T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

TİTANYUM DİOKSİT(TiO_2), ÇİNKO OKSİT(ZnO) VE GÜMÜŞ (Ag) NANOPARTİKÜLLERİNİN TK-6 LENFOBLAST HÜCRELERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Burcu AKSOY

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuncay ORTA

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 13.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuncay ORTA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Önder KILIÇ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAH
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36344 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Tuncay ORTA'ya sonsuz minnet ve teşekkürü borç bilirim.

Araştırma ve çalışmalarıma yardım eden, laboratuvar arkadaşlarım Merve CİVELEK, İsa Beytullah DOĞAN, Medine TOY, Kübra METİN ve Leyla AKPUNAR' a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteklerini ve yardımlarını hep hissettiğim aileme, özellikle Annem Meliha EFE'ye, babam Mehmet EFE'ye, Anneannem Zübeyde ARTAN'a, Dedem Eyüp ARTAN'a, Eşim Cemil AKSOY'a ve hayatımın iyikisi, dünyadaki en değerlim biricik kızım Eylül Erva AKSOY'a çok teşekkür ederim.

Ocak 2022 Burcu AKSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **ix**
ÖZET ..... **x**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
AMAÇ 1
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. NANOPARTİKÜLLER 3
2.1.1. Nanometaryellarin Kullanım Alanları 3
2.1.2. Nanometaryallerin Sınıflandırılması 6
2.1.2.1. Karbon bazlı nanomateryal *6*
2.1.2.2. Metalik oluşumlu nanopartiküller *7*
2.1.2.3. Metal Oksit Nanopartiküller *7*
2.2. NANOPARTİKÜLLERİN TOKSİK ETKİLERİ 8
2.3. NANOPARTİKÜLLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİ 9
2.4. ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜ 10
2.5. GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜ 10
2.6. TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLÜ 11
2.7. YAPILAN TOKSİSİTE ÇALIŞMALARI; 12
2.7.1. Gümüş ve Çinko Oksit Nanopartikülünün Canlılar üzerinde gerçekleştirilen toksisite çalışmaları 12
2.7.2. Titanyum Dioksit Nanopartikülü ile yapılmış toksisite çalışmaları 13
2.7.3. Bazı Önemli Nanopartiküllerin Canlılara Etkisi Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar 14
2.8. KANSER VE NANOTEKNOLOJİ İLİŞKİSİ 15
2.9. MİKRONÜKLEUS 17
2.9.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları 18
2.9.1.1. Mikronükleus Tekniği *19*

2.9.3. Mikronükleus Testi değerlendirmesi *19*
3. MALZEME VE YÖNTEM **21**
3.1. DENEY MATERYALLERİ 21
3.1.1. Çinko Oksit Nanopartikülü (ZnO NP) 21
3.1.2. Gümüş Nanopartikülü (Ag NP) 21
3.1.3. Titanyum Dioksit Nanopartikülü (TiO_2 NP) 21
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE MEDYUM HAZIRLAMA 22
3.2.1. Medyum Hazırlama 22
3.2.2. Hücre pasajı 23
3.3. DENEY SÜRECİ 24
3.4. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 26
3.5. İSTATİSTİKSEL METOT 29
4. BULGULAR **30**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **35**
6. KAYNAKLAR **42**
7. ÖZGEÇMİŞ **49**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Nanometaryal içeren tüketici kullanım ürünleri 3

Şekil 2.2: Nanoteknoloji kullanım ürünlerinde en sık tercih edilen metaller 4

Şekil 2.3: Skorlanabilir binükleat hücre kriterleri. 20

Şekil 2.4: Skorlanabilir mikronükleus kriterleri 20

Şekil 3.1: Medyum filtresi ve hava kompresörü 22

Şekil 3.2: 100 ml' lik steril şişelere aktarılan RPMI-1640 Hepes medyumu.....23

Şekil 3.3: Hemositometre lamı.....23

Şekil 3.4: Hemositometrenin sayım yapılan kareleri 24

Şekil 3.5: Deney sonrası flasklardaki hücre kültürü görüntüsü 25

Şekil 3.6: Boyama esnasında %5'lik Giemsa boyasında bekletilen preperatlar 25

Şekil 3.7: Boyama işlemi biten ve kurumaya bırakılmış preperatlar 26

Şekil 3.8: TiO_2 nanopartiküllerininTK-6 hücre lenfositlerinde oluşturduğu 1 mikronüleuslu binükleat hücre 27

Şekil 3.9: Işık mikroskobu altında binükleat hücrelerde gözlemlenen ve değerlendirilebilir durumda olan mikronükleuslar. 29

