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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN EMBRİYONİK AKCİĞER HÜCRELERİNDE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Olkan AFŞAR

Referans no: 10394790

EDİRNE – 2023

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN EMBRİYONİK AKCİĞER HÜCRELERİNDE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Olkan AFŞAR

Destekleyen kurum: TÜBAP 2021/29

Tez no:

EDİRNE – 2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yönlendiren ders dönemim ve tez dönemimde çok değerli katkıları olan yüksek lisans danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çağatay OLTULU başta olmak üzere, tez çalışmamın deney kısımlarının TÜTAGEM'de yapılmasındaki yardımlarından dolayı TÜTAGEM yönetimine ve Uzman Pelin TÜRKER'e teşekkür ederim. Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2021/29) birimine çalışmalarımızın yürütülmesinde sağladıkları maddi destekten dolayı ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ** 5
- **TİTANYUM DİOKSİT** 11
- **NANOTOKSİKOLOJİ** 17
- **HÜCRE KÜLTÜRÜ** 22

GEREÇ VE YÖNTEMLER 26

BULGULAR 30

TARTIŞMA 35

SONUÇLAR 38

ÖZET 39

SUMMARY 40

KAYNAKLAR 42

ŞEKİLLER LİSTESİ 54

TABLOLAR LİSTESİ 55

ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGE VE KISALTMALAR

8OHdG : 8 hidroksi 2 deoksiguanozin

ANOVA : Varyans Analizi

Au : Altın

$BaSO_4$: Baryum Sülfat

C_8H_6S : Benzotiofenin

CAS : Chemical Abstracts Service

CAT : Katalaz

CB : Karbon Siyahı

CO_2 : Karbondioksit

Cu : Bakır

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

EC : Enzyme Commission

ECD : Elektrokimyasal Detektör

EDTA : Etilen-Diamin Tetra Asetik Asit

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Miktar Tayini)

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

Fe : Demir

GC/MS : Gaz Kromotoğrafi/Mass Spektrofotometri

GSH : Glutatyon

HCl **:** Hidroklorik Asit

HEL 299 / An1: İnsan Embriyonik Akciğeri **(**Human Embryonic Lung) (Diploid) (İnsan)

HPLC-ECD **:** Likid kromotoğrafi-Elektrokimyasal Dedeksiyon

ICP-MS **:** İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer)

KA **:** Kromozom Anormallikleri

KKD **:** Kardeş Kromatit Değişimi

LC-MS-MS **:** Likid Kromotoğrafi/Mass Spektrofotometri

LC_{50} **:** Median Lethal Concentration (Ortalama Letal Konsantrasyonu)

LD_{50} **:** Median Lethal Dose (Ortalama Letal Doz)

MN **:** Mikronukleus

MTT **:** 3-(4,5-dimetiliazol–2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid

NO **:** Azot oksit

NP **:** Nanopartikül

PCR **:** Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RNA **:** Ribonükleik Asit

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SO_2 **:** Kükürt dioksit

SOD **:** Süperoksit Dismutaz

SPE **:** Solid Phase Extraction (Katı Faz Ekstraksiyonu)

Ti **:** Titanyum

TiO_2 **:** Titanyum dioksit

TiO_2-NP **:** Titanyum Dioksit Nanopartikülleri

UI-TiO_2 **:** Ultra İnce Titanyum Dioksit

UV **:** Ultraviyole

Zn **:** Çinko

ZnO **:** Çinko Oksit

GİRİŞ VE AMAÇ

Son dönemlerde hayatımıza giren nanoteknoloji bu alandaki gelişmelerle sıradan günlük hayatımızın içerisinde ve bilim alanında daha çok yer almakta olup tıp, havacılık, fizik, kimya, çevre, malzeme bilimi ve biyoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır (1). Metrenin milyarda biri 'Nano' terimi ile ifade edilirken, 100 nm altındaki boyutlardaki partiküllere nanopartikül (NP) denilmektedir (2, 3).

Silikalı, metal oksitli ve karbonlu nanopartiküller, nanopartiküller arasında toksikolojik değerlendirmesinde en çok çalışması yapılan nanopartiküllerdir (1). Örneğin titanyum dioksit bir metal oksittir ve günümüzde hem toz biçimi hem de nano boyut formundan dolayı güneş koruyucu preparatların formülasyonlarında, ultraviyole (UV) ışınları engelleyebilme özelliğinden dolayı bulunmaktadır (2). Titanyum dioksit, düşük toksisitesi nedeniyle boya, kâğıt, plastik, kaynak çubuğu kaplama malzemesi ve kozmetik üretiminde sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, son çalışmalar nano boyutlu veya ultra ince titanyum dioksitin (Uİ-TiO_2) (<100 nm çapında) sıçanlarda pulmoner fibröz ve akciğer tümörü oluşturabilir. Sıçanlarda, akciğer alveoler makrofajlarında UI-TiO_2 tarafından indüklenen sitotoksisite gözlenmiştir. Bu, Uİ-TiO_2'nin olası olumsuz etkileri hakkında büyük endişe yaratmaktadır (3). Literatürde yer alan çalışmalarda titanyum dioksit nanopartiküllerin (TiO_2-NP) genotoksik etkili olduğu hücrelerde DNA hasarına neden olabileceğini göstermektedir.

Oksidatif DNA hasarına, tek ve çift zincir kırıklarına, bazik alanlar oluşumu, baz katılımı, bazlarda rejenerasyon gibi baz değişimleri oluşabilir veya protein-DNA adduktları oluşabilir (4-6). Fizyolojik koşullarda bahsedilen hasarlar oluşabilmektedir. Örneğin gün içinde 104 defa insan genomunda pürin kaybı sonucu apürinik bölgelerin oluşumu meydana gelebilir.

DNA'da meydana gelen oksidatif değişimler sonucunda DNA antijenik özellik kazanabilir ve buna karşı antikor oluşabilir. Hücredeki proteinler, yağlar ve karbonhidratlarda oksidatif hasar çeşitli reaksiyonlarla meydana gelebilir. İnsan vücudunun her bir hücresinde DNA'da bir gün içerisinde 103 defa oksidatif hasar oluştuğu iddia edilmiştir. DNA hasarı oluşsa da tamir mekanizmaları ile onarılabilir. Oluşan hasar ve tamir arasındaki bir denge olması nedeniyle sağlıklı bireylerde çok düşük miktarda DNA hasarı tespit edilebilir. Sıçan embriyolarında dahi oksidatif baz değişimi (8-OHdG) meydana geldiği saptanmıştır (7). 8-OHdG analizinde bugüne dek Likit kromatografi-Elektrokimyasal Dedeksiyon HPLC-ECD, Likit kromatografı/Kütle spektrofotometri (LC-MS-MS), Gaz kromatografi/Kütle spektrofotometri (GC/MS) ve ELISA gibi çok fazla metot geliştirilmiştir (8, 9).

Nano titanyum dioksit plasentadan geçebilmektedir ve fetus için sağlık riski oluşturmaktadır (10). Tez çalışmamızda insanlarda nano titanyum dioksit partiküllerinin embriyonik akciğer hücrelerinde DNA hasarı oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır (11-14).

GENEL BİLGİLER

NANOTEKNOLOJİ

Nano kelimesi Yunanca *vávoς* (=cüce) kelimesinden gelmektedir. 1 nanometre (nm) 10^{-9} metreye eşittir. Nanoteknoloji, karmaşık makromoleküler sistemlerin oluşumunda kullanılan nano ölçekteki yapısal birimlerin kullanıldığı bilim ve teknolojiyi işaret eder (15).

Nanoteknoloji içerikli ilk rapor (nanoteknoloji terimi kullanılmadan) 1959 yılında Richard Feynman'ın Amerikan Fizik Topluluğu'nun bir toplantısında yaptığı konuşma sırasında kullanılmıştır (16). Feynman bu konuşmasında, daha gelişmiş materyaller ve araçlar üretmek için atomlar ve moleküller tek tek düzenlenirse yeni özellikler kazandırılabileceğinden bahsetmiştir.

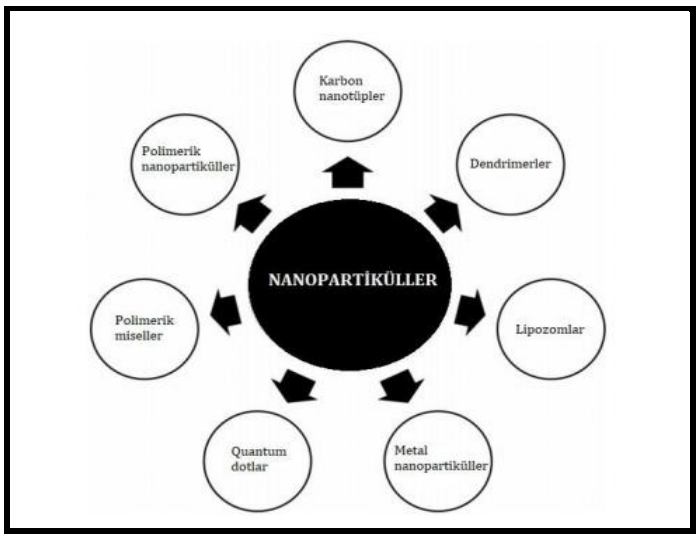
Yirmi yıldan uzun bir süre sonra, Profesör Norio Taniguchi'nin, ultra hassas işlemeyi keşfetmesiyle "nanoteknoloji" terimini ortaya atılmıştır. 1981 yılında, tek tek atomları "görebilen" taramalı tünelleme mikroskobunun geliştirilmesiyle, modern nanoteknolojinin temel taşları kuruldu (17).

NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller, mikron altı boyutlarda yani boyutları 1-100 nm arasında değişen, sentetik veya doğal polimerlerden, inorganik veya seramik elementlerden hazırlanan katı kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir (18, 19). Gelişen nanoteknoloji sonucu günümüzde 1000'den fazla nano ürün; görüntüleme ve ilaç taşıyıcı sistemlerde, biyomedikal, elektronik, tekstil gibi pek çok alanda kullanıma girmiştir (20, 21). Diğer taraftan, nano bileşikler ufak boyut ve geniş yüzey alanları nedeniyle diğer hacimli maddelerden farklıdır. Farklı özellik ve işlevleriyle

kazandıkları aktivite sonucu istenmeyen etkiler gösterebileceği bulguları nanotoksikoloji alt dalının ortaya çıkmasına neden olmuştur (22).

Nanopartiküller, katı dispersiyon partikülleridir. Partikül hareketliliği, difüzyon, ısıl kararlılık, depolama hacmi, yüzey alanı artmasına neden olurlar ve öte yandan ekli enzimlerin katalitik aktifliği, toksisite etkisini, biyoyararlanımı ve birçok ilacın çözünme seviyesini düzenler ve değiştirirler. Nanopartiküller, biyosensörlerin, güneş pillerinin, foto detektörlerin, seramiklerin ve nano jeneratörlerin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılır. Nanopartiküller, metabolizmada bulunan proteinler ve nükleik asitlerin boyutuna çok benzerdir ve bunların üzerinde etkiye de sahiptir. Nanopartiküllerin canlılarda bulunan moleküller ile birleşmesi sonucu çok farklı modifiye nano yapılar meydana gelmektedir. Genelde 7 şekilde sınıflandırılabilirler (23).



Şekil 1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (23, 24).

Karbon Nanotüpler

Boyutu 3 nm ile 1000 nm arasında değişmektedir. İyi derecede iletken özellikleri olan bir tek tabakalı veya çok tabakalı bir yapıya sahip olabilir. Karbon nanotüpler çözünmenin iyileştirilmesi ve gen ve peptid iletim sistemi olarak kullanılabilir (24).

Dendrimerler

Boyutu 10 nm'den daha küçüktür ve düzenli polimerizasyon ile meydana gelirler. 3 kısımdan oluşmaktadırlar: çekirdek, dal ve yüzey. Birden fazla dala sahiptir ve tek dağılımlı polimer sistem olarak bulunur. Bu yapıların, biyoyararlanımı daha düşüktür, biyoaktif moleküllerin düzenli olarak verilebilmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (25).

Lipozomlar

Boyutları 50 ile 100 nm arasında değişen fosfolipit veziküldür. Multidireksiyonel tutma özelliği olan biyo uyumlu bir yapıya sahiptirler. Lipozomlar, gen ve peptitlerin aktif ve pasif iletiminde kullanılırlar (26).

Metalik Nanopartiküller

İyileştirilmiş stabilite ile fonksiyonelleştirme için geniş yüzey alanı ile 100 nm'den küçük yapılardır. İlaç ve gen iletiminde çok etkilidirler ve teşhis deneyleri için çok hassastırlar (27).

Quantum Dotlar

2 nm ile 10 nm boyutlarda bulunan, daha fazla foto stabilitesi, dar emisyon aralığı ve fazla floresans miktarı ile geniş UV uyarma kabiliyeti olan nanopartiküllerdir. DNA hibridizasyonu, farklı immünolojik deneyler, reseptör aracılı endositoz ve renkli ultrason gibi birçok alanda kullanılırlar (28).

Polimerik Miseller

Polimerik miseller daha fazla ilaç tutma ve biyo stabilite ile 10-100 nm uzunluktadır ve hedefe özel aktif ve pasif ilaç iletimi için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (29).

Polimerik Nanopartiküller

Uyumlu ve gelişmiş ilaç koruması için biyolojik olarak bölünebilen 10 nm ile 1000 nm boyutları arasında bulunan nanopartiküllerdir. Biyoaktivitesi yüksek moleküllerin aktif ve pasif iletimi için de kullanılan seçilmiş olan ilacın kontrollü salımı için yaygın bir şekilde kullanılırlar (30).

NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

Nanopartikül çeşidi, nanopartikülün büyüklüğü, çalışmada kullanılan yönteme göre nanopartikülün sitotoksik ve genotoksik etkisi hakkında farklı verilerin bildirildiği çalışmalar vardır. Pan ve ark. nanopartikül boyutundaki çok ufak farklılıklar dahi sitotoksiteye etki edeceğini göstermek amacıyla melanom, L929 ve HeLa hücreleri farklı büyüklüklerdeki altın (Au) nanopartiküllerine 12 saat maruz bırakmış ve sitotoksisite değerlendirilmesi yapmıştır. Çalışma sonucunda 15 nm boyutundaki altın partiküllerinin toksik etkili olmadığı, ancak 1,4

nm boyutundaki altın partikülleri nekroz ile hücre ölümüne neden olurken, 1,2 nm boyutundaki altın nanopartiküllerinin programlı hücre ölümü olan apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (31).

Yapılan bir çalışmada (32), farklı boyutlarda birçok değişik nanopartikülün sıçan akciğer hücrelerindeki (BRL 3A) sitotoksisitesi MTT testi ile gösterilmiş ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile aralarında ilişkiyi tespit etmişlerdir. Bakterilerde yapılan bir araştırmada, çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin toksik etkili olduğu bildirilmiştir (33). Fare nöroblastom hücre hatlarında ise ZnO nanopartiküllerinin morfolojik bozukluğu sebep olduğu, insan endotel hücrelerinde kromozom hasarına neden olduğu, insan epidermal hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarının doza bağlı olduğu araştırmalarda rapor edilmiştir (34-36).

İnsan akciğer epiteli ve deri fibroblast hücrelerinde ve in vivo olarak sıçanlarda yapılan çalışmalarda anataz yapıdaki titanyum dioksitin (TiO_2) 100 µg/mL üzerinde konsantrasyonda uygulandığı zaman MTT testi ile sitotoksik etkisi gösterilmiş buna ek olarak solunum sistemi üzerinde de toksik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (37). İnsan lenfosit kültüründe yapılan bir çalışmada TiO_2 nanopartiküllerine (<100 nm) 6,24 ve 48 saat süre ile 0,25, 65, 130 µg/mL dozlarında maruz bırakılmış sitotoksisite ve genotoksisitesi değerlendirilmiştir. Maruz kalma süresi ve uygulanan dozun sitotoksik etkinin ortaya çıkmasında önemli olduğu ve hücre ölümünde artışa neden olduğu belirtilmiştir. COMET testi ile genotoksik açıdan doz miktarı 65 µg/ml DNA hasarında kontrole oranla arttığı gösterilmiştir. Ayrıca mikronükleus (MN) meydana gelmesinde mutasyon frekansında fazla oluştuğunun meydana geldiği belirtilmiştir (38). Başka bir çalışmada TiO_2'ye maruz kalma sonucunda oksidatif stres ve genotoksisite oluşumunun değerlendirmek için MN ve kardeş kromatit değişimi testi ile toksisite değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışmada miktara bağlı olarak genotoksik etkide artış olduğu ve oksidatif stresi artırdığı belirlenmiştir (39). Balıklarda yapılan bir çalışmada 11,8-38,5 nm boyutlarındaki TiO_2 nanopartiküllerinin toksik etkileri değerlendirilmiştir. genotoksik etkinin çalışılan dozda bulunmadığı, sitotoksik etki ise lizozomal canlılık testi ile değerlendirilmiş ve sitotoksik etkinin 50 µg/mL doz ve üzerinde ise bulunduğu bildirilmiştir (40).

Sitotoksisite Testleri

Kimyasalların hücrelerdeki ve dokulardaki toksik etki mekanizmaları sitotoksisite değerlendirmesinde önemlidir. Karsinojenez ve inflamasyon dahil olmak üzere bir dizi patolojik süreçte sitotoksisite önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Sitotoksisite ayrıca serbest radikaller, tahriş edici maddeler ve genotoksinler dahil olmak üzere diğer ajanların aktivitesini de modüle edebilir (41).

