



Nanomalzemelerin Biyomedikal Alanda Kullanımları ve Toksisitelerinin Değerlendirilmesi

Gamze TİLBE ŞEN¹, Pınar ERKEKOĞLU², Belma KOÇER GÜMÜŞEL²

¹Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara

1. Giriş

Nanopartiküller (NP), boyutları 1-100 nm arasında değişen ve ana materyalin yapısına göre farklı özellikler gösteren maddelerdir. NP'ler, farklı fizikokimyasal özellikleri, yapı ve özgüllükleri açısından aynı maddenin daha büyük ölçekli yapısından önemli farklılıklar gösterebilir (Azhdarzadeh vd., 2015; Lan vd., 2012). NP'ler enzimler, reseptörler ve antikorlar gibi büyük biyolojik moleküllerden boyut olarak birkaç yüz nanometre daha küçüktür. İnsan hücrelerinden yaklaşık 10-100 bin kat daha küçük boyutlara sahip NP'ler, biyomoleküllerle hücre yüzeyinde ve hücre içinde farklı etkileşimler gösterebilir (Azhdarzadeh vd., 2015; Lan vd., 2012).

İlk kez 1959 yılında Richard Phillips Feynman "maddenin atomik katmanda işlenebilirliğini" belirtmiş, bundan onbeş yıl sonra Norio Taniguchi ilk kez "Nanoteknoloji" ifadesini kullanmıştır. 1996 yılında Kimya Nobel ödülünü Richard Errett Smalley "Buckyballs" ya da "Fullerenes" olarak bilinen ilk nanomalzemeleri üreterek kazanmıştır. 1991 yılında ise Sumio Iijima "karbon nanotüpleri" bulmuştur. 21. yy'a girilmesiyle nanomalzeme ve NP'ler üzerindeki araştırmalar hız kazanmıştır (Krätschmer, 2011). Günümüzde ise, başta medikal ve biyomedikal alanlar olmak üzere birçok farklı alanda nanomalzemelerin kullanımı yaygınlaşmıştır ve pek çok nanomalzeme yapısındaki ilaç taşıma sistemi tasarlanmaktadır (Praveena vd., 2007;

Rao vd., 2001). Özellikle kanser gibi hayatı tehdit eden hastalıklarla mücadele etmek için hücre içi düzeyde hedeflenen ilaç taşıyım sistemleri geliştirilmektedir. Ayrıca, NP, kuantum noktacık (QD), karbon nanotüp, paramanyetik NP ve lipozom yapısındaki ilaçların insan immün yetmezlik sendromu (AIDS), diyabet, sıtma, tüberküloz ve prion hastalığı gibi patolojik durumlarda kullanılmak üzere tasarlandığı belirtilmektedir (Behera vd., 2015; Kaushik vd., 2017; McMahon vd., 2015). Son yıllarda kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı vb. hastalıkların erken teşhisi biyomedikal alanda odak noktası olmuştur (Nazir vd., 2014; Nguyen vd., 2010).

Günümüzde nanoteknoloji biyomedikal, farmasötik, tarım, çevre, ileri malzemeler, kimya bilimi, fizik, elektronik, bilgi teknolojisi gibi birçok bilim ve teknolojiyi kapsayan çok disiplinli bir bilim koludur; günümüzde pekçok alanda uygulamaları bulunmaktadır. Ayrıca nano özellikteki malzemelerin ve cihazların sentezi ve uygulamalarının görüntüleme ajanları, ilaç taşıma araçları, teşhis cihazları gibi çeşitli biyomedikal uygulamalara da büyük katkı sağladığı görülmektedir (Nazir vd., 2014; Nguyen vd., 2010).

Nanopartiküllerin küçük boyutu ve yüksek yüzey hacim oranları, biyomedikal alanda kullanışlı kılan temel özelliklerindendir. Bu özelliklerine bağlı olarak yüksek yüzey enerjisine sahiptirler. Ayrıca benzersiz optik, elektronik ve mükemmel manyetik özellikleri diğer üstünlükleri arasında sayılabilir. Yüksek yüzey alanı, farmakokinetik özellikleri iyileştirmek, vasküler dolaşım ömrünü uzatmak ve biyomedikal uygulamalarda biyolojik kullanılabilirliği arttırmak için modifikasyona olanak tanımaktadır. Literatürde en çok çalışılmış nanomalzemelerin QD'ler, karbon nanotüpler, paramanyetik NP'ler ve lipozomlar olduğu görülmektedir (Azhdarzadeh vd., 2015).

2. Nanopartiküllerin Biyomedikal Uygulamaları

Nanopartiküller, soy metaller (Au, Ag, Pt, Pd), yarı iletkenler (CdSe, ZnS, CdS, TiO_2 , PbS, InP, Si), manyetik bileşikler (Fe_3O_4 , Co, CoFe_2O_4 , FePt, CoPt) ve bunların birleşimleri de dâhil olmak üzere çeşitli yapılardan oluşabilmektedir. NP'ler biyomedikal alanda ilaç taşıyıcısı, takip ajanı, gen tedavisi için vektör, hipertermi tedavilerinde ve manyetik rezonans görüntülemede (MR) kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. NP'lerin tıpta kullanılabilir olması için belirli kriterleri karşılamaları gerekmektedir. İn vivo uygulamalar için, NP'ler hem minimum düzeyde sitotoksisteye sahip olmalı hem de konvansiyonel ajanlara kıyasla daha iyi performans göstermelidir. İn vivo ortamda NP'ler plazma proteinleri ile etkileşmemeli ve retikuloendotelyal sistem (RES) tarafından alınmamalıdır. Fizyolojik koşullar altında, geniş bir pH aralığında, NP'ler kolloidal dengeyi korumalıdır. İlaç moleküllerini veya gen terapisi için DNA gibi makromolekülleri taşıyan NP'lerin istenilen bölgeye ulaşmadan bu molekülleri erken salıvermemesi gerekir. Aynı zamanda NP'lerin yüzey modifikasyonu ilgili biyomoleküllerle spesifik etkileşimleri için gereklidir (Nguyen vd., 2010).

Nanopartiküller üç katmandan oluşmaktadır: Çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif cisimleri ve polimerler ile işlevselleştirilebilen yüzey tabakası,



çekirdekten kimyasal olarak farklı olan kabuk tabakası ve NP'nin merkezi olan çekirdek. Ayrıca NP'ler boyutlarına, morfolojilerine ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak sınıflara ayrılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Nanomalzemelerin sınıflandırılması (Rümenapp vd., 2014).

SINIF	ALT SINIF	MALZEME	YAPI	TANIM
Organik	Lipitler	Fosfolipit	Lipozom	Fosfolipit çift tabakadan oluşan nanoküreler
			Miseller	Fosfolipit tek tabakadan oluşan nanoküreler
		Katı lipit	Katı lipit NP	Lipit çekirdeğin sürfaktanlar ya da polimerlerle stabilize edildiği nanoküreler
	Polimerler	PLGA	NP'ler	Nano ölçekte üç fiziksel boyuta da sahip çeşitli şekillerde yapılar (<100 nm).
		PLA		
		Kitosan	Dendrimerler	Çekirdek ve PPI sıralı katmanlarından oluşan küresel nanomoleküller.
		Jelatin		
İnorganik	Soy metaller	PAMAM	NP'ler	Nano ölçekte üç fiziksel boyuta da sahip çeşitli şekillerde yapılar (<100 nm)
		PPI		
		Altın		
	Oksitler	Gümüş	NP'ler	Nano ölçekte üç fiziksel boyuta da sahip çeşitli şekillerde yapılar (<100 nm)
		Platin		
		Manyetik ve süperparamanyetik demir oksitler		
	Yarı iletkenler	Kadmiyum	QD'ler	Optik özelliklere sahip yarı iletken nanokristaller
		Selenyum		
		Tellür		
		İndiyum		
	Karbon bazlı	Karbon	Fullerenler	Karbon atomlarından oluşan, kafes şeklinde yapısı olan, içi boş nanoküreler
			Nanotüpler	Nano ölçekte iki fiziksel boyuta sahip silindirik yapılar (<100 nm)
	Diğer	Gözenekli silika	Nanopartiküller	Nano ölçekte üç fiziksel boyuta da sahip çeşitli şekillerde ve gözenekli yapılar (<100 nm) (gözenek çapı: 2-50 nm)

NP:nanopartikül; PAMAM: poliamidoamin; PLA: polilaktik asit; PLGA : poli-D, Laktit-ko-glikolid; PPI: polipropilenimin; QD: kuantum noktacık

2.1. Karbon Bazlı Nanopartiküller

Fullerenler ve karbon nanotüpler karbon bazlı NP'lerin başlıca iki sınıfını temsil etmektedir (Chatterjee vd., 2014). Karbon nanotüpler boru şeklinde, 1-2 nm çapındadır. Çaplarına bağlı olarak yarı iletken veya metalik olabilmektedirler. Benzersiz fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahiptirler ve bu malzemeler dolgu maddeleri, çevresel iyileştirmede verimli gaz adsorbanı, farklı inorganik-organik katalizörler için destek ortamı gibi pek çok ticari uygulamada kullanılmaktadır (Chatterjee vd., 2014).

Fullerenler, allotropik karbon formları gibi küre şeklinde içi boş kafeslerden oluşmaktadır. Bu malzemeler düzenlenmiş beşgen ve altıgen karbon birimlerine sahiptir. Elektrik iletkenliği, yüksek mukavemeti, yapısı, elektron ilgisi nedeniyle en çok çalışılan partiküllerdendir. Yapılan bir çalışmada, tümörlerin MR görüntülenmesinde gadolinyum atomlarını taşımak için yeniden modellenmişler, tümörlü doku hedeflenmesi için reseptör agonistleri ve antagonistleri ile yüzeyleri fonksiyonelleştirilmiştir. Sonuçta suda çözünür gadolinyum-fullerenlerin 48 saate kadar kanda dolaşım süresinin uzaması ve boşaltım sisteminden gecikmeli olarak temizlenmesi sağlanmıştır. Fulleren formülasyonlarının aktif tümör hedeflenmesinde kullanılmadan önce, in vivo olarak güvenilirlik değerlendirilmesi tamamlanmalıdır. Buna ek olarak, bu moleküllerin klinik olarak MR görüntüleme uygulamalarında güvenilirliklerinin test edilmesi gerekmektedir (McCarthy ve Weissleder, 2007).

2.2. Metal Nanopartiküller

Metal öncüllerden oluşan bu NP'ler, lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) karakteristiklerinden dolayı benzersiz opto-elektrik özelliklere sahiptir. Metal NP'lerin görünüş, boyut ve şekil kontrollü sentezleri ve gelişmiş optik özellikleri birçok araştırmada kullanılmalarını sağlamıştır (Chatterjee vd., 2014). Metalik manyetik NP'lerin biyomedikal uygulamaları Şekil 1'de verilmiştir.

Demir, kobalt veya nikelden yapılan metalik manyetik NP'ler ise kimyasal kararsızlıklarından dolayı biyolojik uygulamalarda genellikle kullanılmamaktadır. Bu metalik manyetik NP'ler çekirdek-kabuk yapısını oluşturmak üzere, altın ya da silika gibi kaplamalar ile kaplanmaktadır. Bu strateji ucuzdur, kısa zamanda ve farklı durumlarda uygulanabilir (Edmund vd., 2010; Jua vd., 2013; Kuzyniak vd., 2010).

