özellikleri ve partikül büyüklüğü olmaktadır. [111, 61].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. SiO₂ NP'lerin Karakterizasyonu

3.1.1. Zeta Potansiyeli

Bu çalışmada ticari olarak satın alınan SiO₂ NP'leri (Sigma-Aldrich, ürün no: 637246, Saint Lois, USA) kullanıldı. SiO₂NP'lerinin katalog özellikleri Çizelge 3.1de belirtildiği gibidir. Karakterizasyon analizi için Zetasizer cihazı (Nano ZS, Malvern Zetasizer MPT-2 Titrator Instruments Ltd. Birleşik Krallık) ile zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Bunun için 0.15 g toz SiO₂ NP'leri 30 mL SF (% 0,9'luk NaCl çözeltisi) ile seyreltilerek karışım hazırlandı. Manyetik karıştırıcıda (IKA® C-MAG HS 7, Staufen, Almanya) karışım 15 dakika karıştırıldı. NP'lerin aglomera olma eğilimini önlemek ve homojen dağılımını sağlamak amacıyla 30 dak. ultrasonik homojenizatör (Bandelin Electronics, Model HD 2200, Berlin, Almanya) kullanıldı. Elde edilen karışım zetasizer cihazına yerleştirilerek incelendi. İşlemler oda sıcaklığı olan 37 °C'de gerçekleştirildi.

Silisyum Dioksidin Katalog Özellikleri
Yüzey alanları = 590-690 nm ²
Saflık=%99,5
Partikül boyutu = 5-15 nm
Kaynama noktası = 2230 °C
Yoğunluğu = 2,2-2,6g/mL (25 °C sıcaklıkta)
Kütle Dansitesi = 0,068 g/Ml
Donma Noktası = >1600 °C

Çizelge 3.1. SiO₂ NP'lerin Katalog Özellikleri

3.1.2. FESEM İncelemesi

Nanoparçacıkların şekil ve boyut analizleri FESEM ile yapıldı. Bunun için iki ucu karbon bantlı stublara toz halindeki SiO₂ NP'lerinden yerleştirildi. (Şekil 3.1-A) Stub etrafında yapışmayan toz SiO₂ NP'leri temizlendikten sonra stublar birkaç kez iletkenlik kazandırmak için platin ile kaplaması yapıldı. (Şekil3.1-B) FESEM cihazı (Zeiss, Supra 55, Almanya) için uygun olan mikroskop (SZX2-ILLB, Olympus Cor. Tokyo, Japonya) altında görüntü alınacak şekilde yerleştirildi. Yerleştirilen SiO₂ NP numunelerinden çeşitli büyütmelemlerle görüntü alındı. (Şekil3.1-C).

3.1.3. XRD İncelemesi

Nanoparçacıkların amorf yapıda olup olmadığını belirlemek için XRD analizi Bruker AXS D8 ADVANCE X Işını Toz Difraktometresi kullanılarak yapıldı. XRD analizi; oda sıcaklığında, 0,02

tarama hızında 10° - 80° aralığında, Bragg yasasına göre paralel ışın metodu kullanılarak gerçekleştirildi.



A

B

C

Şekil 3.1. Stublar (A), kaplama cihazı (B), FESEM Cihazında SiO₂ NP'lerin Görüntülenmesi (C)

3.2. Hücre Kültürü

Hücre hattının açılması ve çoğaltılmasında Mersin Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda bulunan hücre kültürü laboratuvarı kullanıldı.

3.2.1. ARPE 19 Hücre Hattı

Bu çalışmada ticari olarak satın alınan İnsan Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) hücre hattı (ATCC CRL-2302™ Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC), Manassas, VA, USA) kullanıldı. Bu hücreler ticari olarak satın alındığı için etik kurul onayı gerekmemekte olup etik kurul onayına başvurulmadı.

3.2.2. Medyum Hazırlanması

İnkübasyon ortamları nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37°C'dir. Büyüme ortamları için, %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM GlutaMAX, %1 Penisilin-streptomisin, %1 amfoterisin ile katkılanmış Dulbecco's modified Eagle's medyum (DMEM F12) medyumunu kullanıldı. Hazırlanan katkılı medyum +4 °C'de saklandı.

3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Sıvı azot içerisinde dondurulmuş halde bulunan hücrelerin çözülmesi; önceden hazırlanmış katkılı büyüme ortamı 4°C'den alınarak 37°C'ye getirildi. Kriyovial içindeki hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak önceden ısıtılmış steril su içeren su banyosu yardımıyla hızlı bir şekilde 37°C'ye getirildi. Tamamen çözülen hücre süspansiyonu vialli %70 lik alkolle temizlenerek laminar kabine alındı. Hücre süspansiyonu önceden medyum ile ıslatılmış olan transfer pipeti yardımıyla çekilerek yine medyum ile ıslatılmış olan 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı. Falkon tüpe aktarılan hücrelerin üzerine 9 mL katkılı büyüme ortamı yavaşça ve

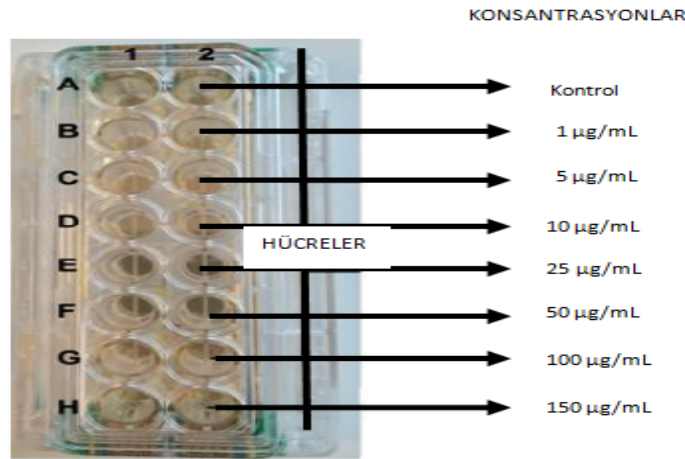
damla damla olacak şekilde eklendi. Transfer pipeti yardımıyla 2-3 defa pipetaj yapıldı. Tüp 300 xg'de 10 dk santrifuj edildi. Üst faz atılarak dipte kalan çökelti 1 mL katkılı büyüme ortamı ile resüspande edildi. Süspansiyondan 20 µL alındı ve bu hacim 200 µL'lik endorf tüpü içerisinde 20 µL tripan mavisini ile karıştırıldı. Karışım iki uçtan Thoma lamına yayıldı. Faz -kontrast mikroskopu ile 20X büyütmede hücre sayımı gerçekleştirildi. Ortalama sayım değeri seyreltme faktörü ve 10^4 ile çarpılarak mililitredeki hücre sayısı hesaplandı. Canlılık oranı tespit edildikten sonra 1 mL hücre süspansiyonu içeren 15 mL'lik falkon tüp üzerine 9 mL katkılı büyüme ortamı eklenerek T75 hücre kültürü kabına ekildi ve nemli atmosferde %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübasyonu sağlandı. Ekimden 4-6 saat sonra hücrelerin büyüme ortamları taze katkılı ortam ile değiştirildi. Hücrelerin morfolojileri ve tutunma oranları faz -kontrast mikroskopu yardımıyla incelendi. Büyüme ortamları ertesi gün ve bundan sonra her üç günde bir olacak şekilde değiştirildi. Yaklaşık 7 gün sonra %80 oranında konfluent olan hücreler diğer deneylerde gerekli olan sayıya ulaşana kadar pasajlandı.

Pasajlama için gerekli miktardaki katkılı medyum ve tripsin-EDTA oda sıcaklığı olan 37 °C'ye getirildi. Her bir T75 flask için 15 mL katkılı medyum ve 7,5 mL tripsin-EDTA kullanıldı. Pasajlanacak hücre flaskları laminar kabine getirildi. Büyüme ortamları çekilerek 1X D-PBS ile 3 defa hücreler yıkandı. Son D-PBS çekildikten sonra hücrelere tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika 37 °C'de inkübasyonu yapıldı. Inkübasyon süresi dolan hücre flaskları faz-kontrast mikroskopu yardımıyla incelendi ve tripsinizasyon işlemi gerçekleşen flasklar tekrar laminar kabine alındı. Enzimatik aktivasyonun durdurulması amacıyla flaskların üzerine aynı hacimde katkılı medyum eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifujuslandı. Santrifüjden sonra üst faz atılarak pellet 1 mL katkılı medyum ile çözüldü. Hemositometre ile hücre sayım yapıldı ve T25 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı.

3.3.Sitotoksosite Analizi

Sitotoksitenin değerlendirilmesi için 2 adet 16 kuyulu 96'lık e-plate (ACEA marka ID:730344) kullanılarak ve etkin SiO₂ NP dozlarını belirlemek için xCELLigence sistemi (Roche, Mannheim, Germany) ile gerçekleştirildi. Sitotoksosite analizi için hücre flasklarından büyüme ortamları uzaklaştırılarak 3 mL 1X D-PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Son yıkamadaki DPBS çekildikten sonra 2 mL % 0,05 tripsin-EDTA hücrelere eklendi. 5 dk boyunca 37 °C'de inkübasyonları sağlandı. Tripsin inaktivasyonu için flasklara 2 mL katkılı medyum eklenerek 300 g'de 5 dakika santrifüjü yapıldı. Üst faz uzaklaştırılarak, pellet 1 mL katkılı medyum ile resüspande edildi. Hücrelerdeki canlılık oranının belirlenmesi amacıyla Cedex hücre sayım cihazı (Roche AG) kullanıldı. Her bir T75 flaskından yaklaşık olarak 1×10^5 hücre elde edildi. 16 kuyulu e-platelerin her bir kuyusunda ≈ 10.000 hücre ekilmesi için hücre süspansiyonu dilüsyon oranları hesaplandı.

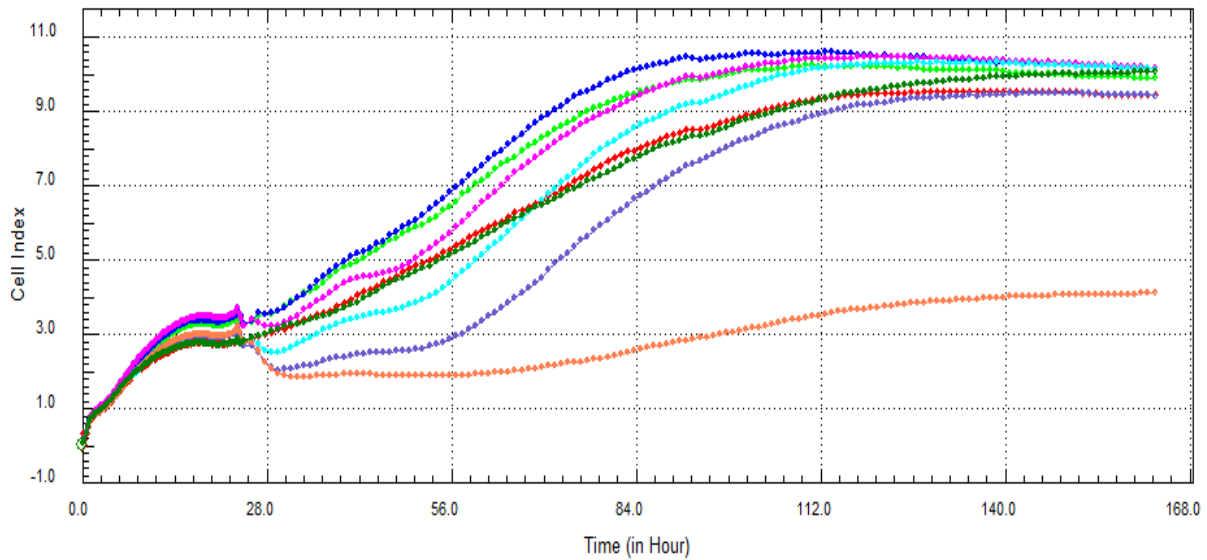
xCELLigence verilerinin RTCA (realtime cell analyzer) programında işlenmesi ve hücre analiz grafiklerinin eldesi için; RTCA programı kullanıldı. Program otomatik olarak RTCA kontrol ünitesine bağlı RTCA cihazını tanıyarak uygun kullanıcı arayüzünü başlattı. Layout, Expnote ve Schedule öğelerini içeren deney protokol sayfaları dolduruldu. Schedule için izlenen aşamalar: kör okuma aşaması; hücre izleme aşaması ve bileşik aktivitesi izleme aşaması biçimindedir. İstatistiksel analizler için her bir uygulamada, $n=4$ tekrar şeklinde kuyucukların kodlaması sağlandı. Çalışma grupları kontrol ve deney olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Kontrol grubu için herhangi bir uygulama hücrelere yapılmadı. Deney grubu düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon grubuna ayrıldı. Tüm ayarlamalar sağlandıktan sonra e-platelerin her bir kuyusuna 100 μL katkılı medyum eklendi. E-plateler inkübatördeki enstrümanına yerleştirildi. Ve deney başlatılarak ilk okuma (kör okuma) gerçekleştirildi. Kör okuma tamamlandı. Plateler inkübatörden çıkarıldı. Laminar kabine alındı. Kuyulara 90 μL hacimde 10.000 hücre bulunan süspansiyon, son hacim 190 μL olacak şekilde eklendi. İnkübatöre tekrar alınan e-plate ler için hücre izleme aşaması başlatılarak 24 saat beklendi. 24 saat sonra hücre izleme aşaması beklemeye alındı (pause). İnkübatörden E-plateler alındı ve laminar kabine aktarıldı. Plateler için belirlenmiş kuyu kodlarına göre 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda NP stoklarından 10 μL kullanılarak kuyulardaki son hacimler 200 μL 'ye tamamlandı. Gruplarının E- Plate üzerine yerleşimi Şekil 3.2'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.2.Farklı konsantrasyonlardaki SiO_2 nanoparçacıklarının E-Plate Üzerine Yerleşimi

E-plateler geri inkübatöre alındı. Bileşik aktivitesi izleme aşamasına geçildi. Bu aşama kullanılan bileşik ve hücre hattına bağlı olarak 48-96 saat arası gerçekleşmektedir. Ve deney 168. saatte sonlandırıldı. Ortaya çıkan verilerden kontrole oranla, grupların kendi alt konsantrasyon grupları hem de diğer grubun konsantrasyon grupları arasında karşılaştırma yapabilmek için one-way ANOVA testi uygulandı. ARPE 19 hücrelerinin SiO_2 NP'lerinin farklı

konsantrasyonlara verdiği proliferasyon yanıtını değerlendirebilmek için yapılan gerçek zamanlı hücre analiz çalışmasında oluşan proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı Cell Index-Time Grafiği çıkarıldı (Şekil 3.3). Elde edilen veriler cihazın yazılımı ile hücre indeksi cinsinden sayısallaştırıldı.



Şekil 3.3. Kontrol ve SiO₂ konsantrasyonlarına ait gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri. Mor: kontrol, koyu yeşil: kontrol, kırmızı: 1 µg/mL SiO₂, açık yeşil: 5 µg/mL SiO₂, mavi: 10 µg/mL SiO₂, pembe: 25 µg/mL SiO₂, turkuaz: 50 µg/mL SiO₂, mor: 100 µg/mL SiO₂ ve turuncu: 150 µg/mL SiO₂ yi temsil etmektedir. Hücre çoğalma eğrileri 24 saat boyunca izlenmiş ve tüm SiO₂ konsantrasyonları 24. saatte eklenmiştir.

3.4. Deney Grupları

SiO₂ NP'leri için 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/ mL farklı konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen xCELLigence Yöntemi ile Hücre İndeksinin (Cell Index: CI) Hesaplanması sonucuna göre 50, 100, 150 µg/mL olmak üzere 3 deney grubu oluşturuldu. Sitotoksosite deneylerinde 24 saat ilaç uygulamasının yapıldığı 3 doz grubunun yanı sıra hiç ilaç uygulanmayan bir kontrol grubu olmak üzere toplam 4 grup çalışıldı.

Grup 1: Kontrol grubu, bu gruptaki ARPE 19 hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2: Bu gruptaki ARPE 19 hücrelerine düşük doz olan 50 µg/mL SiO₂ NP uygulandı.

Grup 3: Bu gruptaki ARPE 19 hücrelerine orta doz olan 100 µg/mL SiO₂ NP uygulandı.

Grup 4: Bu gruptaki ARPE 19 hücrelerine yüksek doz olan 150 µg/mL SiO₂ NP uygulandı.

3.5. Apoptoz

Sağlıklı hücrelerin iç membranındaki değişiklikler Annexin V işaretleme ile ölçülebilir. Annexin V antikoru Ca⁺⁺ varlığında plazma membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine

bağlanır. Ve işaretleme sonucunda canlı hücre, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre olarak sınıflandırılması gerçekleştirilir.

Akım sitometri yardımıyla hücrelerdeki apoptoz oranının analizi APC-Annexin V Apoptoz kiti (Biolegend Ürün Kat. No: 640932) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler iki defa soğuk PBS ile 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Pellet ticari olarak satın alınan kitin içindeki 1X binding buffer ile çözüldü. Solüsyonun 100 µL'si 5 mL lik kültür tüplerine alındı. Tüplere yine kit ile beraber gelen solüsyonlardan 5 µL APC Annexin V ve 5 µL PI eklendi. Tüpler vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyonları sağlandı. 400 µL 1X Binding Buffer eklendi. MEİTAM'da akış sitometrisi (BD Facsaria III Cell Sorter) ile analiz okumaları gerçekleştirildi. Annexin V (-) ve PI (-) boyanan hücreler canlı, sağlıklı hücreler, Annexin V (+) ve PI (-) olan hücreler erken apoptoz, Annexin V (+) ve PI (+) geç apoptoz, Annexin V (-) ve PI (+) olanlar ise nekrotik/ölü hücreler olarak analizleri yapıldı.