Basit bir sitotoksisite testi, hücresel veya nükleer morfolojideki değişiklikler için parlak alan mikroskobu ile hücrelerin görsel olarak incelenmesini içerir. Fiorito ve ark. tek duvarlı karbon nanotüplerin sitotoksisitesini değerlendirirken bu tekniği kullanmışlardır (42). Bununla birlikte, yayınlanmış nanopartikül çalışmalarında kullanılan sitotoksisite tahlillerinin çoğunda kolorimetrik yöntemlerle hücre ölümü ölçülmektedir. Bu kolorimetrik yöntemler, plazma zarı bütünlüğünü ve mitokondriyal aktiviteyi ölçen testlere ayrılabilir. Bazı sitotoksik ajanlara maruz kalmak, hücre zarında hasara neden olur ve böylece hücresel içerik hücreler arası alana sızar. Buna dayalı canlılık testleri, nötr kırmızı ve Tripan mavisi testlerini içerir. Tripan mavisi testinde boya canlı hücre zarından içeri giremez ve sadece ölü hücreler boyanır. Nötr kırmızı veya tolüen kırmızısı, canlı hücre plazma zarını difüzyon yoluyla geçebilen zayıf bir katyonik boyadır. Bu boya, hücre içindeki lizozomlarda birikme eğilimindedir. Hücre zarı bütünlüğü bozulması, hücreye alınan nötr kırmızı boyasının dışarı sızmasına yol açar. Böylece canlı ve ölü hücreler arasında ayrım yapılabilir. Sitotoksisite, değişen maruz kalma koşulları altında nötr kırmızı alımın spektrofotometrik ölçümleri alınarak belirlenebilir (42).

Titanyum dioksit nanoparçacıkları ve biyomedikal nanomalzemeler gibi çözünmeyen metal oksit tarafından indüklenen potansiyel sitotoksisite mekanizması hala tartışmalıdır. Bununla birlikte, bazı raporlar TiO_2 nanoparçacıklarının oksidatif stresi indükleme yetenekleri dahil olmak üzere potansiyel toksisitesine, genotoksisite ve immünotoksisite dikkat çekmiştir. Bununla birlikte, bu sitotoksik etkilerin arkasındaki mekanizma hala belirsizdir.

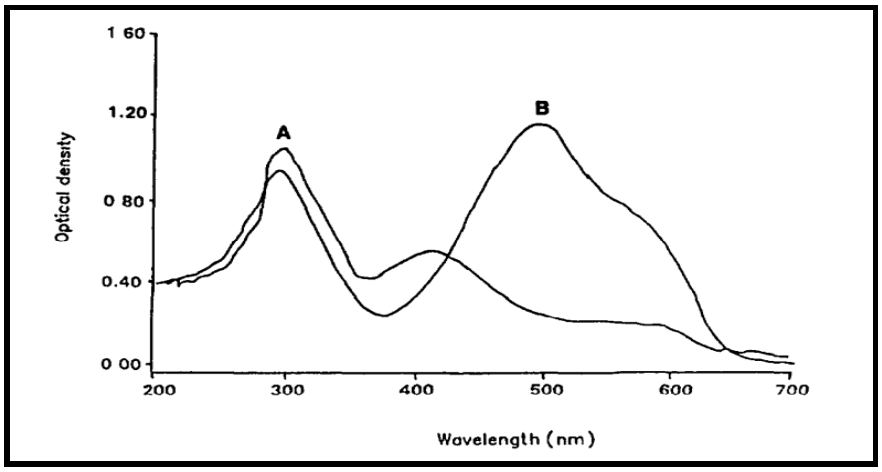
Test edilen sitotoksisite parametreleri arasında hücre canlılığı, ROS oluşumu, mitokondriyal depolarizasyon, plazma zarı sızıntısı, artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ve iltihaplanma tepkisi yer alır (43).

Nötral Kırmızısı testi (NR-Neutral Red) ve MTT sitotoksisite ölçümlerinde veya toksik madde tespitinde ve hücre canlılığı ölçümlerinde genellikle kullanılan yöntemlerdir (44).

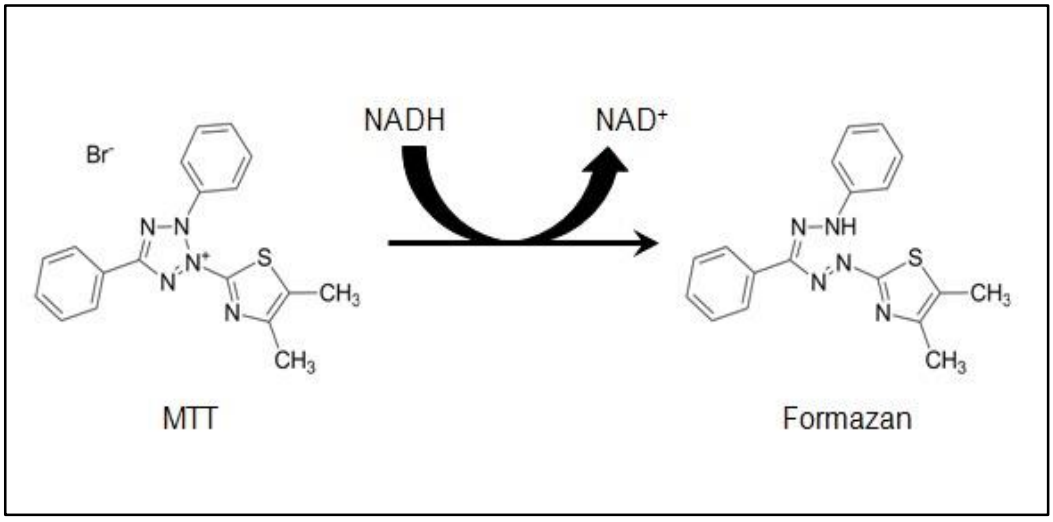
Nötral kırmızısı alımı testi: Nötral kırmızısı alımı testi kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem lizozomlarda anyonik kısımların nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) boyanması prensibine dayanır. Katyonik yapıda olmasından dolayı anyonik yapılara tutunmaktadır (45-47). Hücre üzerindeki ya da hassas lizozom membranın dağılması sonucu, boyanın emilim ve tutunma özelliğini kaybeder. Bu durumda hücreler birbirinden ölü, canlı ya da hasarlı olarak ayrılır (48, 49). Canlı ve bütünlüğünü koruyan hücrelerin lizozomlarında nötral kırmızı boyası fazla miktarda birikmektedir (50).

MTT testi: MTT(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testinin MTT'nin canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır. Besi kültüründe bulunan canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile meydana gelen bu dönüşüm toplam canlı hücre sayısı ile paraleldir ve in-vitro sitotoksisite değerlendirilmesinde MTT testi çoğunlukla tercih edilmektedir (51). Canlı hücreler, MTT reaktifini suda çözünmeyen, hücrelerde çökelen ve organik çözücülerle ekstrakte edilmesi gereken renkli bir formazan ürününe indirger. Hücreler öldüğünde, MTT'yi formazana dönüştürme yeteneğini kaybederler, bu nedenle renk oluşumu, canlı hücrelerin yararlı ve uygun bir belirteci olarak hizmet eder. MTT'nin formazana indirger, ancak nikotinamid adenin dinükleotit veya belirli mitokondriyal enzimler aracılığıyla MTT'ye elektron aktaran benzer indirgeyici molekülleri içermesi muhtemeldir (52).

Bu reaksiyon, sarı tuzları, konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenebilen organik bir çözücü içinde çözülebilen mavi renkli formazan kristallerine dönüştürür. Ayrıca, test lösemiler ve küçük hücreli akciğer karsinomu gibi yüzen hücreler için de kullanılabilir ve her zaman hücre replikasyonu, ilaca bağlı hücre ölümü ve MTT substratından formazan ürünü üreten enzimatik aktivite kaybı için yeterli zaman sağlar (53).



Şekil 2. MTT formazan reaktifinin (25 ug/mL) DMSO (A) ve 0,04N HCI / izopropanol (B) içindeki absorpsiyon spektrumları (53).



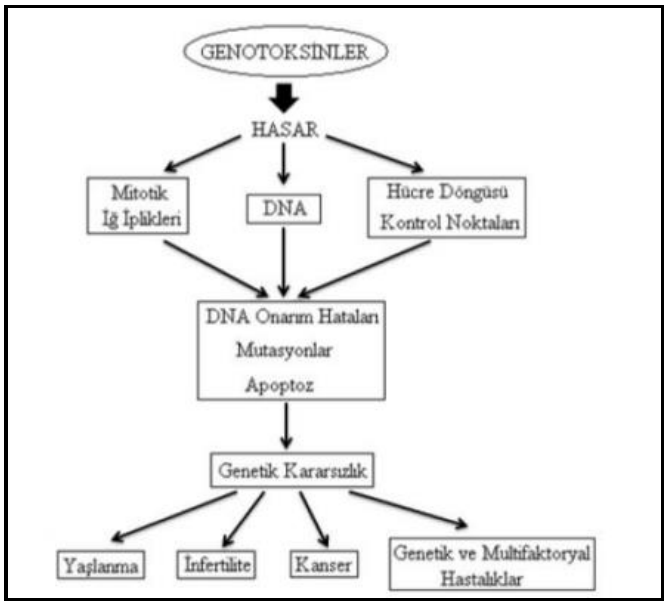
Şekil 3. MTT ve renkli formazan ürününün yapıları (54).

Genotoksisite

Genotoksisite, fiziksel, biyolojik ya da kimyasal maddelerin genetik materyalde neden olduğu hasardır (55). Genotoksisitenin dolaylı mekanizmaları, genotoksik etkilere yol açan DNA dışı hedeflerle etkileşimler olarak tanımlanabilir. Bu esas olarak lipit peroksidasyonunu ve protein katkılarını kapsar. Genotoksik olaylar apoptoza yol açabilir. Bu olaylar kromozom kaybı ve ayrışmayan aneugenler için belirlenen eşik değerlerin altında gerçekten genotoksik olmayan etkiler olabilir veya alternatif olarak apoptoz ile seçici olarak elimine edilen indüklenmiş anöploid hücreler olabilir (56).

Prokaryotik (ör. bakteriyel) veya ökaryotik (ör. memeli, kuş veya maya) hücrelerde DNA hasarını veya bunun biyolojik sonuçlarını saptayan bir dizi uç nokta ile genotoksisite için birçok in vitro ve in vivo test geliştirilmiştir (57). Bu testlerden bazıları;

- Kromozom anormallikleri testi (KA)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu Testi (PZR)
- Comet Testi
- Ames Testi
- Kardeş Kromatit Değişimi Testi (KKD)



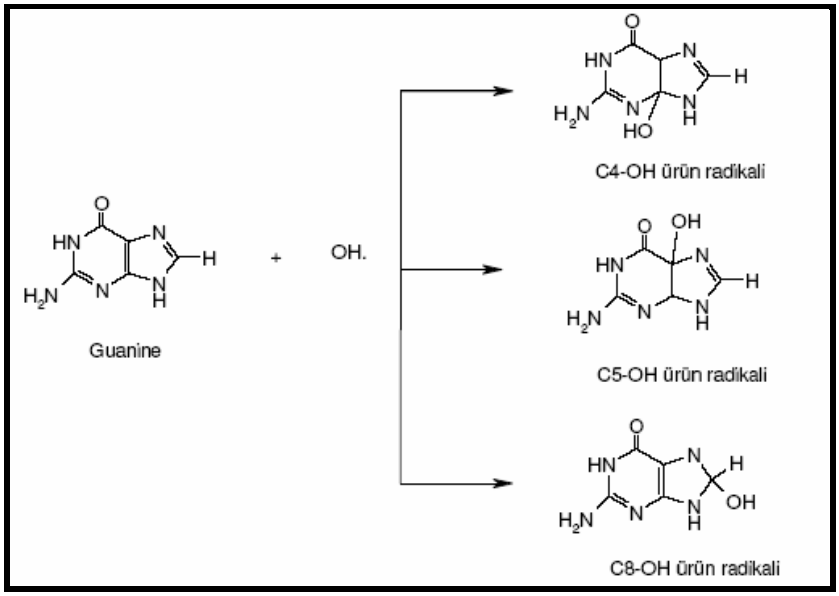
Şekil 4. Genotoksik maddelerin oluşturdukları hasar ve olası sonuçları (58).

8 hidroksi 2 deoksiguanozin (8-OHdG): Oksidatif lezyonlar, karsinojenez ve genetik materyaldeki oksidatif stresin değerlendirilmesinde biyobelirteç kullanılmaktadır. Biyobelirteç olarak 8-OHdG'nin idrarda miktarının tayin edilmesinin dejeneratif hastalıklar ve kanser risk değerlendirilmesinde birçok çalışmada tercih edilmiştir. 8-OHdG'nin kantitatif olarak ölçülmesinde karşılaşılan metodolojik sorunları çözmek için, Oksidatif DNA Hasarı için Avrupa Standartları Komitesi, oksidatif DNA ürünlerinin izolasyonu ve saflaştırılması prosedürleri sırasında yapay oksidasyon sorunlarını çözmek için 1997 yılında kurulmuştur (59).

Tagesson ve ark. malign lenfoma dâhil maligniteleri olan hastalarda idrar 8-OHdG konsantrasyonunun yükseldiğini bildirmiştir. Kemoterapiyi takiben idrar 8-OHdG seviyesinde değişiklikler gösterilmiştir. Elektrokimyasal detektörlü (ECD) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), hücreler, dokular ve idrar numunelerindeki 8-OHdG içeriğini ölçmek için yaygın olarak kullanılır (60).

HPLC yöntemleri, çok sayıda örneklem içeren çalışmalar için anahtar faktörler; doğru ölçüm ve yapısal doğrulama için açıkça üstün olsa da ELISA yöntemleri genellikle kullanım kolaylığı, daha yüksek verim ve daha düşük maliyetler temel alınarak kullanılır. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar mevcut ELISA tekniklerinin doğruluğunu ve kesinliğini sorguladığından, bu metodolojiyi kullanan çalışmalardan elde edilen sonuçlar sorgulanmıştır. İki yöntem arasında tarafsız bir karşılaştırma sağlamak için, LC-MS-MS ve yöntemler arasında geçerli karşılaştırmalara izin veren numune saflaştırma teknikleriyle yaygın olarak kullanılan üç ELISA kitini kullanarak idrarın yan yana analizleri yapılmıştır. Sonuçlar, test edilen

ELISA'ların, muhtemelen idrardaki ilgili bileşiklerle çapraz reaktivitenin bir sonucu olarak idrarda bulunan DNA hasar markırının doğru bir şekilde belirlenmesine izin vermediğini göstermektedir. Bununla birlikte, ELISA yöntemlerinden ikisi, özellikle SPE saflaştırmasından sonra, LC-MS-MS ile elde edilenlerle önemli ölçüde ilişkili olan değerlerle sonuçlandı. Bu nedenle, bu ELISA'lar, DNA hasarı markırı için seçicilikten yoksunken, genel oksidatif stres belirteçleri olarak fayda bulabilir (61).



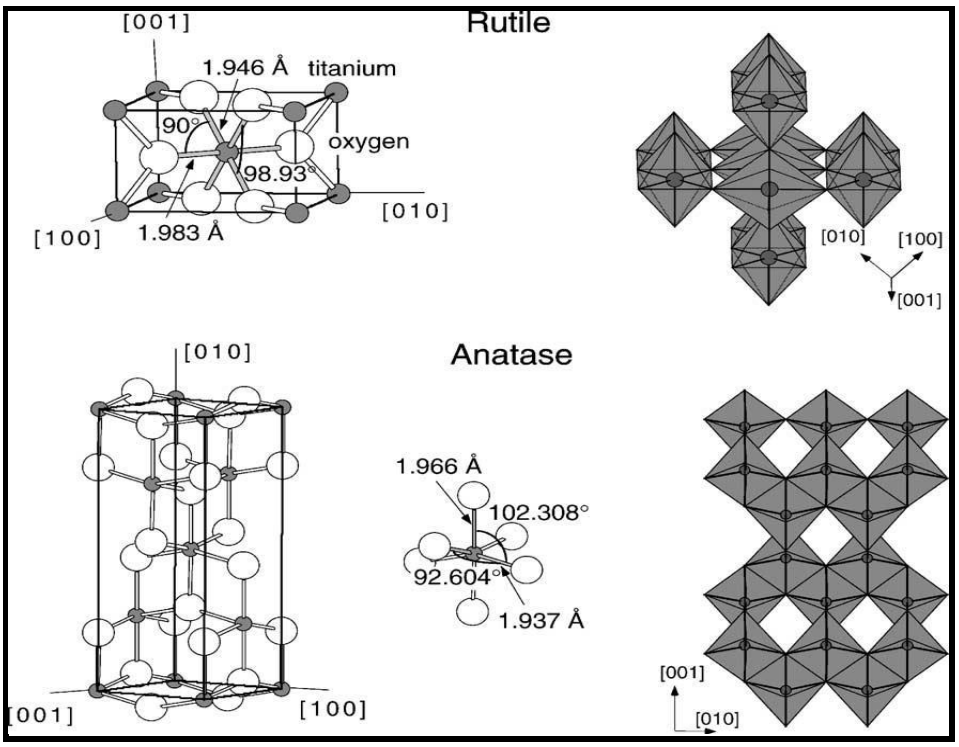
Şekil 5. Hidroksil radikali ve guanin bazının reaksiyonu (62)

TİTANYUM DİOKSİT

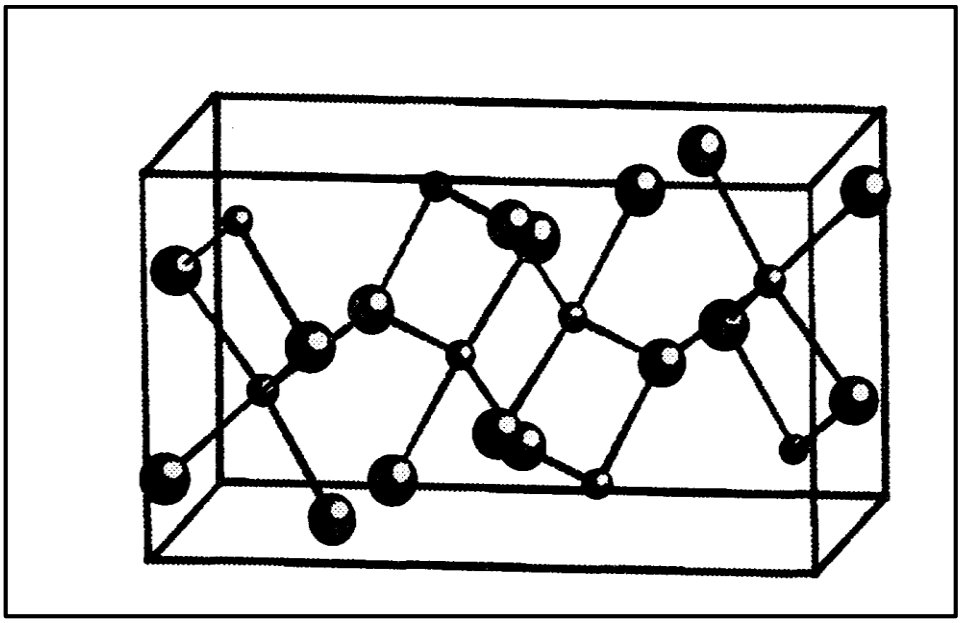
Titanyum dioksit (TiO_2), doğada doğal olarak bulunan bir metal oksittir. Yirminci yüzyılın başlarındaki ticari üretiminden bu yana, TiO_2 bir pigment olarak ve güneş kremlerinde, boyalarda, merhemlerde, diş macunlarında vb. yaygın olarak kullanılmaktadır. TiO_2'in geniş uygulaması, düşük toksisitesi ile ilgilidir (63, 64). Bu uygulamaların önemi ve çeşitliliği, son yıllarda TiO_2 nanomalzemelerinin üretimi, karakterizasyonu ve temel anlayışında büyük ilgi ve önemli ilerlemeler sağlamıştır. Nano ve mikro kristal TiO_2 ile ilgili önemli bir konu, TiO_2 kristallerinin özel fasetlerle sentezi olmuştur (65).