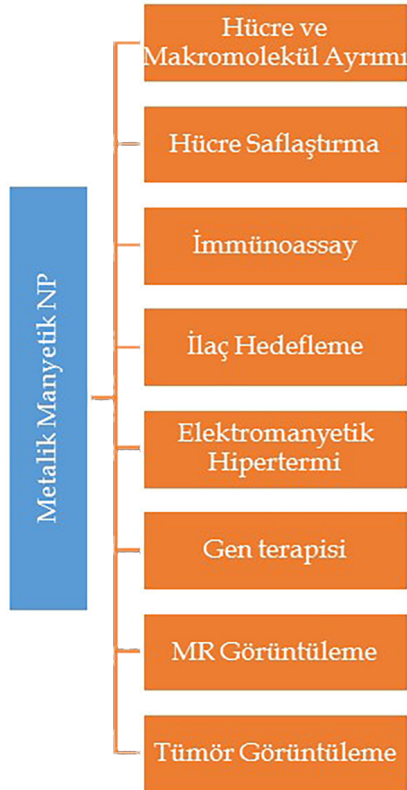
Çeşitli görüntüleme yöntemleri için ajanlar ve tedavi edici ilaçlar manyetik NP'ler üzerine bağlanabilmektedir. Bağlayıcı molekül, moleküler tanıma için işlevsel gruplar içerebilmektedir. Çok fonksiyonlu manyetik NP'ler sağlam bir matriks içine kapsüllenerek çekirdek/kabuk yapısı oluşturmak için hazırlanabilmektedir. Çekirdek/kabuk manyetik NP sentezinde altın, silika, çinko oksit, polimer, ya da lipozomlar matriks olarak kullanılmaktadır. Sağlam kabuk sadece manyetik çekirdeği korumakla kalmaz, aynı zamanda diğer hassas biyolojik ajanlarla manyetik çekirdeğin doğrudan temasını ve toksik bileşenlerin salınımını önler. Çekirdek/kabuk yapısı kızılötesi spektrumda ve MR görüntü yanıtında güçlü absorpsiyon göstermekte, çok modlu görüntülemeye olanak sağlamaktadır. Au kaplamalar kararlılıkları ve biyouyumlulukları açısından üstünlüklere sahiptir. Silika kabuk, anti-kanser ilaçlar ve floresan moleküller için bir taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Silika kabuklar sulu koşullarda kararlı olmaları ve sentez kolaylıkları nedeniyle manyetik NP'ler için koruyucu kaplamalardır. MR görüntüleme ve ilaç salınımında manyetik NP'lerin kullanımı için çekirdek-kabuk yapıları, manyetik NP'lerin biyo-uyumlu Si ya da Au ile kaplanmasıyla elde edilmektedir. Bu inert kaplamalar da manyetik çekirdeklerin kimyasal bozulmasına karşı koruma sağlamakta ve toksik bileşenlerin salınımını önlemektedir (Edmund vd., 2010; Jua vd., 2013; Kuzyniak vd., 2010).

Kolloidal Au NP'lerin biyomoleküllere benzeyen, boyuta bağlı değişen özellikleri



ve renkleri, biyomedikal uygulamalarda, özellikle kanser araştırmalarında dikkat çekmektedir. Au NP'lerin dokuların mikroskopik görüntülenmesinde çok kullanışlı problemler olduğu kanıtlanmıştır. Benzersiz ışık absorpsiyon ve saçma özellikleri sağlıklı hücrelerin, kanserli hücrelerden ayırt edilmesini sağlamaktadır (McCarthy ve Weissleder, 2007). Au NP'ler boyut ve şekil kontrolü veya yüzey modifikasyonu ile esnek bir kolorimetrik kontrast vermektedir. Bunlara ek olarak az toksik ve biyouyumlu olarak nitelendirilmekte, optik görüntülemeye kolaylıkla kullanılmakta ve çeşitli kanser tiplerinin görüntülenmesinde yardımcı rol oynamaktadır. Antikor konjuge Au NP'ler konfokal yansıma mikroskopu kullanıldığında bile kanser görüntülemeyi çok daha kolay hale getirmektedir (Karakoti vd., 2014).

Bilgisayarlı Tomografi (BT) zararlı olmayan tıbbi görüntüleme yöntemlerindendir. Genellikle farklı tipteki hücreler arasındaki kontrastı arttırmak için X-ışını absorplayici kontrast ajan kullanılmaktadır. Au NP'ler yüksek X-ışını absorpsiyon katsayısına sahiptir; ayrıca çok yönlüdür: boyutları ve şekilleri kontrol edilebilmekte, yüzeyleri istenen malzemelerle işlevsel hale getirilebilmektedir. Son zamanlarda kaplanmış Au NP'ler kanser tespiti için in vivo BT çalışmalarında kullanılmaktadır. Au¹⁹⁸ gibi Au radyo izotopları farklı kanser türlerini tedavide kullanılmış, ¹²⁵I, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc gibi farklı radyoaktif çekirdeğe sahip Au kolloidler derin doku mineralize kemik görüntülemeye etkili bulunmuştur (Karakoti vd., 2014).



Şekil 1. Metalik Manyetik NP'lerin Biyomedikal Uygulamaları (Anton vd., 2010).

Non-invaziv fototermal terapi de kanser tedavisinde umut vaat etmektedir. Fototermal terapi, dokuların içine minimum saçılımla nüfuz eden, görünür NIR bölgedeki, iyonize olmayan bir ışık kaynağı kullanılmaktadır. Optik olarak aktif Au NP'ler, ışık radyasyonunu lokalize ısıya dönüştürerek tümör dokularını öldürmektedir. Au NP'lerin yüzey plazmon özelliklerinin ayarlanması sonucu, kanser hücrelerini, bakterileri, virüsleri ve protozoanları öldüren etkili fototermal özelliklere sahip Au nanoküreler, nanokabuklar, nanorodlar ve nanokafesler elde edilebilmektedir. Bu teknik kullanılarak, Au NP'lerinin dokularda tümör sınırlarının tam işaretlenmesi sağlanabildiğinden, klinik olarak kullanılabilmesi önerilmektedir. Geniş bir NIR radyasyon ışını ile uyarılmış Au nanorodları, NIR bölgesinde bir absorpsiyon bandı oluşturmakta ve bu da tümörlerin fototermal olarak yok edilmesini sağlamaktadır (He & Ma, 2014).

Fototermal çalışmaların yanı sıra, Au NP'ler fotodinamik terapi (PDT) gibi diğer tümör tedavi yöntemlerinde de kullanılmaktadır. PDT, tümörlere verilen fotoaktif maddelerin (ftalosiyanın veya yarı iletken kristaller gibi boyalar) yüzeyinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla kanser dokularının foto-oksidasyonudur. Au NP'lere konjugasyon yoluyla, fotoaktif boyaların başarılı bir şekilde taşınmasına dair literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. Au NP - fotosensitör konjugatları, fotoaktif boya ve nanoparçacık arasında etkin enerji veya elektron transferi sağlayarak in vitro kanser modellerinde fotodinamik etki sağlamıştır (Lehner vd., 2013).

Anti-kanser ilaçların uygulanmasında da Au NP'lerin kullanımı hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle son derece toksik ilaçların taşınmasında etkili ve nispeten güvenli ilaç taşıyıcıları oldukları kanıtlanmıştır. Au NP'lerin yüzey kimyası değiştirilerek, küçük ilaç moleküllerinin ilgili dokulara taşınımı sağlanabilir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), yüksek anti-kanser özelliklere sahip bir sitokindir; ancak yüksek toksisitesi, terapötik uygulamasını ciddi ölçüde sınırlamaktadır. Bununla birlikte, TNF- α içeren PEG kaplı Au NP'ler, TNF- α molekülünün sistemik toksisitenin azaltarak tümörde hasar oluşmasını sağlamıştır. Bu konjugatlar ile yapılan in vivo deneylerde, karaciğer, dalak ve diğer sağlıklı organlarda birikimin az olduğu veya olmadığı görülmüştür (Visaria vd., 2006).

2.3. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik NP'ler, organik bazlı, çoğunlukla nanoküre ve nanokapsül şeklinde olan NP'lerdir. Genel kütlesi katı olan ve moleküllerin küresel yüzeyinin dış sınırına adsorbe edildiği matriks parçacıklarından oluşurlar. Kolayca işlevsel hale getirilebilirler (Chatterjee vd., 2014).

Çeşitli doğal ve sentetik polimerler, polimerik NP'lerin sentezinde kullanılmaktadır. NP sentezinde kullanılan doğal polimerler kitosan, dekstran, albümin, heparin, jelatin ve kollajeni içermektedir. Bunlara ek olarak polietilen glikol (PEG), poliglütamik asit (PGA), poli-D, Laktit-ko-glikolid (PLGA), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), N- (2-hidroksipropil) -metakrilamit kopolimeri (HPMA) gibi sentetik polimerler NP hazırlamak ve kanser tedavisinde ilaç kapsüllemeye kullanılmaktadır. Bu polimerik formlar dendrimerler, lipozomlar, nanoküreler ve miselleri içermektedir (McCarthy



ve Weissleder, 2007).

Dendrimerlerin yapısal çeşitliliği onları ilaç taşıma uygulamaları için çok yönlü nano cihazlar haline getirmektedir. Bu çok monodispers NP'ler yüksek yoğunluklu ilaç yüklerini taşıyabilmektedir. İlaçlar dendrimerin iç boşluğunda kapsüllenmekte veya kovalan olarak yüzeydeki dallanmış birimlere bağlanmaktadır. Böylelikle ilacın farmakolojik özellikleri arttırılmaktadır. Dendrimerler tümörlerin görüntülenmesi ve tedavisinde de umut verici adaylardır. Dendrimer benzeri malzemeler kullanılarak tümörlerin spesifik hedeflenmesi ve yok edilmesi için oligosakkaritler, polisakkaritler, oligopeptidler, çoklu doymamış yağ asitleri, folat ve tümör ilişkili antijenler olmak üzere çeşitli hedefleme ligandları geliştirilmiştir. Gadolinyum (^{153}Gd) genellikle en etkili MR kontrast ajanı olarak kabul edilmektedir. Ancak gadolinyumun geleneksel polimerler ve proteinlere konjuge edildiği çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, gadolinyum konjüge edilmiş dendrimerler spesifik hedefleme ve tümör görüntülemeye başarı sağlamıştır (McCarthy ve Weissleder, 2007).

2.4. Lipit Bazlı Nanopartiküller

Lipit bazlı NP'ler, genellikle küresel, çapları 10 ile 1000 nm arasında değişen partiküllerdir. Polimerik NP'lerde olduğu gibi, lipit NP'leri lipitten yapılmış sağlam bir çekirdeğe ve çözünür lipofilik moleküller içeren bir matrikse sahiptir. Sürfaktanlar veya emülgatörler bu NP'lerin dış yüzeyini stabilize etmek için kullanılmaktadır. Lipit nanoteknolojisi, kanser tedavisinde lipit NP'lerin ilaç taşıyıcıları ve RNA salınımında tasarımına ve sentezine odaklanan özel bir alandır (Chatterjee vd., 2014).

Lipozomlar, sulu bir çekirdekten ve kapalı çift katmanlı fosfolipitlerden oluşmaktadırlar. Sırasıyla çekirdek kısmında veya lipit katmanında hidrofilik veya hidrofobik yükler taşımaktadırlar. Biyouyumlu ilaç taşıma ajanlarıdır; antikanser ajanlar da dahil olmak üzere çeşitli ilaçların taşınmasında başarıyla kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte lipozomlar, RES'in ürettiği makrofajlar ile fagositoz yoluyla temizlenmeye karşı savunmasızdır. Kan dolaşımındaki yarılanma ömrü, yüzey PEGilasyonu veya lipit çapraz bağlanması yoluyla arttırılmaktadır. Ayrıca, lipozomlar tümörlü bölgede pasif hedefleme sonucu artmış permeabilite ve retansiyon etkisi (EPR) ile birikebilmektedir (McCarthy ve Weissleder, 2007).