3.6.Hücre Döngüsü

ARPE 19 hücrelerinin bölünme siklusu üzerindeki SiO₂ NP'lerinin etkilerini gösterebilmek amacıyla hücre siklusu BD CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit (Lot No: 9183628, Ref: 340242) ile deney yapıldı. Kit; hücre membranında bulunan lipidlerin deterjanlar yardımıyla çözülmesi, hücre iskeletinin ve nükleer proteinlerin tripsin yardımıyla uzaklaştırılması ve hücre RNA'nın enzimler ile parçalanması prensibine göre çalışmaktadır. Deney grubunu oluşturan hücre flasklarına son konsantrasyonları 50 µg/ mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL olacak şekilde SiO₂ NP uygulandı ve 24 saat süresince inkübasyonları sağlandı. Daha sonra tripsinizasyon işlemi uygulandı. Santrifüj edilen hücreler öncelikle 17x100 mm'lik FACS tüplerine aktarıldı. Bu işlemi takiben hücreler 5 dakika boyunca 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletin üzerine kit ile gelen Buffer Solüsyonu 1'er mL olacak şekilde eklenerek 2 defa 5 dakika 500 g'de santrifüj edildi. Hücrelerin üzerine tekrar 1 mL Buffer solüsyonu eklenerek Cedex XS cihazında sayım yapıldı. Hücreler 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ayarlandı. Hücreler bu aşamada ilk olarak 5 dakika boyunca 400 g'de santrifüj edildi. Süpernatantın tamamı atıldı. Tüplere 250 µL Solüsyon A (TrypsinBuffer) eklendi. Ardından Solüsyon A'nın etkisini görebilmek için oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Solüsyon A ortamdan çekilmeden üzerine 200 µL Solüsyon B (Tytripsin Inhibitör and RNase Buffer) eklendi. Karıştırma işleminin ardından Solüsyon B'nin etkisini görebilmek için oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyonu sağlandı. İnkübasyonun ardından Solüsyon A ve B boşaltılmadan tüm tüplere 200 µL (2°C -8°C) soğuk olan Solüsyon C (Propidium Iodide Stain Solution) eklendi. 10 dakika boyunca buzdolabında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasını takiben örnekler 40 µm ve 70 µm'lik filtreler kullanılarak filtre edildi. Hazırlanan solüsyonlar sırasıyla akım

sitometri cihazında okutuldu. Gerekli olan voltaj ve kompanzasyon ayarlandı. Örnekler okutuldu ve çıkan analiz sonuçları ModFit LT programı ile analiz edildi.

3.7. Biyokimyasal Yöntemler

ARPE 19 hücrelerinin SiO₂ NP'lerine maruziyeti sonucunda oluşturabileceği oksidatif stresi belirlemek için lipid peroksidasyonu malondialdehit (MDA) düzeyleri, antioksidan glutatyon peroksidaz (GSHPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri incelendi. Enzim aktivitelerinin U/mg protein olarak belirtebilebilmesi için ise hücrelerin protein düzeylerine bakıldı.

3.7.1. Protein Miktarının Ölçümü (Lowry yöntemi)

Deneyin Prensibi: Alkali çözeltilerde bakır-protein kompleksi oluşur. Bakır-protein kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin - Ciocalteus - Phenol Reaktifi) redüklemektedir. Ve koyu mavi bir renk oluşturmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır [112].

Kullanılan Reaktifler Sırasıyla:

A Reaktifi: 0,1 N NaOH çözeltisi ile %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi oluşturuldu.

B1 Reaktifi: %1'lik CuSO₄.5H₂O çözeltisi oluşturuldu.

B2 Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi oluşturuldu.

B Reaktifi: B1 ve B2 eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı.

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1mL A reaktifi eklenerek reaktif taze oluşturuldu ve bekletilmeye bırakılmadan kullanıldı.

D Reaktifi: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile birlikte karıştırıldı.

Protein standardı: 250 mg/100 mL bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/mL, protein bulunduracak şekilde dilüe edilerek uygun çalışma standartları hazırlandı.

	Kör Tüpü	Numune Tüpü	Standart
Numune (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dakika beklendi.			
D reaktifi (µL)	300	300	300

Çizelge 3.2. Protein (Lowry Metodu) Ölçüm Protokolü

Tüpler vorteksleildi. Oda sıcaklığında 20-30 dakika inkübasyonu yapıldı. Spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbansı kör tüpüne karşı okutuldu. BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak her bir örnek için protein miktarı hesaplanıldı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı ise mg olarak ifade edildi.

3.7.2. Malondialdehit Ölçümü

Lipit peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbitrik asit ile reaksiyonu sonucunda oluşan pembe kırmızı renk absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır [113].

Kullanılan Reaktifler:

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksipropan 1 mL'de çözülür.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile birlikte tamamlanır. Çalışma esnasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.

SDS çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılarak 100 mL'ye distile su ile birlikte tamamlanır. Ve çözülür.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile birlikte 100 mL'ye tamamlanarak pH'ı 3,5'e ayarlanır.

TBA çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılarak 100 mL'ye distile su ile birlikte tamamlanır. Isıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılır.

Deneyin Yapılışı:

	Kör	Standart	Örnek
Standart(1/10dilüe) (µL)	-	50	-
Örnek (µL)	-	-	50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
Distile su (µL)	400	350	350

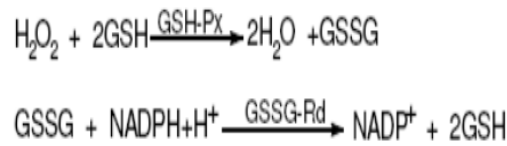
Çizelge 3.3. Malondialdehit (MDA) Ölçüm Protokolü

Tüpler 30 dakika süre ile 95 °C'de inkübe edilir. Musluk suyunda soğutularak 500 µL distile su eklendi ve 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenerek tüpün kapağı kapatıldı.

Karışımlar beyazlaşınca kadar vortekslendi. 15 dakika 4000 rpm’de santrifüjlendi. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp kör tüpe karşı 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonda GSH’nın H₂O₂ oksidasyonu sonucuyla oluşan GSSG’nin glutasyon redüktaz (GSSG-Rd) kataliziyle tekrar GSH’a dönüşmesi esnasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden 340 nm’de görülen absorbans azalmasının 4 dakika boyunca izlenmesi prensibine dayanır.



Kullanılan Reaktifler Sırasıyla:

Fosfat tamponu: 0,05 M (pH 6,8) (5mM EDTA içerir)

Redükte L-Glutasyon çözeltisi: 0,15 M

NADPH çözeltisi: 7,2 mM

Glutasyon Redüktaz çözeltisi: 100 U/mg protein/mL

Sodyum Azid çözeltisi: 2 M

Hidrojen Peroksit çözeltisi: 30 Mm

	Örnek (Doku Homojenizatu)
Fosfat Tamponu	2,65 mL
Redükte Glutasyon çöz.	0,1 mL
NADPH çözeltisi	0,1 mL
Glutasyon Redüktaz çözeltisi	0,01 mL
Sodyum Azid çözeltisi	0,01 mL
Numune	0,1 mL
Hidrojen Peroksit çözeltisi	0,1 mL

Çizelge 3.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçüm Protokolü

Hazırlanan çözelti 2 dakika 25 °C’de inkübe edildi. 340 nm’deki absorbansı ölçüldü ve ölçülen bu değere karşı spektrofotometre sıfırlandı. Bu çözelti üzerine 0,1 mL H₂O₂ çözeltisi eklendi. 2 dakika boyunca enzim aktivitesindeki düşüş incelendi [114]. Her numune ve kontrol tüpü için 2. ve 4. dakikalarda OD değerleri kullanıldı. ΔOD/dk değerleri hesaplandı. Sonra numune ΔOD /dk değerlerinden kontrol değerleri çıkarıldı. Net ΔOD /dk değerler elde edildi.

Hücre GSH-Px aktivitesi, miligram protein başına (U/mg protein) spesifik aktivite cinsinden verildi.

3.7.4.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

3.7.4.1.Deney Prensibi:

Oksidatif yolla enerji üretimi esnasında ortaya çıkan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm'de absorblanan renk ölçülmesi esasına dayanır [115].

Kullanılan Reaktifler Sırasıyla:

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılır, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülür. Bidistile su ile birlikte 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de bir hafta boyunca dayanıklı kalır.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alındı. Bidistile su ile birlikte 10 mL'ye tamamlanarak her deney zamanı taze olarak hazırlandı.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg Na₂EDTA. 2H₂O bidistile suda çözüldü. Ve 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃ bidistile suda çözüldü. Ve 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözüldü. 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözüldü. 10 mL ye tamamlanarak her deney zamanı taze olarak hazırlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na₂EDTA, 3 mL 400 mM Na₂CO₃, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırıldı. Her deney zamanı taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g (NH₄)₂SO₄ bidistile suda çözüldü. 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş (NH₄)₂SO₄ çözeltisinde çözüldü. 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg CuCl₂.2H₂O bidistile suda çözöldü. 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

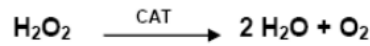
Deneyin Yapılışı:

2,85 mL SOD reaktifi örnek tüpüne ve kör tüpüne aktarılır. Örnek tüpüne 100 µL süpernatant eklendi. Her iki tüpe 50 µL ksantin oksidaz ilave edildi. Tüpler 20 dakika 25 °C'de inkübesi gerçekleştirildikten sonra tüplere 100 µL CuCl₂ çözeltisi ilave edildi.

En son aşama olarak kör tüpüne 100 µL süpernatant ilave edildi ve karıştırıldı. Kör tüpünün ve örnek tüpünün 560 nm'de absorbansları ayrı ayrı ölçöldü. SOD aktivitesi bulundu. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.7.5.Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz aktivite analizinde Aebi tarafından tarif edilen yöntem kullanıldı [116]. Yöntemin amacı, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240 nm' de gözlenmesidir.



Kullanılan Reaktifler Sırasıyla:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0,681 g KH₂PO₄ bidistile suda çözöldü. Ve 100 mL'ye tamamlanarak kullanıldı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2,77 g Na₂HPO₄.12H₂O bidistile suda çözöldü. 155 mL'ye tamamlanılarak kullanıldı.

Fosfat Tamponu (50 mM pH 7,0): A/B oranı 1/1,55 olacak şekilde karıştırılarak pH 7 olacak şekilde ayarlanarak hazırlandı.

Hidrojen Peroksid Çözeltisi (30 mM): 34 µl %30 luk H₂O₂ 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlanarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kuvarzt spektrofotometre küvetlerine 10 µL 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 µL fosfat tamponu eklendi. Örnek küvetine 1 mL 30 mM H₂ O₂ eklendi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma kör tüpe karşı 240 nm'de 1 dakika boyunca gözlendi. Spesifik aktivitesi ünite/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.8. Elektrobiyofiziksel Yöntem

Patch Clamp Yöntemiyle TRP Kanal Akımlarının Ölçülmesi

Elektrobiyofiziksel analiz için patch-clamp yönteminin tüm hücre modu kullanıldı. Ölçümler kontrol, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 NP uygulaması ile tüm gruplar için yapıldı. 70 mm'lik petri kaplarına ekimi gerçekleştirilen tek hücrelerden ekimden sonraki 1 ve 2 gün içinde kayıtlar alındı. Kayıt ortamında canlılığın devam etmesi ve kayıt alınabilmesi için banyo çözeltisi (mM) 130 NaCl, 5 CsCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES ve 5 glukoz, (pH 7.3 NaOH) hazırlandı. Kayıt alınmasında cam pipetlerin doldurulması için pipet çözeltisi (mM) 140 CsCl, 2 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 2,5 EGTA ve 10 HEPES, (pH 7.3 NaOH) hazırlandı. Boro silikat cam pipetler Sutter P97 model pipet çekicide çekilerek iç çapı 0,84 mm, dış çapı 1,5 mm mikropipetler elde edildi ve kayıt almada içerisine pipet çözeltisi doldurularak yama kenetleme sisteminde bulunan pipet tutucu kısmına takılarak kullanıldı. 2-6 M Ω aralığında elektrotlar elde edildi. Tüm gruplar için patch clamp analizi oda sıcaklığında ($\approx 22-25^\circ\text{C}$) gerçekleştirildi. Kayıtlarda, iki kanallı olan bilgisayar kontrollü Multi clamp 700B (Axon Instruments, ABD) amplifikatörü ve Digidata 1322A (Axon Instruments, ABD) sayısal çevirici kullanıldı. Uygun şekilde elde edilen pipetler CV-7B (Axon Instruments, ABD) model gerilim izlemesi yapan operasyonel amplifikatör pipet tutucu bölümüne takılarak Multiclamp 700B yükselteci ile bağlantısı oluşturuldu. Kayıtlar esnasında hücre ile pipetin takibi için BM-37XB (U-Therm International (H. K.) Limited), invert mikroskop kullanıldı. Ölçümler Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı tarafından kayıtlandı. Kenetleme direnci hücre zarına protokol uygulaması ile akım kaydı alınarak, Clamp fit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edilerek değerlendirildi. (Şekil 3.4) Hücre ile pipet arasında 1-10 G Ω mühürleme direnci elde edildikten sonra zar potansiyeli -40 mV'a kenetlendi. Stimülasyon için 500 ms süreli rampa kullanıldı. Rampa -140 mV'dan başlayıp +60 mV'a kadar arttırıldı. TRP akımları kayıtlanarak her grup için maksimum akım değerleri ölçüldü.



Şekil3.4.Patch Clamp Düzenegi

3.9. Konfokal Mikroskop Fluo 4-AM ile Hücre İçi Ca^{+2} Derişiminin Ölçülmesi

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu (Zeiss LSM 700) ile hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değişiklikleri F14201 kodlu ThermoFisher marka Fluo 4 AM kullanılarak elde edildi. Her biri 50 μ g olmak üzere toplam 10 tüp Fluo 4 AM $-20^{\circ}C$ de tutuldu. Mw (Molekül ağırlığı)= 1096,95 g/mol 1 L=1000 mL çözücü içinde 1096,95 g Fluo 4AM çözersek 1 M solüsyon elde edildi. Stok solüsyon DMSO içinde 1 mM olacak şekilde hazırlandı, bunun için:

$$X = 1000 \times 50 / 1096000 = 0,045 \text{ mL} = 45 \text{ } \mu\text{L} \text{ hacimde 1 mM çözelti elde edildi.}$$

Çalışma solüsyonu olarak 10 μ M çözelti kullanıldı. Bunun için 1 mM çözeltiyi 100 kat sulandırılarak istenilen konsantrasyon (1mM= 1000 μ M) 45 μ L çözelti 4455 μ L (4,45mL) HBSS+ tamponu ile (HBSS+10mM HEPES+10 mM Glikoz) sulandırılarak hazırlandı. Deneye hazırlık aşamasında; deneyden 2 gün önce: 96 kuyulu petrilerin sadece 1'er kuyusuna kuyu başına 3000 hücre ekildi. Tedbir olarak 2'şer kuyuya da yedek hücreler ekildi. Deney günü: toplamda 12 adet 96-well-plateler ile;

- Kontrol (herhangi bir uygulamanın olmadığı)
- D1= Düşük doz (50 μ g/mL) SiO_2 Np uygulandı.
- D2= Orta doz (100 μ g/mL) SiO_2 Np uygulandı.
- D3= Yüksek doz (150 μ g/mL) SiO_2 Np uygulandı.

Tek bir plate için 1 adet kontrol kuyusu ve bunun gibi 3 adet plate oluşturuldu. Aynı şekilde D1 için her platete 1 kuyu olmak üzere 3 plate ve benzer şekilde D2, D3 grupları içinde gerçekleştirildi. Her grup için 3 plate ve her platete o gruba ait 1 kuyu hücre ile ekilmiş oldu. Deney günü uygun miktarda Fluo 4 AM stoğundan alınarak ilk kuyuya eklendi. Her kuyuda Fluo 4 AM süresi 60 dakikadır. (Çizelge 3.5) Son beş dakika kala deney gruplarına belirlenen dozda SiO_2 NP uygulandı. Ve beş dakika dolunca 15 dk görüntüleme yapıldı. Bu durumda ikinci plate Fluo 4 AM, ilk plate e konulduğu saatten 20 dakika sonra yerleştirildi.