Şekil 4.1: Çinko Oksit Nanopartikülü MN/BN- Doz ilişkisi 31

Şekil 4.2: Çinko Oksit Nanopartikülü Pİ - Doz ilişkisi.....31

Şekil 4.3: Gümüş Nanopartikülü MN/BN- Doz İlişkisi.....33

Şekil 4.4: Gümüş Nanopartikülü Pİ -Doz İlişkisi 33

Şekil 4.5: Titanyum Dioksit Nanopartikülü MN/BN-Doz İlişkisi 35

Şekil 4.6: Titanyum Dioksit Nanopartikülü Pİ -Doz İlişkisi 35

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Nanoteknolojik ürünlerin bazı kullanım alanları ve faydaları 5

Tablo 4.1: Çinko Oksit Nanopartikülü Sayım Sonuçları.....30

Tablo 4.2: Gümüş Nanopartikülü Sayım Sonuçları.....32

Tablo 4.3: Titanyum Dioksit Nanopartikülü Sayım Sonuçları.....34

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
TiO_2	**:** Titanyum Dioksit
ZnO	**:** Çinko Oksit
Ag	**:** Gümüş
CuO	**:** Bakır Oksit
Fe_2O_3	**:** Demir Oksit Bileşiği
SiO_2	**:** Silisyum Oksit
µg	**:**Mikrogram
nm	**:**Nanometre
ml	**:**Mililitre
CO_2	: Karbon Dioksit
Fe_3O_4	: Demir Oksit Bileşiği
Al_2O_3	: Aliminyum Oksit
CrO_3	: Krom Oksit
NO_3	: Nitrat
Ag NO_3	: Gümüş Nitrat
g	**:** Gram
mol	**:** Molar
°C	**:** Santigrat Derece
cm^3	: Santimetre Küp
Au	**:** Altın
KCL	**:** Potasyum Klorür

Kısaltmalar	Açıklama
NP	**:** Nanopartikül
Pİ	**:** Proliferatif İndeks
BN	**:** Binükleat
MN	**:** Mikronükleus
Sit-B	**:** Sitokalasin B
UV	**:**Ultraviole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİTANYUM DİOKSİT(TiO_2), ÇİNKO OKSİT(ZnO) VE GÜMÜŞ (Ag) NANOPARTİKÜLLERİNİN TK-6 LENFOBLAST HÜCRELERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Burcu AKSOY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Nanoteknolojik ürünler olan nano metal ve nano metal oksitler, pek çok tüketim ürününde çeşitli amaçlar ve durumlar için günümüzde çok fazla oranda kullanılmaktadır. Örneğin Çinko oksit (ZnO); boyacılık, deterjan ve antibakteriyel ürünlerde, lastik sanayi, kauçuk üretimi, kozmetik, çeşitli biyomedikal kremler, petrol ürünleri, seramik sektörü, cam ürünleri, kaplama endüstrisi gibi çok çeşitli alanlarda hammadde olarak kullanılırken, Gümüş (Ag); yazıcı mürekkeplerinde, fotoğraf endüstrisi, elektronik parçalar, bozuk para üretimi, süs eşyası ve takılar, alaşımlar, dişçilik ve su saflaştırma endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca elektronik, tıp, kimya alanında, yakıt üretimi ve katkı maddelerinde nanopartiküller olarak kullanılmaktadır.

Titanyum dioksit (TiO_2), kozmetik sanayisi, kişisel bakım ürünleri, güneş kremleri, diş macunları, boya ve gıda boyaları, elektronik ve fotokataliz için sensör yapımı, kağıt, plastik ve farmasötik tabletlerde yaygın şekilde kullanılan, doğal olarak toksik olmamasına rağmen, nanoebatlarda çok küçük boyutlu ve düşük çözünürlük özelliği bulundurmasından, çeşitli bitki ve hayvan hücrelerinde ve kültürdeki hücrelerde toksik etkili olabilen bir metal oksittir.

Tüketimi hızla yaygınlaşan ve gittikçe farklılaşan bu ürünlerin, gerek kullanıldıktan sonra gerekse de üretim aşamasında nano aygıtlarca oluşan atıkları bilinçsiz bir şekilde çeşitli ortamlardan doğal ekosistemlere bırakabilmektedir. Oluşan bu nanokirlilik sonucu, yeryüzünde yaşayan organizmalar ve yapay olarak üretilmiş materyaller insan yapımı bu

nanopartiküllere direkt ya da dolaylı olarak maruz kalabilmektedir. Havada yüzen bu maddeler, daha önce bu tür maddelere maruz kalmayan canlı türlerinin hücrelerine tutunabilirler ve hücresel düzeyde; proteinlerle, hücre membranlarıyla, DNA ve organeller ile iletişime geçebilirler.