2.5. Yarı İletken Nanopartiküller

Yarı iletken NP'ler, metaller ve ametaller arasındaki özelliklere ve geniş bant aralıklarına sahiptirler. Bant aralıklarıyla oynanarak özelliklerinde değişim sağlanabilmekte, bu özellikleri sayesinde fotokatalizör, fotoğraf optiği ve elektronik cihazların uygulamalarında kullanılabilmektedirler (Chatterjee vd., 2014).

Literatürde en çok çalışılan yarı iletken NP'ler QD'lerdir. QD'ler, boyutları 2-10 nm olan nanokristallerdir ve yarı iletken yapıya sahiplerdir. QD'ler periyodik cetvelin II-VI (CdSe, PbSe, CdS, ZnO) ve III-V (InAs, InSb, GaAs) grubu bileşiklerinden elde edilmektedir. Optik ve elektriksel özelliklerinden kaynaklı en çok üretilen kuantum noktalar CdSe, InAs, CdS, GaN, InGeAS, CdTe, PbS, PbSe, ZnS'dir. QD'ler

beyaz ışığı emerek, nano saniyeler sonra parçacıkların farklı kombinasyonu şeklinde geri yaymaktadır. Yayıdıkları ışığın dalga boyu, QD'nin boyutu değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Uygulama alanları daha verimli çalışan güneş panelleri, tıpta teşhis için kullanılan biyo-ajanlar, çok daha az enerjiyle çalışan lazerler, istenilen renkte LED aydınlatmalar, az enerjiyle çalışan ve daha fazla aydınlatan ampuller, çok daha az enerjiyle çalışan plazma televizyon ve ekranlar olarak bilinmektedir. QD yüzey modifikasyonu ve stabilizasyonu biyolojik fonksiyonların düzenlenmesi (örn; sitotoksiste) ve biyomedikal uygulamalar için önemlidir. Sentezlenen QD'ler genellikle suda çözünmeyen yapılardır, hidrofilik olabilmeleri için yüzeyleri kaplanmaktadır. Ayrıca, kaplanmamış QD'ler çok reaktiftir ve spesifik olmayan biyomakromoleküllerle istenmeyen etkileşimlere girmekte ve genel olarak ağır metallerden yapıldıkları için hücre/hayvan modellerine uygulandıklarında istenmeyen toksik etkilere neden olmaktadır. Bazı durumlarda (örn; UV'ye maruz kalma), QD'ler oksidasyona uğrayabilir ve sonucunda biyolojik ortama ağır metallerin (örn; kadmiyum iyonları) salımı söz konusu olmaktadır. Bu durum, ROS oluşumu yoluyla nükleik asitler, enzimler ve diğer biyomoleküllerin üzerinde istenmeyen intrinsik biyolojik etkilerini arttırabilir. Bu problemler genellikle uygun bir yüzey modifikasyonu ile giderilmektedir (Barkalina vd., 2014; Khan vd., 2017).

QD'lerin son derece parlak ve kararlı olan fotolüminesans özellikleri biyomedikal görüntüleme ve tedavi için kullanışlıdır. Biyomedikal uygulamalarda görüntüleme ajanları olarak yüksek fotolüminesans, geleneksel organik boyalarla karşılaştırıldıklarında yüksek molar tükenme, NIR'dan UV'ye dar ve simetrik emisyon spektrumları ile geniş absorpsiyonlarının olması gibi üstünlüklere sahiptir. Kanserli hücreye spesifik ligandlar/antikorlar/peptitler ile konjuge QD'ler insan kanser hücrelerinin hedeflenmesi için etkili olmaktadır. QD'lerin ilaç taşınımı için doğrudan kullanımı uzun dönemde toksisitesi nedeniyle tartışmaya açık bir konudur. QD çekirdeği, benzer boyutları ve yüzey özellikleri nedeniyle organik ilaç taşıyıcılar ya da daha biyouyumlu inorganik kontrast ajanlar (altın, manyetik NP'ler) ile kolaylıkla değiştirilebilmektedir (Cobley vd., 2010; Visaria vd., 2006). QD'lerin biyomedikal uygulamaları Şekil 2'de gösterilmiştir.

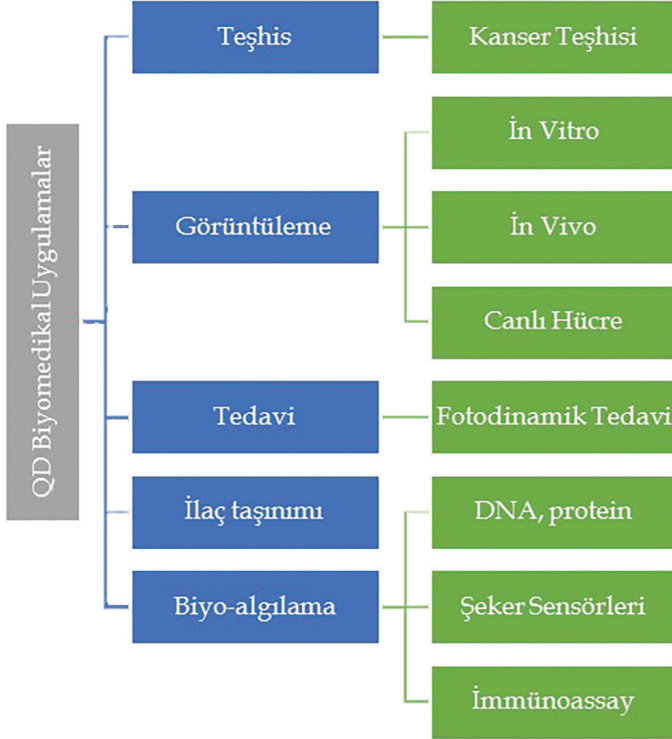
3. Nanomalzemelerin Klinik Uygulamaları

Son yıllarda nanomalzemeler ile yapılan klinik araştırmalarının sayısı sürekli olarak artmakta ve gelecekte bu eğilimin yenilikçi araştırmalara bağlı olarak devam edeceği düşünülmektedir. Sözü edilen araştırmaların çoğu, bir lipozomal veya NP taşıyıcı sistem kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca bir dizi NP bazlı tedavi, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından klinik kullanım için onaylanmıştır. Birçok klinik kanser tedavi protokolü, yan etkiler ve dolayısıyla optimal olmayan etkinlik nedeniyle yüksek etkinlik görülen dozları içermemektedir. İlaç direncinin ortaya çıkışı konvansiyonel kanser kemoterapötiklerinin klinik uygulamalarında bir başka zorluktur. Kemoterapide NP bazlı ilaç taşıma sistemlerinin kullanımı, tolere edilebilirliği artırmakta ve daha iyi bir etkinlik sağlanmaktadır. Ancak klinik uygulamalarda hala zorluklar devam etmektedir (Dreaden vd., 2012). Kanser tedavisi ve tespiti için başarıyla onaylanmış ve ticarileştirilmiş nano-ilaçlardan



bazıları Tablo 2’de listelenmiştir.

Nanomalzemeler, biyo-tıpta, özellikle de kanserin görüntülemesinde ve tedavisinde umut verici uygulamalar olarak kabul edilmekle birlikte, bu teknolojinin klinik uygulamalarda başarılı bir şekilde benimsenmesi için, uzun vadeli toksisite çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Gelişmiş özelliklere sahip nanomalzemeler, kısa süreli tedavilerin taleplerini karşılamalı ve uzun süreli maruziyette olumsuz etkilere neden olmamalıdır. Nanomalzemelerin klinik uygulamalarda güvenli kullanımı için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



Şekil 2. Kuantum Noktacıkların Biyomedikal Uygulamaları (Kuo vd., 2012).

4. Nanotoksikoloji

Nanoteknolojinin hızlı gelişimi ve nanomalzemelerin biyomedikal alanda artan kullanımları ile bunların toksik etkileri konusunda çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. “Nanotoksikoloji”, nanomalzemeler ve biyolojik sistemler arasındaki etkileşimleri araştıran, bu yapıların fizikokimyasal parametreleri (örneğin; boyut, şekil, yüzey modifikasyonu) ile toksik etkilerinin ortaya çıkışı arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir bilim dalı olarak son yıllarda önem kazanmıştır (Hobson vd., 2016; Radomska 2016). Özellikle, gümüş, altın, titanyum dioksit, selenyum dioksit, demir oksit, alümina, çinko oksit, karbon siyahı ve dizel atığı NP’lerinin toksik etkileri üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

5. Nanomalzemelerin/nanopartiküllerin toksisitelerini etkileyen özellikler

Bu alanda yapılan çalışmalarda, üretilen nanomalzemelerin büyük yapıdaki benzerleriyle karşılaştırıldıklarında, küçük boyutlara, spesifik yüzey alanına ve reaktif yüzeye sahip oldukları; özellikle yüksek düzeyde ROT oluşumuna neden olarak sitotoksosite ve genotoksositeye yol açtıkları belirtilmektedir (Khalili Fard vd., 2015; Azhdarzadeh vd., 2015). Ayrıca nanomalzemelerin intrinsik toksikolojik özellikleri, saflıkları ve kimyasal bileşimleri de toksisitelerini önemli ölçüde etkilemektedir (Hobson vd., 2016; Radomska 2016). Şekil 3’de nanomalzemelerin toksisitelerini etkileyen özellikler gösterilmiştir.

Nanomalzemelerin/ NP’lerin toksisitelerini etkileyen özellikleri aşağıda detaylı olarak incelenmektedir:

1. *Boyut:* NP’lerin “yüksek yüzey alanı ve hacim oranları” nedeniyle toksik etkilerinin büyük yapıdaki benzerlerine göre farklı bir şekilde ortaya çıkabileceği belirtilmektedir (Donaldson vd. 2004; Donaldson ve Borm, 2004). Bu durum, bu partiküllerin intrinsik toksisitesi, reaktivite ve katalitik özelliklerinde artışı yol açar (Ying vd., 2001; European Commission-Health and Food Safety Scientific Committees, 2012). Yüzey alanına göre birim başına kütlelerinin fazla olması nedeniyle özellikle NP’lerin başta akciğerler olmak üzere, birçok önemli sistem üzerinde proinflatuvar etkilere yol açabilecekleri öngörülmektedir. Diğer taraftan, bazı NP’lerin farklı bölgelere taşındıkları; başta hepatik sistem, gastrointestinal sistem, deri, santral sinir sistemi, üreme sistemi ve hematopoetik sistem olmak üzere birçok sistem üzerinde toksik etki gösterebildikleri bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda akciğer toksisiteleri dışında bu sistemlerdeki toksik etkileri de yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Donaldson vd, 2004; Donaldson ve Borm, 2004).
2. *Yüzey Alanı:* NP’lerin boyutlarının küçük olması yüzey alanlarındaki artışı beraberinde getirir. Bu özellikleri nedeniyle oluşturdukları akciğer inflamasyonu ve lenf bezi yükleri büyük yapıdaki benzerlerine göre daha fazladır (Tran vd., 2000).
3. *Kimyasal bileşim, intrinsik toksisite ve saflık:* NP’lerin toksisitelerini etkileyen en önemli faktörlerden ikisi kimyasal bileşimleri ve intrinsik toksik özellikleridir. NP’lerin yüzeyleri farklı materyallerle kaplanarak toksisiteleri azaltılıp, etki yerine ulaşmaları sağlanabilir. PEG, en çok tercih edilen kaplama materyalidir ve PEG ile kaplama NP’lerin yüzeylerinin hidrofilik olmasını sağlar. Ayrıca, genelde “mononükleer fagositik sistem (MPS)” tarafından NP’lerin tanınması ve fagosite edilmesini önler. Böylece, NP’ler sistemik dolaşımda daha uzun süre kalır ve artan permeabilite ve alıkonma (enhanced permeability and retention, EPR) etkisinden yararlanarak pasif hedeflendirmeye uygun ilaç formülasyonları oluşturulur (Feltis vd., 2012; Gref vd., 2000; Pratsinis vd., 2013). Diğer taraftan, NP’lerin saflığı da gerek toksisiteleri, gerekse medikal



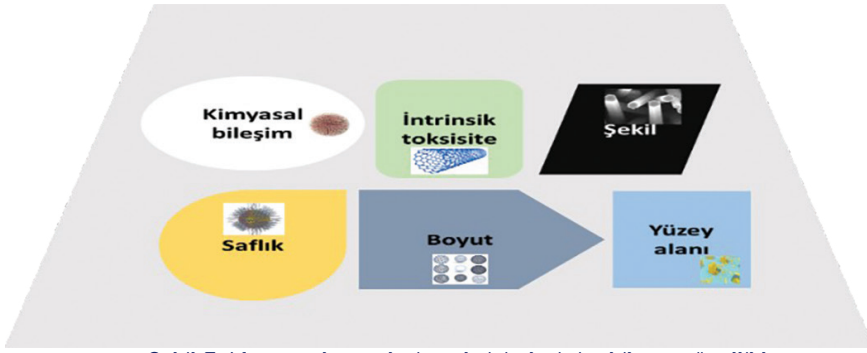
ve biyomedikal uygulamalarda etkililiklerini belirleyen önemli bir faktördür (Ying vd., 2001; European Commission-Health and Food Safety Scientific Committees, 2012). Şekil 4'de medikal ve biyomedikal uygulamalarda kaplama işleminde en çok kullanılan polimer maddelere örnekler verilmektedir. Şekil 5'de nanomalzemelerin kaplanmalarının yararları gösterilmiştir.