	Fluo 4 AM	SiO_2 Nanopartikül	Görüntüleme
İlk plate Kontrol	13:30	<u>Yok</u>	14:30
2. plate Kontrol	13:50	<u>Yok</u>	14:50
3. plate Kontrol	14:10	<u>Yok</u>	15:10
4.plate D1= 50 μg/mL	14:30	15:25 (50 μ g/mL)	15:30
5. plate D1=50 μg/mL	14:50	15:45 (50 μ g/mL)	15:50
6. plate D1= 50 μg/mL	15:10	16:05 (50 μ g/mL)	16:10
7. plate D2=100 μg/mL	15:30	16:25 (100 μ g/mL)	16:30
8. plate D2=100 μg/mL	15:50	16:45 (100 μ g/mL)	16:50

9. plate D2= 100 µg/mL	16:10	17:05 (100 µg/mL)	17:10
10. plate D3=150 µg/mL	16:30	17:25 (150 µg/mL)	17:30
11. plate D3= 150 µg/mL	16:50	17:45 (150 µg/mL)	17:50
12. plate D3=150 µg/mL	17:10	18:05 (150 µg/mL)	18:10

Çizelge 3.5. ARPE 19 Hücre Hattı Üzerindeki SiO₂ NP'lerinin Fluo 4AM ile Görüntüleme-Zaman Aralıkları

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

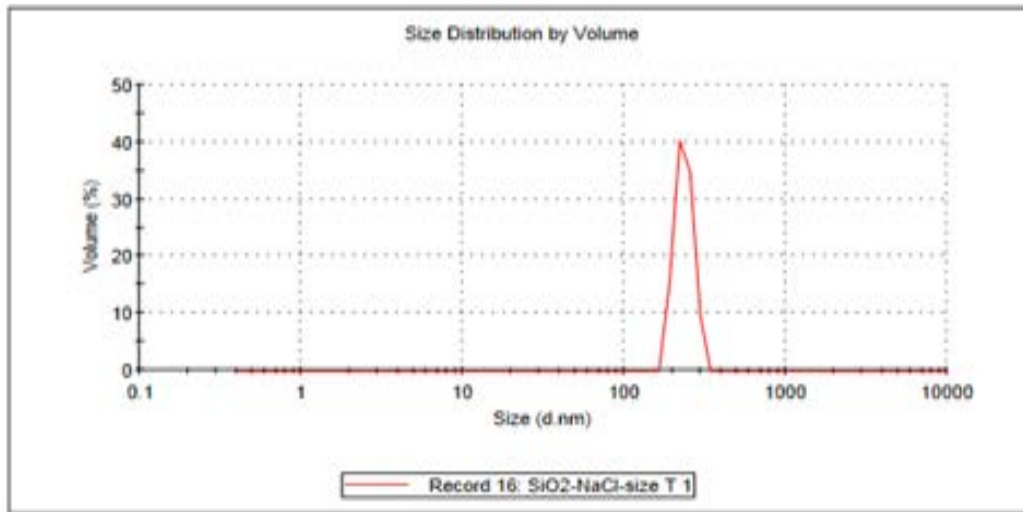
Verilerin analizi için SPSS (IBM version 20, İstanbul, Türkiye) istatistiksel paket program kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov testiyle, ölçülen tüm değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu gösterildikten sonra gruplararasıdaki karşılaştırmalar için ANOVA testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar LSD ile yapıldı. İstatistiksel önemliliğin sınırı $p < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

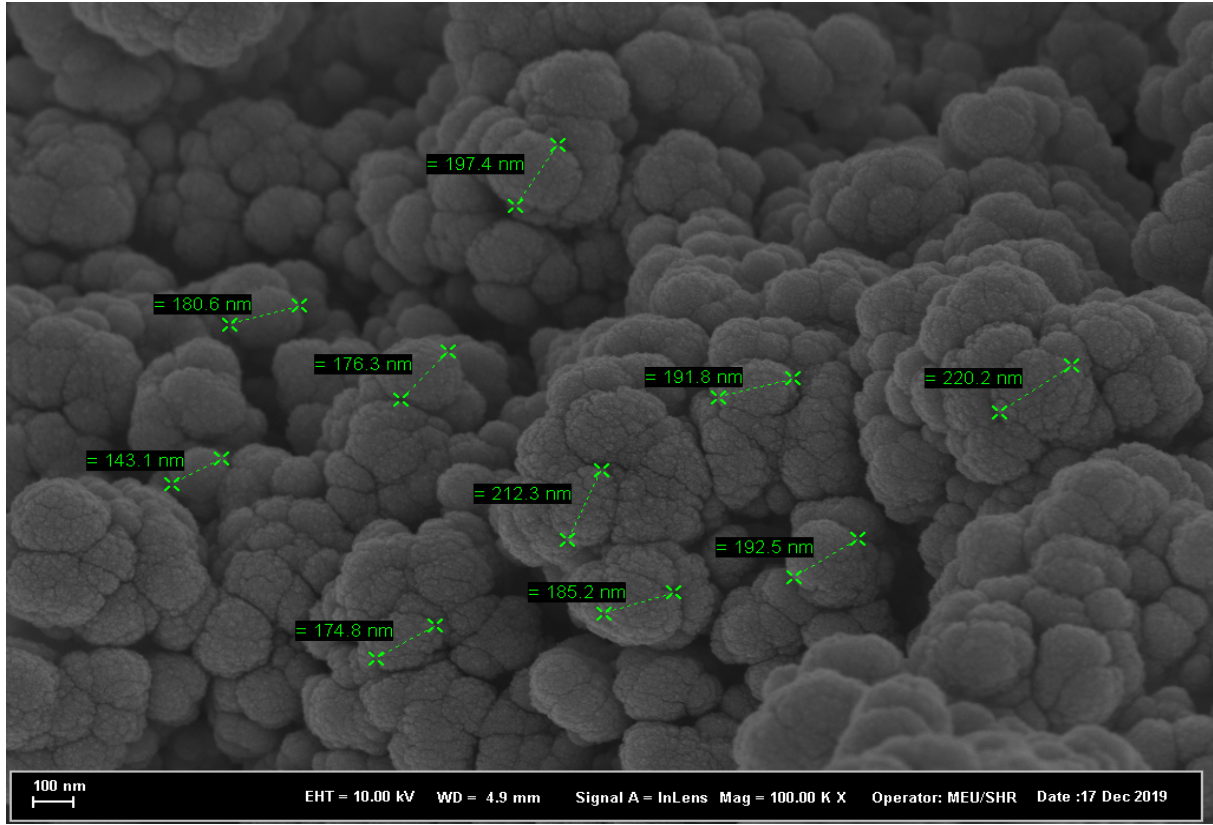
4.1. SiO₂NP'lerinin Karakterizasyonu

4.1.1. Zeta potansiyeli, FE-SEM ve XRD İncelemesi

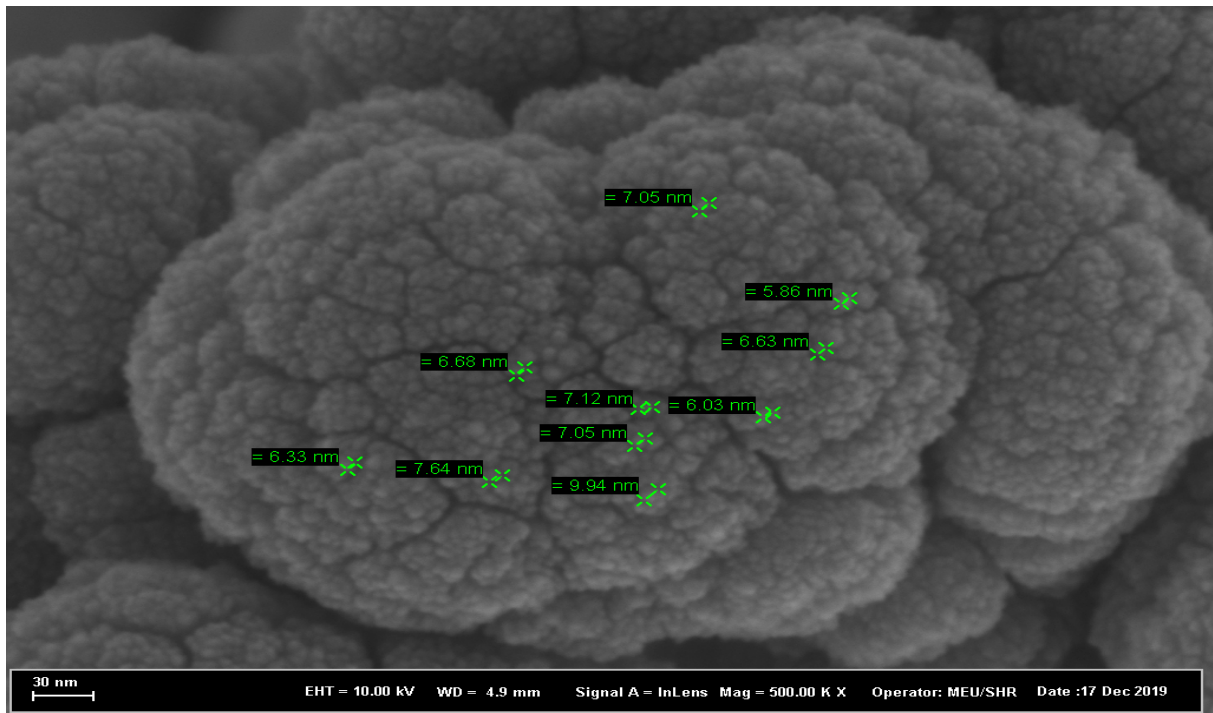
Zetasizer cihazı ile SiO₂ NP'leri üzerinde yapılan inceleme sonucunda, SiO₂ NP'lerinin zeta potansiyeli -156 mV, iletkenliği 14,5 mS/cm ve hidrodinamik çapı 235,1 nm olarak belirlendi. (Şekil 4.1) Ölçümler 25°C sıcaklıkta yapıp ortalaması alınarak hesaplandı. SiO₂ NP'leri bir araya gelme eğiliminde olan yapılardır. FESEM cihazı ile yapılan ölçümlerde SiO₂ NP'lerin çapı alınan ölçümlerin ortalaması alınarak yaklaşık 7,50±0,12 nm (Şekil 4.3) bulundu. Ölçüm sonucu üretici firmanın NP boyutu ile uyumluluk gösterdi. Yapılan boyut analizleri ve FESEM cihazından alınan görüntüler birbiri ile uyumlu bulundu. FE-SEM analizi sonucunda aglomera eğilimi nedeniyle alınan sonuçların ortalama değeri elde edildi. (Şekil 4.4) XRD cihazı ile yapılan incelemede; numunenin amorf yapıda olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.5) XRD sonuçları SiO₂ NP'lerin genel özellikleri ile uyumlu bulundu.



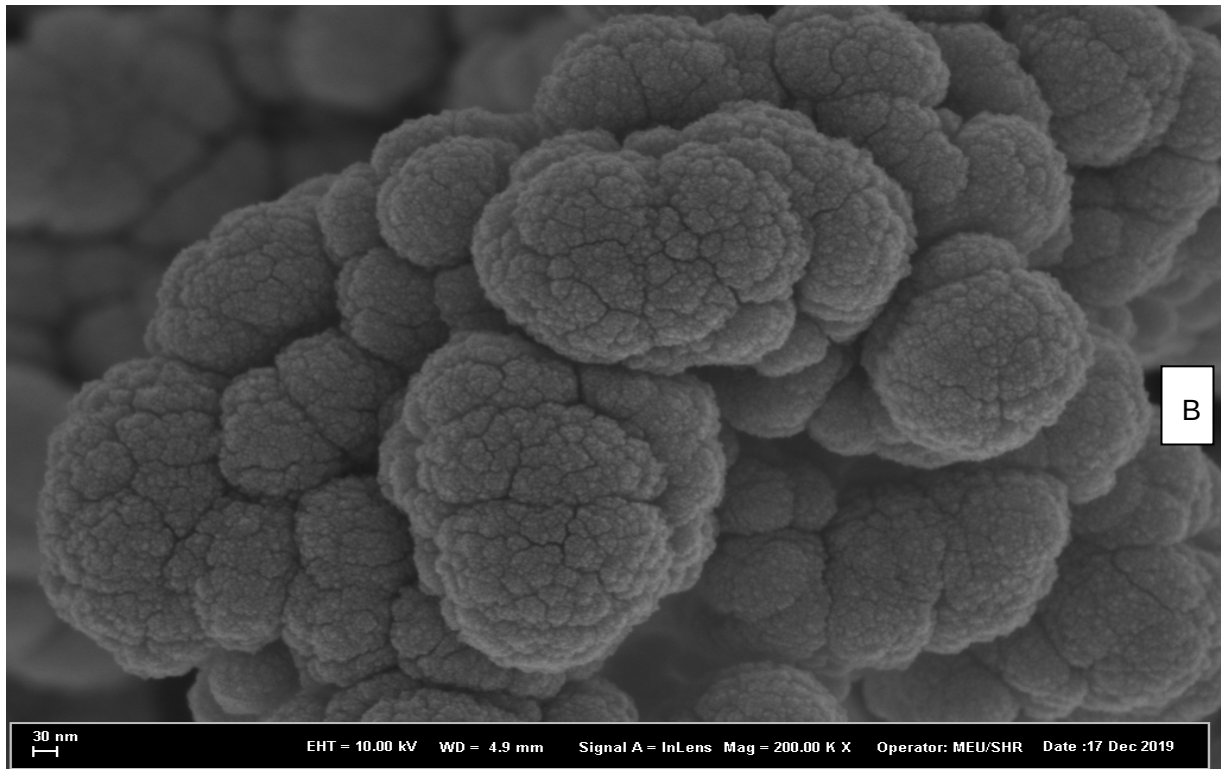
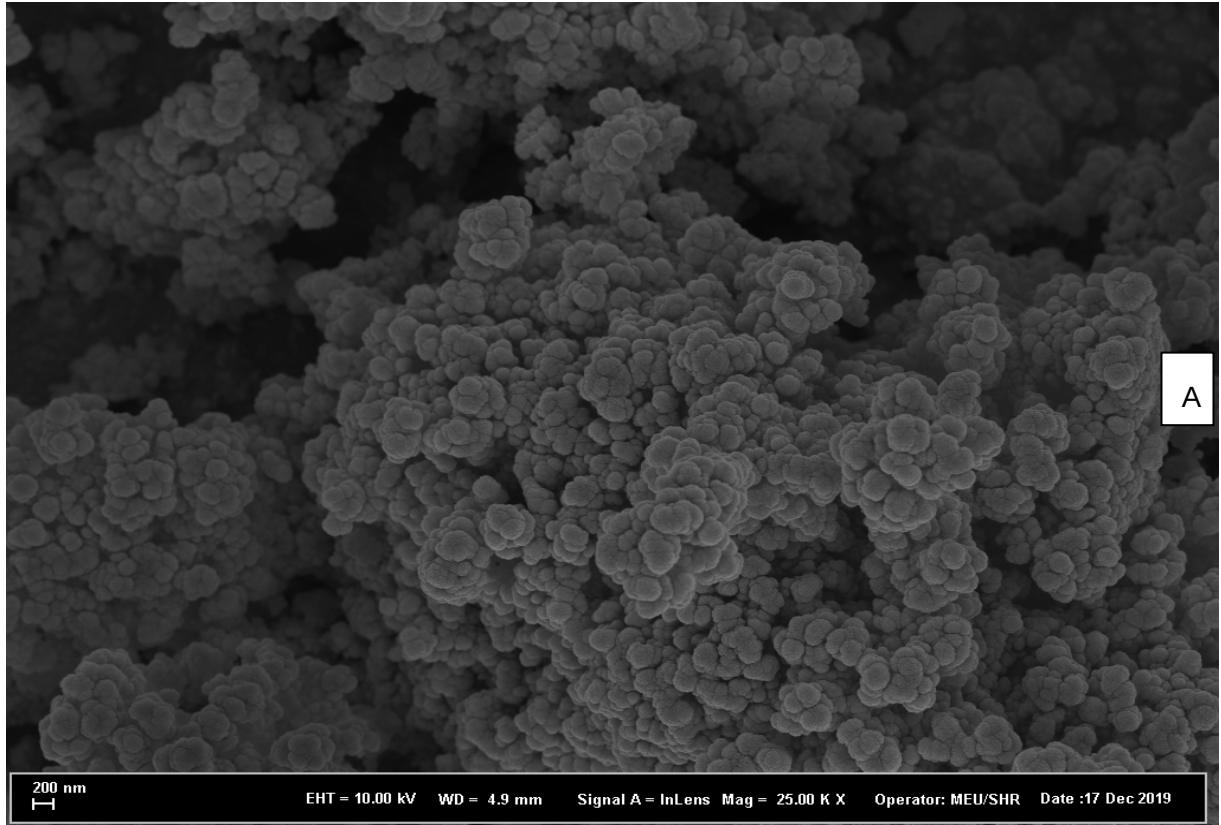
Şekil 4.1. Zetasizer Ölçüm Sonucu NP Büyüklüğü Diagramı



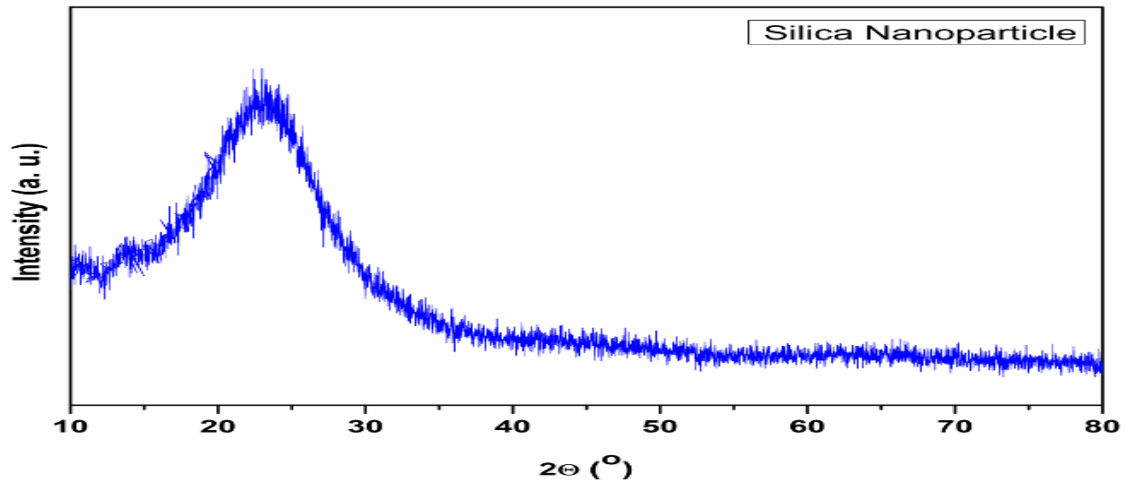
Şekil 4.2. Agromela Olan SiO₂ NP'lerin Boyut Ölçümleri



Şekil 4.3. Agromela Olmadan Önceki SiO₂ NP'lerin Boyut Ölçümleri



Şekil 4.4.Farklı Büyütme Oranlarıyla SiO₂ NP'lerin FESEM Görüntüleri. (A, B)



Şekil 4.5. SiO₂ nanoparçacıklarının kristal yapısının XRD ile analizi. 2θ=20° civarında olması SiO₂ nanoparçacıklarının amorf yapısına işaret etmektedir.