TiO_2 üç farklı polimorf oluşturur: rutil, anataz ve brokit. Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca TiO_2, ilginç elektrik, manyetik, katalitik ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu özelliklere dayanarak, çeşitli teknolojik uygulamalar mümkündür. Günümüzde sadece rutil ve anataz titanyum dioksitin uygulamalarda kullanımı tercih edilmektedir. Şekil 6'da Rutil ve anataz formlarının birim hücreleri ve kristal formları

görülmektedir. Ana yapı bloğu rutil ve anataz kristal biçimindekine benzer şekilde, hafifçe eğilmiş oktahedral yapı içerisinde 6 oksijen atomu ile çevrelenmiş merkezde ise bir titanyum atomu bulunmaktadır. Rutilde, komşu oktahedralar <101> tipi yönler boyunca bir köşeyi paylaşırlar ve uzun dönüşümlü olarak 90°C'de istiflenirler. Bunların dışında komşu oktahedralar 90° açı ile birbirini takip eden kendi uzun eksenleri boyunca toplanmıştır. Anatazda köşe paylaşan oktahedra (0 0 1) düzlemleri oluşturur. Bu kenarları ile aşağıdaki oktahedra düzlemi ile bağlanırlar. Rutil yapısında her oktahedron, 10 komşu oktahedron (2 paylaşımlı kenar oksijen çifti, 8 paylaşımlı köşe oksijen atomu) ile bağlantılıdır. Anataz yapısında ise diğer 8 komşu oktahedron (4 paylaşımlı kenar ve 4 paylaşımlı köşe atomu) ve oktahedron yapıları bağlantılıdır. Üç TiO_2 yapısının hepsinde, oktahedranın istiflenmesi, üç kat koordineli oksijen atomları ile sonuçlanır (66, 67).



Şekil 6. Anataz ve Rutil formlarının birim hücre ve kristal yapıları (67)



Şekil 7. Titanyum Dioksit Brokit formunun molekül yapısı (66)

Tablo 1. TiO_2 için fiziksel ve kimyasal özellikleri (68)

Gıda Katkı Maddesi Kodu	E 171
CAS Numarası	13463-67-7
Renk İndeksi Numarası	CI 77891
Molekül Ağırlığı	79,866 g/mol
EC Numarası	236-675-5
Yoğunluk	3,78 g/cm^3(Anataz) 4,23 g/cm^3(Rutil)
pH	3-7,5 (% 5' lik dispersiyonunun)
Kaynama Noktası	2972 °C
Erime Noktası	1843 °C
Kırılma İndisi	2.488(Anataz) 2.609(Rutil) 2.583(Brokit)
Enerji Boşluğu	3,05 eV(rutil)
Kristal Yapısı	Tetragonal (rutil ve anataz) Ortorombik (brokit)

EC: Enzyme Commission, **CAS:** Chemical Abstracts Service.

Genel olarak TiO_2, büyük enerji boşluğu mükemmel bir bant aralığı nedeniyle yarı iletkeni olarak kabul edilir. (Eg = 3,2 eV). Bu nano yapısallaştırılmış malzeme, fotoaktif hale getirilmek için yakın UV ışığının kullanılmasını gerektirir. Sonuç olarak, TiO_2 nanoparçacıklarını kullanan fotokataliz son zamanlarda çok önemli hale gelmiştirS8. TiO_2 nanoparçacıklarının kullanımı, fotodegradasyon sürecini ve toksik organik kirleticilerin tam

mineralizasyonunu iyileştirmiştir. Aslında, TiO_2 nanoparçacıkları, çevre teknolojisinde atık su ve yeraltı suyunun arıtılması, benzotiyofenin dizel yakıttan uzaklaştırılması ve hava kirleticilerin, özellikle nitrojenoksit, sülforoksitler ve uçucu organik bileşiklerin bozunması için başarıyla kullanılmıştır. TiO_2 nanopartikülleri geniş spesifik yüzey alanına sahip olmalarına rağmen, katalizör verimliliği üzerinde istenmeyen bir etki olan daha büyük partiküller oluşturan çok kolay bir şekilde topaklanma ve birleşme eğilimleri ve TiO_2 partiküllerinin ayrılması ve geri kazanılmasındaki zorluklar nedeniyle ticari uygulamalar hızlı bir şekilde geliştirilmemiştir. Bununla birlikte, fotoaktivitesi nedeniyle TiO_2, ZnO'da olduğu gibi güneş kremlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (69).

Oldukça fazla üründe TiO_2 nanopartikülleri katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Şeffaflaştırıcı özelliği nedeniyle vernik ve boya imalatında, mürekkep yapımında, kâğıt sanayisinde, plastik malzemelerde ve ilaç endüstrisinde, güneş kremleri gibi kozmetik malzemelerde kullanılır. Nano boyuttaki TiO_2 dalga boyu 180-340 nm arasında olan mor ötesi (UV) ışınlara maruz kaldığında reaktif hale dönüşür. TiO_2 molekülleri UV ışınlara maruz kaldığında katalitik bir tepkime başlar, safsızlık oluşturan azot oksitler gibi moleküllerin foto bozunumu nano TiO_2 molekülleri ile artırılır. Fotokatalik özelliği nedeniyle günümüzde nano TiO_2 kullanımı artış meydana gelmektedir. Örneğin, inşaat yapıların dış kısımlarında bulunan malzemelerde kullanılan içerisinde nano TiO_2 bulunan boyalar, yüzeyde bakteri ve kirliliğin bulunmasını engellemekte ve kirin yağmurla basit bir şekilde giderilmesini sağlamaktadır. TiO_2 foto katalitik özelliğe sahip bir madde olmasından dolayı fotokimyasal hidrojen ve kendi kendini temizleme özelliği olan camlarda kullanılmaktadır. TiO_2 nanopartikülleri çevre teknolojilerinde; yer altı sularının ve yer üstü atık sularının arıtılmasında, dizel yakıtlardan benzotiofenin (C_8H_6S) maddesinden arındırılmasında ve kükürt dioksit (SO_2), azot oksit (NO) gibi kirli havaya neden olan moleküllerin giderilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (70-72).

Güneş kremleri, günümüzde neredeyse her tüketicinin tükettiği ürünlerdir. Güneş kremleri içinde ZnO ve TiO_2 nanopartikülleri deri yüzeyine beyaz bir görünüm verir. Geniş bir yüzey alana sahip olan bu partiküller görünür ışığın dağılmasına neden olur. Partikül yüzey alanının küçüklüğü ışığın dağılımının azalmasına neden olur. Bu nedenle, aynı içeriğe sahip fakat nano formda eklendiğinde, daha az miktarda ışık saçılır ve güneş kremleri daha transparan görüntü kazanır bu nedenlerden dolayı günümüze güneş kremlerinde nanopartiküllerin kullanımı artmaktadır (36). TiO_2 ve ZnO genellikle boya malzemesi olarak sanayide geniş bir alanda kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Fiziksel özellikleri dikkate alındığında, TiO_2 ve ZnO

UV radyasyonunu engellemek adına güneş kremlerinde çok fazla oranda uygulanmaktadır (73). Nano ölçekli TiO_2 ve ZnO nano olmayan güneş kremleri ile benzer seviyede UV radyasyonunu engellediği kanıtlanmıştır (74). Bunların dışında, bu maddelerin nano olarak tercih edilmesinin nedeni deriye uygulandığında nano olmayan partiküllere oranla daha şeffaf olmalarıdır. Güneş kremlerinin formülleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki temel özellikleri esas alınarak değerlendirilir. Kimyasal güneş kremi formülleri güneşin saçtığı mor ve ötesi ışınlarının emilimi esnasında güneş ışınlarına maruz kaldıklarında yapılarında oluşan kimyasal tepkime ile mor ve ötesi ışınlarına emilim yapar. Fakat bu durum deri yüzeyinde birtakım sorunlara sebep olmaktadır. Emilim mekanizması kimyasal tepkimeler sonucunda olduğu için mor ve ötesi ışık altında meydana gelen bu tepkimeler deride kızarma, kaşıntı ve yara gibi sorunlar oluşturmaktadır. ZnO ve TiO_2 fiziksel güneş kremi içeriklerinin en tanınan örnekleridir. Bu tarz inorganik yapılar kimyasal tepkimeler meydana gelmeden mor ve ötesi ışınları emerek veya dağıtarak koruyucu etki göstermektedir.

Çinko oksit güneşin saçtığı UVA ve UVB ışımalarını absorplamasından dolayı güneş kremlerinde kullanılabilecek iyi seçeneklerden birisidir. TiO_2 kullanımı, bu sektörde en çok kullanılan ZnO'in ardından gelmektedir. TiO2-NP'lerinin değişik alanlardaki kullanımları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. TiO_2'in kullanım alanları (68)

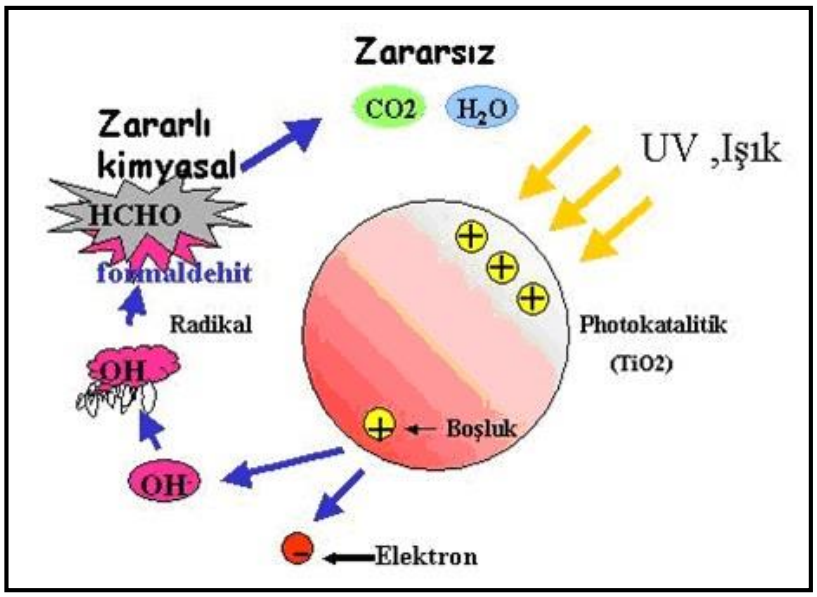
Uygulama Alanı	Kullanım Özellikleri
Cam	Cam üretiminde beyazlaştırıcı olarak ve cam elyaf imalatında rutil kristal formu kullanılmaktadır.
Seramik	Mineli seramik üretiminde rutil kristal formu tercih edilmektedir.
Kozmetik	UVA ve UVB ışınlarını engellemek için losyonlarda ve güneş kremlerinde, diş macunlarında opaklaştırıcı, kayganlaştırıcı ve kalınlaştırıcı olarak kullanılmaktadır.
Tekstil	Kumaşların kendi kendini temizlemesi ve ütülemesi için kullanılır.
Diş hekimliği	Pulpa kaplama ve kök kanalı dolgusu malzemelerinde kullanılır.
Boya	Anataz kristali vernik, mürekkep, beyaz boya üretiminde kullanılır.
Plastik	Şeffaflaştırıcı olarak kullanılır.
Kaplama	Sırlar ve emayelerde kullanılmaktadır.
İlaç	Renklendirici ajan olarak ve kaplama malzemesi olarak tercih edilir.
Kağıt	Kağıt üretiminde beyazlaştırıcı olarak kullanılır.

TiO_2'in Fotokatalitik Etkisi

Fotokatalizör, solid bir malzemenin, ışığın etkisiyle aktifleşerek tepkime oluşturması ve tepkime boyunca varlığını devam ettirmesidir. Uygun bir fotokatalist; Görünür ışık veya

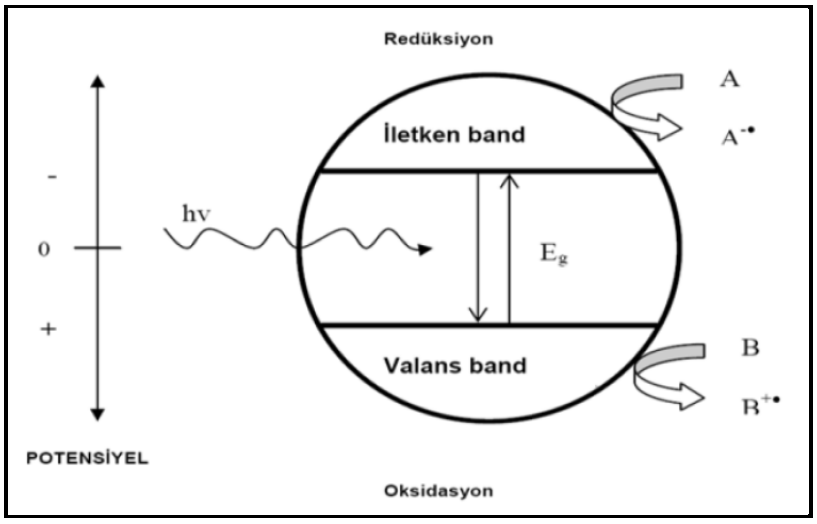
ultraviyole ışık ile hareket etmeli, yüksek fotokatalitik aktivite, düşük tane boyutu, yüksek yüzey alanı ve kararlılık gibi özelliklere sahip olmalı ve toksik etkisi olmamalıdır. Kristal yapıya sahip yarı iletken bir malzeme olan TiO_2'nin anataz ve rutil kristal formları fotokatalitik özelliklere sahiptir (75, 76).

TiO_2, klorofilin fotosentez kabiliyetine benzer şekilde, fotokatalitik özelliğe sahiptir (77). Şekil 8'de gösterildiği gibi TiO_2 gün ışığından emilim yaptığı UV ışınlarını ya da evlerde aydınlatma amaçlı bulunan flüoresan ışıkla etkisi ile bir organik malzemeyi CO_2 ve H_2O'ya çevirir (78).



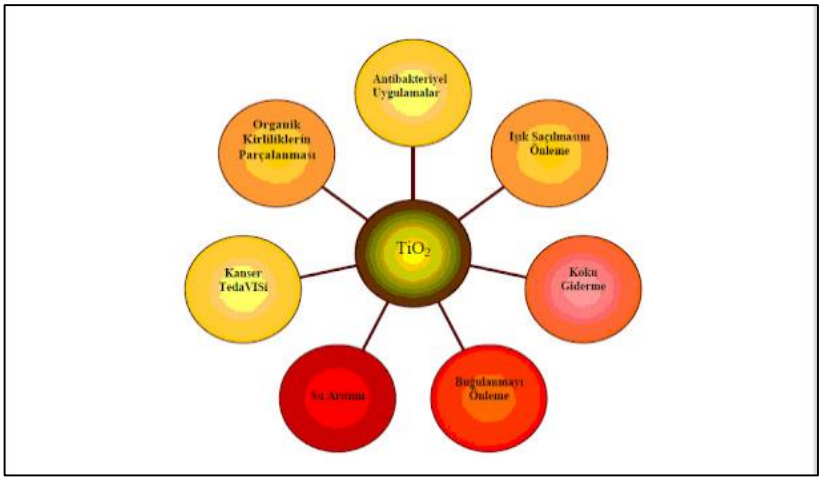
Şekil 8. TiO_2'in fotokatalitik etkisi (79).