4. *Şekil:* NP'lerin toksisitelerinin şekilleriyle de ilişkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle fiber yapıda olan "nanotüp"lerin toksisitelerinin şekilleriyle bağlantılı olduğu; bunların ince ve küçük yapıları nedeniyle kolay solunabilir oldukları ve yüksek derecede inflamasyona yol açtıkları belirtilmektedir. Ayrıca, nanotüplerin şekilleri nedeniyle biyokalicilikleri da yüksektir (European Commission-Health and Food Safety Scientific Committees, 2012). Örneğin, karbon nanotüplerin toksik tozlardan çok daha farklı mekanizmalarla toksik etki gösterdikleri ve yapılan kemirici çalışmalarında sitotoksik ve inflamatuvar etki göstermeden, akciğer granülomalarını ve multifokal granülamatöz lezyonlarını indükledikleri gözlenmiştir (Lam vd., 2004, Warheit vd., 2004). Doz-kütle bazında değerlendirildiğinde, nanotüplerin kuartz partiküllerine göre akciğer toksisitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Warheit vd., 2004).

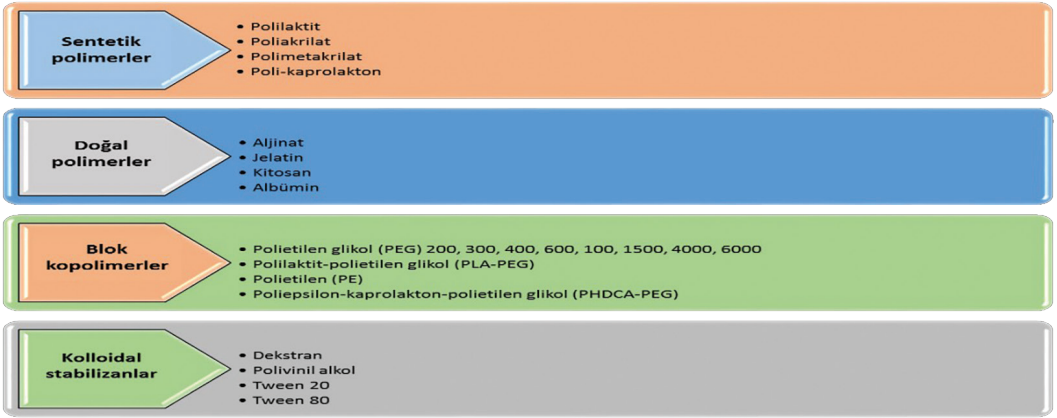
Tablo 2. Kanser tedavisinde onaylanmış ticari nanomalzemeler (McCarthy ve Weissleder, 2007).

Ürün/Cihaz	Nanoplatform/aktif ajan	Durum	Aktif Mekanizma
Doxil/Caelyx1Ö	Dokosorubisin HCl Lipozom (PEG ile kaplı)	Onaylı	Kemoterapi
DaunoXomeÖ	Lipozomal daunorubisin	Onaylı	Kemoterapi
MyocetÖ	Lipozomal dokosorubisin (PEGilasyon yok)	Onaylı	Kemoterapi
AbraxaneÖ	Paclitaxel albumin NP	Onaylı	Kemoterapi
FeridexÖ	Dekstrn kaplı demir oksit NP	Onaylı	MR Görüntüleme
EndoremÖ	Carboksidekstran kaplı demir oksit NP	Onaylı	MR Görüntüleme
Resovist/supravistÖ	Dekstran kaplı demir oksit NP	Onaylı	MR Görüntüleme
ThermoDoxÖ	Isı ile aktif olan lipozomal dokosorubisin kapsüllenmesi	Onaylı Faz III	Kemoterapi
Lumirem, Sinerem, FeraSpinÖ	Demir oksit NP	Onaylı / Araştırılan	Geliştirilmiş MR görüntüleme kontrast
OntakÖ	Protein NP (IL-2 Protein)	Onaylı (1999)	Hedefli taşıma
NanoThermÖ	Demir oksit NP	Onaylı	AC manyetik ısıtma

IL-2: interlökin 2; MR: manyetik rezonans; NP:nanopartikül; PEG: polietilenglikol



Şekil 3. Nanomalzemelerin toksisitelerini etkileyen özellikler.



Şekil 4. Medikal ve biyomedikal uygulamalarda kaplama işleminde en çok kullanılan polimer maddelere örnekler.



Şekil 5. Nanomalzemelerin kaplanmalarının yararları.



5.1. Nanopartiküllerin toksik etkileri ve biyolojik sistemlerle etkileşimleri

Nanopartiküller çok kısa süredir medikal ve biyomedikal alanlarda kullanımda olduğu için, biyolojik sistemlerle etkileşimleri konusundaki veriler yetersizdir. NP'lerin hücre içine alınmaları ve takiben primer toksik etkileri olan oksidatif stresin gelişimi şu basamaklarla gerçekleşir (Bakand ve Hayes, 2016; Khalili Fard vd., 2015):

1. NP'ler akciğerde veya hedef organdaki hücrelerin seçici yarı geçirgen hücre duvarından geçerek hücre membranına tutunur.
2. Hücre içine alımları genelde difüzyon ve endositoz ile gerçekleşir.
3. NP'lerin hücre içine alınmalarını takiben hücrenin farklı organellerine (çekirdek, mitokondri, endoplasmik retikulum, Golgi cisimciği) translokasyonları gerçekleşebilir.
4. NP'ler içine alındıkları hücrenin enerji üretimini değiştirebilir; ATP deplesyonu görülebilir.
5. Takiben "intraseküller ROT" oluşabilir.
6. ROT oluşumunun nihai sonuçları olarak glutatyon gibi önemli tiyollerin düzeylerinin azalması, antioksidan savunma sistemlerinin ve enzimlerinin baskılanması, lipid peroksidasyonunda artış, lipid peroksidasyondan bağımlı veya bağımsız protein oksidasyonu, hücre membranının lizisi ve DNA zincir kırıkları gibi hasarlar oluşabilir.
7. Takiben hücredeki intraseküller kalsiyum düzeylerindeki artış nedeniyle hücre apoptoza veya nekroza gidebilir.
8. Eğer DNA hasarları onarılmaz ve hücre yaşamına devam ederse, mutasyonlar ortaya çıkabilir.

5.2. Solunum yoluyla maruziyet

Her ne kadar akciğerlerdeki ince bariyer tabaka birçok partikülün geçişi için iyi bir engel oluştursa da ve derin akciğer bölgelerine geçişi engellese de, özellikle işyerinden yüksek miktarlarda temas ile bariyer etkinliğini yitirebilir ve respiratuvar toksisite gelişebilir (Chortarea vd., 2015; Endes vd., 2014; Yokel ve Macphail, 2011).

5.3. Dermal yolla maruziyet

İnsan derisi genel olarak birçok ajana karşı iyi bir bariyer kabul edilir. Ancak, dermal maruziyetle metal veya metal oksit NP'lerine maruziyet mümkündür. Örneğin, güneş koruyucuların içinde yer alan titanyum dioksit NP'lerine deri yoluyla maruz kalılabileceği ve düşük miktarlarda olsa da, sistemik dolaşıma geçebilecekleri bildirilmiştir (Larese Filon vd., 2015). Yapılan bir çalışmada, nanotüpler gibi fiber

yapıdaki nanomalzemelerin, insan keratinosit hücrelerinde sitotoksik olabileceği ve oksidatif strese yol açabileceği bildirilmiştir (Shvedova vd., 2003).

5.4. Oral yola maruziyet

Gıda, su, kozmetik, ilaç, biyomedikal malzemeler ve gıda katkı maddelerinde bulunan birçok NP'e oral yolla maruziyet söz konusu olabilir. Özellikle, titanyum dioksit, gümüş, altın, silikon dioksit ve çinko oksit NP'lerine oral yolla yüksek derecede maruz kalınması olasıdır. 70 kg'lık bir bireyin günlük olarak 1,8 mg/kg gümüş NP'lerine ve 0,45 mg/kg titanyum dioksit NP'lerine (E171 gıda boyasının içinde yer almasından dolayı özellikle un, sofrata tuzu, şeker, sakız, diş macunu, sabun, deterjanlar, ilaçlar, vitaminler, şekerleme, karbonat ve kabartma tozlarından) maruz kalabileceği önerilmektedir. Ayrıca, özellikle çocukların titanyum dioksit NP'lerine maruziyetinin erişkinlere göre daha yüksek olduğu (1 mg/kg/gün) belirtilmektedir (Dekkers vd., 2011; Weir vd., 2012). Titanyum NP'lerinin oral absorpsiyonları düşüktür. Genelde kalın bağırsaktan absorbe olurlar (%4.5); mide ve ince bağırsaktan absorpsiyonları oldukça düşüktür (Jani vd., 1994). Translokasyonları yüksek değildir; ancak Caco-2 hücre ince tabakalarından %14 oranında translokasyona uğrayabildikleri gösterilmiştir (Koenenman vd., 2010).

6. Nanomateriyallerde Yapılan Toksikite Testleri

Nanomateriyallere özel geliştirilmiş özel toksisite testleri henüz yoktur. Ancak, büyük ölçekli partikül ve materiyallere uygulanabilen tüm toksisite testlerinin NP ve nanomateriyallere de uygulanması mümkündür.