4.2.Sitotoksosite Analiz Sonuçları

xCELLigence yöntemi sonucunda yapılan sitotoksosite analizinde sitotoksositeyi değerlendirebilmek için canlı hücre sayısının bir göstergesi olan hücre indeksi değeri hesaplandı. Hücre indeksi SiO₂ NP'lerine maruziyetten 24 saat sonrası için hesaplandı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Kontrol ve doz grupları için SiO₂NP uygulamadan önce hücre indeksi değerleri kontrol grubunda 2.70 ± 0.45, 50 µg/mL SiO₂ grubunda 2.96 ± 0.33, 100 µg/mL SiO₂ grubunda 2.90 ± 0.43 ve 150 µg/mL SiO₂ grubunda 2.98 ± 0.35 olarak elde edildi. SiO₂ NP uygulanmadan önce hücre canlılığı değerlerinde gruplar arasında önemli bir fark gözlenmedi.(p>0.05).

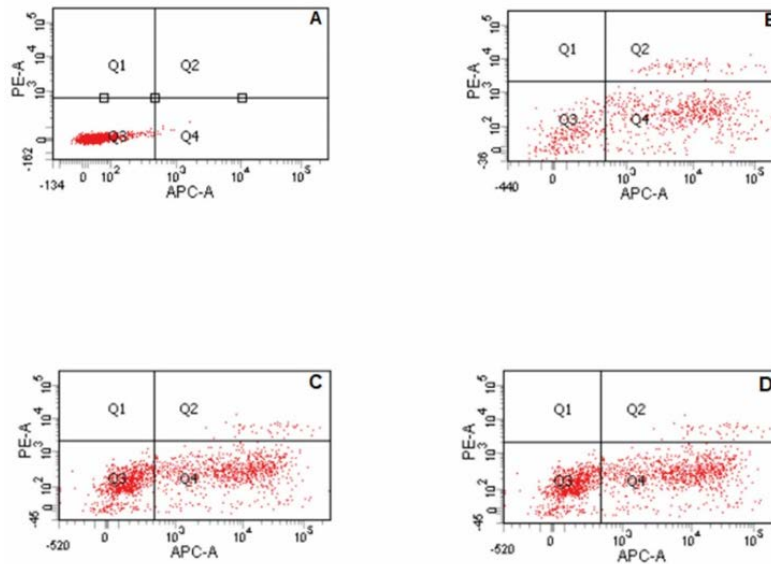
Kontrol ve doz grupları için SiO₂ NP uygulamasından 24 saat sonra hücre indeksi kontrol grubunda 4.45 ± 0.83, 50 µg/mL SiO₂ grubunda 3.66 ± 0.52, 100 µg/mL SiO₂ grubunda 2.49 ± 0.23 ve 150 µg/mL SiO₂ grubunda 1.87 ± 0.28 olarak hesaplandı. SiO₂ NP uygulanmasından 24 saat sonra hücre indeksi değeri doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azaldı. (p<0.05). SiO₂ NP uygulamadan önce ve sonra için karşılaştırma yapıldığında ise doz grupları arasında fark anlamlı bulundu. (p<0.05). (Tablo4.1)

Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Hücre Canlılığının SiO₂ NP Öncesi ve SiO₂ NP uygulanmasından 24 Saat Sonraki Değerlerinin Değişimi^a kontrol grubu ile ^b50 µg/mL grubuyla karşılaştırıldığında ve ^c 100 µg/mL grubuyla karşılaştırıldığında p<0.05.

Grup	SiO ₂ NP öncesi	24 saat sonra
Kontrol	2.70±0.45	4.45±0.83
50 µg/mL SiO ₂	2.96±0.33	3.66±0.52 ^a
100 µg/mL SiO ₂	2.90±0.43	2.49±0.23 ^{a,b}
150 µg/mL SiO ₂	2.98±0.35	1.87±0.28 ^{a,b,c}

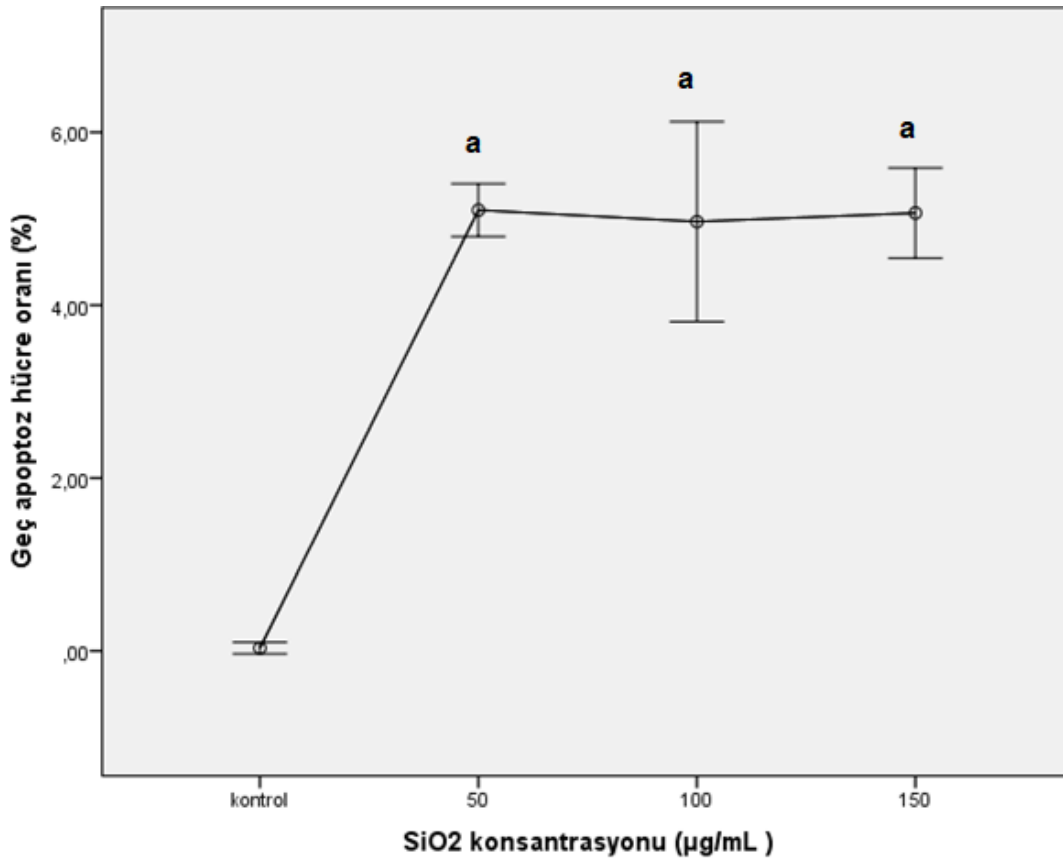
4.3. Apoptoz (Hücre Yüzeyinde Annexin-V-FITC ile) Sonuçları

ARPE 19 hücreleri T25 flaskta hücreler konfluent olduğunda kontrol grubu ve 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL konsantrasyonlarda SiO₂ NP'lerine 24 saat boyunca maruz bırakıldı. Annexin-V-FITC kiti ile yapılan boyama ile hücre süspansiyonları cihazda okutuluncaya kadar +4°C'de bekletildi ve okumadan sonra apoptotik aktivite değerlendirildi. Elde edilen diyagramlarda Q1=Nekrotik hücre, Q2=Geç apoptoz, Q3= Canlı hücre, Q4=Erken apoptozu temsil etmektedir. (Şekil 4.6). Ortalamalar % olarak ve ± standart sapma olarak verildi.

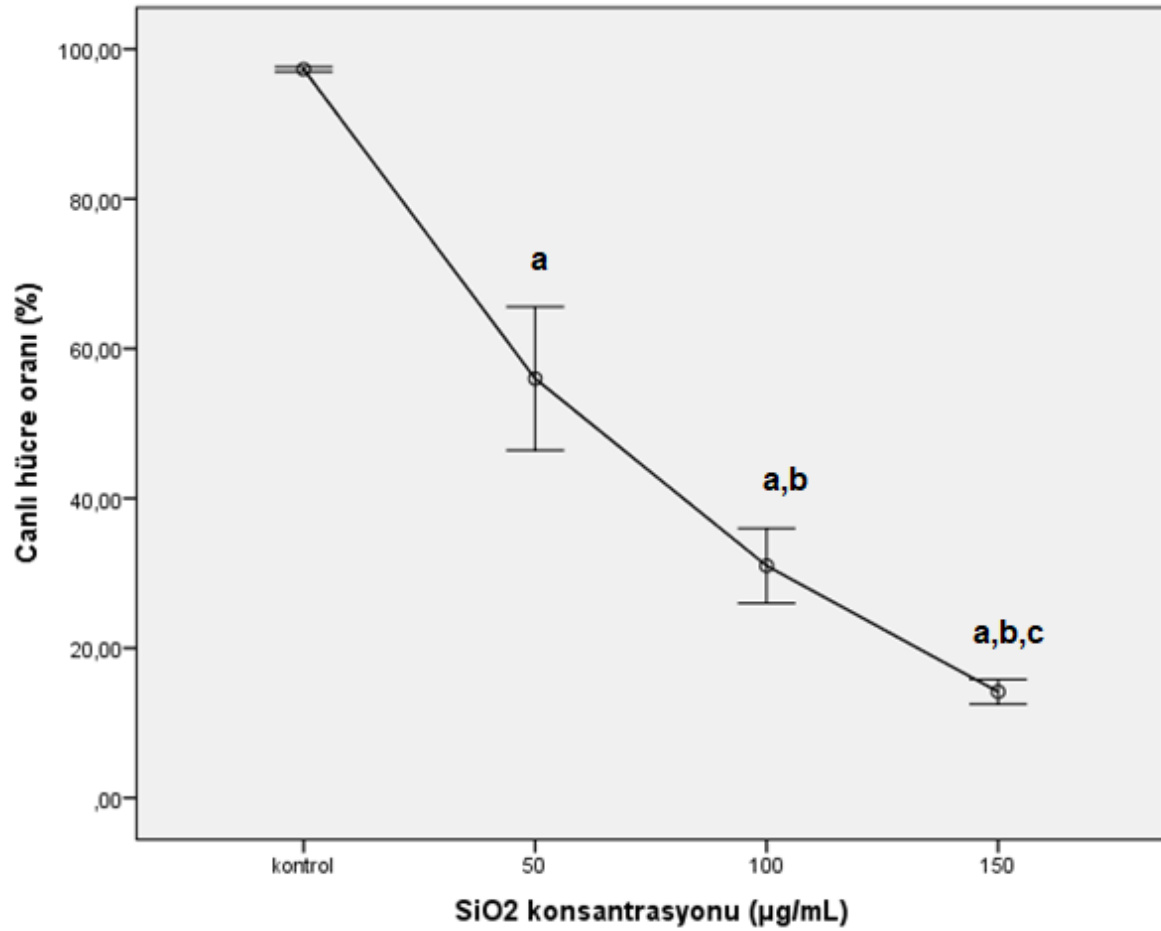


Şekil 4.6. SiO₂ NP'lerinin ARPE 19 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik etkisi (A) kontrol, (B) 50 µg/mL (C), 100 µg/mL ve (D) 150 µg/mL SiO₂ NP grubu Q1: Nekrotik hücreler; Q2: Geç apoptoz; Q3: Canlı hücreler; Q4: Erken apoptoz. Şekilden de görüldüğü gibi SiO₂ NP'leri ARPE-19 insan retinal pigment epitel hücrelerinde apoptoza giren hücre oranını artırmıştır.

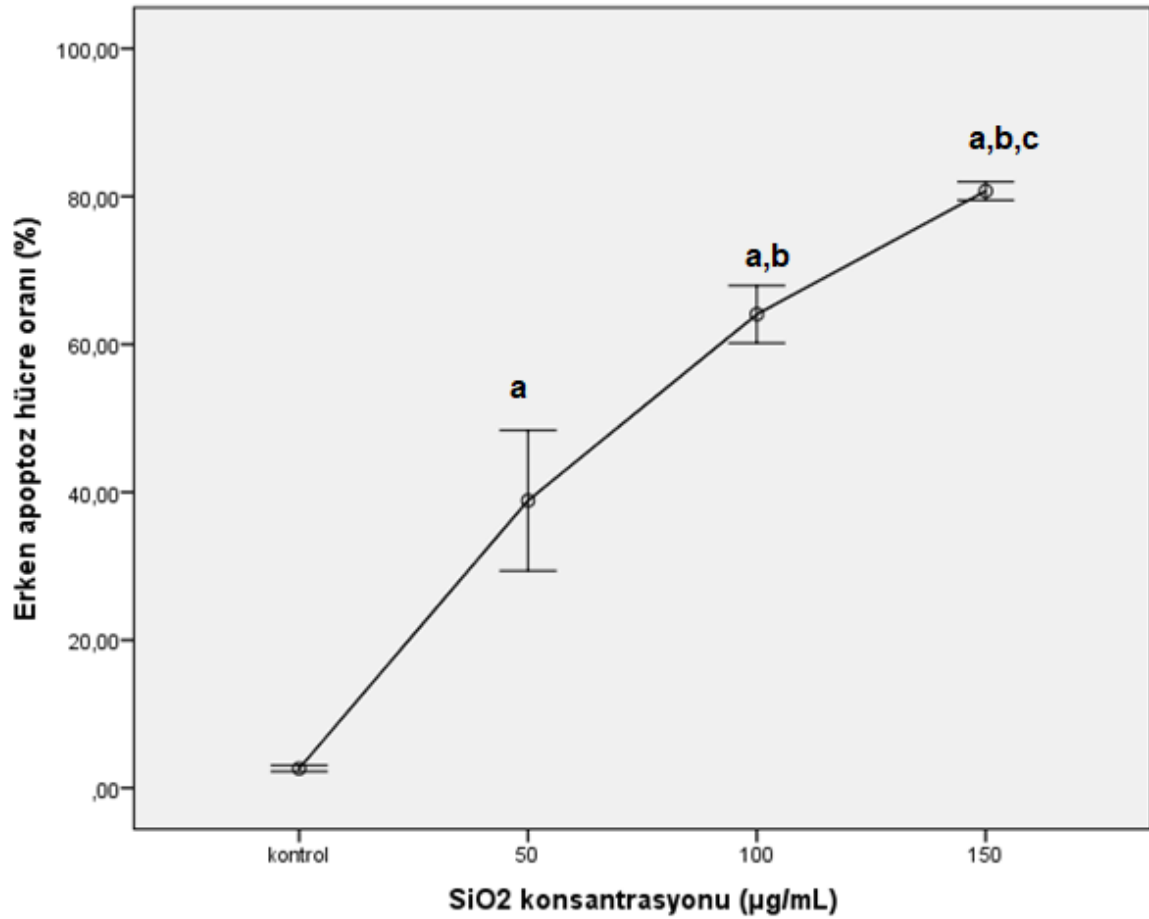
ARPE 19 hücrelerinde kontrol ve 50 µg/ mL, 100 µg/ mL ve 150 µg/ mL SiO₂ NP uygulanan doz grupları arasında nekrotik hücre (Q₁) görülmedi. Geç apoptoz (Q₂) hücre oranı; Kontrol grubunda %0,33 ± 0,05, 50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda % 5,10 ± 0,26, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda %4,96 ± 1,00, 150 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %5,06 ± 0,45 olarak bulundu. Doz gruplarında geç apoptozda kontrole göre önemli oranda artış gözlemlendi. (p<0.05). Doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. (Şekil 4.7). Canlı hücre oranı (Q₃); Kontrol grubunda %97,3 ± 0,30, 50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %56,0 ± 8,28, 100 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda % 31,0 ± 4,33 ve 150 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %14,1 ± 1,42 olarak saptandı. (Şekil 4.8) Hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla artan doz miktarı ile önemli oranda azaldığı gözlemlendi. (p<0.05) Doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (p<0.05) Erken apoptoz giren hücre oranı (Q₄); kontrol grubunda %2,63 ± 0,35, 50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %38,8 ± 8,22, 100 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %64,0 ± 3,36, 150 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda %80,7 ± 1,06 olarak belirlendi. Doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (p<0.05) (Şekil 4.9)



Şekil 4.7. Akım sitometride Annexin V (+) ve PI (+) boyanan geç apoptoz giren hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama ± standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Geç apoptoz giren hücre oranı tüm dozlarda kontrole göre artmıştır. Ancak bu artış doza bağlı değildir. (^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05).



Şekil 4.8. Akım sitometride Annexin V (-) ve PI (-) boyanan canlı hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi canlı hücre oranı SiO₂ konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. (^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$; ^b50 µg/mL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ ve ^c100 µg/mL ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$).



Şekil 4.9. Akım sitometride Annexin V (+) ve PI (-) boyanan erken apoptoza giren hücrelerin gruplara göre dağılımı. Barlar ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine karşılık gelmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi erken apoptoza giren hücre oranı SiO₂ konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. (^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$. ^b50 µg/mL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$. ^c100 µg/mL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$).