Ağır metallerin sitotoksik ve genotoksik etkileri kullanılan elemente göre değişiklik gösterebilir. Ancak temelde toksisite mekanizmaları direkt ve indirekt olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Etki olarak bakıldığında; membran yapı/fonksiyon değişimi, antioksidan enzimlere karışma, enerji metabolizmasında inhibisyon, DNA yapısında değişim ve stres genlerinin expresyonunun indüklenmesi ve bazı enzimatik aktivite etkilerinde önemli rol oynamaları örnek olarak verilebilir.

Çinko Oksit Nanopartikülü (ZnONP), Gümüş Nanopartikülü (AgNP) ve Titanyum dioksit Nanopartikülü (TiO_2NP) nün TK-6 lenfoblast hücreleriyle etkileşiminin incelendiği bu çalışmada, bu metallerin distile suda çözülebilen formları olan Çinko Oksit NP, Gümüş NP ve Titanyum dioksit NP kullanılmıştır. Çözücü olarak distile suyun tercih edilme nedeni, olası toksik etkilerin deney sonuçlarını etkileme olasılığının göz önünde bulundurulmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışma yönteminin amacı, laboratuvar ortamında inkübe edilmiş TK-6 lenfoblast hücrelerinin, çeşitli dozlarda nanopartikül ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen preparatların değerlendirilmesi için çeşitli sitotoksik ve genotoksik (kromozom hasarı, mikronükleus, apoptotik ve mitotik indeks, hücre apoptozu vb.) hasarlarının tespitini in vitro ortamda sağlamaktır. Kullanılacak metallerin, farklı dozlarına karşılık gelen mikronükleus sıklıklarına regresyon analizi uygulanarak elde edilen doz-cevap eğrilerinden yararlanılarak, kullanılan nanopartiküllerin toksik doz seviyeleri incelenmiştir.

Günümüzde pek çok kullanım yeri olan bu metal nanopartiküllerin toksik seviyelerinin insan lenfositleri üzerinde oluşturduğu hasarların çalışılması, bu partiküllerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin farklı açılardan değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, insan kökenli TK-6 lenfoblast hücreleri kullanılmıştır. Her bir deney grubu için hücre flasklarına 5 ml de 1 x 10^6 tane olacak şekilde TK-6 hücreleri ekilmiştir. Kullanılacak her bir madde için 5 farklı doz belirlenmiş 1'er tane de kontrol grubu flaskı ekimi yapılmıştır. Her doz için 2000 binükleat (BN) hücre sayılmaya çalışılmış, genotoksik etkiler mikronükleus tekniği kullanılarak saptanmıştır. Hücrelere verilen kimyasal maddeler sonucunda oluşan mikronukleusların doz cevap eğrileri karşılaştırılmıştır. Kullanılan istatistik programı ile metallerin TK-6 hücrelerini etkileme oranları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar,bu metaller ile yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

Doz olarak Çinko Oksit Nanopartikülü için 5,10,20,30 ve 50 µg/ml kullanılmıştır. Gümüş Nanopartikülü için 2.5,5,10,25 ve 50 µg/ml kullanılmıştır. Titanyum Dioksit nanopartikülü için ise 25,50,75,100 ve 125 µg/ml uygulanmıştır. Doz başına 2000 binükleat hücrenin sayıldığı bu çalışmada her bir doz, kendi kontrol grubuyla beraber regresyon analizi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Tüm dozlar için proliferatif indeksler (Pİ) de ayrıca değerlendirilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile;Titanyum Dioksit Nanopartikülü (TiO_2 NP) , Çinko Oksit Nanopartikülü (ZnONP) ve Gümüş Nanopartikülü (AgNP) için TK-6 lenfoblast hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik hasarları irdelenmiştir. Uygulanan dozlarda; TiO_2NP ve AgNP nin artan dozlarla

birlikte anlamlı bir hasar oluşturduğu, ZnO NP nin ise uygulanan dozlarda hücrelerde yeterli hasara ulaşmadığı regresyon analizi ile tespit edilmiştir.