6.1. In vitro testler

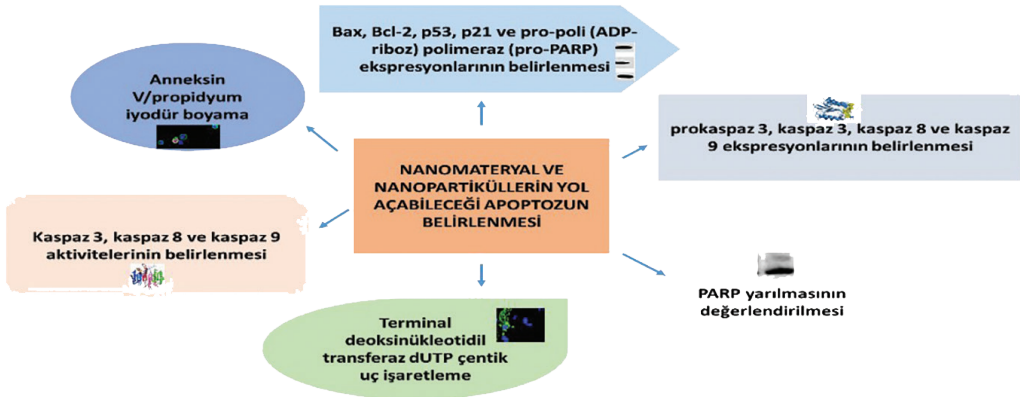
Sitotoksikite testleri: NP ve nanomateriyaller tarafından oluşturulan sitotoksikiteyi tespit etmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2h-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), hücre proliferasyon ajanı (suda çözünür formazan, WST-1), nötral kırmızısı (NR), trifenil mavisi, kristal viyole, and laktat dehidrojenaz (LDH) gibi genel sitotoksikite testleri kullanılmaktadır (de Lima vd., 2012; Determination of Cytotoxicity, 2016; Fotakis ve Timbrell, 2006). Bu testlerden MTT testi, sarı renkli MTT'nin canlı hücredeki mitokondriyel dehidrojenazlar tarafından suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına göre işler. XTT ve WST-10 testleri ise, benzer bir prensibe dayanır; ancak bu kez oluşan suda çözünen sarı renkli kristaller oluşur (de Lima vd., 2012; Determination of Cytotoxicity, 2016; Fotakis ve Timbrell, 2006; van Meerloo vd., 2011). LDH testinde hücrede ölüm durumunda salınan sitozolik bir enzim olan LDH'nın salınımı belirlenir. LDH'ın laktatı piruvata dönüştürürken ortaya çıkan NADH, diaforaz tarafından sarı bir tetrazolyum tuzu olan 2-(p-iyodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorür (INT)'yi kırmızı formazana dönüştürmesi esasına dayanır. LDH aktivitesi hücre kültürünün süpernatantında sitotoksikite biyogöstergesi olarak ölçülür (de Lima vd., 2012; Determination of Cytotoxicity, 2016; Fotakis ve Timbrell, 2006). Diğer bir yöntem ise 3-amino-7-dimetil-amino-2-metilfenazin hidroklorür (NR) yöntemidir.



NR katyonik bir boyadır; sitozolde non-iyonik difüzyona uğrar ve canlı hücrelerin lizozomal membranlarında akümüle olur. Ölü hücrelerde ise, bu olay gerçekleşmez (Zuang vd., 2001).

Apoptozun belirlenmesi: İn vitro sistemlerde apoptozun belirlenmesi için en sık kullanılan yöntemler, Anneksin V/propidyum iyodür boyama, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi, prokaspaz 3, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 ekspresyonlarının belirlenmesi, terminal deoksinnükleotidil transferaz dUTP çentik uç işaretleme (TUNEL), Bax, Bcl-2, p53, p21 ve pro-poli (ADP-riboz) polimeraz (pro-PARP) ekspresyonlarının belirlenmesi ve PARP yarılmalarının değerlendirilmesidir. Ayrıca, akış sitometrisiyle erken/geç apoptotik ve/veya nekrotik hücreler ve hücre siklusunun ilerlemesi de belirlenebilir (Aden vd., 2017; Blankenberg vd., 1999; Demchenko, 2012; Fox ve Aubert, 2008; Krysko vd., 2008; Loo, 2011). NP ve nanomateriyallerde apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler Şekil 6'de gösterilmiştir.

Diğer Yöntemler: ATP deplesyonunu belirlenmesi, hücre membranlarının bütünlüğünün belirlenmesi, mitokondriyel şişme ve hasarın incelenmesi ve lizozomal membran stabilizasyonunun değerlendirilmesi ile de sitotoksiste konusunda bilgiler edinilebilir (Papadopoulos ve Meyer, 2017; Singh vd., 2015).



Şekil 6. Nanopartikül ve nanomateriyallerde apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Oksidatif stresin belirlenmesi: Oksidatif stres NP'lerin toksisiteleri altında yatan temel mekanizmalarından biridir (Khalili Fard vd., 2015). Oksidatif stresin belirlenmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanlardan biri intrasellüler ROT düzeylerinin ölçülmesidir. Diğer taraftan, antioksidan enzim aktivitelerinin (glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz gibi), glutatyon düzeylerinin (total, redükte veya okside glutatyon düzeyleri; hücre içi redoks oranının belirlenmesi), lipid perosidasyonunun (malondialdehit veya F2 izoprostan düzeylerinin ölçümü), protein oksidasyonunun (karbonil gruplarının ölçülmesi) ve total antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi ile in vitro oksidatif stres oluşumu belirlenebilir (Roeslein vd., 2013; Harfield vd., 2012; Marnett, 1999; van Kuijk, 1988; van Kuijk & Dratz, 1987; Dalle-Donne vd., 2003; Somogyi vd., 2007; Pisoschi ve Negulescu, 2011; Halliwell, 2014).

Genotoksisitenin belirlenmesi: İn vitro sistemlerde NP ve nanomateriyaller tarafından oluşturulan genotoksisitenin belirlenmesi için en sık kullanılan yöntemler Comet yöntemi, mikroçekirdek yöntemi, hipoksantin fosforibozil transferaz (HPRT) gen mutasyon testi, histon 2AX (H2AX, çift sarmal DNA kırıklarının belirlenmesi için) belirleme yöntemi, yüksek sürümlü genom-kapsamlı translokasyon dizilemesi (HTGTS), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA baz hasarlarının [8-okzo-2'-deoksiguanosin (8-oxo-dG)] değerlendirilmesi olarak sıralanabilir (Parry vd., 2010).

İn vitro deri ve göz iritasyon ve korozyon testleri: Medikal ve biyomedikal malzemelerin yapısında bulunan NP ve nanomateriyallerin in vitro deri ve göz iritasyon testleri için yeniden yapılandırılmış insan epidermis dokuları ve yeniden yapılandırılmış insan kornea benzeri epitel dokuları kullanılabilir. Bu dokular ve kullanımlarıyla ilgili bilgiler OECD Test Kılavuzlarında (TG 439, TG 431, TG 492) yer almaktadır (OECD TG 431, 2015; OECD TG 439, 2015; OECD TG 492, 2015).

Fototoksosite testleri: Medikal ve biyomedikal malzemelerin yapısında bulunan NP ve nanomateriyallerin fototoksik özelliklerini belirlenebilmesi için sıklıkla kullanılan bir yöntem olan ve 3T3 fibroblastlarının nötral kırmızı geri alımını ölçen "3T3 nötral kırmızısı gerilimi (NRU) yöntemi" kullanılabilir. Bu yöntem OECD TG 432'de detaylı olarak verilmiştir (OECD TG 432, 2004).

6.1 İn vivo toksisite testleri

Tüm farmasötik ürünler ve biyomedikal malzemelere uygulanan klasik toksisite testlerinin NP ve nanomateriyallere de gerektiğinde bir takım modifikasyonlarla uygulanması mümkündür. Bu testler akut, subakut, subkronik ve kronik toksisite testleridir.

Akut toksisite testlerinde amaç, kullanılan hayvan popülasyonunun yarısında ölüme neden olan dozu (medyan letal doz 50, LD50) bulmak veya tahmin etmektir. Uygulama tek bir kez yapılır ve 14 gün boyunca uygulama yapılan hayvanlardaki tüm değişiklikler kaydedilir. Akut toksisite testlerinin sonunda hayvanlar öldürülür ve tüm makroskopik, mikroskopik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılır (OECD TG 401, 1987).

LD50 testi 2002'den beri kullanılmamaktadır; ancak bu testin yerine üç alternatif test önerilmiştir. Bu testlerden "sabit doz prosedürü (FDP)"nde dişi sıçanlar kullanılır; OECD TG 420 olarak yayınlanmıştır ve testte amaç LD50'yi tahmin etmektir. Diğer bir alternatif test metodu "akut toksik sınıf metodu (ATC)"dur; teste her cinsten 3 hayvanla başlanır; OECD TG 423 olarak yayınlanmıştır ve testte amaç LD50'yi tahmin etmektir. "Yukarı aşağı prosedürü (UDP)" ise, diğer bir alternatif yöntem olup, testte dişi sıçanlar kullanılır. Limit testine 5 hayvanla başlanır; OECD TG 425 olarak yayınlanmıştır ve testte amaç LD50'yi güvenlik sınırlarıyla birlikte kesin olarak belirlemektir (OECD TG 420, 2001; OECD TG 423, 2001; OECD TG 425, 2008).

Subakut toksisite testlerinde amaç, doz-cevap eğrisini ve hedef organları belirlemek ve subkronik toksisite testleri için ön bilgi edinmektir. Testlerde çoklu uygulama



yapılır ve uygulama 14-28 gün boyunca sürer. Testlerde uygulanan her doz için 10 kemirici kullanılır. 28 günlük oral subakut toksisite testinin uygulanışı OECD TG 407'de açıklanmaktadır. Subakut inhalasyon toksisite testi OECD TG 412, subakut dermal toksisite testi ise OECD TG 404 olarak olarak yayınlanmıştır (OECD TG 404, 2015; OECD TG 407, 2008; OECD TG 412, 2009).

Subkronik toksisite testleri, tekrarlayan dozlarda uygulama yapılan hayvanın yaşam süresinin %10'unu geçmeyecek şekilde gerçekleştirilir. Testlerde uygulanan her doz için 20 kemirici kullanılır. 90 günlük oral subkronik toksisite testi OECD TG 408 olarak yayınlanmıştır. Testlerin amacı uygulanan maddenin "ters etki gözlenmeyen düzey (NOAEL)"ini ve "en düşük ters etki gözlenen düzey (LOAEL)"ini belirlemek ve "referans dozları (Rf)"nı NOAEL, LOAEL ve belirsizlik faktörlerini kullanarak hesaplamaktır (OECD TG 408, 1998).

Kronik toksisite ve karsinogenisite testleri, OECD TG 453 olarak yayınlanmıştır. Bu testlerde amaç, düşük doz, uzun süre maruziyetin etkilerinin belirlenmesidir. Deneylere başlamadan önce, ön deneyler gerçekleştirilerek "maksimum tolere edilebilir doz (MTD)" belirlenir. Bu doz hayvanda %10 kilo kaybına neden olan dozdur. Hayvanlara MTD dozu, bu dozun yarısı veya çeyreği uygulanabilir. Her doz grubu için her iki cinsten en az 10 hayvan seçilir. Uygulama hayvanın yaşamı boyunca devam edebileceği gibi, 12 veya 24 ayla da sınırlandırılabilir. Amaç düşük doz, uzun süre uygulama ile maddenin karsinogenik özelliğinin belirlenmesidir. Kronik toksisite testlerinin sonunda, hayvanlarda daha önce kontrol grubuna göre kanser görülme sıklığının ne kadar yüksek olduğunun belirlenmesi; kontrol grubuna göre hedef organda hayvanın o anki yaşında görülmeyen tümör sıklığının ne kadar arttığının belirlenmesi veya o yaşta hiç görülmeyen tümörlerin kontrol grubuna göre ne kadar yüksek olduğunun belirlenmesi ile maddelerin olası karsinogenik potansiyelleri değerlendirilir (OECD TG 453, 2009).

Klasik toksisite testlerinin yanı sıra NP ve nanomateriyallerin üreme ve gelişimsel toksisite testleri, dermal iritasyon potansiyelleri ve göz iritasyonu yapma olasılıkları da belirlenebilir. Ayrıca in vitro testlerde kullanılan yöntemler kullanılarak genotoksisite testleri ve oksidatif stres oluşturma özellikleri değerlendirilebilir. Diğer taraftan, oluşturdukları olası immün cevap değişiklikleri de ölçülebilir.