4.4. Biyokimyasal Yöntemler

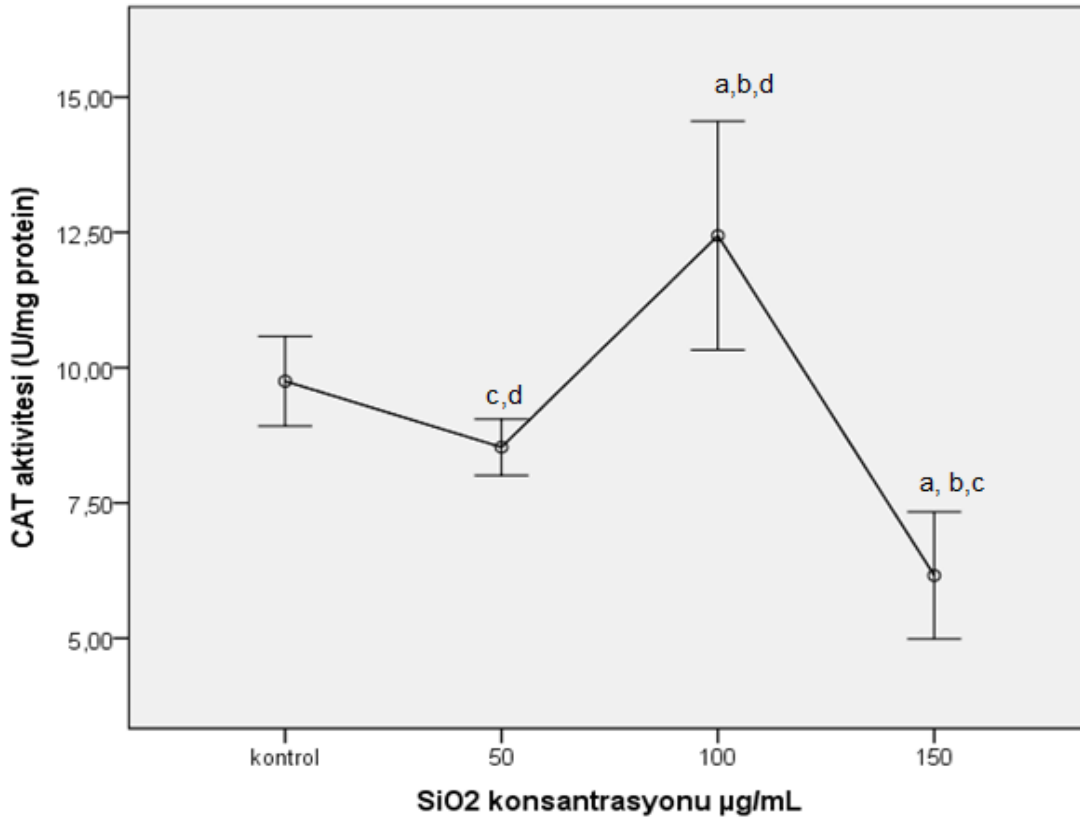
4.4.1. ARPE 19 Hücreleri Üzerinde SiO₂ NP'lerinin Etkilerinin Biyokimyasal Değerlendirilmesi

ARPE 19 hücrelerinde ortalama CAT düzeyi (U/mg protein); kontrol grubunda $9,75 \pm 0,71$, 50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda $8,52 \pm 0,44$, 100 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda $12,4 \pm 1,83$, 150 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda $6,15 \pm 1,01$ olarak bulundu. CAT aktivitesinde 50 µg/mL doz grubunda kontrole göre önemli bir fark görülmezken 100 µg/ mL doz grubunda kontrole göre önemli oranda arttı. 150 µg/ mL doz grubunda ise kontrole göre önemli oranda azaldı. (Şekil 4.10). Dozlar arasındaki fark önemli bulundu.

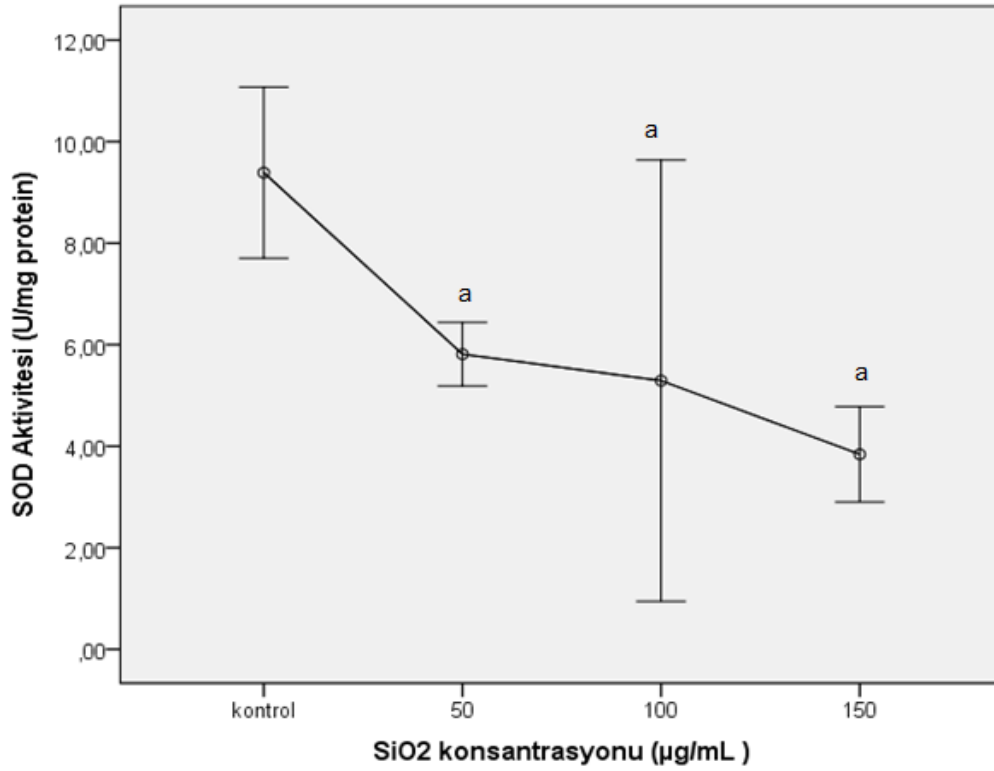
ARPE 19 hücrelerinde ortalama SOD düzeyi (U/ mg protein); kontrol grubunda $9,38 \pm 1,45$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $5,81 \pm 0,54$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $5,29 \pm 3,76$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $3,84 \pm 0,81$ olarak bulundu. Tüm doz gruplarında kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). (Şekil 4.11). Dozlar arasındaki fark önemli bulunmadı.

ARPE 19 hücrelerinde ortalama MDA düzeyi (nmol/ mg protein); kontrol grubunda $18,0 \pm 0,82$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $32,9 \pm 1,91$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $39,1 \pm 3,08$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $67,7 \pm 2,54$ olarak saptandı. Tüm doz gruplarında kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$). (Şekil 4.12). Dozlar arasındaki fark da önemliydi.

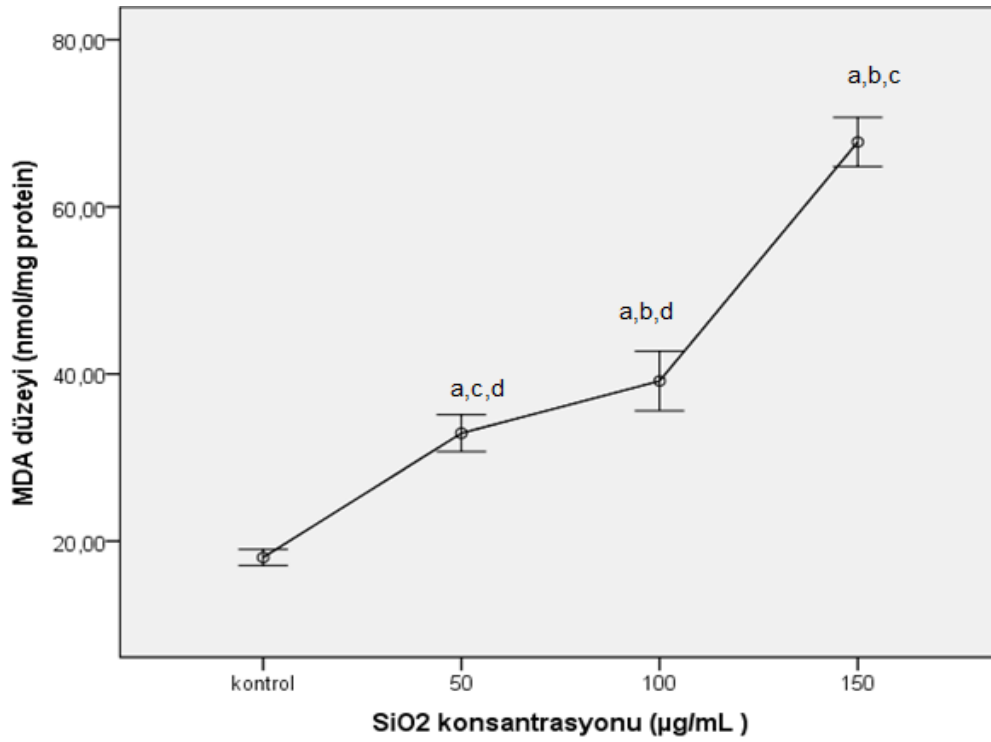
ARPE 19 hücrelerinde ortalama GSH düzeyi (U/ mg protein); kontrol grubunda ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $35,0 \pm 1,57$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $31,3 \pm 0,63$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 NP doz grubunda $23,9 \pm 1,23$ kontrolle ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kıyasla azalma gözlemlendi. Tüm doz gruplarında kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). (Şekil 4.13). Dozlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu.



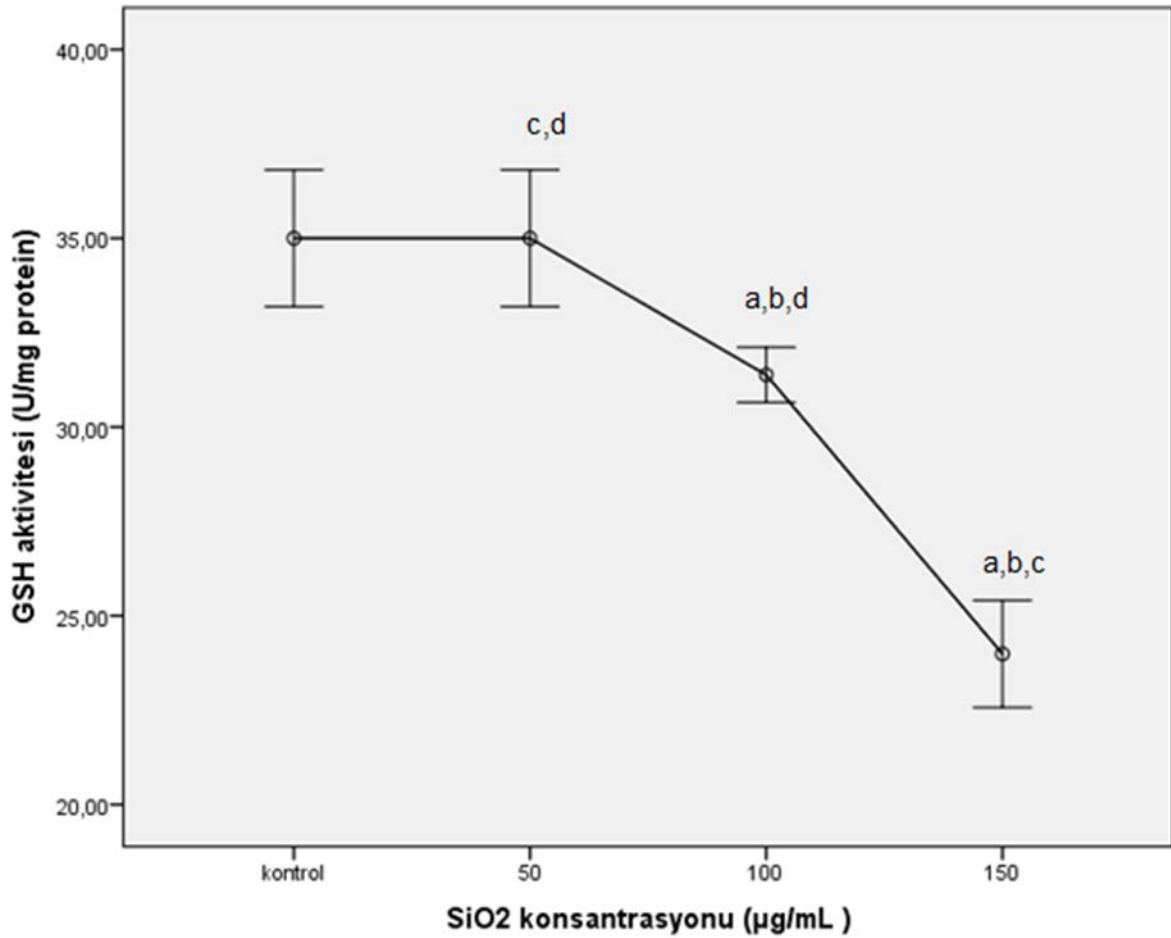
Şekil 4.10. Ortalama CAT Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 'den farklı, c: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 'den farklı, d: 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SiO_2 'den farklı ($p < 0.05$)



Şekil4.11. Ortalama SOD Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 µg/mL SiO₂'den farklı, c: 100 µg/mL SiO₂'den farklı, d;150 µg/mL SiO₂'den farklı (p<0.05)



Şekil4.12. Ortalama MDA Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 µg/mL SiO₂'den farklı, c: 100 µg/mL SiO₂'den farklı, d;150 µg/mL SiO₂'den farklı (p<0.05)



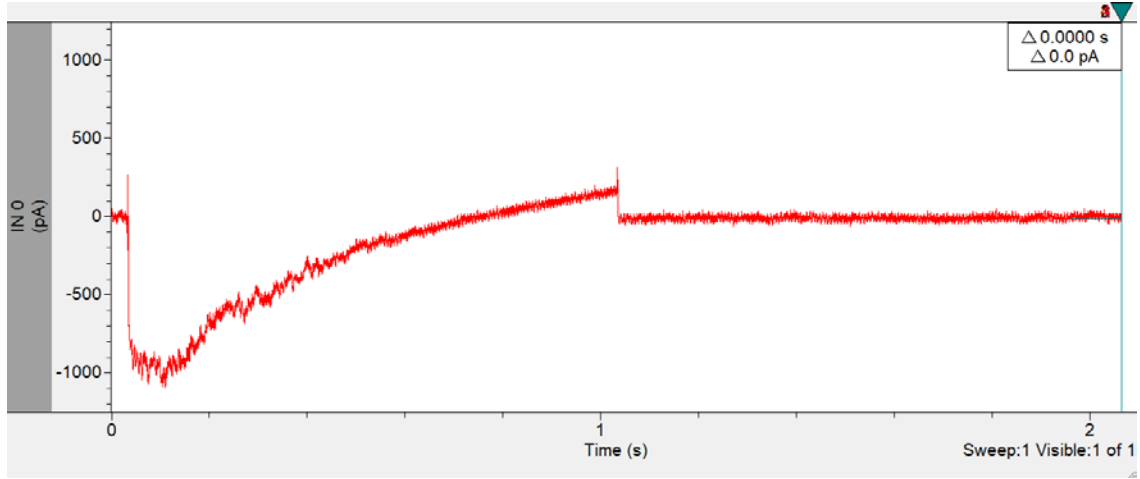
Şekil4.13. Ortalama GSH Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi. a: kontrolden farklı, b: 50 µg/mL SiO₂'den farklı, c: 100 µg/mL SiO₂'den farklı, d;150 µg/mL SiO₂'den farklı (p<0.05)

4.5.Elektrobiyofiziksel Kayıtlar

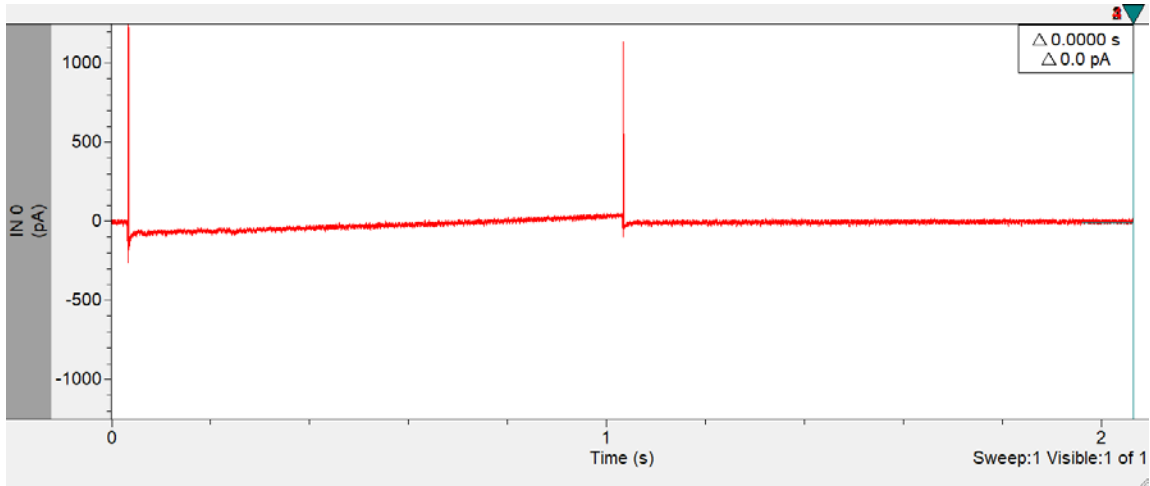
Patch Clamp Yöntemiyle TRP Kanal Akımlarının Kayıtlanması

Patch clamp deneylerinde belirlenen kenetleme protokolünün uygulanması sonucunda zar akımları kaydedildi. SiO₂ NP'lerin Ca²⁺ kanalında bir blokaj yapıp yapmadığını değerlendirildi. Tüm doz grupları için, SiO₂ NP uygulanmadan önce ve 50, 100, 150 µg/ mL doz uygulandıktan sonra olmak üzere her bir hücreden toplamda 6 defa kayıt alındı.

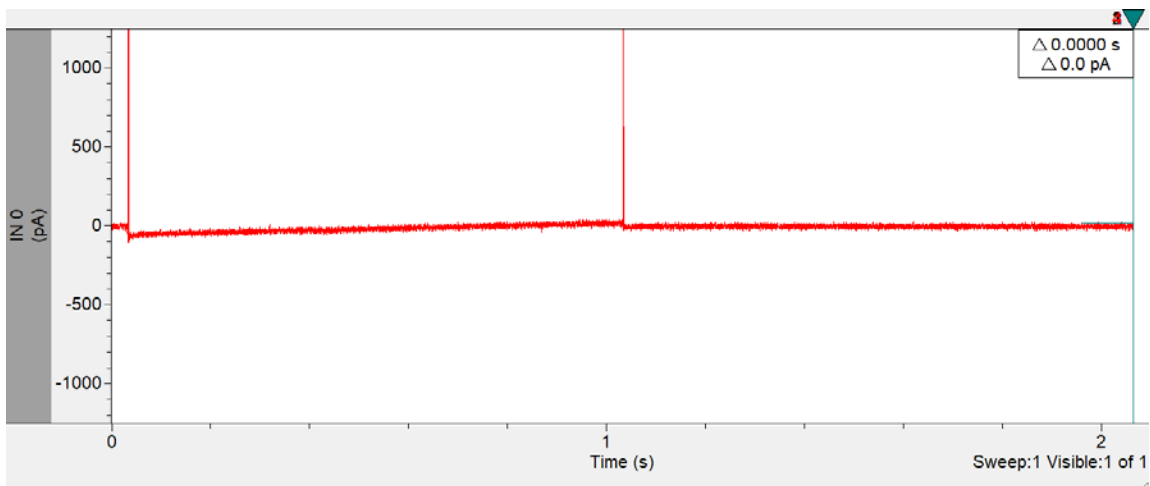
Kontrol grubu için ortalama maksimum akım değeri 855,27 ± 193,26 pA, 50 µg/mL doz grubunda 58,33 ± 15,75 pA, 100 µg/mL doz grubunda 61,87 ± 54,01 pA, 150 µg/mL doz grubunda 45,22 ± 31,17 pA olarak bulundu. Tüm doz grupları kontrolden farklı gözlemlendi. Akım değeri kontrole göre önemli oranda azaldı (p<0.05). Ancak doza bağlı bir değişiklik gözlenmedi.