Işık olan bir alanda, TiO_2 değerlik bandında bulunan elektron uyarılır. Bu çok fazla enerjiye sahip olan elektron, TiO_2' in iletkenlik bandına geçerek negatif elektron (e-) ve pozitif boşluk (h+) çiftini oluşturur (Şekil 9). Bu kısım, bir yarı iletken özelliğe sahiptir ve burada foto uyarılma meydana gelmektedir. Bant boşluğu, iletkenlik bandı ve değerlik bandı arasında meydana gelen enerji farkına denir ve foto uyarılma için 388 nm ışık dalga boyu olması gerekir (79).



Şekil 9. Fotokataliz oluşumunun mekanizması: A-İndirgenebilir ve B-Oksitlenebilir malzemeler (80)

TiO_2 ayrıca, anti bakteriyel özelliğe sahiptir, organik buhar fazındaki bileşikleri bölerek kokuları önleyici (tütün ve benzin vb.) özellik gösterir (Şekil 9). Ek olarak, kirlenmiş binaların dış cepheleri TiO_2' in anti durağan, oksitleyici, suyu seven özelliklerinden dolayı hava koşullarının yardımı ile kendi kendini temizleme özelliğine sahiptir (81-88).



Şekil 10. Fotokatalitik nano TiO2' in uygulama alanları (79)

NANOTOKSİKOLOJİ

Nanotoksikoloji temel olarak nanomalzemelerin/nanopartiküllerin toksisitesi ile ilgilenir. Nanotoksikolojik çalışmaların temel amacı, nanoparçacıkların ve nanofarmasötiklerin insan ve çevre üzerindeki toksik/tehlikeli etkilerini belirlemektir. Farklı toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak incelenen tipik nanoparçacıklar, gümüş (Ag-NPs), altın (Au-NPs), titanyum dioksit (TiO_2-NPs), sezyum dioksit, demir oksit, alümina, çinko oksit (ZnO-NPs),

karbon siyahı (CB) ve dizelden türemiş nanopartiküllerin yanı sıra karbon nanotüpler, fullerenler ve "nano C60" dır. Kuantum boyut etkileri ve geniş yüzey alanı-hacim oranı nedeniyle nanomalzemeler daha büyük muadillerine kıyasla benzersiz özelliklere sahiptir. Nanopartiküllerin toksisitesi, aynı malzeme veya elementi içeren daha büyük partiküllerde görülmeyebilir. İnert elementlerden yapılmış olsa bile nanomalzemeler (örn. altın) nanometre boyutlarında oldukça aktif hale gelebilir (89, 90).

Nanopartiküllerin biyolojik etkisinin anlaşılması çalışmaları, nanopartiküllü tüketici ürünlerinin kullanılması ile zamanla artmıştır (91). Hücre içerisinde veya çevresinde meydana gelen ROS nanoyapılı ürünlerin toksisitesinin araştırılmasında kullanılan temel etmenlerin başında gelmektedir (92). Hidroksil radikalleri, süperoksitler ve ROS insan metabolizmasında devamlı üretilmektedir. Düşük seviyedeki ROS, hücresel sinyalizasyonun oluşturulmasında ve normal hücre üremesinde önemli etkiye sahiptir. Fakat ROS üretiminin artması hücresel yıpranmanın patojenezinde çok etkilidir. Oksidatif stres, DNA, lipidler ve protein gibi biyomoleküllere zarar vererek kanser hücrelerinin çoğalmasına sebep olabilir. Oksidatif stres, DNA hasarını tetikleyerek kanser hücrelerinin meydana gelmesinde etki gösteren genomik kararsızlığa neden olur. Oksidatif stres farklı yollar ile oluşabilir. Yabancı bileşiklerin metabolizması, mitokondriyal solunum ve enflamasyon vb. oksidatif stresin oluşumunda çok önemli rol oynarlar. Hücre içerisinde veya çevresinde nanoyapıların yayılma özellikleri çeşitli yollarla hücreyi hasara uğratmaktadır (93, 94). Ayrıca, nano boyutlu malzemelerin yüzey elektroniği ve değişik özellikteki grupları, nanopartiküller ile onları saran bileşikler arasında etkileşiminin seviyesini belirler (95, 96). Hücresel hasarın seviyesinin ölçülmesinde nanopartiküllerin büyüklükleri çok büyük bir öneme sahiptir. Nanopartiküller boyutları sayesinde çok kolay bir şekilde hücre zarından içeri girerek hücre içerisinde hasara neden olmaktadırlar (97). Bununla birlikte nanopartiküllerin şekilleri de hücresel etkinliklerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Yuvarlak olmayan nanopartiküllerin yuvarlak olanlara göre değişik biyolojik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (98).

Son yıllarda nanotoksikoloji alanında çalışan bilim insanları, nanomalzemelerin özellikle inhalasyon çalışmalarında daha yüksek toksisite göstermesi nedeniyle nanoteknoloji ürünlerine ilişkin daha sıkı düzenlemelerin hazırlanmasını talep etmektedir (99).

Nanopartiküllerin Güvenlik ve Toksisitesi

Nanomalzemeler hem sağlık hem de çevre sorunlarına neden olabilir (100). Özellikle toksisite ile ilgili çalışmalar son yıllarda oldukça fazla yayınlanmış olmasına rağmen,

toksikoloji alanında yayınlanan makalelerin sayısı ile karşılaştırıldığında hala azdır (101-106). Malzemelerin davranışı ve toksisitesi ile ilgili verilerin çoğu, esas olarak solunum üzerine yapılan çalışmalardan gelmektedir. Nano ölçekli bileşenleri içeren formülasyonlar, düşük çözünürlük gibi sorunları çözmek için kullanıldığından, malzemelerin davranışına ilişkin veriler de farmasötik çalışmalardan elde edilebilir (107-111).

Nanopartiküllerin Olası Toksisite Nedenleri

a) Boyut: Nanopartiküllerin toksik etkilerinin çoğu, yüksek yüzey/hacim oranıyla ilgilidir. Bu nedenle, kütle-doz bazında nanopartiküller/nanomalzemeler daha büyük parçacıklar ile karşılaştırıldığında daha fazla toksisiteye sahip olabilir (110, 111). Boyut küçültmesi, yüzey/hacim oranında önemli bir artışa yol açar ve göreceli olarak daha fazla molekül yüzeyde olabilir. Bu fenomen, intrinsik toksisitede artışa neden olabilir. Bu özellik partikülleri daha reaktif veya katalitik hale getirebilir (112).

Nanopartiküllerin daha büyük yüzey alanı-birim kütle oranları, bazen özellikle akciğerlerde daha büyük proinflamatuar etkilere neden olabilir. Ayrıca, bazı nanopartiküller birikme bölgelerinden beyin veya kan gibi uzak organlara/sistemlere hareket edebilirler. Bu fenomen, partikültoksikolojisinde büyük bir bakış açısına neden olmuştur. Akciğer toksisitesine odaklanmak yerine, toksikologlar nanopartiküllerin beyin, kan, karaciğer, cilt ve bağırsak üzerindeki toksik etkilerini de incelemektedirler (110, 111). Yüzey alanı, enflamasyon açısından çok önemlidir. Düşük toksisiteli partiküller üzerinde yapılan araştırmalar, TiO_2'nin, miligram cinsinden dozlandığında $BaSO_4$'e kıyasla daha şiddetli bir akciğer iltihabına ve partikül lenf düğümü yüküne yol açtığını göstermiştir. Ancak, doz yüzey alanı olarak ifade edildiğinde cevap şiddeti arasındaki farklılıklar ortadan kalkmıştır, böylece partikül büyüklüğünün önemi gösterilmiştir (113).

b) Kimyasal bileşim, saflık ve intrinsik toksikolojik özellikler: Nanopartiküllerin toksik etkileri hem kimyasal bileşimlerine hem de yüzeylerine adsorbe edilen maddelerin bileşimlerine bağlıdır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin yüzeyleri, daha az zararlı hale getirilmeleri için kaplama ile değiştirilebilir. Karbon siyahının toksik etkisi TiO_2 ile karşılaştırıldığında daha ciddi bulunmuştur; her iki nanopartikül daha büyük eşdeğerleri ile karşılaştırıldığında sıçanlarda akciğerde enflamasyona ve akciğer epitelinde daha ciddi hasara yol açtığı gösterilmiştir (113). Ayrıca nanopartiküllerin reaktivitesi yüzeylerine adsorbe ettirilen kimyasallar (organik veya metal) ile değiştirilebilir. Bu kimyasallar toksisiteyi arttırabilir veya azaltabilir. Parçacıklı hava kirleticilerinden (yani dizel egzoz parçacıkları) izole

edilen fraksiyonların, *in vitro* olarak hücreler üzerinde ciddi toksik etkiler yarattığı gösterilmiştir (114-118). Wilson ve arkadaşları metalik demirin karbon siyahı nanopartiküllerinin reaktif etkisini arttırdığını göstermiştir (119). Süper paramanyetik demir oksit nanopartikülleri ile yapılan bir çalışmada nanopartiküllerin yüzeyin pullulan ile kaplanması durumunda *in vitro* sitotoksisitesinin azaldığı gösterilmiştir (120, 121). Dekstran ve albümin ile türevlendirilmiş demir oksit nanopartiküllerinin saf hallerine göre daha az *in vitro* sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (122).

c) Şekil: Çok az kesin kanıt olmasına rağmen, nanoparçacıkların sağlık üzerindeki etkileri şekillerine bağlıdır. Özellikle inhalasyonla ilgili olarak şekil hakkındaki tartışmanın en önemli örneği liflerdir. İncelik ve uzunluk gibi fiziksel parametrelerinin solunabilirliği, iltihaplanma potansiyelini ve biyolojik kalıcılıklarını belirlediği görülmektedir. Örneğin, "nanotüpler" olarak adlandırılan özel bir lif kategorisinin çapı birkaç nanometredir; bununla birlikte, birkaç mikrometre olabilen bir uzunluğa sahiptirler. Yakın tarihli bir çalışma, karbon nanotüplerin, normal toksik toz modelinden farklı olarak, tamamen yeni bir mekanizma ile yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir (123).

İki kemirgen çalışmasında, tek duvarlı karbon nanotüplerin intratrakeal uygulamadan sonra akciğer granülomlarını ve multifokal granülomatöz lezyonları (enflamasyon, hücre proliferasyonu veya sitotoksisite olmadan) indüklediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, toksik tozların normal paradigmasını takip etmeyen, nanotüplerin potansiyel olarak yeni bir pulmoner toksisite ve yaralanma mekanizması olduğunu gösterdi ve bu nanotüplerin yeni bir grafit formu olarak sınıflandırılamayacağını göstermektedir (124, 125). Kütle başına doz bazında, nanotüpler, akciğer toksisiteleriyle iyi bilinen kuvars parçacıklarından daha toksik olduğu gösterilmiştir (125).

Nanopartiküllere Maruz Kalma

Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerle etkileşimleri hakkında çok fazla şey bilinmemektedir. Küçük boyutları nedeniyle hücre zarlarından ve yüksek organizmalarda bulunan farklı bariyerlerden de geçebilirler (123). Bununla birlikte, bu parçacıkların hücre çekirdeğine, Golgi organeline, Endoplazmik Retikuluma veya diğer iç hücresel bileşenlere girip girmediği açık değildir.

a) Nanopartiküllere deri yoluyla temas: İnsan derisi, sağlam olduğunda farklı türdeki nanoparçacıklara karşı iyi bir bariyerdir. Mevcut bilgiler, 4 nm'den büyük nanopartiküllerin sağlam cilt boyunca taşınmasının ihmal edilebilir olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte,

metal ve metal oksit nanopartiküllerinin çözünmesi mümkündür ve organizmadaki iyon konsantrasyonları, dermal partikül maruziyeti ile artabilir (örn. TiO_2 nanopartikülleri) (126). İnsan keratinosit hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmanın sonuçları, karbon nanotüplere maruz kalmanın hızlandırılmış oksidatif stresin yanı sıra sitotoksisiteye yol açtığını göstermiştir. Bu bulgular, nanopartiküllerin, özellikle nanotüplerin dermal toksisiteye sahip olabileceğini ortaya koymaktadır (127).

b) Nanopartiküllere solunum yoluyla temas: Nanopartiküllerin ve nanomalzeme ürünlerinin piyasaya sürülmesiyle, insanların aerosollere ve partiküllere maruz kalma şekli hızla değişmektedir. Silikozis ve pnömokoniozis gibi tarihsel olarak önemli akciğer hastalıkları, kontrol önlemlerinin iyileştirilmesiyle önemli ölçüde azaltılırken, nanopartiküllere maruz kalma yeni ortaya çıkan bir sağlık sorunu haline gelmektedir (92, 128-133).

Mevcut araştırmalar, solunan partiküler maddeye (özellikle ultra ince partiküllere) maruz kalma ile artan kardiyovasküler ve pulmoner morbidite ve mortalite arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (134-142). Her yıl İngiltere'de asbestos nedeniyle 2000 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (143). Bu ölüm döngüsü dünya çapında birçok gelişmiş ülkede tekrarlanmıştır. Asbesti olağanüstü yararlı bir malzeme yapan aynı benzersiz ince lifli özellikleri, aynı zamanda fibrozis ve karsinojenezis gibi kronik olumsuz sağlık etkilerine de yol açmıştır.

Yapılan bir klinik vaka çalışmasında, 5-13 ay boyunca poliakrilat içeren nanopartiküllere maruz kalan yedi genç kadın işçide, nefes darlığı ve plevral efüzyonlar ile karakterize ciddi akciğer hasarı bildirilmiştir (133). Patolojik incelemelerde pulmoner fibrozis ve plevrada yabancı cisim granülomları da gözlenmektedir. Nanopartiküllerin, pulmoner epitelyal ve mezotelyal hücrelerin sitoplazma ve karyoplazmaları dahil olmak üzere hem dış hem de iç hücresel bölmelere penetrasyonu elektron mikroskobu kullanılarak doğrulanmaktadır. Bu nedenle, yeni geliştirilen nanopartiküllerin ve nanomalzeme ürünlerinin olası risklerinin insan kaynaklı olumsuz etkiler ortaya çıkmadan önce değerlendirilmesi gerekmektedir.

c) Nanopartiküllere gastrointestinal kanal yoluyla temas: Gümüş nanopartikülleri, TiO_2NP, silikon dioksit nanopartikülleri ve çinko oksit nanopartikülleri gibi nanopartiküllere oral maruziyet, su, kozmetik, ilaç ve gıda takviyelerinin yutulmasından kaynaklanabilir. Gümüş nanopartikülleri için önerilen miktarın 1,8 mg/kg/gün olduğu tahmin edilmektedir (70 kg'lık bir kişi için yaklaşık 126 mg/gün) (144).

İnsanlar, tatlılardan, sakızlardan ve kurabiyelerden E171'in yutulması nedeniyle TiO_2 partiküllerine oral olarak maruz kalırlar. Bu ürünler genellikle yaklaşık 1-5 μg/mg E171 içerir ve günlük alım miktarı 70 kg olan bir yetişkin için 0,45 mg/kg'a (yaklaşık 31,5 mg/gün) ve çocuklar için 1 mg/kg'a ulaşabilir (145).

Günlük gıda alımı ve sıvı tüketimine ilişkin anket verilerine dayanarak, gastrointestinal sistemdeki yaklaşık konsantrasyonlarından kaba tahminler yapılmıştır. Ulusal Diyet ve Beslenme Araştırması, ortalama 449,7 g/gün katı gıdanın (protein, karbonhidrat ve yağ) genellikle erkekler tarafından ve kadınlar için 328,1 g/gün tüketildiğini bildirmiştir (146).

Ortalama sıvı alımının 1,98 L/gün olduğu ve ülkeler arasında önemli farklılıklar olduğu öne sürülmüştür (147). 2,5 L hacminde gıda (katı ve sıvı) yutulduğu varsayılırsa, en düşük ve en yüksek günlük alımlarına göre gümüş için 0,008-0,032 μg/mL, silisyum oksit nanopartikülleri için 9,2-50,4 μg/mL ve TiO_2NP için 0,12-12,6 μg/mL konsantrasyonları kabul edilmiştir.

Oral yoldan alınan nanopartiküllerin absorpsiyonu için, en ilgili morfolojik parametreler, giriş portalının alanı ve bariyer kalınlığıdır. TiO_2 nanopartikülleri üzerinde yürütülen insan ve hayvan çalışmalarının çoğunda, translokasyonları (18, 40-50, 120 ve 130 nm boyutlarında) genellikle tespit limitinin altında olduğu görülmüştür (148). TiO_2 partikülleri midede %0,06, ince bağırsakta %0,11 ve kalın bağırsakta %4'e kadar emildiği gösterilmiştir (149). Tersine, 40 nm boyutundaki titanyum dioksit nanopartiküllerinin Caco-2 mono tabakaları boyunca %14'e kadar yer değiştirebileceği bildirilmiştir (150). TiO_2 IARC tarafından 2b olası kanserojen sınıfına alınmıştır ve gıda katkı maddesi olarak Avrupa Birliği'nde yasaklanmıştır. Nanopartiküllerin oral toksisitesi *in vitro* sistemler tarafından test edildiğinde, çalışmalar fizyolojik olarak ilgili pH, proteazlar, tuz konsantrasyonları ve ozmotik basınç ile tasarlanmalıdır. Aksi takdirde, bulgular literatüre gerektiği gibi katkıda bulunamaz.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücrelerin uygun bir besi ortamında laboratuvar koşullarında çoğaltılmasına hücre kültürü denir. Belirli bazı moleküllerin etkisini gözlemlemek, hücreler aracılığı ile yapılan ve yaşam koşullarına bırakılan farklı moleküllerin etkilerini gözlemlemek için belirli hücre tiplerinde, kültür ortamında yapılan deneyler, in vitro çalışmalar olarak tanımlanır. İn-vitro çalışmalar biyoteknoloji ile paralel olarak ilerlemektedir (151). Doku biyolojisi, genomik, proteomik, genetik mühendisliği ve kimya mühendisliğini kapsayan çeşitli disiplinlerlede araştırmalarda kullanılan doku kültürü teknolojisi, araştırmacı laboratuvar ortamda hücre ve

doku tepkilerini çalışma olanağı sağlamaktadır (152, 153). Genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler hücre kültüründe çok fazla çalışmanın yapılmasına imkan sağlamıştır. Farklı hücreler vektör, doğal ve değiştirilmiş insan proteinlerinin imalatında kullanılır. Hücre mühendisliği proteinlerin stabilitesinde ve biyolojik aktivitesinde değişime olanak sağlar. Hücre kültürü bilimindeki ilerlemeler doku mühendisliğinin gelişmesine neden olmaktadır (154).

Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

İlaçların hücrelerde kimyasal değişikliğe uğramasında etkili olan enzim sistemlerinin ve enzim etkinliğine etki edebilecek hususların belirlenmesi, ilaç metabolizması ile meydana gelen metabolitlerin toksik etkilerinin belirlenmesi, ilacın metabolize olarak yarılanma süresinin ve aralarındaki etkileşim seviyesinin saptanması ile beraber ilaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık etkilerinin araştırılması alanlarında hücre kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır (155).

Toksisite Çalışmalarında Hücre Kültürünün Faydası ve Önemi

İn-vitro ortamda hücre kültürü araştırmalar kimyasalların olası toksik etkilerini beyin gibi belirli doku hücreleri üstünde araştırılmasına imkân sağlar. Buna ek olarak hücresel toksisite mekanizmalarının açıklanması, deney hayvanın kullanımını azaltmak için alternatif bir yöntem olması, insan üzerinde yapılamayacak çalışmaların insan hücrelerinde denemesine gibi çeşitli imkanlar sağlar. İn-vitro ortamda hücre kültürü çalışmalarının olumsuz yanları ise hücrelerin in-vitro koşullarda ömürlerinin kısa olması, hücrelerin in-vitro ortamda kofaktörlere ihtiyaç duymaları, organ sistemlerinin etkileşimlerini yansıtmamaları gibi dezavantajları vardır (156).

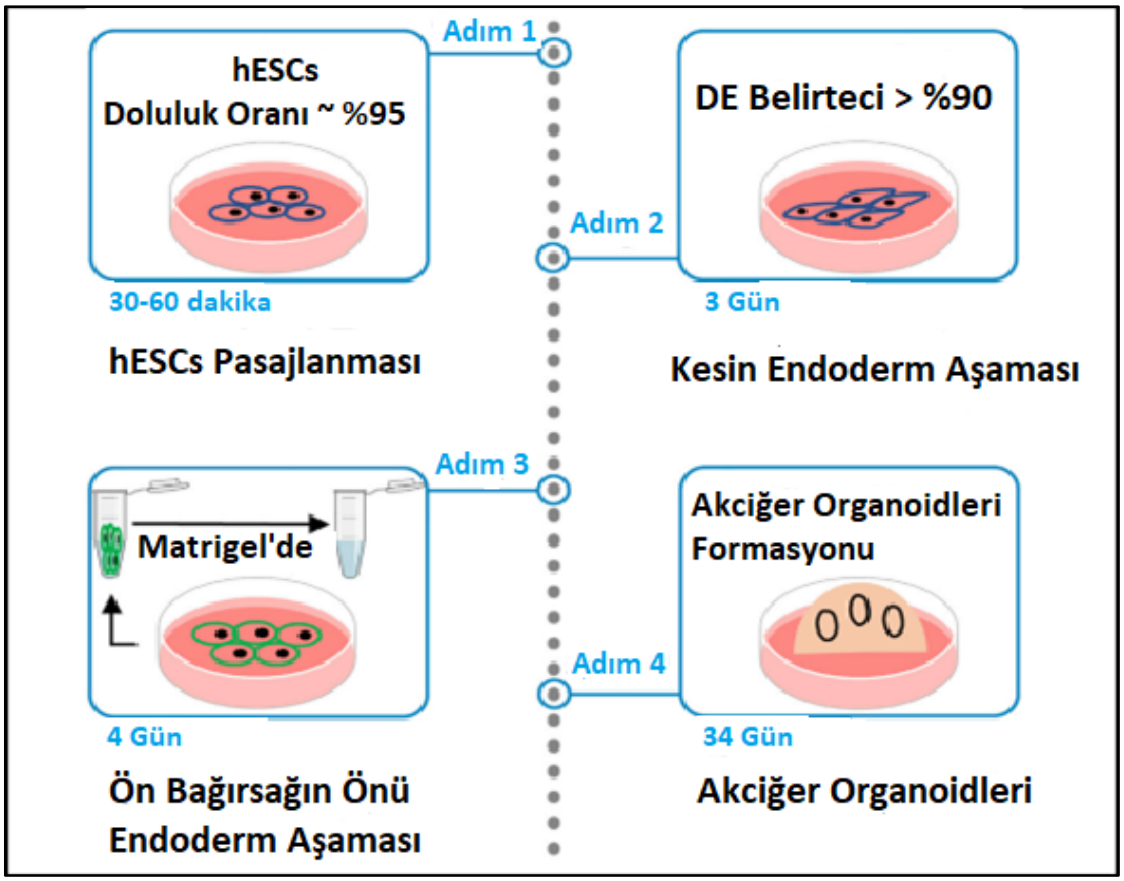
Hücre Kültür Türleri

Hücre kültürleri birçok kaynaktan sağlanabilir. Hücre kültürleri sağlanış pasajlamaları ve elde edilişleri göz önünde bulundurulduğunda üç türü vardır.

a) Primer hücre kültürü: Tripsin kullanılarak dokulardan yalıtılmış hücrelerin laboratuvar ortamlarda çoğaltılmaları ile meydana getirilen kültürlerdir. Genelde bu kültürler bir miktar pasajın ardından üreme kabiliyetlerini yitirirler.

b) Sekonder hücre kültürü: Diploid hücrelerden sağlanan ikincil hücre kültürü hücreleri maksimum 50 defa pasaj yapılabilir ve kromozom sayıları normal olan hücrelerden meydana gelirler.

c) Sürekli hücre kültürü: Sonsuz çoğalma kabiliyetine sahip bu hücreler çoğu zaman malign tümörlerden meydana gelirler ve sınırsız sayıda pasajlanabilirler. Bu tür hücreler hücre kültüründe modifikasyona uğrarlar ve değişiklik gösterebilen kromozom sayılarına sahiptirler (157).



Şekil 11. İnsan embriyonik kök hücre kaynaklı akciğer organoidlerinin üretimi (158)

Akciğer organoidleri Şekil 11'de görüldüğü gibi, Matrigel'de kendiliğinden birleşerek oluşur ve akciğer epitel hücre tiplerini içerir. 3D akciğer organoidlerinden (HLO'lar) türetilen insan embriyonik kök hücreleri (hESC'ler), insan akciğer gelişimini ve hastalığını incelemek için umut verici bir model sağlar (158, 159).

Akciğer organoidleri, in vivo muadilleriyle tutarlı yapıları ve işlevleri sergileyen 3D doku mühendisliği mini akciğerlerdir. Bu karmaşık modeller, akciğer gelişiminin incelenmesinden hastalık modellemesine kadar çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır, ancak çalışmalar nanomalzeme testi için uygunluklarını henüz sorgulamamıştır (160).

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda akciğer BEAS-2B, WI-38, CCD-19Lu, IMR-90, MRC-5 ve HEL 299 hücreleri kullanılmıştır (161).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Çalışmada HEL 299 / An1 insan embriyonik akciğer hücre (Diploid) hattı kullanılmıştır. Hücre kültüründe yapılan işlemler steril ortamda laminar flow kabininde (Safe Fast Elite (EN 12469 2000) yapılmıştır. Hücre kültüründe hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması %95 nemli 37°C'da %5 CO_2'li inkübatörde yapılmıştır. Hücreler %5 yeni doğan sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin,10 mg/mL streptomisin ve 100 IU/ml penisilin içeren HAMS F12: EMEM: DMEM besin ortamında75 cm^2 flasklara ekilmiştir. Hücrelerin yapışması ve özellikleri mikroskopta kontrol edilmiştir. Flaskların tabanına yapışan hücreler hücre kültürü ile aynı ısıdaki Tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tipte kalan hücreler uygun besi yeri eklenerek pasajlanmış ve 3'er gün ara ile 5. pasaja kadar çoğaltılmıştır. 5. pasajda hücreler DMSO medyumlu kryotüplerde sıvı azot içinde dondurulmuştur ve -150 °C'de depolanmıştır. Çalışmaların tümünde hücre hatlarının 5. pasajlarından başlandı.

MTT TESTİ ile LD_{50} DOZUNUN BELİRLENMESİ

MTT testinde, sarı renkli 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid isimli tetrazolyum tuzunun canlı olan hücrelerin mitokondrileri tarafından suda çözünmeyen mor renkli kristallere dönüştürmesi prensibine dayanan ve bu renk değişiminin spektrofotometre ile belirlendiği kolorimetrik bir yöntemdir.

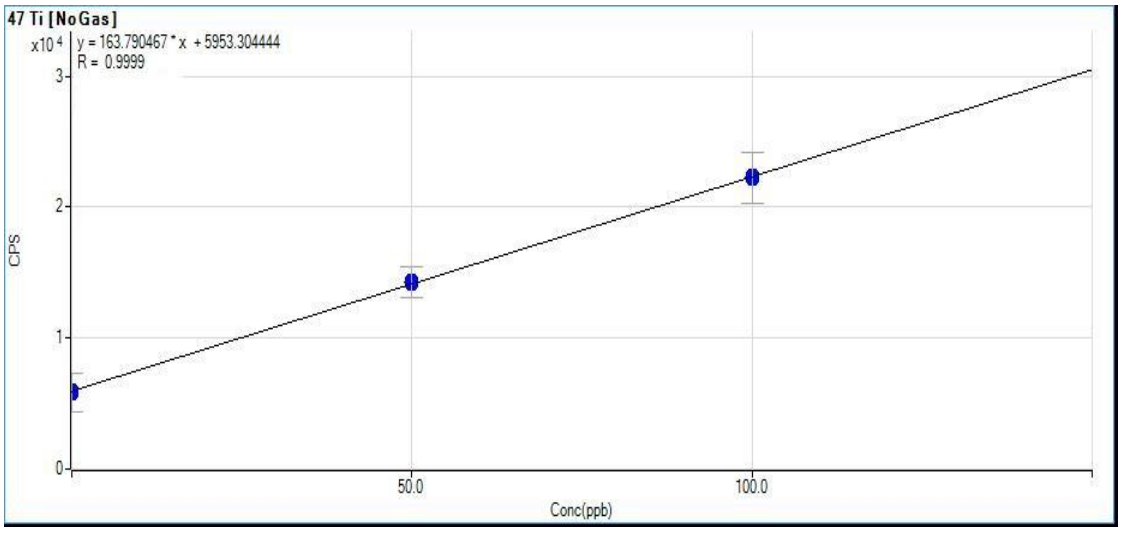
96 kuyucuklu plakalara $1x10^5$ olacak şekilde hücre ekimi yapılıp 24 saat süre ile %95 nemli 37°C'da %5 CO_2 ortamda inkübe edilmiştir. Ardından 0 µM, 0,90 µM, 1,59 µM, 3,13µM, 6,25 µM, 12,50 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM dozlarında 20 µl nanotitanyum

oksit partikülleri 24 ve 48 saatler için ayrı plakalara uygulanmıştır. 5 mg/mL sarı renkli 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid 20 µl/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara uygulandı ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatlik inkübasyonun sonunda plakalar ters çevrilerek medyum uzaklaştırılmıştır. Tetrazolyum tuzunun çözünmesi için 200 µl DMSO ilave edilerek Multiskan GO mikroplaka okuyucu ile 492 nm dalga boyunda hücrelerin optik yoğunlukları okunmuştur. Elde edilen veriler SPSS 22 ile probit analizi ile değerlendirilerek LD_{50} değerleri hesaplanmıştır. Hücre canlılığı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

% Hücre Canlılığı: Örnek absorbans değeri / Kontrol absorbans değeri * 100

İNDÜKTİF EŞLEŞMİŞ PLAZMA-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (ICPMS) İLE TİTANYUM MİKTAR TAYİNİ

Hücrelere 24 ve 48 saat LD_{50} değerlerine maruz bırakıldıktan sonra ICP MS analizi uygulanmıştır. Hücre kültüründe medyum uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücrelere 1 mL %65 nitrik asit eklenip 24 saat beklenerek hücreler sindirilmiştir. Ardından üzerine 9 mL ultra saf su eklenerek Agilent 7700 model ICP kütle spektrometresi (Agilent Teknolojileri, Waldbronn, Almanya) ile okunmuştur. Titanyum saptaması için ^{49}Ti izotopu ve dahili standart olarak ^{115}In kullanılmıştır.



Şekil 12. Titanyum ICP MS kalibrasyon grafiği

DNA İZOLASYONU ve HİDROLİZİ

DNA izolasyonu Invitrogen Pure Link Genomic DNA Mini Kit ile kit yönergelerine göre yapılmıştır. Crow ve ark. tarafından kullanılan DNA hidroliz yöntemi kullanılmıştır (162). DNA'nın hidrolizi için, DNA deferoksamin mesilat içine ilave edildi (162). 10 µL nükleaz P1 (Sigma) 1 U/µL konsantrasyonunda 0,3 M sodyum asetat içinde çözüldü ve 1 mM $ZnSO_4$, pH 5,3 ilave edildi (162). Ardından hazırlanan çözelti deferoksamin mesilat içine çözünmüş olan DNA'ya eklendi (162). Çözelti karışımı (hala çözülmemiş DNA ile) vortekslendi ve inkübe edildi (37°C'de 2 saat) (162). Ardından tekrar vortekslendikten sonra1 saat daha inkübe edildi (162). Daha sonra 10 µL 0,5 M Tris ve 0,2 µL alkalin fosfataz, 1 mM Na_2EDTA karışımı pH 8'de 20 U/µL eklendikten sonra 1 saat inkübe edildi (162). Karışım vortekslendi ve 37°C'de ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı sonra tekrar vortekslendi (162). Karışım santrifüjlendi (5 dakika 5000g) ve süpernatandan alikotlar analiz için alındı (162).

SIVI KROMATOGRAFİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS-MS) ile 8-OHdG MİKTAR TAYİNİ

24 ve 48 saat LD_{50} değerleri maruziyeti sonunda Crow ve ark. tarafından kullanılan LC-MS-MS ile 8-OHdG tayini yöntemi kullanılmıştır (162). Analiz Agilent 1260 HPLC sistemi (Agilent Teknolojileri, Waldbronn, Almanya) ve 6460 Triple Quadrupol (Agilent) kütle analizörü ile yapıldı. Ölçüm için cihaza bağlı bulunan Poroshell EC C18.6x150mm 2,7 m kolonu 40 ºC'a ayarlandı ve 20 µL örnek cihazda çalışıldı. Çalışmada iki farklı mobil fazdan faydalanıldı. Mobil faz A olarak %0,1 formik asit içeren ultra saf su ve mobil faz B olarak ise metanol kullanıldı. Mobil faz karışımı 0,5 ml/dakika akış hızı ile sisteme gönderildi. Metanol gradienti ile elüsyon tekniği kullanılarak analitler kolondan alındı. 8-OHdG piklerinin gözlendiği 4-5 dakika aralığından sonra, 5 ile 6 dakikalar arasında B hattından %80'lik metanol çözeltisi, 6 ile 7 dakika arasında % 30'luk metanol ile gradient uygulandı ve 7. dakikada her bir örnek için analiz tamamlandı. Analiz bittikten sonra kolona % 50'lik metanol çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Adı	**Markası**	**Kodu**
HEL 299/An1 Hücre	AnkaraŞap Enstitüsü	99050301
Nano TiO_2	Sigma	791326
MTT	Biomatik	A3338
Etanol	Merck	603-002-00-5
DMSO	Merck	67-68-5
Ham's F-12	Multicell	318-010-CL
EMEM	Multicell	320-026-CL
DMEM	Multicell	319-020-CL
Tripsin-EDTA	Multicell	352-542-EL
L-Glutamin	Multicell	609-065-EL
FBS	Multicell	FBS-HI-IIA
Penisilin-Streptomisin	Multicell	450-201-ZL
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	K182002

Tablo 4. Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazların Adı	Kullanılan Cihazların Markası
Laminar Kabin	Safe Fast Elite (EN 12469 2000)
Etüv (%5 CO2)	Panasonic
Santrifüj	Hermle
Mikro plaka spektrofotometre	Multiskan go-Thermo Fisher Scientific
Vorteks	WiseMix
LC-MS-MS	Agilent 1260
ICP kütle spektrometresi	Agilent 7700

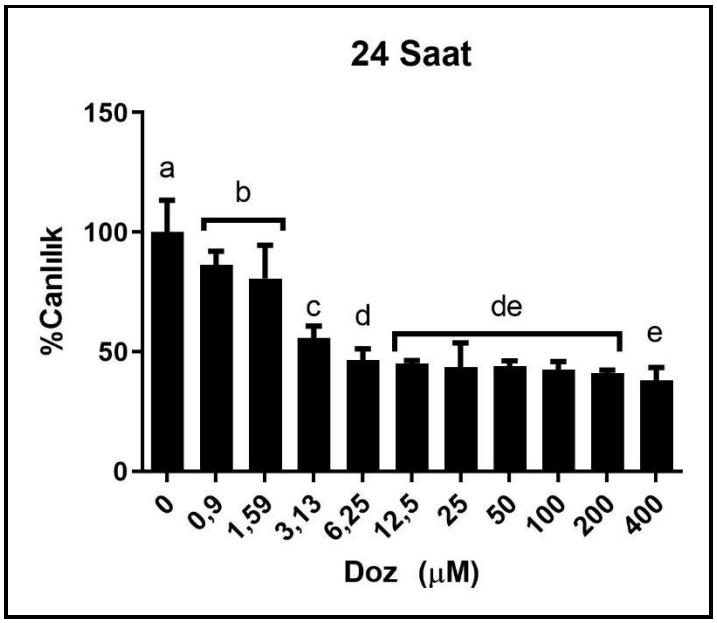
İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

SPSS 22 yazılımı ile grup varyanslarının heterojenliği levene testi ile testi edilmiştir. Grupların karşılaştırılması tek yönlü ANOVA post hoc Duncan ve post hoc Tukey ($p<0,05$) ile yapılmıştır. LD_{50} değeri SPSS 22 yazılımı ile probit analizi ile belirlenmiştir. Canlılıktaki değişimin doza bağlılığı korelasyon analizi ile r^2 değerinin belirlenmesi ile yapılmıştır. Oksidatif DNA hasarının karşılaştırılmasında bağımsız değişkenler T testi kullanılmıştır.