7. Nanomateriyal ve nanopartiküllerde toksikolojik risk değerlendirmesi

Nanopartikül ve nanomateriyallerin toksikolojik risk analizleri de büyük ölçekli materyal ve partiküllere benzer şekilde gerçekleştirilir. Toksikolojik risk değerlendirmesinde amaç NP ve nanomateriyallerin insan popülasyonları üzerinde yol açabilecekleri olası istenmeyen etkilerin öngörülmesidir (Kleijnans, 2003). NP ve nanomateriyaller için risk değerlendirmesi 4 aşamada yapılır (Kleijnans, 2003):

- a. Tehlikenin belirlenmesi: "Tehlike" bir maddenin zarar verme potansiyeli veya ters etkiye yol açma olasılığı olarak ifade edilir. NP ve nanomateriyallerin intrinsik

özellikleri, kimyasal bileşimleri, saflıkları, şekilleri, boyutları ve yüzey alanları tehlikelerini belirlemekte etkindir. Bu özelliklerine ve olası maruziyet yollarına göre tehlike belirlenir (Faustman & Omenn, 2015; Kleinjans, 2003).

- b.** Doz-cevap değerlendirmesi: “Doz” biyolojik bir sisteme giren madde miktarıdır. “Sistemik doz” ise, spesifik bir organ veya sistem tarafından tutulan madde miktarıdır. NP ve nanomateriyallerin inhalasyonla alımlarında hedef organa translokasyonları düşük olsa da, büyük ölçekli materyal ve partiküllerden farklı toksik etkiler oluşturabilme ve farklı doz-cevap eğrileri verebilme olasılıkları vardır. Bu doz-cevap eğrileri aynı NP ve nanomateriyalin farklı boyutları arasında da değişiklik gösterebilir (Faustman ve Omenn, 2015; Kleinjans, 2003).
- c.** Maruziyetin değerlendirilmesi: “Maruziyet” bir maddenin biyolojik sistemle temas halinde kalması olarak ifade edilebilir. Maruziyet değerlendirmesinde temel olarak NP ve nanomateriyallerle biyolojik sistem arasındaki temasın ne boyutta ve ne kadar sürede gerçekleştiği; bu maruziyetin de büyük ölçekli partikül ve materyallere göre farkı önemli unsurları oluşturur. Zira, NP ve nanomateriyallerin küçük boyutları, geniş yüzey alanları ve farklı boyut: kitle oranları nedeniyle, toksisitelerinin büyük ölçekli partikül ve materyallere göre daha farklı olabileceği öngörülebilir (Faustman ve Omenn, 2015; Kleinjans, 2003).
- d.** Risk karakterizasyonu: “Risk” belirli bir maruziyet ya da durumun zarar verme olasılığıdır. Tehlikenin aksine, risk azaltılabilir veya kontrol edilebilir. Günümüzde oluşturabileceği risklerin tam olarak karakterize edildiği NP ve nanomateriyal yoktur. Özellikle farklı yüzey modifikasyonları, şekilleri ve değişen boyutları bu maddelerin risk karakterizasyonunu zorlaştırmaktadır (Faustman ve Omenn, 2015; Kleinjans, 2003).

7.1. Sıklıkla kullanılan nanomateriyal ve nanopartiküllerin toksik etkileri

7.1.1. Çinko oksit nanopartikülleri

Çinko oksitten üretilen NP’lerin birçok medikal ve biyomedikal alanda kullanımları vardır. Diğer taraftan, güneş koruyucuların ve birçok kişisel bakım ürününün de yapısında bulunurlar (Huang vd., 2006; Huang vd., 2010). İn vitro sistemlerde yapılan çalışmalarda çinko oksit NP’lerinin en belirgin toksik etkilerinin oksidatif stres oluşturmaları olduğu belirlenmiştir. Özellikle yüksek dozlarda sitotoksik oldukları, membran hasarına yol açtıkları, hücre morfolojisini değiştirdikleri, DNA hasarı oluşturdıkları, mitokondriye toksik etkilerinin olduğu ve apoptozu indükledikleri belirtilmiştir (Brunner vd., 2006; Guan vd., 2012; Huang vd., 2010; Meyer vd., 2011; Sharma vd., 2012). Kronik olarak çinko oksit NP’lerine maruziyetin insan hepatoma hücrelerinde (HepG2) birçok enzimin ekspresyonunu değiştirdiği ve DNA hasarı oluşturduğu bildirilmiştir (Osman vd., 2010).

7.1.2. Titanyum oksit nanopartikülleri

Titanyum oksit kimyasal olarak inert bir maddedir. Ancak, yapılan çalışmalarda



titanyum dioksit NP'lerinin deney hayvanlarında bazı toksik etkilere yol açtığı, oksidatif stresi indükledikleri, genotoksositeye ve inflamasyona neden oldukları belirlenmiştir (Bhattacharya vd., 2009; Liu vd., 2009; Trouiller vd., 2009). Genotoksik etkileri DNA hasarı ve DNA katım ürünü oluşturmaları şeklinde ortaya çıkar (Bhattacharya vd., 2009). Deney hayvanlarında immün sistemi, karaciğer ve böbrek işlevlerini etkiledikleri; ayrıca akciğer, dalak ve miyokarda da toksik etkilere yol açtıkları gösterilmiştir. Diğer taraftan, glikoz ve lipid homeostazını da etkiledikleri belirtilmiştir (Liu vd., 2009; Liu vd., 2010).

Yapılan birçok çalışma titanyum dioksit NP'lerinin erkek üreme sistemi üzerinde potansiyel bir toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Hong ve ark. (2016), titanyum dioksit NP'lerine maruz kalan 28 günlük ICR farelerin Sertoli hücrelerinden izole edilmiş primer hücre kültüründe hücre canlılığının azaldığını, apoptotik sitokin düzeylerinin arttığını, apoptoz gelişiminin (sitokrom c, Bax, kaspaz-3, glukoz-düzenleyici protein 78 (GRP78), C/EBP homolog proteini ve kaspaz-12'nin ifadesinde artma; Bcl-2 'nin ise ifadesinde azalma) ve oksidatif stresin indüklendiği ve de antioksidan kapasitenin düştüğünü belirlemişlerdir (Hong vd., 2016).

7.1.3. Gümüş nanopartikülleri

Uzun yıllardır gümüş preparatları antibakteriyel olarak ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda ise, gümüş NP'lerinin ilaç olarak ve biyomedikal uygulamalarda (yara kaplama malzemeleri cerrahi aletlerin kaplanması ve protezler) kullanımı artmıştır (Chen & Schluesener, 2008). Gümüş NP'lerinin birçok yolla insan vücuduna girdikleri, kan-beyin engelini aştıkları ve beyne ulaşabildikleri bilinmektedir. Ayrıca, deney hayvanlarına inhalasyon veya subkütanoz enjeksiyon ile uygulanmaları sonucu dalak, karaciğer, böbrek ve beyne transloke olabildikleri de bilinmektedir (Tang vd., 2009). Diğer taraftan, başka NP'lere oranla toksisitelerinin daha yüksek olduğu; intrasellüler ROT üretiminde artışa ve hücre ölümüne yol açabildikleri de belirlenmiştir (Hussain vd., 2011). Polivinil-pirolin kaplı gümüş NP'lerinin (6-20 nm) insan akciğer hücre hattına uygulanmaları sonucunda doz-bağımlı toksisiteye ve DNA katım ürünlerinin oluşmasına yol açmaktadır (Foldbjerg vd., 2011). Ayrıca, insan lösemi hücre hattında yapılan bir çalışmada peptit kaplı gümüş NP'lerin sitrat kaplı olanlara göre daha toksik olduğu bulunmuştur (Haase vd., 2011). Diğer taraftan, gümüş NP'lerinin primer hedeflerinden biri üreme sistemidir. Thakur ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, gümüş NP'lerinin (5-20 nm) erkek Wistar sıçanlarda testiste histopatolojik değişikliklere, spermatojenik hücrelerde bozulmaya, germ hücrelerinde nekroza, spermatogonia ve Leydig hücrelerinde anormal fibroblast benzeri bir görünüme, komşu Sertoli hücreleri arasında anormal boşluklara ve mitokondride yapısal hasara yol açtığını gözlemişlerdir (Thakur vd., 2014). Miresmaeili ve ark. (2013)'nin yaptıkları çalışmada ise, farklı dozlarda (50, 100 ve 200 mg/kg) gümüş NP'lerinin (70 nm) sıçan spermatozoasının akrozomunda ve spermatojenik hücrelerin sayısı üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Akrozom reaksiyonunda kontrol grubu ve iki yüksek doz grubu arasında fark belirlenmiştir. Sertoli hücre sayısı ve seminifer tübül çapları gümüş NP uygulamalarından etkilenmemiştir. Ayrıca, tüm uygulama yapılan deney gruplarında, spermatozoanın

yanı sıra primer spermatositler ve spermatitlerin sayısında da önemli bir azalma görülmüştür (Miresmaeili vd., 2013).

7.1.4. Demir oksit nanopartikülleri

Demir oksit NP'leri, biyomedikal uygulamalar, ilaç taşıyım sistemleri ve diagnostik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu NP'lerin karaciğer ve retiküloendotelyal organlarda biriktiği belirtilmektedir (Albukhaty vd., 2013; Naqvi vd., 2010). Yapılan hayvan çalışmalarında, demir oksit NP'lerinin farklı organellerde (endozom/lizozom) akümüle olduğu ve takiben dekompose olup sitoplazmaya salındıkları ve sonuçta hücrel demir havuzuna katıldıkları görülmüştür. Manyetik demir oksit NP'leri inhalasyon yoluyla maruziyet sonrası karaciğer, dalak, akciğer ve beyinde birikirler ve kan beyin engelini geçebilirler (Liu vd., 2013). Bu NP'lerin hücre lizisine, inflamasyona ve kan koagülasyonunda bozulmaya yol açtıkları da belirlenmiştir (Zhu vd., 2008). Fare nöroblastoma hücrelerine (Neura-2A) uygulanmalarından sonra, yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne, hücre morfolojisinde ve permeabilitesinde bozulmaya; takiben mitokondriyel hasara ve apoptoza yol açtıkları da saptanmıştır. Bu olayların altında yatan mekanizmalardan en önemlisinin ise, intrasellüler ROT üretiminde yol açtıkları artış ve takiben lipid peroksidasyonunun ve DNA hasarının artışı olduğu ifade edilmiştir (Jeng vd., 2006).

7.1.5. Altın nanopartikülleri

Altın NP'leri oldukça özgül fizikokimyasal özelliklere sahiplerdir. Kolayca işlevselleştirilebilirler. İnert ve non-toksik olarak kabul edilirler. Ayrıca farklı kaplama ve yüzey modifikasyonları ile biyomedikal uygulamalarda, ilaç taşıyıcı sistemlerde, termal terapide ve kontrast ajanlarının bileşiminde kullanılabilirler (Jain vd., 2012). Lösemi hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada, sferik yapıları altın NP'lerinin hücre içine girebildikleri; ancak hücrel işlevleri etkilemedikleri belirlenmiştir (Connor vd., 2005). Yapılan bazı çalışmalarda ise, farklı özelliklerdeki altın NP'lerinin sitotoksik olabilecekleri ifade edilmiştir. Altın NP'lerinin sitotoksik özelliklerinin uygulama dozuna, yan zincirine (katyonik olanlar daha toksik), kullanılan stabilizere ve uygulama yapılan hücre hattına bağlı olduğu belirtilmektedir (Connor vd., 2005; Jain vd., 2012).