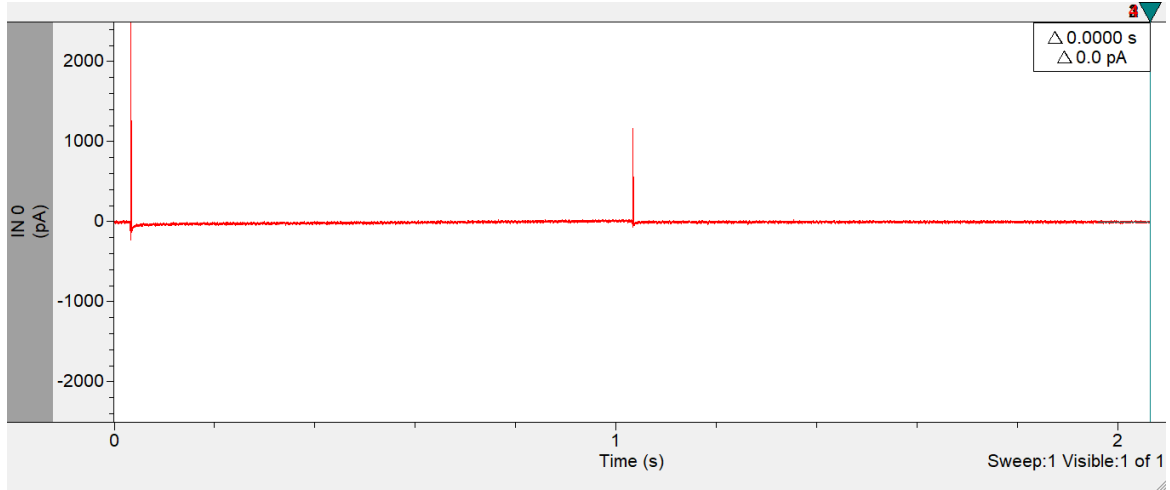
Şekil 4.14. Kontrol Grubu İçin TRP Kanal Akım Kayıt Örneği



Şekil 4.15. 50 µg/ mL SiO₂ Grubu için TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek



Şekil 4.16. 100 µg/ mL SiO₂ Grubu için TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek



Şekil 4.17. 150 µg/mL SiO₂ Grubu İçin TRP Kanal Akımlarından Bir Örnek

4.6. Hücre Döngüsü Sonuçları

4.6.1. SiO₂ NP Uygulamasından 24 Saat Sonra Hücre Döngüsü Analizi ile DNA Hasarının Gösterilmesi

Hücre döngüsü analizi; ARPE 19 hücre hattı üzerinde SiO₂ NP maruziyeti sonucunda anormal DNA'lı hücre hatlarını belirlemede ve hücre döngüsü faz dağılımlarını göstermek için kullanıldı. BD FACS ARIA III akım sitometri cihazı ile kullanılarak gerçekleştirildi. ModFit LT yazılımı ile analiz edildi.

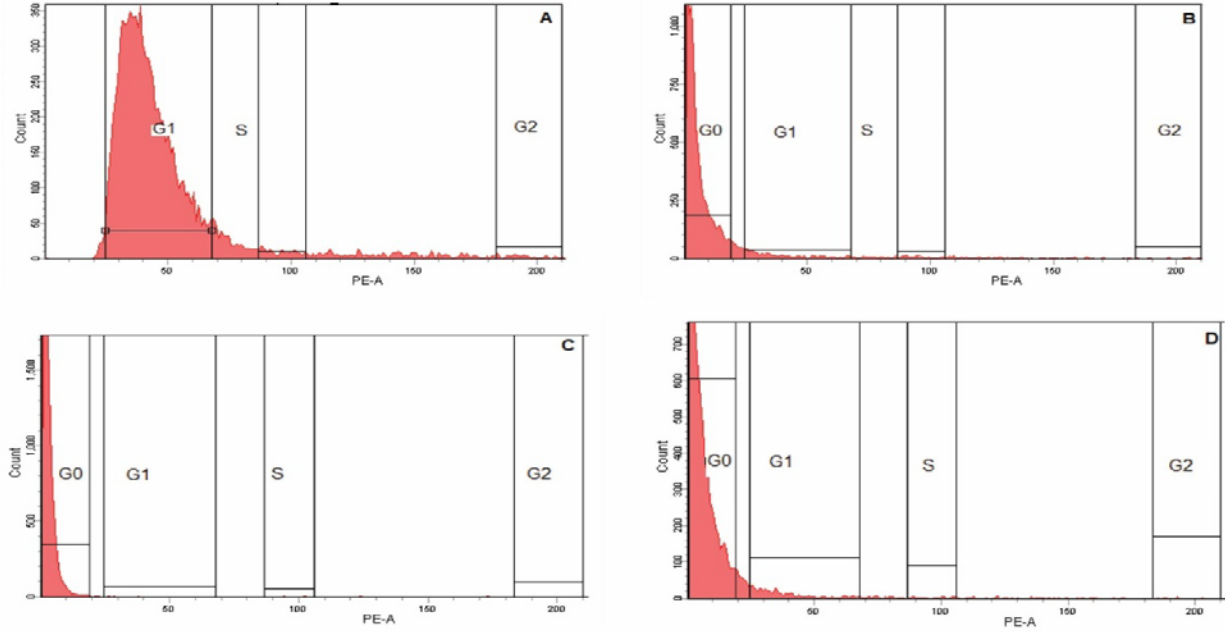
ARPE 19 hücre hattında SiO₂ NP uygulamasından 24 saat sonra akım sitometri yöntemi ile hücre döngüsü faz dağılımı elde edildi. (Şekil 4.18)

SiO₂ NP uygulandıktan 24 saat sonra G₀ fazındaki hücrelerin oranı kontrol grubunda % 0,35 ± 0,07, 50 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 82,43 ± 7,70, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 88,26 ± 1,19 ve 150 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 74,7 ± 7,18 değeri elde edildi. G₀ fazındaki hücre oranı doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli oranda yüksek bulundu. (p<0.05). Doz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. (p>0.05).

G₁ fazındaki hücrelerin oranı kontrol grubunda %79,65 ± 0,49, 50 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 3,80 ± 0,35, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 1,66 ± 0,37 ve 150 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 3,43 ± 1,69 bulundu. G₁ fazındaki hücre oranı doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma anlamlı bulundu. (p<0.05). Doz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. (p>0.05).

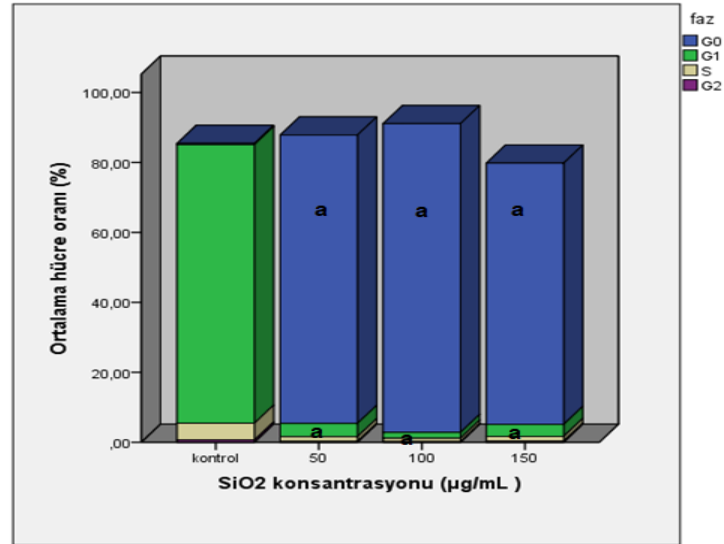
S fazındaki hücrelerin oranı kontrol grubunda % 4,80 ± 2,70, 50 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda %1,33 ± 0,88, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 0,96 ± 0,11 ve 150 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % 1,36 ± 0,70 bulundu. S fazındaki hücre oranı doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma anlamlı bulundu (p<0.05). Doz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05).

G₂ fazındaki hücrelerin oranı kontrol grubunda % $0,65 \pm 0,07$, 50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubunda % $0,26 \pm 0,15$, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % $0,2 \pm 0,001$ ve 150 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda % $0,31 \pm 0,15$ bulundu. G₂ fazındaki hücre oranı doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma görüldü. ($p < 0,05$). Doz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.18.SiO₂ uygulandıktan 24 saat sonra akım sitometri ile hücre döngüsü analizi.

Şekilde G₀, G₁, S ve G₂ hücre döngüsünün fazlarını göstermektedir. (A) kontrol grubu, (B) 50 µg/ mL SiO₂, (C) 100 µg/ mL SiO₂ ve (D) 150 µg/ mL SiO₂ grubu için hücre döngüsünü temsil etmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi kontrol grubunda hücrelerin büyük çoğunluğu G₁ fazında iken SiO₂ uygulanmış hücrelerde hücrelerin en büyük kısmının G₀ fazındadır. A=Kontrol grubu, B=50 µg/ mL SiO₂ NP doz grubu, C=100 µg/ mL SiO₂ NP doz grubu,D=150 µg/ mL SiO₂ NP doz grubu.

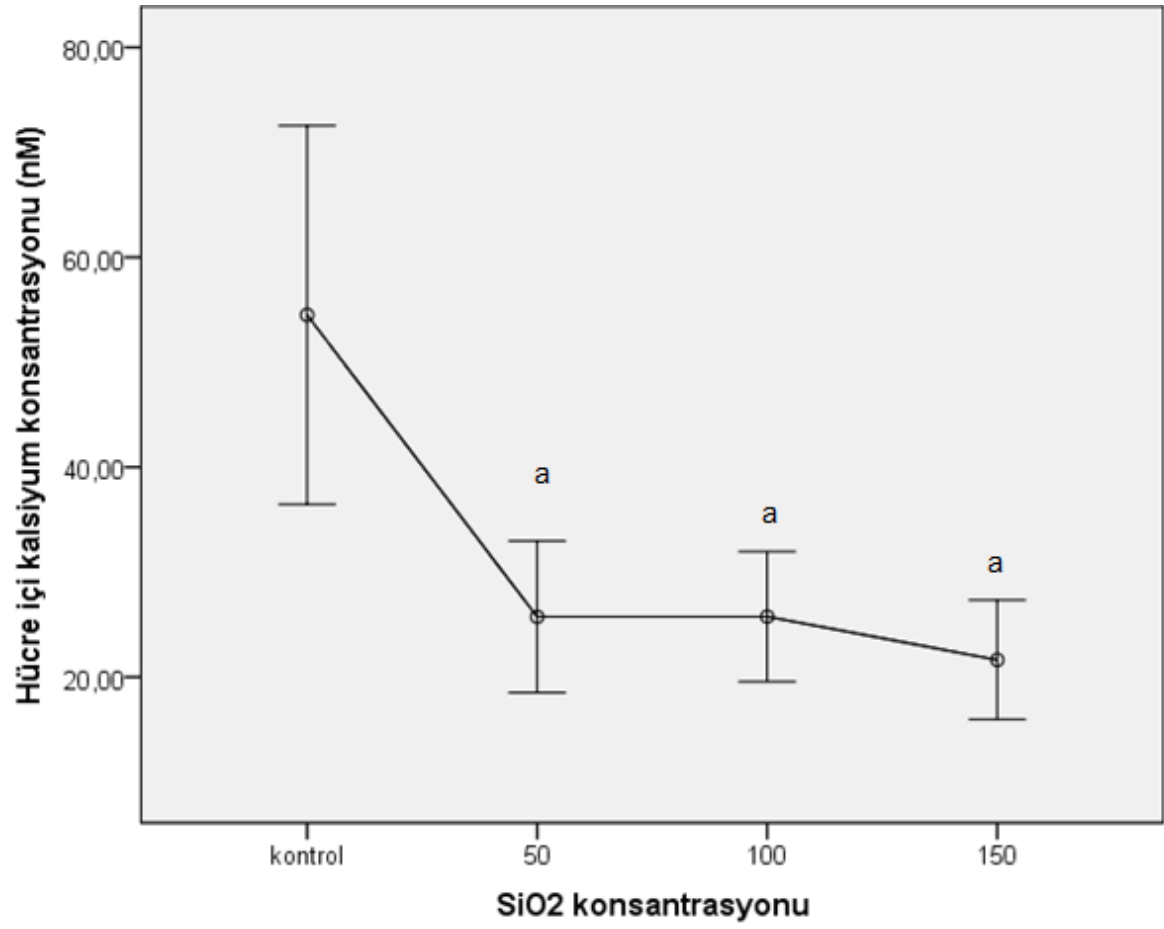


Şekil 4.19. Hücre döngüsü G₀, G₁, S ve G₂ fazlarındaki ortalama hücre oranı.

^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05.

4.7. Konfokal Mikroskop Fluo 4 AM ile Hücre İçi Ca²⁺ Derişimi Sonuçları

Hücre içi görüntüleme florasana işaretli ile uyarı ışığının hücreye penetrasyonu ve hücreye yayılımı zor olması nedeni ile yüksek enerji kullanılmasını gerektiren biyomedikal araştırma yöntemlerindendir. ARPE 19 hücre hattı üzerine SiO₂ NP uygulaması ile hücre içi Ca²⁺ konsantrasyon değişiklikleri Fluo 4AM kullanılarak konfokal mikroskop ile değerlendirildi. Kontrol grubu için hücre içi ortalama Ca²⁺ derişimi; 54,50 ± 15,62 nM, 50 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda 25,73 ± 6,25 nM, 100 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda 25,75 ± 5,37 nM ve 150 µg/mL SiO₂ NP doz grubunda 21,63 ± 4,92 nM olarak bulundu. Tüm doz gruplarında kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (p<0.05). Ancak doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Hücre İçi Ca^{+2} Derişiminin Doza Bağlı Değişimi. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada SiO₂ NP'leri kullanarak ARPE 19 hücre hattı üzerinde etkisi elektrobiyofiziksel biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılarak incelenmiş ve SiO₂ NP'lerinin ARPE 19 hücre hattı üzerindeki toksik etkilerine ilişkin ipuçları elde edilmiştir.

Gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi kullanılarak kontrol ve doz gruplarında hücre proliferasyonunun bir göstergesi olan hücre indeksi değerlendirilmiştir. 50 µg/mL SiO₂ grubunda hücre indeksi kontrole göre %18 olarak azalırken bu azalma 100 µg/mL SiO₂ grubunda %45 ve 150 µg/mL SiO₂ grubunda ise %58 olarak belirlenmiştir. SiO₂ NP'lerinin RPE'de hücre proliferasyonu üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak farklı hücrelerde bu etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ahamed tarafından yapılan çalışmada 15 nm boyutunda ve 25-200 µg/mL doz aralığındaki SiO₂NP'lerinin insan deri epitel hücrelerinde ve insan akciğer epitel hücrelerinde hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak önemli oranda azalttığı rapor edilmiştir [117]. Aydın ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada 0-100 µg/mL doz aralığındaki SiO₂ NP'lerinin insan alveolar epitel ve farinks hücrelerindeki sitotoksitesi araştırılmış ve her iki hücrede doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır [118]. Yang ve ark. hepatosit hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise 25-200 µg/mL doz aralığında uygulanan SiO₂ NP'lerinin bu hücrelerin canlılığında doza bağlı olarak önemli oranda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir [88]. Burada sunulan çalışmada da SiO₂ NP'ları 50-150 µg/mL doz aralığında doza bağlı olarak RPE hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Önceki çalışmalarla birlikte bizim çalışmamız SiO₂ NP'lerinin farklı hücrelerde sitotoksik etki göstererek hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

Hücre ölümü apoptoz ya da nekroz olmak üzere iki yolla gerçekleşir [119]. SiO₂ NP'lerinin hücre proliferasyonunda yol açtığı azalmanın mekanizmasını açıklayabilmek için bu çalışmada akım sitometrik Annexin V-FITC yöntemiyle apoptoz saptanmıştır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz fizyolojik bir süreçtir. Bölünmelerle çoğalan hücreler homeostazisi apoptoz ile dengelemektedir. Hücrede apoptoz sırasında biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenmektedir [120]. Apoptoza uğrayan hücrelerde küçülmeler büzüşmeler gerçekleşirken en önemli değişim hücre membranındaki sitoplazmik yüzeyde bulunan negatif yüklü fosfatidilserin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkması durumudur. Apoptoz nekrozdan farklıdır. Nekroz, akut hasarda görülen, fizyolojik olmayan bir durumdur. Nekrotik hücreler parçalanır; sitoplazma ve çekirdek içeriği çevreye salınır; bu inflamasyon tepkimesini tetikler. Bir hücrenin apoptoza mı yoksa nekroza mı gideceğini sıcaklık, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti-kanser ilaçlar gibi bazı uyaranlar belirler. Bu uyaranların birçoğu düşük dozda apoptoza, yüksek dozlarda ise nekroza sebep olur [121]. Erken apoptotik hücreler Annexin VFITC1⁺/PI2⁻ boyanma paterni gösterirken, geç apoptotik hücreler plazma membranlarındaki integrasyonun kaybına bağlı olarak VFITC1⁺/PI2⁺ patern

gösterirler [120]. Bu çalışmada 50-150 µg/ mL doz aralığında SiO₂ NP'ları nekrotik hücre oluşumuna neden olmamıştır. Erken apoptoz ve geç apoptozu indüklemiştir. SiO₂'nin uygulanmasından 24 saat sonra 50 µg/ mL doz grubunda hücrelerin % 38.8'i erken apoptozdayken, % 5.1'nin geç apoptozda olduğu gözlenmiştir. 100 µg/mL SiO₂ doz grubunda % 64'ünün erken apoptozda ve % 4.96'sının geç apoptozda, 150 µg/mL doz grubunda ise % 80.7'sinin erken apoptozda ve % 5.06'sının geç apoptozda olduğu saptanmıştır. SiO₂ NP'larının farklı dokularda farklı sinyal yollarını kullanarak apoptozu aktive etme potansiyeline sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların birinde Zhang ve ark. insan akciğer fibroblast hücre hattında yaptıkları çalışmada 20 nm boyutunda ve 250-1500 µg/mL doz aralığındaki SiO₂ NP'larının apoptozu neden olduğu ve apoptotik aktivitenin doza bağlı olarak arttığını rapor etmişlerdir [97]. Bir başka çalışmada Ahamed 25-200 µg/mL doz aralığındaki SiO₂ NP'larının insan deri epitel hücrelerinde ve insan akciğer epitel hücrelerinde apoptozu doza bağlı olarak indüklediğini bildirmiştir [117]. İnsan RPE hücre hattında SiO₂NP'larının apoptoz üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bizim bulgularımız SiO₂NP'larının farklı dokularda apoptozu indüklemeye potansiyeli olduğunu rapor eden çalışmalarla uyumludur [119].