BULGULAR

MTT TESTİ İLE SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

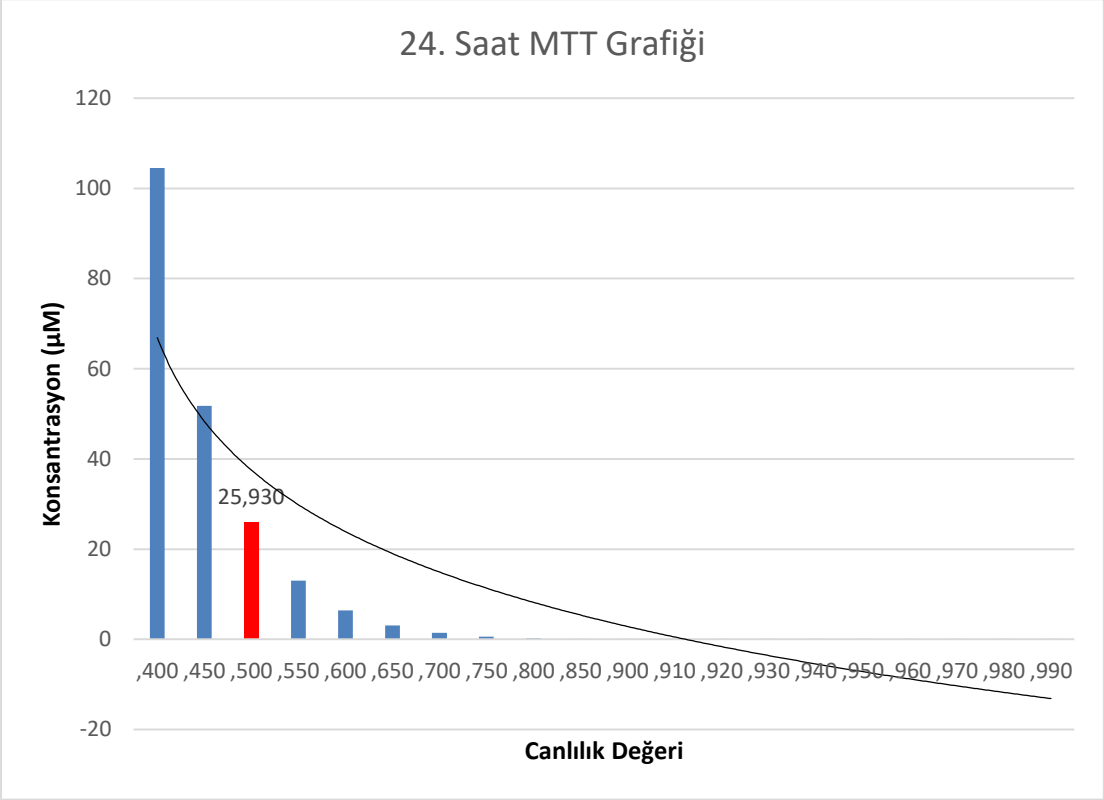
İnsan embriyonik akciğer hücre (HEL 299/An1) hattına 24 ve 48 saat sürelerle 0,9 µM ila 400 µM doz aralığında nanotitanyum dioksit uygulanmıştır. Gereç ve yöntemler kısmında belirtildiği şekilde gerçekleştirilen MTT testi ile elde edilen verilere SPSS 22 yazılımı ile probit analizi uygulanarak LD_{50} değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 13. HEL 299/An1 hücre hattına 24 saat nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz, %canlılık grafiği. Farklı harfler ortalamalar arasında anlamlı farkı ifade etmektedir

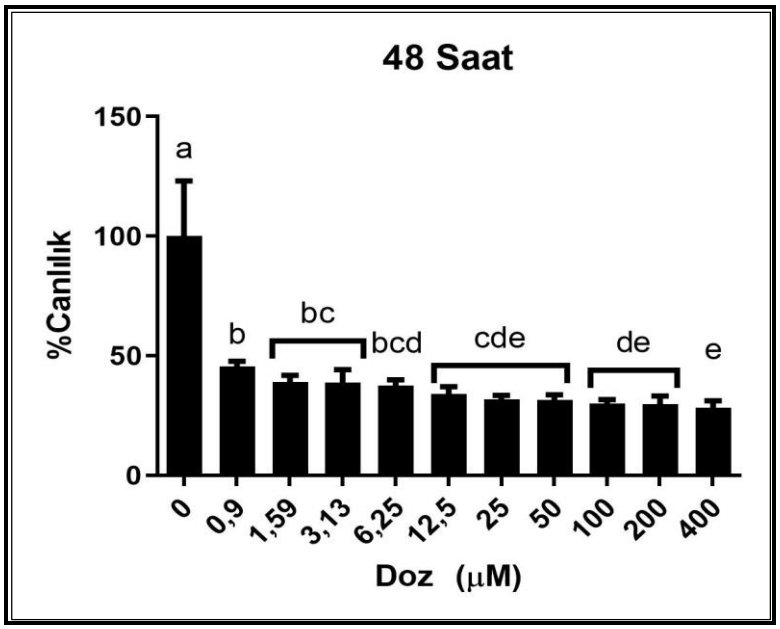
(Tek yönlü ANOVA post hoc duncan; ±Standart sapma; $p<0,05$; n=8)

HEL 299/An1 hücre hattına 24 saat süreyle 0,9 µM ila 400 µM doz aralığında nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz canlılık grafiği Şekil 13'te verilmiştir ve nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu canlılık azalmıştır ($p<0,0001$). 24 saat uygulamasında tüm grupların canlılığı kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ve canlılığın doza bağlı azalması arasında ilişki tespit edilmiştir ($r^2=0,692$).



Şekil 14. Nanotitanyum dioksite 24 saatlik maruziyet sonrası probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği (n=8).

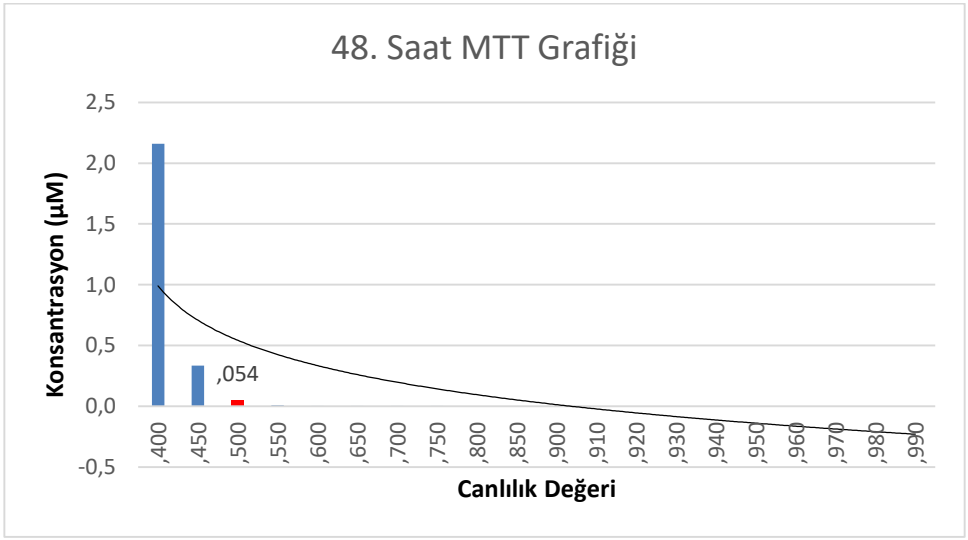
24 saat nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen absorbans doz verilerinin probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği ve 24 saat LD_{50} değeri 25,93µM olarak Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 15. HEL 299/An1 hücre hattına 48 saat nano titanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz, %canlılık grafiği. Farklı harfler ortalamalar arasında anlamlı farkı ifade etmektedir

(Tek yönlü ANOVA post hoc duncan; ±Standart sapma; $p<0,05$; n=8).

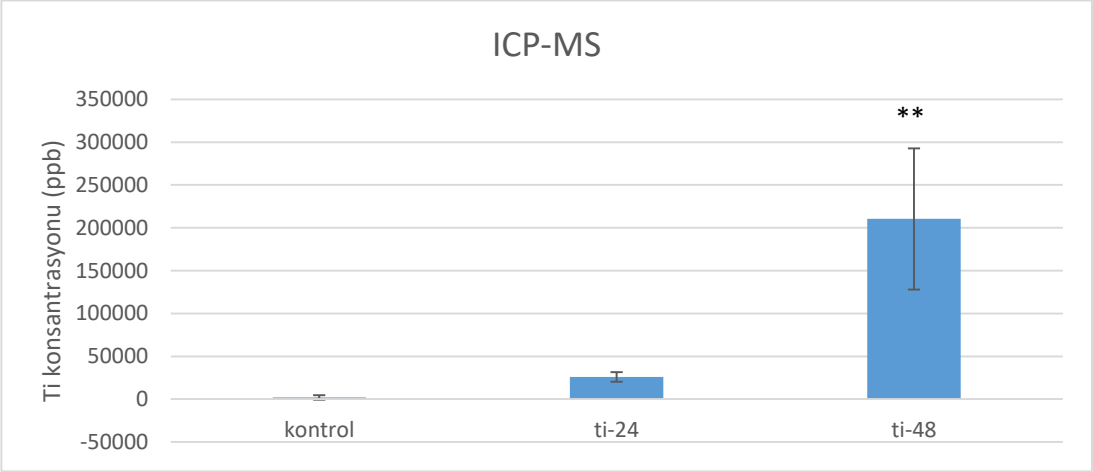
HEL 299/An1 hücre hattına 48 saat süreyle 0 µM ila 400 µM doz aralığında nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz canlılık grafiği Şekil 15'de verilmiştir ve nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu canlılık azalmıştır ($p<0,0001$). 48 saat uygulamasında tüm gruplarda canlılık kontrole göre istatiksel anlamlı azalmıştır ve doz canlılık arasında zayıf bir ilişki vardır ($r^2=0,417$).



Şekil 16. Nanotitanyum dioksite 48 saatlik maruziyet sonrası probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği (n=8).

48 saat nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen absorbans doz verilerinin probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği ve 48 saat LD_{50} değeri 0,054 µM olarak Şekil 16'da verilmiştir.

ICP-MS İLE TİTANYUM MİKTAR TAYİNİ

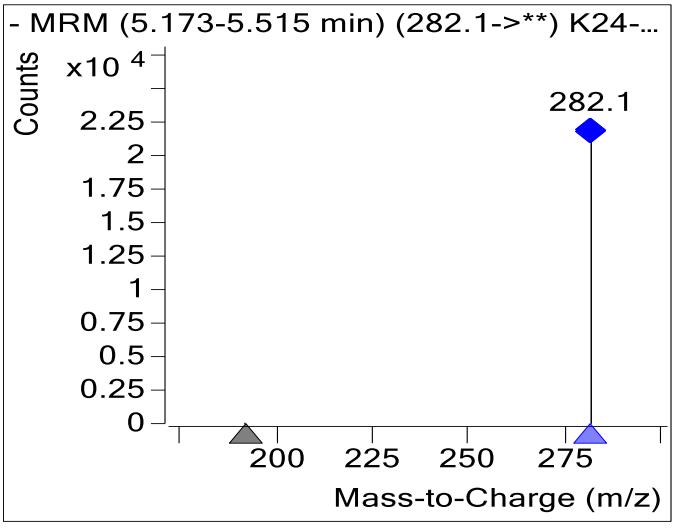


Şekil 17. ICP MS ile nanotitanyum dioksit miktar tayini.

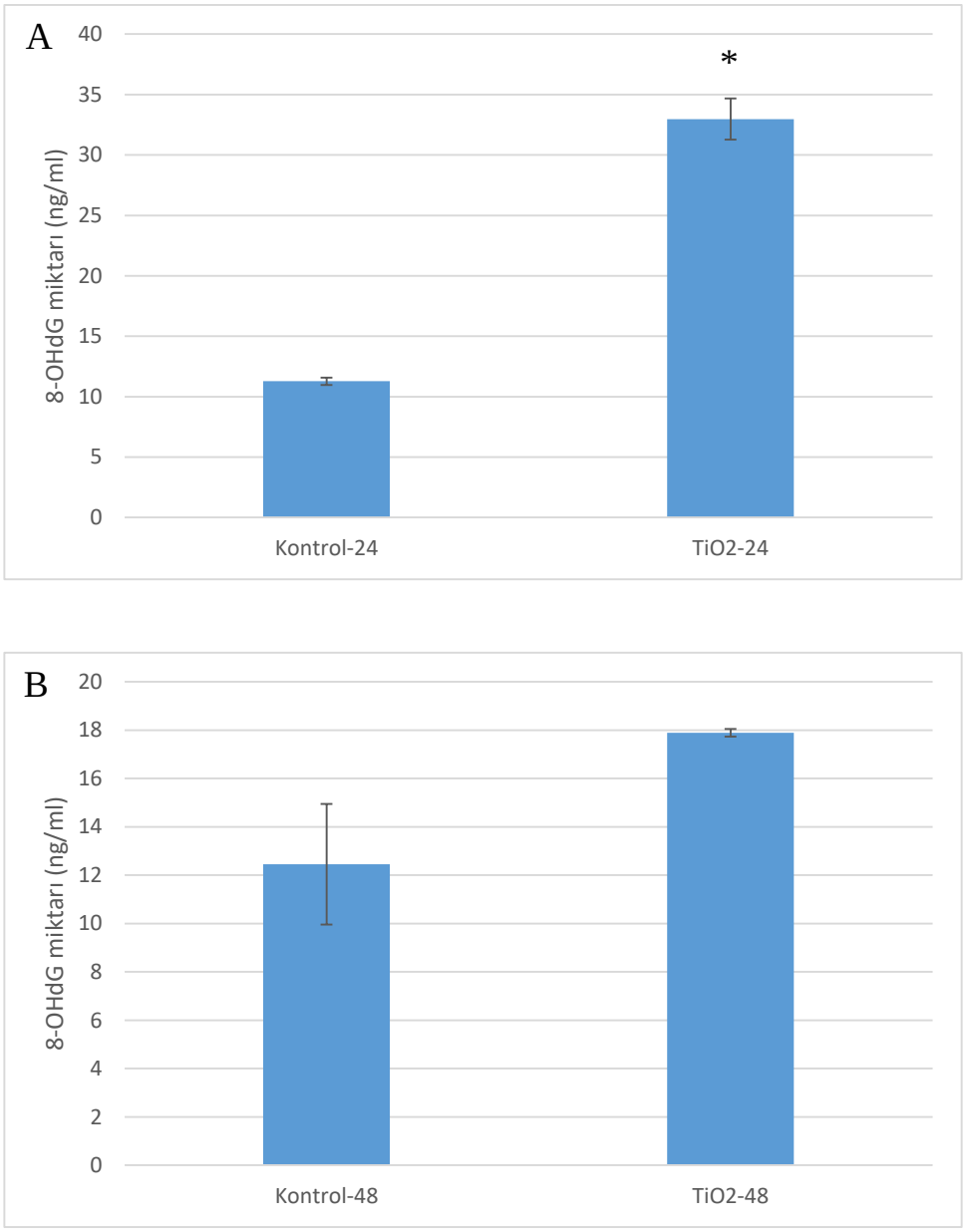
Tek yönlü ANOVA post hoc Tukey (n=3). Kontrole karşı **; p<0,01.±Standart sapma.

24 saat ve 48 saat LD_{50} dozunda maruz kalma sonrası elde edilen ICP MS verileri Şekil 17'de verilmiştir. 48 saat nanotitanyum dioksite maruz kalma sonucu hücrelerde bulunan titanyum miktarı kontrole göre anlamlı düzeyde artmıştır. 24 saat maruz kalma grubunda ise miktar istatistiksel anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

LC-MS-MS ile 8-OHdG MİKTAR TAYİNİ



Şekil 18. LC-MS-MS analizinde elde edilen 8-OHdG kütle parmak izi



Şekil 19. LC-MS-MS ile 8-OHdG miktar tayini analizin sonuçları (A. 24 saat maruz kalma, B. 48 saat maruz kalma). ±Standart sapma. (Bağımsız değişkenler T testi, *; p<0,05)

24 saat ve 48 saat LD_{50} dozunda maruz kalma sonrası elde edilen LC-MS-MS analizi ile elde edilen 8-OHdG miktarları şekil 18'de ve 8-OHdG kütle parmak izi şekil 19'da verilmiştir. Kontrol grubuna göre nano titanyum dioksite maruz kalan 24 saat grubunda istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) 8-OHdG miktarı belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı TiO_2 nanopartiküllerinin insan embriyonik akciğer hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkisini araştırmaktı. Çalışmamızda 5. pasaja kadar çoğaltılan hücrelere LD_{50} dozunun belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) testi, titanyum miktar tayini için İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS), DNA İzolasyonu ve Hidrolizi yapılıp 8-hidroksi deoksiguanozin miktar tayini için de LC-MS-MS analizi yapılmıştır.