7.1.6. Karbon bazlı nanomateriyaller

Farklı uygulamalar göz önüne alındığında, karbon nanotüpler, fullerenler, tek veya çoklu duvarlı karbon nanotüpler gibi karbon bazlı nanomateriyallerin oldukça sıklıkla kullanıldığı görülebilir (Huczko, 2001). Çözünür karbon bazlı nanotüpler, görüntüleme uygulamalarında umut vaat etmektedir. Ayrıca CB nanotüpler, kemik, kırık, kas ve sinir dokusu oluşturulması için doku mühendisliğinde biyoyıkılabilir polimerik nanokompozit olarak kullanılmaya başlanmıştır. Karbon bazlı nanomateriyallerin boyutlarının dışında, hazırlanma metotları ve yapılarında bulunan eser elementlerin de toksisiteyi ve biyolojik cevabı etkileyebildiği belirtilmektedir (Donaldson vd., 2006; Pulskamp vd., 2007).



Karbon bazlı nanomateriyallerin sitotoksik olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Bir çalışmada, farklı yapıdaki karbon bazlı nanomateriyallerin akciğer kanser hücreleri üzerindeki toksisiteyi değerlendirilmiştir ve bu hücrelerde sitotoksik olabileceği gösterilmiştir (Magrez vd., 2006). Yapılan bir diğer çalışmada, karbon bazlı nanomateriyallerin insan alveolar karsinoma epitel hücre hattı, primer insan bronşiyel hücreleri ve insan keratinosit hücre hatlarında boyut-bağımlı bir sitotoksikite gösterdikleri bulunmuştur (Herzog vd., 2007). Kemiricilerde yapılan çalışmalarda ise, çoklu duvarlı karbon nanotüplerin intraperitoneal uygulamaları sonucu asbest benzeri karsinojenik etkiler gösterebilecekleri belirlenmiştir (Poland vd., 2008). Tekli duvarlı karbon nanotüplerin ise, kronik maruziyet sonucu hayvanların karaciğerinde birikebildikleri ve karaciğer enzimlerinde (LDH, alanin transaminaz, aspartat transaminaz) ve lipid peroksidasyonda artışa; glutatyon düzeylerinde ise azalışa neden oldukları belirlenmiştir (Yang vd., 2008). Karbon bazlı nanomateriyallerin üreme sistemi toksisitesi de gösterdikleri bilinmektedir. Üç farklı boyutta (14, 56 ve 95 nm) intratrakeal yoldan (her hafta 10 kez 0,1 mg/fare) karbon temelli nanomateriyallerin uygulamasını takiben, 14- ve 56-nm boyutlarındaki nanomateriyallere maruz kalan gruplarda serum testosteron düzeyleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Histolojik incelemeler, seminifer tübülde bir takım sıvı dolu kesecikler oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca, parçacık sayısının erkek üreme sistemine etkisi de araştırılmıştır. Parçacık sayısı kontrollü olan 14 nm boyutundaki NP'lere maruz kalan grupta, 56 nm boyutundaki nanomateriyale maruz kalan gruptan daha az ters etki gözlenmiştir (Yoshida vd., 2009). Bai ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, erkek farelere intravenöz olarak karbon nanotüp uygulamasının (1 mg/ml) fertilite ve testis üzerindeki etkilerini incelemiştir. Karbon nanotüplerin testislerde biriktiği, 15 gün uygulama sonrasında oksidatif strese ve seminifer epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir; ancak oluşan hasar 60. ve 90. günlerde onarılmıştır. Hayvanların sperm sayısı, niteliği ve bütünlüğü ve seks hormonlarının düzeyleri karbon nanotüp uygulamasından en uzun süreli uygulama (90 gün) sonunda bile etkilenmemiştir. Ayrıca, karbon nanotüplere maruz bırakılan erkek fareler ile çiftleştirilen dişi farelerin doğum sayısı, maruz kalmayan erkek farelerle çiftleştirilen dişi farelerin doğum sayısından farklı bulunmamıştır (Bai vd., 2010).

7.1.8. Silika nanopartikülleri

Silika NP'leri özellikle ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve nanosilikanın biyouyumlu olduğu önerilmektedir. Kolayca işlevselleştirilebilirler (Park & Park, 2009; Wilczewska vd., 2012). Lin ve ark. (2006)'nın yaptığı bir çalışmada, insan bronşiyokarsinoma hücrelerine silika NP'lerinin (15-46 nm) farklı dozlarda (10-100 µg/ml) uygulanması sonucu, doz-bağımlı bir sitotoksik etki, intrasellüler ROT ve lipid peroksidasyonda artış belirlenmiştir (Lin vd., 2006). Yapılan farklı in vivo ve in vivo çalışmalarda ise silika NP uygulamalarının inflamasyon biyomarkörlerinde (interlökin 6 ve 8, tümör nekroz faktör α) artışa ve mitokondriyel hasara yol açtığı görülmüştür (Cho vd., 2007; Cho vd., 2009; Sun vd., 2011).

8. Sonuç

Günümüzde NP'ler ve tüm nanomateriyaller hayatımıza önemli ölçüde girmiştir. Bu nano boyuttaki malzemelerin en önemli kullanım alanlarından biri biyomedikal uygulamalar olmuştur. Ancak, bu malzemelerin toksik etkileriyle ilgili henüz yeteri kadar veri yoktur. Ayrıca gerek toksik etkilerinin belirlenmesi, gerekse toksikolojik risk değerlendirilmelerinin yapılması için henüz bu malzemelere özel yeni test ve değerlendirme sistemleri bulunmamaktadır; büyük ölçekteki benzeriyle aynı toksikolojik değerlendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu malzemelerin farklı yapılarının göz önüne alındığı yeni toksikolojik değerlendirme yöntemlerinin geliştirilmesi ve araştırmacıların bu konulara eğilmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, hali hazırda bulunan toksikolojik testler ile bu malzemelerin başta sitotoksisite olmak üzere tüm toksik etkilerinin hem in vitro, hem de in vivo olarak ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi için daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Araştırmacıların başta altın ve gümüş gibi en sık kullanılan NP'ler ile toksisite mekanizmalarının aydınlatılmasına dair yapacakları çalışmaların büyük önem taşıyacağı ve biyomedikal alanda bu malzemelerin kullanımıyla ilgili soru işaretlerini giderebileceği söylenebilir.

9. Kaynaklar:

- Adan, A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176.
- Albukhaty, S, Naderi-Manesh, H, Tiraihi, T. (2013). In vitro labeling of neural stem cells with poly-L-lysine coated super paramagnetic nanoparticles for green fluorescent protein transfection. *Iranian Biomedical Journal*, 17(2), 71-76.
- Azhdarzadeh, M, Saei, AA, Sharifi, S, Hajipour, MJ, Alkilany, AM, Sharifzadeh, M, Ramazani, F, Laurent, S, Mashaghi, A, Mahmoudi M. (2015) Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology. *Nanomedicine (London)*, 10(18), 2931-2952.
- Bai, Y, Zhang, Y, Zhang, J, Mu, Q, Zhang, W, Butch, ER, Snyder, SE, Yan, B. (2010). Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nature Nanotechnology*, 5(9), 683-689.
- Bakand, S, Hayes, A. (2016). Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), pii: E929.
- Barkalina, N, Charalambous, C, Jones, C, Coward K. (2014). Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine*, 10 (5), 921–938.
- Behera, SS, Pramanik, K, Nayak, MK. (2015). Recent Advancement in the Treatment of Cardiovascular Diseases: Conventional Therapy to Nanotechnology. *Current Pharmaceutical Design*, 21(30), 4479-4497.
- Bhattacharya, K, Davoren, M, Boertz, J, Schins, R, Hoffmann, E, Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Partical and Fiber Toxicology*, 6, 17.
- Blankenberg, F, Narula, J, Strauss, HW. (1999). In vivo detection of apoptotic cell death: a necessary measurement for evaluating therapy for myocarditis, ischemia, and heart failure. *Journal of Nuclear Cardiology*, 6(5), 531-539.
- Brunner, TJ, Wick, P, Manser, P, Spohn, P, Grass, RN, Limbach, LK, Bruinink, A, Stark, WJ. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Sciences and Technology*, 40(14), 4374-4381.



- Chatterjee, K, Sarkar, S, Jagajjanani Rao K, Paria S. (2014) Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science* 209, 8–39.
- Chen, X, Schluesener, HJ. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1-12.
- Cho, M, Cho, WS, Choi, M, Kim, SJ, Han, BS, Kim, SH, Kim, HO, Sheen, YY, Jeong, J. (2009). The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicological Letters*, 189(3), 177-183.
- Cho, WS, Choi, M, Han, BS, Cho, M, Oh, J, Park, K, Kim, SJ, Kim, SH, Jeong, J. (2007). Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicology Letters*, 175(1-3), 24-33.
- Cobley, CM, Au, L, Chen, J, Xia, Y. (2010). Targeting gold nanocages to cancer cells for photothermal destruction and drug delivery. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 7, 577-587.
- Connor, EE, Mwamuka, J, Gole, A, Murphy, CJ, Wyatt, MD. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325-327.
- Dalle-Donne, I, Rossi, R, Giustarini, D, Milzani, A, Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329 (1-2), 23-38.
- de Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N., 2012. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32, 867-879.
- Demchenko, A.P., 2012. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp. Oncol.* 34, 263-268.
- Determination of Cytotoxicity, 2016. *Prog. Drug Res.* 71:159-161.
- Donaldson, K, Aitken, R, Tran, L, Stone, V, Duffin, R, Forrest, G, Alexander, A. (2006). Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences*, 92(1), 5-22.
- Donaldson, K, Borm, P. (2004). Particle and Fibre Toxicology, a new journal to meet a real need. *Particle and Fibre Toxicology*, 1(1), 1.
- Donaldson, K, Stone, V, Tran, CL, Kreyling, W, Borm, PJ. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(9), 727-728.
- Dreaden, EC, El-Sayed, MA. (2012). Detecting and destroying cancer cells in more than one way with noble metals and different confinement properties on the nanoscale. *Accounts of Chemical Research*, 45(11), 1854-1865.
- Edmund, AR, Kambalapally, S, Wilson, TA, Nicolosi, RJ. (2011). Encapsulation of cadmium selenide quantum dots using a self-assembling nanoemulsion (SANE) reduces their in vitro toxicity. *Toxicology In Vitro*, 25(1), 185-90.
- European Commission. Health and Food Safety Scientific Committees. Commission Staff Working Paper. Types and uses of nanomaterials, including safety aspects. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee on the Second Regulatory Review on Nanomaterials. 2012. Erişim: http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/nanotechnology/docs/swd_2012_288_en.pdf
- Faustman, EM, Omenn, GS. (2015). Risk Assessment. Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, Third Edition. Klaassen C, Watkins, JB. s. 49-60. The McGraw-Hill Companies Inc, New York.
- Feltis, BN, OKeefe, SJ, Harford, AJ, Piva, TJ, Turney, TW, Wright, PF. (2012). Independent cytotoxic and inflammatory responses to zinc oxide nanoparticles in human monocytes and macrophages. *Nanotoxicology*. 6(7), 757-765.
- Foldbjerg, R, Dang, DA, Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 85(7), 743-750.