Apoptotik indüksiyonun hücre siklusu arestiyle ilişkili olup olmadığını saptamak için hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Hücrelerin DNA içeriği, hücre döngüsünün G₀, G₁, S, G₂ ve M' den oluşan aşamalarıyla ilişkilidir. Hücrenin DNA içeriğinin akış sitometrik analizi, hücre döngüsünün dağılımı ve hücrenin proliferasyon aktivitesini açıklar [88]. Akış sitometresi; bölünmenin hangi fazında ne miktarda hücre bulunduğu ve hücrelerin çoğalma hızları ile ilgili bilgi verir [122]. Bu çalışmada 50-150 µg/mL doz aralığındaki SiO₂ NP'larının uygulamadan 24 saat sonra insan RPE hücreleri hücre döngüsü üzerine etkisi incelenmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin %79.65'i G₁ fazındayken SiO₂ uygulanan hücrelerin büyük bölümünün G₀ fazında olduğu gözlenmiştir. G₀ fazındaki hücre oranı 50 µg/mL SiO₂ grubunda % 82, 100 µg/mL SiO₂ grubunda % 88.26 ve 150 µg/mL SiO₂ grubunda ise %74.7 olarak saptanmıştır. Retina dejenerasyonlarının çoğunlukla; hücre döngüsünün G₀ fazında dinlenen, bölünmeyen, hareketsiz RPE hücrelerinden kaynaklandığı bilinmektedir [123]. Bu çalışmada SiO₂ NP'larına maruz kalan RPE hücrelerinin büyük kısmının G₀ fazında birikmesi SiO₂ NP'larının RPE hücrelerinde G₀/G₁ fazında arrest oluşturarak retina dejenerasyonuna yol açabileceğini düşündürmüştür.

Retinal pigment hücrelerinde eksitasyon, sekresyon, hücre farklılaşması, gen ekspresyonu, endositoz ve apoptoz gibi birçok hücrenin hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu ile kontrol edilir. Kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler ise tüm bu süreçlerin değişmesine yol açabilir [124]. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ya iyon kanalları aracılığıyla ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine girmesiyle veya sarkoplazmik retikulumdan

kalsiyum salınımlarıyla artar. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalması ise Ca ATPaz tarafından kalsiyumun hücre içi depolara geri alınması veya Na^+/Ca^{++} değiş tokuşçusu aracılığıyla gerçekleşir. RPE hücrelerinin fizyolojik işlevlerini yerine getirebilmesi için hücre içi kalsiyum konsantrasyonu yaşamsal öneme sahiptir [124]. Bu tez çalışmasında hücre içi kalsiyum derişimi tüm gruplarda konfokal mikroskop kullanılarak Fluo 4 AM ile ölçülmüş ve doz gruplarında kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Hücre içi kalsiyum derişiminin yanısıra patch clamp tekniği kullanılarak RPE hücrelerinde TRP kanal akımları da ölçülmüştür. Tüm gruplarda TRP kanal akımlarının kontrole göre azaldığı ancak kanal akımlarında doza bağlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. RPE hücrelerinde hücre dışı kalsiyumun hücreye girişi temel olarak voltaj bağımlı L-Tipi kalsiyum kanalları aracılığıyla sağlanır. Ayrıca iyonotropik purinerjik reseptör kanallarının da kalsiyum girişinde önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Ancak her iki kanal spesifik bir uyarana yanıt olarak aktif hale gelir. Bundan dolayı herhangi bir stimülasyon etkisinde kalmayan RPE'nin fizyolojik işlevleri için gerekli kalsiyum girişi için kullanılan yollardan biri TRP kanallarıdır [124]. Bu tez çalışmasında RPE hücreleri herhangi bir şekilde stimüle edilmediği için L-tipi kanallar yerine TRP kanal akımlarının kayıtlanması tercih edilmiştir. Elde edilen sonuçlar SiO_2 NP'lerinin TRP kanal akımlarında bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. TRP kanal akımlarındaki değişikliğin glokom, katarakt ve retinopati gibi hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir [125]. Yapılan literatür taramasında SiO_2 NP'lerinin retinal pigment epitel hücreleri üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak fare trakeabronşiyal epitel kültür hücrelerinde ve insan havayolu epitel kültür hücrelerinde yapılan bir çalışmada SiO_2 NP'lerinin TRP kanal akımlarını inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun konsantrasyondan bağımsız olduğu bildirilmiştir [93]. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar Sanchez ve arkadaşlarının hava yolu epitel hücrelerinde elde ettikleri sonuçla uyumludur.

SiO_2 NP'lerinin RPE hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin mekanizmasını açıklayabilmek için bu çalışmada oksidatif stres parametreleri olan SOD, CAT ve GSH aktiviteleri ile MDA düzeyi araştırılmıştır. Oksidatif stres, hücreler ve dokularda reaktif oksijen türlerinin üretimi ve birikimi ile biyolojik sistemlerin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengenin bozulduğu bir olgudur [126]. Reaktif oksijen türleri normalde oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilirler ve hücre sinyalizasyonu gibi süreçlerde de rol oynayabilirler. Ancak, UV, iyonlaştırıcı radyasyonlar, kirleticiler ve ağır metaller gibi çevresel stres faktörleri ve bazı ilaçlar reaktif oksijen üretimini büyük oranda arttırabilirler. Bu da oksidatif stres aracılığıyla hücre ve doku hasarına neden olabilir [126]. Yapılan birçok çalışmada NP'ların reaktif oksijen türlerini arttırarak oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir [127]. NP'ların oluşturdukları oksidatif stres büyük ölçüde mitokondri, peroksizom, lizozom ve golgi aygıtı gibi organellerde oluşturduğu fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir. Özellikle mitokondri ve

peroksizom, hücrel redoks sinyal ağları ile ilgili organellerdendir. Bu organellerin işlevsizliği ile aşırı ROS üretimi, diğer organellerde daha fazla işlev bozukluğuna yol açar. SiO₂ NP'lerinin farklı hücrelerde oluşturduğu oksidatif strese ilişkin sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Zhao ve ark. tarafından BEAS-2B akciğer epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücreler yaklaşık 57.7 nm boyutunda ve 2, 10, 50 µg/mL dozunda SiO₂ NP'lere 24 saat maruz bırakılmış ve bunun sonucunda doza bağlı mitokondrial işlev bozuklukları, oksidatif stres, DNA hasarı ve hücre ölümü gözlenmiştir [128]. HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerinde Wang ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada boyutları 20 - 50 nm ve dozu 0-1000 µg/mL aralığında değişen SiO₂ NP'lerine maruziyetin oksidatif stresi arttırdığı gözlenmiştir [129]. Benzer şekilde H9c2 kardiyomiyosit hücrelerinde Cui ve ark. tarafından yapılan çalışmada 60 nm boyutunda ve 25, 50, 100 ve 200 µg/mL dozlarındaki SiO₂ NP'lara 24 saat boyunca maruz kalma sonucunda oksidatif streste artış olduğu rapor edilmiştir [130]. Çömelekoğlu ve ark. 150 µg/mL dozunda ve 6, 20 ve 50 nm boyutundaki SiO₂ NP'larına 28 gün boyunca maruz kalan sıçanların beyin, böbrek ve karaciğerinde oksidatif stresin arttığını bildirmişlerdir [131]. Bu tez çalışmasında da önceki çalışmalara benzer şekilde ortalama 7.5 nm boyutunda ve 50, 100 ve 150 µg/mL dozlarındaki SiO₂ NP'lerinin RPE hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığı gözlenmiştir. Fotoreseptörlerle yakın ilişki içinde olan ve görme fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli bir role sahip olan RPE vücuttaki en oksidatif ortamlardan biridir. RPE'nin fizyolojik işlevlerini sürdürmesi için düşük düzeyde reaktif oksijen türlerine ihtiyacı vardır. Ancak çeşitli faktörler antioksidan sistemi etkileyerek RPE'yi oksidatif strese karşı savunmasız hale getirebilir ve bu da farklı retinal dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir [132].

5.1. Öneriler

Bu çalışmada ortalama 7,50 ± 0,12 nm boyutundaki SiO₂ NP'lerinin hücre proliferasyonunu azalttığı, apoptoza ve hücre döngüsünde areste sebep olarak ARPE 19 hücrelerinde doza bağlı sitotoksik etkiyi oluşturduğu göstermiştir. TRP kanal akımı, hücre içi Ca konsantrasyonu ile oksidatif stres parametrelerinin ölçümü bu sitotoksik etkinin oluşumunda hücre içi Ca geçişlerinde ve oksidatif streste meydana gelen değişikliklerin rolü olabileceğini düşündürmüştür. Ancak sitotoksik potansiyelin mekanizmasının tam olarak açıklanabilmesi için ilgili sinyal yollarını da içeren daha ileri araştırmaların yapılmasına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- [1]. Tsai, C.-H, Wang, P.-Y, Lin, I.-C, Huang, H, Liu, G.-S., & Tseng, C.-L. (2018). Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. *International Journal of Molecular Sciences*.
- [2]. Weng, Y, Liu, J, Jin, S, Guo, W, Liang, X, & Hu, Z. (2017). Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 281–291
- [3]. Reichhart, N, & Strauß, O. (2014). "Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium". *Experimental eye research*, 126, 27-37.
- [4]. Shafaie, S, Hutter, V, Cook, M. T, Brown, M. B, & Chau, D. Yb (2016) "In vitro cell models for ophthalmic drug development applications". *BioResearch open access*, , 94-108.
- [5]. Sanders K, Degn L, W R, Zucker RM, Dreher K, (2011). "In Vitro Phototoxicity and Hazard Identification of Nano-scale Titanium Dioxide "
- [6]. Abudayyak M. (2015) "Bazı metal bazlı nanomateryallerin toksik etki potansiyellerinin araştırılması" Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü.
- [7]. Ajnai, G, Chiu, A, Kan, T, Cheng, C.-C, Tsai, T.-H, ve Chang, J, (2014), "Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy" *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 6:172-178
- [8]. Dinyari, R., Loudin, J. D., Huie, P., Palanker, D., & Peumans, P. (2009, December). "A curvable silicon retinal implant." In *Electron Devices Meeting (IEDM), International* (pp. 1-4). IEEE.
- [9]. Göz <https://tr.wikipedia.org/wiki/Göz>
- [10]. Optisyonluk 1 <http://www.bingol.edu.tr/documents/Optisyonluk>
- [11]. Acarkan T. (2017) "MSS Hastalıkları Ve Kranial Sinir Disfonksiyonlarına Nöralterapi Yaklaşımı Ve Trigeminal Nevralji " Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi Cilt 11, Sayı 2
- [12]. Görme "photoreception." *Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite*. Chicago: Encyclopædia Britannica, 2011.
- [13]. EyeInstituteOfTheLaurentians. Gözün Tabakaları, <Http://lwww.İnstitutdeloeil.com> (2013)
- [14]. Wilkinson C. P, Rice TA (1997) *Retinal Detachment 2nd.ed*. MOSBY, 1 -28
- [15]. Arıkan Terzi E.S. (2014) "Rora, Robo1, Cfhvehtra1 Gen Polimorfizmlerinin Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu İle İlişkinin Araştırılması" Doktora Tezi Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Afyonkarahisar
- [16]. Albayrak S. (2007) "Proliferatif Vitreoretinopati Nedeni İle Nüks Retina Dekolmanı Gelişen Hastalarda 5-Fluorourasil Ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Kullanımının Retina Dekolman Rekürensine Etkisi" Uzmanlık Tezi T.C. S.B. Prof. Dr. N. Reşat Belger Beyoğlu Göz Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul
- [17]. The Organization of the Retina and Visual System, 2014
- [18]. Margalit E., Sadda S. R. (2003) "Retinal and Optic Nerve Diseases" 963–974, Blackwell Publishing, Inc. International Society for Artificial Organs.
- [19]. Parker Ş. Histoloji. 1993 Uludağ Üniversitesi Basımevi. Bursa: 471-98.
- [20]. Gökmen F G. (2003) *Sistematik Anatomi*. Güven Kitabevi. İzmir; 794-892.
- [21]. Flynn HW, et al: Basic And Clinical Science Course Section 12, 2003 -2004 Retina And Vitreus. American Academy Of Ophthalmology. San Francisco USA.
- [22]. Allahverdiyeva N. (2017) " Retina Pigment Epitel Dekolmanı Olan Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Olgularında Anti-Vegf Tedavinin Etkileri" Uzmanlık Tezi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ANKARA
- [23]. Turgut B. ve ark (2007) " Oküler Anjiyogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü" *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 16:38-46
- [24]. Voigt A.P., Mulfaul K, Mullin N. K, Ve Ark (2019) "Single-Cell Transcriptomics Of The Human Retinal Pigment Epithelium And Choroid İn Health And Macular Degeneration" *PNAS Cilt* 116 No 48
- [25]. Behar-Cohen, F., Gelizé, E., Jonet, L., & Lassiaz, P. (2020). Anatomie de la rétine. *Médecine/sciences*, 36(6-7), 594–599.

- [26]. Ban, Y, Wilt, S.D, Rizzolo, L.J, (1991). Two secreted retinal factors regulate different stages of development of the outer blood–retinal barrier. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 435, 439–463.
- [27]. Joseph, D.P., Miller, S.S., (1991). Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *J. Physiol.* 435, 439–463.
- [28]. İnan Ü.Ü, Öztaşan N, (2011) " Physiology Of Retinal Pigment Epithelium" *Retina Vitreus*;19:6-15
- [29]. Altıntaş N, (2013) "Kalıtsal Retinopatilerde Retina Pigment Epiteli'nin Önemi ve Tünelin Sonundaki Işık: Retinitis Pigmentosa / Leber Congenital Amaurosis'in Genetiği" *Van Tıp Dergisi*, Cilt:20, Sayı:2, syf:119
- [30]. Gandhi M.D, Pal D., Mitra A.K (2004) " Identification and functional characterization of a Na⁺-independent large neutral amino acid transporter (LAT2) on ARPE-19 cells" *International Journal of Pharmaceutics* 275 189–200
- [31]. Johansson, J. K., Karema-Jokinen, V. I., Hakanen, S., Jylhä, A., Uusitalo, H., Vihinen-Ranta, M., Nymark, S. (2019). Sodium channels enable fast electrical signaling and regulate phagocytosis in the retinal pigment epithelium. *BMC Biology*
- [32]. Strauss O. (2005) The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev.*;85:845–881.
- [33]. Wimmers, S., Karl, M. Ve Strauss, O. (2007). Ion channels in the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research* 26 263–301
- [34]. Aydemir T. (2005) "Yırtıklı Retina Dekolmanlarında Skleral Çökertme Cerrahisi Sonuçlarımız " *Uzmanlık Tezi S.B.Prof. Dr. N. Reşat Belger Beyoğlu Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İSTANBUL*
- [35]. Kahraman Polat D., (2008) "Retinitis Pigmentosa'lı Hastalarda Bazı Enflamasyon Ve Oksidatif Stres Belirteçlerinin Değişimi" *Uzmanlık Tezi T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü İstanbul*
- [36]. Tolochko N.K. (2009) "History Of Nanotechnology" *Nanoscience And Nanotechnologies Encyclopedia Of Life Support Systems (Eolss)*, Belarus State Agrarian Technical University, Belarus
- [37]. Sahoo.S.K., Parveen S., Panda J.J. (2007), "The present and future of nanotechnology in human health care" *Clinical Nanomedicine* , Pages 20-31
- [38]. Taniguchi N. (1974) On the Basic Concept of NanoTechnology'. *Proc Intl Conf ProdEng Tokyo Part II, Tokyo: Japan Society of Precision Engineering.*
- [39]. Binnig G, Rohrer H. (1982) "Scanning Tunneling microscopy". *Helvetica Physica Acta* 55:726-735.
- [40]. Turgut Dr. O, Keskin Dr.H.L., Avşar Dr.A.F. (2011) "Nanoteknoloji Nedir?" *Turkish Medical Journal*:5(1)
- [41]. Doğru E. (2016) " Boyut Kontrollü Ag Nanopartiküllerinin Ve Ag@Go Nanokompozitin Papatya (Matricaria Chamomilla) Bitki Ekstresi Kullanılarak Biyojenik Sentezi Ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması" *Tez Projesi, Yüksek Lisans Erciyes Üniversitesi Kayseri*
- [42]. Biswas A. K. , Islam M. R. , Choudhury Z.S., Asif M.ve Kadir M .F (2014) "Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics" *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology.*
- [43]. Khan I. Saeed K. İ Khan (2017) "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities" *Arabian Journal of Chemistry*
- [44]. <https://inovatifkimyadergisi.com/nanoparcaciklar-sigarada-hastalıklara-olan-toksinleri-sonduruyor>
- [45]. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N., (2006) " Toxic Potential of Materials at the Nanolevel" *Science* , Cilt 311, Sayı 5761
- [46]. Roco, M.C.(2005). International perspective on government nanotechnology funding in. *Journal of Nanoparticles Research*, 7: 707-12
- [47]. Hu, H., Fan, X., Guo, Q., Wei, X., Yang, D., Zhang, B., Gu, N. (2019). Silicon dioxide nanoparticles induce insulin resistance through endoplasmic reticulum stress and generation of reactive oxygen species. *Particle and Fibre Toxicology*