Yüzey alanı geniş ve küçük partiküllere sahip olan TiO_2, çok fazla kimyasal tepkimeye girme eğilimindedir ve bu tepkimeye girme eğilimi de toksisiteye sebep olmaktadır. Metal nanopartiküller ile yapılan bazı araştırmalar ve çalışmalar, partiküllerin genotoksik ve sitotoksik etkilere sebep olduğu ve herhangi bir yolla teması olan insanlar için ise tehlikeli olabilecekleri gösterilmiştir (163).

Yüksek verimli, yüksek talep gören ticari NP'ler olarak, TiO_2 nanopartiküller, yüksek stabiliteleri ve antikorozif ve foto-katalitik özellikleri sayesinde beyaz pigment, kişisel cilt bakım ürünü, su arıtma maddesi ve bakterisidal madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Çalışmalar, TiO_2 nanopartiküllerin tüketici ürünlerinde kullanılan ilk beş NP türünden biri olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni TiO_2 nanopartiküllerinin parlaklıkları ve yüksek kırılma indeksleri nedeniyle beyaz görüntü oluşturmalarıdır. TiO_2NP'ler, geniş UV spektrumu azaltma özelliklerinden dolayı cildi ultraviyole (UV) radyasyondan korumak için güneş koruyucu olarak kullanılabilir ve nanopartiküllerin insan derisine nüfuz etmediğine inanılmaktadır. Ayrıca, TiO_2 nanopartiküller UV ışığına maruz kaldıklarında katalitik hale gelirler ve katalitik aktiviteleri yoluyla kimyasalları yok etmek için su arıtmada kullanılırlar. Titanyum Dioksit nanopartiküllerin toksisitesi parçacık boyutuna göre değişir. Çoğu çalışma, partikül boyutu

küçüldükçe toksisitenin arttığını göstermiştir. B. subtilis için Letal konsantrasyon 50 (LC_{50}) değerlerinin, aynı koşullar altında 16,2 nm nanopartiküller için 96 mg/L ve 45,8 nm nanopartiküller için 401 mg/L olduğu rapor edilmiştir, bu da toksisitede 4 katlık bir farkı göstermektedir. *E. coli* 'deki 3 saatlik LC_{50}'nin 10 nm (17 mg/L), 25 nm (59 mg/L) ve 50 nm (304 mg/L) olduğu tahmin edilmiştir, bu da partikül boyutu arttıkça nanopartikül toksisitesinin art arda azaldığını ortaya koymaktadır. Artan yüzey alanı nanopartikül hücre bağlanması ve hücre içi ve hücre dışı maddelerin inhibisyonu için daha elverişli olduğundan, daha küçük parçacıklar daha kolay topaklanma eğiliminde olabilirler ve bu da bakteriyel hücre metabolizmasının bozulmasına ve hatta ölüme neden olabilir. Bu çalışmalar, daha küçük Titanyum Dioksit nanopartiküllerin belirli bir aralıkta daha yüksek toksisite sergilediğini göstermektedir (164).

Çalışmamızda HEL 299/An1 hücre hattına 24 saat ve 48 saat süreyle 0,9 µM ila 400 µM doz aralığında nanotitanyum dioksit uygulanması yapılmıştır. Çalışma sonucunda 24 saat LD_{50} değeri 25,93 µM ve 48 saat LD_{50} değeri 0,054 µM olarak ölçülmüştür. 24 saat ve 48 saat uygulamalarında tüm gruplarda canlılık kontrole göre istatiksel anlamlı azalmıştır. 24 saat maruz kalma grubunda doz canlılık arasında anlamlı bir ilişki, 48 saat grubunda ise zayıf bir ilişki olduğu saptanmıştır. Nano titanyum dioksite maruz kalmanın malonaldehit (MDA), 8-hidroksi-2-deoksiguanozin, süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksidanları artırdığı ve ek olarak Katalaz (CAT), glutatyon (GSH), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimleri ve moleküllerin miktarlarını azaltarak oksidan, anti oksidan dengesini bozması sonucu hayvan dokularında oksidatif hasara neden olduğunu gösterilmiştir (165). 10 nm'den küçük nano titanyum oksit nanopartiküllerin ise 8-OHdG istatistiksel anlamlı artırdığını raporlamışlardır (165). Yapılan bir çalışmada nanotitanyum dioksite solunum yolundan maruz kalmanın potansiyel sağlık riskleri oluşturduğu bildirilmiştir ve çalışmada pulmoner toksisite deneylerinde sıkça kullanılan insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) titanyum nanopartiküllerine maruz kalmanın oksidatif stres, mikronükleus oluşumuna, genotoksisite ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (166). Başka bir çalışmada ise gebe farelerin içinde nanotitanyumunda bulunduğu nano metallere intratrekeal maruz kalması sonucu yavru farelerde akciğer gelişimin etkilendiği ve fetal dönemde vasküler endotelyal büyüme faktörü-α (VEGF-α) ve ekstrasellüler proteaz olan matriks metalloproteinaz 9'un (MMP-9) pulmoner ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (167). Başka bir çalışmada da Titanyum Dioksit nanopartiküllerin toksisitesinin partikül boyutuna bağlı olduğunu, fare embriyolarının büyümesi ve gelişmesi ve doku ve organların morfolojisi

üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir (168). Bu çalışmalarda belirtilen sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Proteinler ve lipitlerin, hücresel membranlarda kalıcı oksidatif hasar oluşturduğunun deneysel kanıtları vardır. Hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'nın serbest radikallere sonucu oluşan oksidatif lezyonlarının en çok oluşanlarından birisinin 8-OHdG olması biyomarker olarak kullanımını mümkün kılmaktadır. Çalışmalarda, üriner 8-OHdG'nin dejeneratif hastalıklar ve kanser risk değerlendirmesinde kullanılan tercih edilen biyobelirteç olmuştur (59).

Yapılan bir çalışmada madde etkisi altında araç sürücüsü şüphelileri ve uyuşturucu madde kullandırılmış suç vakalarından 100 adet idrar örneği her iki metodoloji kullanılarak analiz edilmiş ve LC-MS-MS ile elde edilen sonuçlar, enzime bağlı immünosorbent tahlil (ELISA) sonuçları ile karşılaştırılmıştır (169). Ayrıca, her iki metodolojinin maliyeti değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışmada LC-MS-MS yöntemi, ELISA sonuçları için doğrulanan konsantrasyonlara eşit veya daha düşük tespit sınırlarındaydı, daha az eksojen girişime sahipti ve örnek başına tarama maliyeti ELISA ile karşılaştırıldığında ~%70 oranında azaldığı bildirilmiştir. Adli idrar örneklerinin toksikoloji sonuçlarının karşılaştırıldığında, sadece ELISA kullanımında, örneklerin %26'sında benzoilekgonin, %33'ünde lorazepam ve %60'ında oksimorfon tespit edilemediği görülmüştür. LC-MS-MS yöntemi kullanılarak diğer analitler zolpidem, gabapentin, tramadol, metadon, meprobamat, fentermin ve metabolitleri tespit edilmiştir. Validasyon sonuçları, toksikolojik sonuç ve maliyet karşılaştırması, LC-MS-MS tarama yönteminin idrar örnekleri için yapılan analiz sonucunda ELISA tarama yöntemlerine göre basit, hassas ve uygun maliyetli bir alternatif olduğunu göstermiştir (169).

Çalışmamız 8 dehidroksi guanozin miktarının tespiti LC-MS-MS ile yapılmıştır. LC-MS-MS yönteminin ELISA yöntemine göre daha hassas ve avantajlı bir metot olduğu için LC-MS-MS yöntemi ile analizlerimizi tamamladık.

SONUÇLAR

Çalışmamızda elde edilen verilere göre brokit yapıda nanotitanyum dioksit nanopartiküllere maruz kalan HEL 299 / An1 insan embriyonik akciğer hücre hattında sitotoksik ve oksidatif DNA hasarının araştırıldığı çalışmamızdaki sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

1. Yapılan MTT testinde 24 ve 48 saat LD_{50} değerleri değerlendirilmiştir. 24 saat maruz kalmada hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). 48 saat LD_{50} değerinin (0,054 μM) 24 saat maruz kalmaya göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$).
2. HEL 299 / An1 hücre hattında ICP-MS ile yapılan titanyum miktar tayininde hücreye giren titanyum miktarı 48 saat maruziyette istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p<0,01$).
3. Oksidatif DNA hasarını tespit etmek için 8-OHdG miktarını LC-MS-MS analizi ile tespit edilmiştir. En yüksek değer olarak 24 saat nanotitanyum dioksit maruz kalma grubunda 8-OHdG miktarı 32,96 ng/mL tespit edilmiş ve artış kontrol grubuna göre anlamlı artmıştır ($p<0,05$).

ÖZET

Nanomateryallerin kullanımı günümüzde gittikçe artmaktadır ve oluşturabilecekleri sağlık riskleri hakkındaki endişe duyulmaktadır. Günümüzde nanopartiküller, biyo sensörlerin, güneş pillerinin, foto detektörlerin, seramiklerin ve nano jeneratörlerin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Çalışmamızda titanyum dioksit nanopartiküllerinin HEL 299 / An1 insan embriyonik akciğer hücre hattında sitotoksik etkisi ve oksidatif DNA hasarı oluşturmasının araştırılması amaçlanmıştır. Brokit yapıdaki nanotitayum dioksit nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Hücrelerin yarısını öldüren değer 24 saat maruz kalma grubunda 25,93 μM ve 48 saat değeri ise 0,054 μM olarak tespit edilmiştir. İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi ile belirlenen hücre titanyum miktarları 24 saatte 25967 ppb, 48 saatte ise 210353 ppb ($p<0,01$) olarak belirlenmiştir. Oksidatif DNA hasarı biyobelirteci olarak 8-OHdG miktarı tespit edilmiştir. Daha hassas bir analiz yöntemi olduğu için sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. 24 saat maruz kalmada 32,96 ng/mL ve 48 saat maruz kalmada 17,89 ng/mL 8-OHdG tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan insan embriyonik akciğer hücre hattında nanopartiküllere maruziyetin neden olduğu toksisitenin değerlendirilmiş olması literatüre katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda titanyum nanopartiküllerinin insan embriyonik akciğer hücre hattında doza bağlı olarak sitotoksisiteye neden olduğu, oksidatif DNA hasarına neden olduğu ve titanyumun 48 saatte daha yüksek miktarda hücreye alındığı bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: nano malzeme, nano titanyum dioksit, oksidatif DNA hasarı, sitotoksisite

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON DNA DAMAGE IN HUMAN EMBRYONIC LUNG CELLS

SUMMARY

The use of nanomaterials is increasing day by day and there is concern about the health risks they may pose. Today, nanoparticles are used extensively in the production of biosensors, solar cells, photodetectors, ceramics, and nano generators. In our study, it was aimed to investigate the cytotoxic effect and oxidative DNA damage of titanium dioxide nanoparticles in HEL 299 / An1 human embryonic lung cell line. The cytotoxic effect of nanotitaium dioxide nanoparticles in brookite structure was determined by MTT test. The value that killed half of the cells was determined as 25,93 μM in the 24-hour exposure group and 0,054 μM in the 48-hour group. Cell titanium amounts determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry were 25967 ppb in 24 hours and 210353 ppb in 48 hours ($p<0.01$). The amount of 8-OHdG was determined as a biomarker of oxidative DNA damage. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method was used because it is a more sensitive analysis method. 32,96 ng/mL at 24-hour exposure and 17,89 ng/mL 8-OHdG at 48-hour exposure were detected.

Evaluation of toxicity caused by exposure to nanoparticles in the human embryonic lung cell line used in our study will contribute to the literature. In our study, it was found that titanium

nanoparticles caused dose-dependent cytotoxicity in the human lung cell line, caused oxidative DNA damage, and a higher amount of titanium was taken up into the cells in 48 hours.

Keywords: nano material, nano titanium dioxide, oxidative DNA damage, cytotoxicity

KAYNAKLAR

1. Başaran N. Nanofarmasötikler ve Uygulamaları, 1. Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri San Tic Ltd Şti. 2014:361-7.

2. Halıcı A, Seyrek A, Aykan K, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D. Nanopartiküllerin genotoksik etkileri. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi. 2021;2(2):19-38.

3. Wang JJ, Sanderson BJS, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutat Res 2007;628(2):99-106.

4. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003;17(10):1195-214.

5. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bioessays 2004;26(5):533-42.

6. Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. Regulat Toxicol Pharmacol 2000;32(3):283-92.

7. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine: 5th Oxford university press, USA; 2015. p. 241-9.

8. Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1997;131:1-87.

9. Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, et al. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. Rapid Commun Mass Spectromet 2004;18(4):505-10.

10. Zhang L, Xie XX, Zhou YG, Yu DN, Deng Y, Ouyang JX, et al. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice. Int J Nanomed 2018;13:777-89.

11. Grande F, Tucci P. Titanium dioxide nanoparticles: a risk for human health? Mini Rev Med Chem 2016;16(9):762-9.

12. Dar GI, Saeed M, Wu A. Toxicity of TiO2 nanoparticles. Aiguo W, Wenzhi R (eds). TiO2 Nanoparticles: Applications in Nanobiotechnology and Nanomedicine. 2020; ch 2, s. 67-103.

13. Baranowska-Wójcik E, Szwajgier D, Oleszczuk P, Winiarska-Mieczan A. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review. Biological trace element research. 2020;193(1):118-29.

14. Sanches PL, Geaquinto LRdO, Cruz R, Schuck DC, Lorencini M, Granjeiro JM, et al. Toxicity evaluation of TiO2 nanoparticles on the 3D skin model: a systematic review. Frontiers Bioengineering Biotechnol 2020;8:575.

15. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharmaceutical Res 2006;23(7):1417-50.

16. Toumey C. Plenty of room, plenty of history. Nat Nanotechnol 2009;4(12):783-4.

17. Toumey C. Probing the history of nanotechnology. Nat Nanotechnol 2012;7(4):205-6.

18. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Controlled Release 2001;70(1-2):1-20.

19. Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Experiment Mol Pathol 2009;86(3):215-23.

20. Curtis J, Greenberg M, Kester J, Phillips S, Krieger G. Nanotechnology and nanotoxicology. Toxicological Rev 2006;25(4):245-60.

21. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. FASEB J 2005;19(3):311-30.

22. Gürsoy AZ. Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. Nobel Tıp Kitabevi. 2014: s. 371.

23. Arsalan A, Younus H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. Int J Biol Macromol 2018;118:1833-47.

24. Bhatia S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. Natural polymer drug delivery systems: Springer; 2016. p. 33-93.

25. Grayson SM, Frechet JM. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. Chem Rev 2001;101(12):3819-68.

26. Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. Cell Mol Biolnlett 2005;10(4):711.

27. Qazi UY, Javaid R. A review on metal nanostructures: preparation methods and their potential applications. Adv Nanoparticles 2016;5(01):27.

28. Bera D, Qian L, Tseng T-K, Holloway PH. Quantum dots and their multimodal applications: a review. Materials 2010;3(4):2260-345.

29. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. J Drug Delivery. 2013;2013.

30. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Progress Polymer Sci 2011;36(7):887-913.

31. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. Small 2007;3(11):1941-9.

32. Hussain S, Hess K, Gearhart J, Geiss K, Schlager J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol Vitro 2005;19(7):975-83.

33. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Lett 2006;6(4):866-70.

34. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. J Environ Sci Health Part A. 2006;41(12):2699-711.

35. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. Environ Health Perspect 2007;115(3):403-9.

36. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicol Lett 2009;185(3):211-8.

37. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol Sci 2006;92(1):174-85.

38. Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutat Res 2007;628(2):99-106.

39. Türkez H, Geyikoğlu F. An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. Toxicol Industrial Health 2007;23(1):19-23.

40. Vevers WF, Jha AN. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on fish cells in vitro. Ecotoxicology 2008;17(5):410-20.

41. Putnam K, Bombick D, Doolittle D. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicol Vitro 2002;16(5):599-607.

42. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. Small 2008;4(1):26-49.

43. Xiong S, George S, Yu H, Damoiseaux R, France B, Ng KW, et al. Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. Arch Toxicol 2013;87(6):1075-86.

44.Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicol Vitro 2001;15(4):477-88.

45.Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. Int J Pharmaceut 2005;288(2):369-76.

46.Bulychev A, Trouet A, Tulkens P. Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. Experimental cell research. 1978;115(2):343-55.

47.Andreoli C, Gigante D, Nunziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. Toxicol Vitro 2003;17(5-6):587-94.

48.Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. Toxicol App Pharmacol 2005;202(1):99-107.

49.Barile FA (ed). Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods: CRC Press; 1st 2019. p. 204-13.

50.Yano CL, Marcondes MCCG. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. Free Radical Biol Medi 2005;39(10):1378-84.

51.Meerloo JV, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: Springer; 2011. p. 237-45.

52.Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. Protocols in in vitro hepatocyte research: Springer; 2015. p. 333-48.

53.Supino R. MTT assays. In vitro toxicity testing protocols: Springer; 1995. p. 137-49.

54.Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. Assay Guidance Manual [Internet]. 2016.

55.Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutat Res Rev Mutat Res 2000;463(2):111-72.

56. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicol Lett 2003;140-141:63-74.