- Fotakis, G, Timbrell, JA. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Fox, R, Aubert, M. (2008). Flow cytometric detection of activated caspase-3. *Methods in Molecular Biology*, 414, 47-56.
- Gref, R, Lück, M, Quéllec, P, Marchand, M, Dellacherie, E, Harnisch, S, Blunk, T, Müller, RH. (2000). 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3-4), 301-313.
- Guan, R, Kang, T, Lu, F, Zhang, Z, Shen, H, Liu, M. (2012). Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 602-607.
- Haase, A, Mantion, A, Graf, P, Plendl, J, Thuenemann, AF, Meier, W, Taubert, A, Luch, A. (2012). A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems. *Archives of Toxicology*, 86(7), 1089-1098.
- Halliwell, B. (2014). Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomedical Journal*, 37(3), 99-105.
- Harfield, JC, Batchelor-McAuley, C, Compton, RG. (2012). Electrochemical determination of glutathione: a review. *Analyst*. 137(10), 2285-2296.
- He, X, Ma, N. (2014). An overview of recent advances in quantum dots for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 124, 118-131.
- Herzog, E, Casey, A, Lyng, FM, Chambers, G, Byrne, HJ, Davoren, M. (2007). A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials the clonogenic assay. *Toxicology Letters*, 174(1-3), 49-60.
- Hobson, DW, Roberts, SM, Shvedova, AA, Warheit, DB, Hinkley, GK, Guy, RC. (2016). Applied Nanotoxicology. *International Journal of Toxicology*, 35(1), 5-16.
- Hong, F, Zhao, X, Chen, M, Zhou, Y, Ze, Y, Wang, L, Wang, Y, Ge, Y, Zhang, Q, Ye, L. (2016). TiO₂ nanoparticles-induced apoptosis of primary cultured Sertoli cells of mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(1), 124-135.
- Huang, CC, Aronstam, RS, Chen, DR, Huang, YW. (2010a). Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology In Vitro*, 24(1), 45- 55.
- Huang GG, Wang CT, Tang HT, Huang YS, Yang J. ZnO nanoparticle-modified infrared internal reflection elements for selective detection of volatile organic compounds. *Analytical chemistry* 2006; 78(7): 2397-2404.
- Huczko, A. (2001). Synthesis of aligned carbon nanotubes. *Journal of Applied Physics*, 2001; 74: 617-638.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* 2005; 19(7): 975-983.
- Jain, S, Hirst, DG, O'Sullivan, JM. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology*, 85(1010), 101-113.
- Jeng, HA, Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Sciences and Health Part A*, 41(12), 2699-2711.
- Ju, L, Zhang, G, Zhang, C, Sun, L, Jiang, Y, Yan, C, Duerksen-Hughes, PJ, Zhang, X, Zhu, X, Chen, FF, Yang, J. (2013). Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. *Mutation Research*, 753(1), 54-64.



- Karakoti AS, Shukla R, Shanker R, Singh S. (2015). Surface functionalization of quantum dots for biological applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 215, 28-45.
- Kaushik A, Jayant RD, Bhardwaj V, Nair M. (2017). Personalized nanomedicine for CNS diseases. *Drug Discovery Today*, pii: S1359-6446(17)30236-2.
- Kuo, WS, Chang, YT, Cho, KC, Chiu, KC, Lien, CH, Yeh, CS, Chen, SJ. (2012). Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*, 33(11), 3270-3278.
- Khalili Fard, J, Jafari, S, Eghbal, MA. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advances in Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447-454.
- Khan, I, Khalid, S, Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, (in press).
- Kleijnans, JC. (2003). Principles in toxicological risk analysis. *Toxicology Letters*, 140-141, 311-315.
- Krätschmer, W. (2011). The story of making fullerenes. *Nanoscale*, 3(6), 2485-2489.
- Krysko, DV, Vanden Berghe, T, D'Herde, K, Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44(3), 205-221.
- Kuzyniak, W, Adegoke, O, Sekhosana, K, D'Souza, S, Tshangana, SC, Hoffmann, B, Ermilov, EA, Nyokong, T, Höpfner, M. (2014). Synthesis and characterization of quantum dots designed for biomedical use. *International Journal of Pharmacy*, 466(1-2), 382-389.
- Lam, CW, James, JT, McCluskey, R, Hunter, RL. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences*, 77(1), 126-134.
- Lan, Z, Yang, WX. (2012). Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine (London)*, 7(4), 579-596.
- Lehner, R, Wang, X, Marsch, S, Hunziker, P. (2013). Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine*, 9(6), 742-757.
- Lin, W, Huang, YW, Zhou, XD, Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), 252-259.
- Liu, G, Gao, J, Ai, H, Chen, X. (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), 1533-1545.
- Liu, H, Ma, L, Zhao, J, Liu, J, Yan, J, Ruan, J, Hong, F. (2009). Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice. *Biological Trace Element Research*, 129(1-3), 170-180.
- Liu, R, Yin, L, Pu, Y, Liang, G, Zhang, J, Su, Y, Xiao, Z, Ye, B. (2009). Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science*, 19(5), 573-579.
- Liu, R, Zhang, X, Pu, Y, Yin, L, Li, Y, Zhang, X, Liang, G, Li, X, Zhang, J. (2010). Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(8), 5161-5169.
- Loo, DT. (2011). In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in Molecular Biology*, 682, 3-13.
- Magrez, A, Kasas, S, Salicio, V, Pasquier, N, Seo, JW, Celio, M, Catsicas, S, Schwaller, B, Forro, L. (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Letters*, 6(6), 1121-1125.
- Marnett, LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1-2), 83-95.
- McCarthy, JR, Kelly, KA, Sun, EY, Weissleder, R. (2007). Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (London)*. 2(2), 153-167.

- McMahon, KM, Foit, L, Angeloni, NL, Giles, FJ, Gordon, LI, Thaxton, CS. (2015). Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles as cancer therapy. *Cancer Treatment Research*, 166, 129-150.
- Meyer, K, Rajanahalli, P, Ahamed, M, Rowe, JJ, Hong, Y. (2011). ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology In Vitro*, 25(8), 1721-1726.
- Miresmaeili, SM, Halvaei, I, Fesahat, F, Fallah, A, Nikonahad, N, Taherinejad, M. (2013). Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(5), 423-430.
- Naqvi, S, Samim, M, Abidin, M, Ahmed, FJ, Maitra, A, Prashant, C, Dinda, AK. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 983-989.
- Nazir, S, Hussain, T, Ayub, A, Rashid, U, MacRobert, AJ. (2014). Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanomedicine*, 10(1), 19-34.
- OECD TG 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. 21 September 1998. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740801e.pdf?expires=1482494829&id=id&accname=guest&checksum=C88C531E6FA6D839354B2D03C641ED5A>.
- OECD TG 420. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure (FDP). 17 December 2001. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742001e.pdf?expires=1482493766&id=id&accname=guest&checksum=CE0BB325180669363B0_1155D120C7592.
- OECD TG 423. Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method (ATC). 17 December 2001. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742301e.pdf?expires=1482493935&id=id&accname=guest&checksum=109AFCFA05AAE4001E_F72BBB0A0DABF4C.
- OECD TG 425. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). 3 October 2008. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742501e.pdf?expires=1482494067&id=id&accname=guest&checksum=5FDAC818B5D803441CDF734F39714CDA>.
- OECD TG 431. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. 29 July 2016. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716161e.pdf?expires=1482489889&id=id&accname=guest&checksum=2A8E2FE12CCB55B6712555B3551C3401>.
- OECD TG 432. In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. 13 April 2004. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9743201e.pdf?expires=148257_6400&id=id&accname=guest&checksum=B4F6BD590D634AAEA4F6B73E803C79B8.
- OECD TG 439. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 28 July 2015. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715291e.pdf?expires=1482489462&id=id&accname=guest&checksum=BBD9677ED6B5DAFABBB00380CC70332D>.
- OECD TG 453. Combined Chronic Toxicity\Carcinogenicity Studies. 7 September 2009. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9745301e.pdf?expires=1482495131&id=id&accname=guest&checksum=8FDA7D7EAE84B64F805E891C6FA5CDA0>.
- OECD TG 492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. 28 July 2015. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715211e.pdf?expires=1482490212&id=id&accname=guest&checksum=5A6054E03ECCBF6C51DF_AF39D9E807D1.
- Osman, IF, Baumgartner, A, Cemeli, E, Fletcher, JN, Anderson, D. (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in Hep-2 cells. *Nanomedicine (London)*, 5(8), 1193-1203.
- Papadopoulos, C, Meyer, H. (2017). Detection and Clearance of Damaged Lysosomes by the Endo-Lysosomal Damage Response and Lysophagy. *Current Biology*, 27(24), R1330-R1341.
- Park, EJ, Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicological Letters*, 184(1), 18-25.



- Parry, JM, Parry E, Phrakonkham P, Corvi R. (2010). Analysis of published data for top concentration considerations in mammalian cell genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 25(6), 531-538.
- Pisoschi, AM, Negulescu, GP. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1, 106.
- Poland, CA, Duffin, R, Kinloch, I, Maynard, A, Wallace, WA, Seaton, A, Stone, V, Brown, S, Macnee, W, Donaldson, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *National Nanotechnology*, 3(7), 423-428.
- Pratsinis, A, Hervella, P, Leroux, JC, Pratsinis, SE, Sotiriou, GA. (2013). Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small*, 2013; 9(15), 2576-84.
- Praveena, G, Kolandaivel, P, Santhanamoorthi, N, Renugopalakrishnan, V, Ramakrishna, S. (2007). Looking beyond carbon nanotubes: polypeptide nanotubes as alternatives? *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 2253-2259.
- Pulskamp, K, Diabaté, S, Krug, HF. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicological Letters*, 168(1), 58-74.
- Radomska, A, Leszczyszyn, J, Radomski, MW. (2016). The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 151-162.
- Rao, CN, Satishkumar, BC, Govindaraj, A, Nath, M. (2001). Nanotubes. *Chemphyschemistry*, 2(2), 78-105.
- Roesslein, M, Hirsch, C, Kaiser, JP, Krug, HF, Wick, P. (2013). Comparability of in vitro tests for bioactive nanoparticles: a common assay to detect reactive oxygen species as an example. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24320-24337.
- Rümenapp, C, Gleich, B, Mannherz HG, Haase A. (2015). Detection of molecules and cells using nuclear magnetic resonance with magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 271-275.
- Sharma, V, Anderson, D, Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17(8), 852-870.
- Singh, G, Pachouri, UC, Khaidem, DC, Kundu, A, Chopra, C, Singh, P. (2015). Mitochondrial DNA damage and diseases. *F1000Research*, 4, 176.
- Somogyi, A, Rosta, K, Pusztai, P, Tulassay, Z, Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), R41-R55.
- Sun, L, Li, Y, Liu, X, Jin, M, Zhang, L, Du, Z, Guo, C, Huang, P, Sun, Z. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology In Vitro*, 25(8), 1619-1629.
- Tang, J, Xiong, L, Wang, S, Wang, J, Liu, L, Li, J, Yuan, F, Xi, T. (2009). Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(8), 4924-4932.
- Thakur, M, Gupta, H, Singh, D, Mohanty, IR, Maheswari, U, Vanage, G, Joshi, DS. (2014). Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 42.
- Thanh NTK, Luke, AW. (2010). Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today*, 5, 213-230.
- Tran, CL, Buchanan, D, Cullen, RT, Searl, A, Jones, AD, Donaldson, K. (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhalation Toxicology*, 12(12), 1113-1126.
- Trouiller, B, Reliene, R, Westbrook, A, Solaimani, P, Schiestl, RH. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Research*, 69(22),

8784-8789.

- van Kuijk, FJ, Dratz, EA. (1987). Detection of phospholipid peroxides in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(5), 349-354.
- Visaria RK, Griffin RJ, Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, Song CW, Bischof JC. (2006). Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(4), 1014-1020.
- Warheit, DB, Laurence, BR, Reed, KL, Roach, DH, Reynolds, GA, Webb, TR. (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences*, 77(1), 117-125.
- Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020-1037.
- Yang, ST, Wang, X, Jia, G, Gu, Y, Wang, T, Nie, H, Ge, C, Wang, H, Liu, Y. (2008). Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology Letters*, 181(7), 182-189.
- Ying, J. (2001). *Nanostructured Materials*. Academic Press, New York.
- Yoshida, S, Hiyoshi, K, Ichinose, T, Takano, H, Oshio, S, Sugawara, I, Takeda, K, Shibamoto, T. (2009). Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32(4), 337-342.
- Zhu, MT, Feng, WY, Wang, B, Wang, TC, Gu, YQ, Wang, M, Wang, Y, Ouyang, H, Zhao, YL, Chai, ZF. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247(2-3), 102-111.
- Zuang, V. (2001). The neutral red release assay: a review. *Alternative Laboratory Animals*, 29(5), 575-599.