- [48]. Ray, P. C., Yu, H., & Fu, P. P. (2009). "Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs". *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27, 1-35.
- [49]. Borm, P. J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., ... & Krutmann, J. (2006). "The Potential Risks Of Nanomaterials: A Review Carried Out For ECETOC". *Particle And Fibre Toxicology*, 3, 11
- [50]. Jong WH, Roszek B. Geertsma RE, Rivm MPO, Bilthoven BA. (2005) "Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health." Rivm Report
- [51]. http://www.isgum.gov.tr/rsm/file/isgdoc/IG20-nanomalzemeler_ve_tehlikeleri.pdf
- [52]. Parlak E.B. (2013), "Gümüş (Ag⁰) Ve Alüminyum (Al⁰) Nanoparçacıklarının Aktif Çamurdaki Mikrobiyal Yapıya Olan Nanotoksikolojik Etkilerinin Belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü NanoBilim ve NanoMühendislik Programı İSTANBUL
- [53]. Casals E, Bastus N, Vázquez S, Varon M, Comenge J, Puentes V. (2008) "Inorganic nanoparticles and biology". *Cont Sci*, 4 (2): 171-176.
- [54]. Luther, W. (2004), International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology.
- [55]. Bandyopadhyay S., Peralta-Videa J.R., Hernandez-Viecas J.A., Montes M.O., Keller A.A., ve Gardea-Torresdey J.L., (2012) "Microscopic and Spectroscopic Methods Applied to the Measurements of Nanoparticles in the Environment" *Applied Spectroscopy Reviews*, cilt 47,
- [56]. Napierska D, Thomassen L.C, Lison D, Martens J.A, Hoet P.H (2010). "The nanosilica hazard: another variable entity" *Particle and Fibre Toxicology*
- [57]. Rahi, Sattarahmady N ve Heli H. (2014) "Toxicity of Nanomaterials-Physicochemical Effects" *Austin J Nanomed Nanotechnol*; 2(6): 1034.
- [58]. Khlebtsov, N., Dykman, L., (2010). Plasmonic nanoparticles. pp. 37– 85. Khlebtsov, N.G., Dykman, L.A., 2010b. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 111, 1–35.
- [59]. Guo, D., Xie, G., Luo, J., (2014). Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *J. Phys. D Appl. Phys.* 47, 13001
- [60]. Lee, S., Choi, S.U.-S., Li, S., Eastman, J.A., (1999). Measuring thermal conductivity of fluids containing oxide nanoparticles. *J. Heat Transfer* 121, 280–285.
- [61]. Eustis, S., El-Sayed, M.A., (2006) "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes". *Chemical Society Reviews* 209–217. (2)
- [62]. Tan X., Liu X., Zhang Y., Zhang H., Lin X., Pu C., Gou J., He H., Yin T., Zhang Y., ve Tang X., (2018) Silica nanoparticles on the oral delivery of insulin' ISSN: 1742-5247 (Print) 1744-7593 (Online) *Journal*
- [63]. Leso V, Fontana L, Romano R, Gervetti P, Iavicoli I. (2019) "Artificial Stone Associated Silicosis: A Systematic Review" *Int J Environ Res Public Health*.
- [64]. Ryu HJ., Seong NW., So BJ., Seo HS., Kim JH., Hong JS, Park MK, Kim MS, Kim YR., Cho KB., Seo MY., Kim MK., Maeng EH., Son SW., (2014) "Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days." *Int J Nanomedicine*. syf 127-36.
- [65]. Chen Q, Xue Y, Sun J. (2013) "Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo" *Int J Nanomedicine*; 8: 1129–1140.
- [66]. Cho M., Cho W.S., Choi M., Kim S.J., Han B.S., Kim S.H., Kim H.O., Sheen Y.Y., Jeong J., (2009) "The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles" *Toxicology Letters* 189, sayı 3, syf. 177-183
- [67]. Santra, S., Zhang, P., Wang, K., Tapeç, R., Tan, W., (2001), "Conjugation of Biomolecules with Luminophore-Doped Silica Nanoparticles for Photostable Biomarkers" *Anal. Chem.* 73, 4988-4993
- [68]. Bharali, DJ, Klejbor, I., Stachowiak, EK, Dutta, P., Roy, I., Kaur, N., Bergey, EJ, Prasad, PN, Stachowiak, MK, (2005) "Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain." *Proc Natl Acad Sci US A*. 9;102(32):11539-44.

- [69]. Luo, D., Han, E., Belcheva, N., Saltzman, WM, (2004) " A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles" *Journal of Controlled Release* cilt 95, sayı 2, syf 333-341
- [70]. Chen, JF, Ding, HM, Wang, JX, Shao, L, (2004) "Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application." *Biomaterials*.
- [71]. Varan C. (2013) " Beyin Glioma Tedavisinde Dozetaksel Yüklü Katyonik Nanopartiküllerin Tasarımı Ve İn Vitro Değerlendirilmesi" Yüksek Lisans Tezi Hacettepe Üniversitesi
- [72]. Koç F., Baydan E., (2003) " Nanopartiküller" E.Ü. *Journal Of Health Sciences* 12(2) syf 65-69
- [73]. Yetişgin A., Güney B., (2017) "Altın Nanopartiküllerinin Tanı Ve Tedavide Kullanımı " *Biyomühendislik Bölümü Lisans Projesi T.C. Yıldız Teknik Üniversitesi İSTANBUL*
- [74]. Tran P. A. , Zhang L., Webster T. J. (2009) "Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine" *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 1097-1114
- [75]. Lee B. K, Yun Y. H. ve Park K. (2015) "Smart Nanoparticles For Drug Delivery: Boundaries And Opportunities" *Chemical Engineering Science* cilt 125, syf. 158-164
- [76]. Kreuter J, Speiser P. (1976) Poli (metilmetakrilat) adjuvanlarının in vitro çalışmaları. *J. Pharm. Sci.* ; 65 : 1624-1627
- [77]. Shengyan L., Lyndon J., Frank X. G. (2012) "Nanomaterials for Ocular Drug Delivery" *Macromolecular. Bioscience.*, 12, 608-620
- [78]. R.A. Bejjania, F. Behar-Cohen, D. Benezrab, R. Gurnyc, and F. Deliec (2005), "Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye" *CHIMIA GENEVA* 59, No. 6 syf 344-347
- [79]. Understanding the hazards of nanomaterials - Nanotechnology - HSE
- [80]. Başaran N." Seramik İşçilerinde Gözlenen Sağlık Sorunları" Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji ABD <http://www.hisam.hacettepe.edu.tr/ismeslek/hastaliklari/seramikiscileri.pdf>
- [81]. Barnes H., Goh N.S.L., Leong T.L., Ve Hoy R., (2019) "Silica-Associated Lung Disease: An Old-World Exposure İn Modern Industries" *Respirology*.
- [82]. Munteanu M.C., Radu M. , Hermenean A. , Sima C., Dinu D. , Costache M. , Grigoriu C., Dinischiotu A. (2010) "Antioxidative Response Induced By Sio2 Nanoparticles İn Mrc5 Cell Line." *Romanian Biotechnological Letters* Syf. 5000-5007
- [83]. Voicu S.N. P., Dinu D., Sima C., Hermenean A. , Ardelean A. , Codrici E., Stan M.S., Zărnescu O. and Dinischiotu A. (2015) "Silica Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line." *International Journal of Molecular Sciences* syf. 29398-29416
- [84]. Çömelekoğlu Ü., Yalın S. , Ocakoğlu K., Söğüt F., Yaman S., Türkseven Ç., Eroğlu P., Aktaş A., Battal D., Yıldırımcan S., (2014) " Sio2 Nanoparçacıklarının Kalbin Elektriksel Ve Mekaniksel Aktivitesi İle Antioksidan Enzim Sistemi Üzerine Etkisi" 26. Ulusal Biyofizik Kongresi Kongre Programı Ve Bildiri Özet Kitabı Cilt :6 Syf 27-28 Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tokat
- [85]. Çömelekoğlu Ü., Yalın S. , Söğüt F., Yaman S., Uzun C., (2017) " Sio2 Nanoparçacıklarının Sıçan Kortikal Kemik Biyomekaniği Üzerine Etkileri Deneysel Çalışma Türkiye Klinikleri Journal Of Laboratory Animals 1(2):63-70
- [86]. Yaman S. (2016), "Sio2 Nanoparçacığının Sıçan Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi" Doktora Tezi Mersin Üniversitesi Mersin
- [87]. Özbay E., (2017) "Sio2 Nanoparçacığının İşitme Sistemi Üzerine Etkisi" yüksek Lisans Tezi Mersin Üniversitesi Mersin
- [88]. Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X., Zhuang, Z. (2010). SiO2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 1.
- [89]. Liang, H.; Jin, C.; Tang, Y.; Wang, F.; Ma, C.; Yang, Y. (2014), Cytotoxicity of silica nanoparticles on HaCaT cells. *J. Appl. Toxicol.* 34, 367-372.
- [90]. Lison D., Thomassen L.C. J., Rabolli V., Gonzalez L., Napierska D., Seo J.W., Kirsch-Volders M., Hoet P., Kirschhock C. E. A., Martens J.A., (2008), " Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays " *Toxicological Sciences*, cilt 104, syf 55-162,
- [91]. Morishita Y, Yoshioka Y., Satoh H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., (2012) "Distribution and histologic effects of intravenously

administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* cilt 420, syf. 297-301

[92]. Distasi C, Ruffinatti FA, Dionisi M, Antonioti S, Gilardino A, Croci G, Riva B, Bassino E, Alberto G, Castroflorio E, Incarnato D, Morandi E, Martra G, Oliviero S, Munaron L, Lovisolo D (2018) "SiO₂ nanoparticles modulate the electrical activity of neuroendocrine cells without exerting genomic effects." *Scientific Reports* 9;8(1):2760.

[93]. Sanchez A, Alvarez J.L, Demydenko K, Jung C, Alpizar Y.A, Alvarez-Collazo J, Cokic S.M, Valverde M. A, Hoet P.H ve Talavera K., (2017) "Silica nanoparticles inhibit the cation channel TRPV4 in airway epithelial cells" *Particle and Fibre Toxicology*

[94]. Feng W, Guo J, Huang H, Xia B, Liu H, Jie Li J, Lin S, Li T, Liu J, Li H, (2015) "Human Normal Bronchial Epithelial Cells: A Novel In Vitro Cell Model For Toxicity Evaluation" *Plos One* 10

[95]. Sergeant J-A, Paget V, Chevillard S, (2012), "Toxicity and Genotoxicity of Nano-SiO₂ on Human Epithelial Intestinal HT-29 Cell Line" *The Annals of Occupational Hygiene*, cilt 56, sayı 5, syf 622-630,

[96]. Nowak JS, Mehn D, Nativo P, García C P, Gioria S, Ojea-Jiménez Í, Gilliland D, Rossi F, (2014) "Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis." *Toxicol Lett.* syf 84-92.

[97]. Zhang X O, Yin Li H, Tang M. Ve Pu Y, (2011) "ZnO, TiO₂, SiO₂, and Al₂O₃ Nanoparticles-induced Toxic Effects on Human Fetal Lung Fibroblasts" *Biomed Environ Sci*; syf 661-669

[98]. Rajiv, S, Jerobin, J, Saranya, V, Nainawat, M, Sharma, A, Makwana, P. Chandrasekaran, N, (2015) "Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro." *Human & Experimental Toxicology*, syf, 170-183.

[99]. Ye, Y, Liu, J, Chen, M, Sun, L, & Lan, M. (2010). In vitro toxicity of silica nanoparticles in myocardial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 131-137.

[100]. Selvaraj V, Bodapati S, Murray E, Rice K .M, Winston N, Shokuhfar T, Zhao Y, Blough E, (2014) "Cytotoxicity and genotoxicity caused by yttrium oxide nanoparticles in HEK293 cells" *International Journal of Nanomedicine*: syf:1379-1391

[101]. Senapati V.A., Kumar A, Gupta G.S, Pandey A.K., Dhawan A, (2015) "ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach" *Food and Chemical Toxicology journal* cilt 85, syf: 61-70

[102]. Wang, L, Chen, C, Guo, L, Li, Q, Ding, H, Bi, H, & Guo, D. (2018). Zinc oxide nanoparticles induce murine photoreceptor cell death via mitochondria-related signaling pathway. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-12.

[103]. Yu, K.-N, Yoon, T.-J, Minai-Tehrani, A, Kim, J.-E, Park, S. J, Jeong, M. S, Cho, M.-H. (2013). Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1187-1195.

[104]. Guo, D, Bi, H, Liu, B, Wu, Q, Wang, D, & Cui, Y. (2013). Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 731-738.

[105]. Del Pozo-Rodríguez, A, Delgado, D, Solinís, M. A, Gascón, A. R, & Pedraz, J. L. (2008). Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: Transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 360(1-2), 177-183.

[106]. Zucker, R. M, Massaro, E. J, Sanders, K. M, Degn, L. L, & Boyes, W. K. (2010). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77A(7), 677-685.

[107]. Wielgus, A. R., Zhao, B., Chignell, C. F., Hu, D.-N., & Roberts, J. E. (2010). Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1), 79-90.

[108]. Quan, J.-H, Gao, F. F, A Lee, M, Yuk, J.-M, Cha, G.-H, Chu, J.-Q, Lee, Y.-H. (2020). Involvement of endoplasmic reticulum stress response and IRE1-mediated ASK1/JNK/Mcl-1 pathways in silver nanoparticle-induced apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Toxicology*, 152540.

- [109] Jin S.E, Jun Eon Jin J.E, Hwang W, Hong S.W. (2019) Photocatalytic antibacterial application of zinc oxide nanoparticles and self-assembled networks under dual UV irradiation for enhanced disinfection. *Int J Nanomedicine*. 14: 1737–1751.
- [110]. Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 1–15.
- [111]. Murugadoss S., Lison D., Godderis J., Brule S., Direk O., Brassinne F., Sebaihi N., ve Hoet P., (2017) "Toxicology of silica nanoparticles: an update" *Arch Toxicol* 91:2967–3010
- [112]. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951); Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275
- [113]. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979); Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- [114]. Paglia DE, Valentine WN. (1967); Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70: 158-169
- [115]. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A (1988); simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34: 497-500.
- [116]. Aebi H. (1984); Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126
- [117]. Ahamed M. (2013). Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Human & experimental toxicology*, 32(2), 186–195.
- [118]. Aydın, E, Türkeş, H, Hacımüftüoğlu, F. (2017). In Vitro Cytotoxicity and Molecular Effects Related to Silicon Nanoparticles Exposures . *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* , 17 (1) , 10-17 .
- [119]. Asweto, C. O., Wu, J., Alzain, M. A., Hu, H., Andrea, S., Feng, L., ... & Sun, Z. (2017). "Cellular pathways involved in silica nanoparticles induced apoptosis: A systematic review of in vitro studies". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 191-197.
- [120]. Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y., & Schenke-Layland, K. (2014). Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- [121]. GüleşÖ., Eren Ü., " Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler" Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008 syf 73-78
- [122]. Kanev, M., & Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33-38.
- [123]. Steindl-Kuscher, K, Krugluger, W, Boulton, M. E, Haas, P, Schratlbauer, K, Feichtinger, H, Binder, S. (2009). Activation of the β -Catenin Signaling Pathway and Its Impact on RPE Cell Cycle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(9), 4471
- [124]. Wimmers, S., & Strauss, O. (2007). Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(12), 5767-5772.
- [125]. Pan, Z., Capó-Aponte, J. E., & Reinach, P. S. (2012). Transient receptor potential (TRP) channels in the eye. In *Advances in Ophthalmology*. IntechOpen.
- [126]. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- [127]. Horie, M., & Tabei, Y. (2020). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free radical research*, 1-41.
- [128]. Zhao X, Abulikemu A, Lv S, Qi Y, Duan J, Zhang J, Chen R, Guo C, Li Y, Sun Z. (2021) Oxidative stress- and mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity by silica nanoparticle in lung epithelial cells from metabolomic perspective. *Chemosphere*.
- [129]. Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y., & Liu, J. (2009). Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 808–815.
- [130]. Cui, G., Zhang, H., Guo, Q., Shan, S., Chen, S., Li, C., ... Du, Z. (2020). Oxidative stress-mediated mitochondrial pathway-dependent apoptosis are induced by silica nanoparticles in H9c2 cardiomyocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1–33.

- [131]. Çömelekoğlu, Ü., Ballı, E., Yalın, S., Eroğlu, P., Bayrak, G., Yaman, S., & Söğüt, F. (2019). Effects of different sizes silica nanoparticle on the liver, kidney and brain in rats: Biochemical and histopathological evaluation. *J Res Pharm*, 23(3), 344-353.
- [132]. Trakkides, T. O., Schäfer, N., Reichenthaler, M., Kühn, K., Enzmann, V., & Pauly, D. (2019). Oxidative stress in retinal pigment epithelial cells increased endogenous complement-dependent inflammatory and angiogenic responses-independent from exogenous complement sources. *bioRxiv*, 722470.