57.Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In: Luch A, editor. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 1: Molecular Toxicology. Basel: Birkhäuser Basel; 2009. p. 87-110.

58.Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi. 2011;4(3):221-9.

59. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2′ -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. J Environment Sci Health, Part C. 2009;27(2):120-39.

60. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. Leukemia Res 2000;24(6):461-8.

61. Chen K-M, Calcagnotto A, Zhu J, Sun Y-W, El-Bayoumy K, Richie Jr JP. Comparison of an HPLC-MS/MS method with multiple commercial ELISA kits on the determination of levels of 8-oxo-7, 8-dihydro-2′-deoxyguanosine in human urine. J New Dev Chem 2018;2:1-13.

62. Dizdaroglu M, Karakaya AE (eds). Advances in DNA damage and repair: oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences: Springer Science & Business Media; 2012. ch 35, s. 86-99.

63. Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Mlynarczyk DT, Glowacka-Sobotta A, Stanisz B, Goslinski T, et al. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine. Nanomaterials 2020;10(2):387.

64. Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. Chem Rev 2007;107(7):2891-959.

65. Chen X, Selloni A. Introduction: titanium dioxide (TiO2) nanomaterials. ACS Publications; 2014. p. 9281-2.

66. Mo S-D, Ching W. Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite. Physical Rev B 1995;51(19):13023.

67. Diebold U. The surface science of titanium dioxide. Surface Sci Rep 2003;48(5-8):53-229.

68. Akıcı M. Titanyum dioksit nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin in vitro olarkak değerlendirilmesi: Trakya Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü; 2017.

69. Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ 2008;400(1):396-414.

70. Moore M. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ Int 2006;32(8):967-76.

71. Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ 2008;400(1-3):396-414.

72. Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. TiO2 photocatalysis: a historical overview and future prospects. Japanese J Appl Physics 2005;44(12R):8269.

73. Gurr J-R, Wang AS, Chen C-H, Jan K-Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 2005;213(1-2):66-73.

74. Popov AP, Priezzhev A, Lademann J, Myllylä R. TiO2 nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. J Physics D App Physics 2005;38(15):2564.

75. Kominami H, Kohno M, Kera Y. Synthesis of brookite-type titanium oxide nano-crystals in organic media. J Materials Chem 2000;10(5):1151-6.

76. Kavan L, Grätzel M, Gilbert S, Klemenz C, Scheel H. Electrochemical and photoelectrochemical investigation of single-crystal anatase. J Am Chem Soc 1996;118(28):6716-23.

77. Ayllon JA, Peiro AM, Saadoun L, Vigil E, Domenech X, Peral J. Preparation of anatase powders from fluorine-complexed titanium (IV) aqueous solution using microwave irradiation. J Materials Chem 2000;10(8):1911-4.

78. Kim H, Lee S, Han Y, Park J. Preparation of dip-coated TiO2 photocatalyst on ceramic foam pellets. J Materials Sci 2006;41(18):6150-3.

79. https://kimyasimya.blogspot.com/2012/10/fotokataliz.html. Fotokataliz. 2012.

80. Wang D, Xiao L, Li X, An J, Duan Y. Highly Efficient Visible Light TiO2 Photocatalyst Prepared by Sol-Gel Methodat Temperatures Lower Than 300 C. J Hazardous Mat 2011;192:150–9.81.

81. Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of TiO2 thin film photocatalysts. Environmental. Sci Technol 1998;32:726–728.

82. Goswami DY, Trivedi DM, Block SS. Photocatalytic disinfection of indoor air. J Sol Energy 1997; 119:92–6.

83. Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO_2 thin films: Dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. J Photochem Photobiol Am Chem 1997;106:51–6.

84. Hur JS, Koh Y. Bactericidal activity and water purification of immobilized TiO_2 photocatalyst in bean sprout cultivation. Biotechnol Lett 2002;24:23–5.

85. Sakai N, Fujishima A, Watanabe T, Hashimoto K. Highly hydrophilic surfaces of cathodically polarized amorphous TiO2 electrodes. J Electrochem Soc 2001;148:3023–6.

86. Miyauchi M, Nakajima A, Fujishima A, Hashimoto K, Watanabe T. Photoinduced surface reactions on TiO2 and SrTiO3 films: Photocatalytic oxidation and photoinduced hydrophilicity. Chem Mat 2000;12:3–5.

87. Fujishima A, Hashimoto K. Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. Thin Solid Films.1999;351:260–3.

88. Machida M, Norimoto K, Kimura T. Antibacterial Activity of Photocatalytic TiO2 Thin Films with Photodeposited Silver on the Surface of Sanitary Ware. J Am Ceramic Soc 2005; 88: 95-100.

89. Mnyusiwalla A, Daar AS, Singer PA. 'Mind the gap': science and ethics in nanotechnology. Nanotechnology 2003;14(3):9.

90. Borm PJ. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. Inhalation Toxicol 2002;14(3):311-24.

91. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G, et al. Safe handling of nanotechnology. Nature 2006;444(7117):267-9.

92. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 2006;311(5761):622-7.

93. Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn Jr, Thomas K, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. Toxicol Sci 2006;90(1):23-32.

94. Yamamoto A, Honma R, Sumita M, Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. J Biomed Mater Res A 2004;68(2):244-56.

95. Karakoti AS, Hench LL, Seal S. The potential toxicity of nanomaterials—the role of surfaces. JOM 2006;58(7):77-82.

96. Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J, et al. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nat Nanotechnol 2007;2(2):108-13.

97. Yoshida K, Morita M, Mishina H. Cytotoxicity of metal and ceramic particles in different sizes. JSME 2003;46(4):1284-9.

98. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. Nature Nanotechnol 2007;2(4):249-55.

99. Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. Occup Environ Med. 2001;58(3):211-6.

100. Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. Ann Ist Super Sanita 2003;39(3):405-10.

101. Dreher KL. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. Toxicol Sci 2004;77(1):3-5.

102. Kreyling WG, Semmler M, Möller W. Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. J Aerosol Med 2004;17(2):140-52.

103. Oberdorster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. Inhalation Toxicol 1996;8:73-89.

104. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle fibre Toxicol 2005;2(1):1-35.

105. Baran ET, Hasirci V. In vivo half life of nanoencapsulated L-asparaginase. J Sci Materials Med 2002;13(12):1113-21.

106. Cascone MG, Lazzeri L, Carmignani C, Zhu Z. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. J Materials Sci Med 2002;13(5):523-6.

107. Cascone MG, Pot PM, Lazzeri L, Zhu Z. Release of dexamethasone from PLGA nanoparticles entrapped into dextran/poly (vinyl alcohol) hydrogels. J Materials Sci Med 2002;13(3):265-9.

108. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. Nature Rev Drug Discovery 2003;2(5):347-60.

109. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. Int J Nanomed 2008;3(2):133.

110. Donaldson K, Borm P. Particle and Fibre Toxicology, a new journal to meet a real need. Springer; 2004. p. 1-3.

111. Donaldson K, Stone V, Tran C, Kreyling W, Borm PJ. Nanotoxicology. BMJ Publishing Group Ltd; 2004. p. 727-8.

112. William RM, Josef F, Sean CE, Ivo MK. Nanostructured materials: Ying J. (ed) London, Academic Press; 2001. p. 3-8.

113. Renwick L, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. Occup Environ Med 2004;61(5):442-7.

114. Durga M, Nathiya S, Rajasekar A, Devasena T. Effects of ultrafine petrol exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation, DNA damage and inflammation in human A549 lung cells and murine RAW 264.7 macrophages. Environ Toxicol Pharmacol 2014;38(2):518-30.

115. Seriani R, de Souza CEC, Krempel PG, Frias DP, Matsuda M, Correia AT, et al. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro-and anti-apoptotic gene expression. Environ Scie Poll Res 2016;23(10):9862-70.

116. Song J-J, Lee JD, Lee BD, Chae SW, Park MK. Effect of diesel exhaust particles on human middle ear epithelial cells. Int J Ped Motorhinolaryngol 2012;76(3):334-8.

117. Lehmann AD, Blank F, Baum O, Gehr P, Rothen-Rutishauser BM. Diesel exhaust particles modulate the tight junction protein occludin in lung cells in vitro. Particle Fibre Toxicol 2009;6(1):1-14.

118. Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, et al. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. Environ Health Perspect 2004;112(14):1347-58.

119. Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. Toxicol App Pharmacol 2002;184(3):172-9.

120. Gupta AK, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials 2005;26(13):1565-73.

121. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 2005;26(18):3995-4021.

122. Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. Biomaterials 2003;24(25):4551-7.

123. Committee ES. Scientific Opinion on risk assessment terminology. EFSA J 2012;10(5):2664.

124. Lam C-W, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Toxicol Sci 2004;77(1):126-34.

125. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicol Sci 2004;77(1):117-25.

126. Filon FL, Mauro M, Adami G, Bovenzi M, Crosera M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. Regulat Toxicol Pharmacol 2015;72(2):310-22.

127. Shvedova A, Castranova V, Kisin E, Schwegler-Berry D, Murray A, Gandelsman V, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J Toxicol Environ Health A 2003;66(20):1909-26.

128. Karn B, Masciangioli T, Colvin V, Zhang W-x, Alivisatos P. Preface, Pertinent Reports and Websites. ACS Publications. 2004. p. xv-xx.

129. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle Fibre Toxicol 2006;3(1):1-35.

130. Liu W-T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. J Biosci Bioeng 2006;102(1):1-7.

131. Renn O, Roco MC. Nanotechnology and the need for risk governance. J Nanoparticle Res 2006;8(2):153-91.

132. Dechsakulthorn F, Hayes A, Bakand S, Joeng L, Winder C. In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. AATEX 2008;14: 397-400.

133. Song Y, Li X, Du X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. Euro Respirat J 2009;34(3):559-67.

134. Frampton MW. Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. Environ Health Perspect 2001;109(4):529-32.

135. Pope Iii CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 2002;287(9):1132-41.

136. Greenberg MI. Occupational, industrial, and environmental toxicology: Elsevier Health Sciences; 2003. p.43-9.

137. Pope III CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. Circulation. 2004;109(1):71-7.

138. Winder C, Stacey NH. Occupational toxicology: CRC press; 2nd 2004.

139. Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. Circulation Res 2006;99(7):692-705.

140. Kan H, London SJ, Chen G, Zhang Y, Song G, Zhao N, et al. Season, sex, age, and education as modifiers of the effects of outdoor air pollution on daily mortality in Shanghai, China: The Public Health and Air Pollution in Asia (PAPA) Study. Environ Health Perspect 2008;116(9):1183-8.

141. Nawrot TS, Alfaro-Moreno E, Nemery B. Update in occupational and environmental respiratory disease 2007. Am j Respirat Critical Care Med 2008;177(7):696-700.

142. Rückerl R, Schneider A, Breitner S, Cyrys J, Peters A. Health effects of particulate air pollution: a review of epidemiological evidence. Inhalation Toxicol 2011;23(10):555-92.

143. Seaton A. Nanotechnology and the occupational physician. Occupational Med 2006;56(5):312-6.

144. Dekkers S, Krystek P, Peters RJ, Lankveld DP, Bokkers BG, van Hoeven-Arentzen PH, et al. Presence and risks of nanosilica in food products. Nanotoxicology 2011;5(3):393-405.

145. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, Von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. Environ Sci Technol 2012;46(4):2242-50.

146. Henderson L, Gregory J, Swan G. The National Diet and Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years. Vitamin and mineral intake and urinary analytes. 2003;3:1-8.

147. Ferreira-Pêgo C, Guelinckx I, Moreno L, Kavouras S, Gandy J, Martinez H, et al. Total fluid intake and its determinants: cross-sectional surveys among adults in 13 countries worldwide. Euro J Nutrition 2015;54(2):35-43.

148. Braakhuis HM, Oomen AG, Cassee FR. Grouping nanomaterials to predict their potential to induce pulmonary inflammation. Toxicol App Pharmacol 2016;299:3-7.

149. Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. Int J Pharmaceut 1994;105(2):157-68.

150. Koeneman BA, Zhang Y, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. Cell Biology and Toxicology. 2010;26(3):225-38.

151. Das RC. Proteins and antibodies make advances as therapeutic products. 2001. p. 8-14.

152. Griffiths B. Animal cell products, overview. Encyclopedia of cell technology. 2003.p. 99-107.

153. Finter N, Garland A, Telling R. Large-scale mammalian cell culture: a perspective. Large-Scale Mammalian Cell Culture Technol 2018:1-14.

154. Ozturk S, Hu W-S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies: CRC press; 2005.

155. Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D, Burchell B. Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. Toxicology 1993;82(1-3):119-29.

156. Gunaratna C. Drug metabolism & pharmacokinetics in drug discovery: a primer for bioanalytical chemists, part I. Current Separat 2000;19(1):17-24.

157. Çiçek C, Bilgiç A. Klinik Viroloji laboratuvarinda uzmanlik öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programi: Bir model. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 2006;20(3):231-41.

158. Han L, Zhao S, Yu F, Rong Z, Lin Y, Chen Y. Generation of human embryonic stem cell-derived lung organoids. STAR Protocols 2022;3(2):101270.

159. Chen Y, Feng J, Zhao S, Han L, Yang H, Lin Y, et al. Long-term engraftment promotes differentiation of alveolar epithelial cells from human embryonic stem cell derived lung organoids. Stem Cells and Development. 2018;27(19):1339-49.

160. Issa R, Lozano N, Kostarelos K, Vranic S. SOC-VI-11 Embryonic stem cell-derived human lung organoids for nanomaterial testing. Toxicol Lett 2022;368:S79.

161. Wang D, Pu J, Liao Y, Liu J, Hu G. Pulmonary protective effects of ultrasonic green synthesis of gold nanoparticles mediated by pectin on Methotrexate-induced acute lung injury in lung BEAS-2B, WI-38, CCD-19Lu, IMR-90, MRC-5, and HEL 299 cell lines. Arabian J Chem 2022;15(1):103533.

162. Crow B, Bishop M, Kovalcik K, Norton D, George J, Bralley JA. A simple and cost effective method for the quantification of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine from urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2008;22(4):394-401.

163. Şekeroğlu ZA. Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2013;70(1):33-42.

164. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. J Environ Sci 2019;75:40-53.

165. An H, Ling C, Xu M, Hu M, Wang H, Liu J, et al. Oxidative damage induced by nano-titanium dioxide in rats and mice: a systematic review and meta-analysis. Biol Trace Element Res 2020;194(1):184-202.

166. Srivastava R, Rahman Q, Kashyap M, Singh A, Jain G, Jahan S, et al. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. Human exper toxicol 2013;32(2):153-66.

167. Paul E, Franco-Montoya M-L, Paineau E, Angeletti B, Vibhushan S, Ridoux A, et al. Pulmonary exposure to metallic nanomaterials during pregnancy irreversibly impairs lung development of the offspring. Nanotoxicology 2017;11(4):484-95.

168. Jia X, Wang S, Zhou L, Sun L. The potential liver, brain, and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice. Nanoscale research letters. 2017;12(1):1-14.

169. Kahl KW, Seither JZ, Reidy LJ. LC-MS-MS vs ELISA: validation of a comprehensive urine toxicology screen by LC-MS-MS and a comparison of 100 forensic specimens. J Analytical Toxicol 2019;43(9):734-45.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (23, 24). 4
Şekil 2. MTT formazan reaktifinin (25 ug/mL) DMSO (A) ve 0,04N HCI / izopropanol (B) içindeki absorpsiyon spektrumları (53). 8
Şekil 3. MTT ve renkli formazan ürününün yapıları (54). 9
Şekil 4. Genotoksik maddelerin oluşturdukları hasar ve olası sonuçları (58). 10
Şekil 5. Hidroksil radikali ve guanin bazının reaksiyonu (62) 11
Şekil 6. Anataz ve Rutil formlarının birim hücre ve kristal yapıları (67) 12
Şekil 7. Titanyum Dioksit Brokit formunun molekül yapısı (66) 13
Şekil 8. TiO_2'in fotokatalitik etkisi (79). 16
Şekil 9. Fotokataliz oluşumunun mekanizması: A-İndirgenebilir ve B-Oksitlenebilir malzemeler (80) 17
Şekil 10. Fotokatalitik nano TiO2' in uygulama alanları (79) 17
Şekil 11. İnsan embriyonik kök hücre kaynaklı akciğer organoidlerinin üretimi (158) 24
Şekil 12. Titanyum ICP MS kalibrasyon grafiği 27
Şekil 13. HEL 299/An1 hücre hattına 24 saat nanotitanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz, %canlılık grafiği. Farklı harfler ortalamalar arasında anlamlı farkı ifade etmektedir 30
Şekil 14. Nanotitanyum dioksite 24 saatlik maruziyet sonrası probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği (n=8). 31
Şekil 15. HEL 299/An1 hücre hattına 48 saat nano titanyum dioksit uygulanması sonucu elde edilen doz, %canlılık grafiği. Farklı harfler ortalamalar arasında anlamlı farkı ifade etmektedir 32

Şekil 16. Nanotitanyum dioksite 48 saatlik maruziyet sonrası probit analizi ile elde edilen konsantrasyon canlılık grafiği (n=8). 32
Şekil 17. ICP MS ile nanotitanyum dioksit miktar tayini. 33
Şekil 18. LC-MS-MS analizinde elde edilen 8-OHdG kütle parmak izi.....33
Şekil 19. LC-MS-MS ile 8-OHdG miktar tayini analizin sonuçları (A. 24 saat maruz kalma, B. 48 saat maruz kalma). ±Standart sapma. (Bağımsız değişkenler T testi, *; p<0,05).....34

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. TiO_2 için fiziksel ve kimyasal özellikleri (68) 13
Tablo 2. TiO_2'in kullanım alanları (68) 15
Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri 29
Tablo 4. Kullanılan cihazlar 29

ÖZGEÇMİŞ