Ocak 2022, 64 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mikronükleus, Çinko Oksit NP, Gümüş NP, Titanyum dioksit NP, Genotoksik hasar, Sitotoksik hasar

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF TOXIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE (TiO_2) ZINC OXIDE (ZnO) AND SILVER (Ag) NANOPARTICLES ON TK-6 LYMPHOBLAST CELLS

Burcu AKSOY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Nano-metal and nano-metal oxides, which are nanotechnological products, are used in many cases for arrival and prediction. For example, Zinc oxide (ZnO); It is used as a raw material in various fields such as paint, detergent and antibacterial products, tire industry, rubber production, cosmetics, various biomedical creams, petroleum products, ceramics industry, glass products, coating industry. Silver (Ag); It is used in printer inks, photographic industry, electronic components, coin making, ornaments and jewelry, alloys, dentistry and water purification industries. It is also used as nanoparticles in electronics, medicine, chemistry, fuel production and additives.

Titanium dioxide (TiO_2) is widely used in the cosmetics industry, personal care products, sunscreens, toothpastes, paints and food dyes, sensor making for electronics and photocatalysis, paper, plastic and pharmaceutical tablets. Although it is not naturally toxic, it is a metal oxide that can be toxic to various plant and animal cells and cells in culture due to its very small size and low solubility in nanoscales.

These products, the consumption of which is rapidly spreading and increasingly differentiated, can unconsciously leave the wastes generated by nano devices from various environments to natural ecosystems, both after use and during production. As a result of this nanopollution, organisms which are living on earth and artificially produced materials can be directly or indirectly exposed to man-made nanoparticles.These substances floating in the air can attach to

the cells of living species that have not been exposed to such substances before, and at the cellular level; They can communicate with proteins, cell membranes, DNA and organelles.

The cytotoxic and genotoxic effects of heavy metals may vary depending on the element used. However, basically, toxicity mechanisms can be grouped under two headings as direct and indirect. When viewed as an effect; Membrane structure/function changes, interaction with antioxidant enzymes, inhibition of energy metabolism, changes in DNA structure and induction of expression of stress genes and playing an important role in some enzymatic activity effects can be given as examples.

In this study, in which the interaction of Zinc Oxide Nanoparticle (ZnONP), Silver Nanoparticle (AgNP) and Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO_2NP) with TK-6 lymphoblast cells was investigated, Zinc Oxide NP, Silver NP and Titanium dioxide NP, which are soluble forms of these metals in distilled water, were used. The reason why distilled water is preferred as a solvent is due to the possibility of possible toxic effects to affect the test results.

The aim of the study method is to detect various cytotoxic and genotoxic (chromosome damage, micronucleus, apoptotic and mitotic index, cell apoptosis, etc.) damages in vitro for the evaluation of the preparations obtained by treating TK-6 lymphoblast cells incubated in vitro with various doses of nanoparticles. By using the dose-response curves obtained by applying regression analysis to the micronucleus frequencies corresponding to different doses of the metals to be used, the toxic dose levels of the nanoparticles used.

Studying the damage caused by the toxic levels of these metal nanoparticles, which have many uses today, on human lymphocytes will allow the effects of these particles on human health to be evaluated from different perspectives.

In this study, human TK-6 lymphoblast cells were used. For each experimental group, TK-6 cells were inoculated into cell flasks as 1×10^6 in 5 ml. For each substance to be used, 5 different doses were determined and 1 control group flask was planted. 2000 binucleate (BN) cells were counted for each dose, and genotoxic effects were determined using the micronucleus technique. The dose response curves of the micronuclei formed as a result of the chemical substances given to the cells were compared. The effect rates of metals on TK-6 cells were calculated with the statistical program used.The results obtained were compared with other studies with these metals.

For Silver Nanoparticle, 2.5,5,10,25 and 50 µg/ml were used. For Titanium Dioxide nanoparticle, 25,50,75,100 and 125 µg/ml were applied. 5,10,20,30 and 50 µg/ml were used for Zinc Oxide Nanoparticle as doses. In this study, in which 2000 binucleate cells were counted per dose, each dose was compared with its own control group by applying the regression analysis. Proliferative indices (PI) for all doses were also evaluated.

In this study, genotoxic and cytotoxic damages of Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO_2 NP), Zinc Oxide Nanoparticle (ZnONP) and Silver Nanoparticle (AgNP) in TK-6 lymphoblast cells were investigated. In applied doses; It was determined by the regression analysis that TiO_2NP and AgNP caused significant damage with increasing doses, while ZnO NP did not reach sufficient damage to the cells at the applied doses.

January 2022, 64 pages.

Keywords: Micronucleus, Zinc Oxide NP, Silver NP, Titanium dioxide NP, Genotoxic damage, cytotoxic damage

1. GİRİŞ

AMAÇ

Nanobilim kavramı ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feyman tarafından bilim felsefesiyle ilgili bir sohbeti sırasında gündeme getirilmiştir [1]. Nanobilim kavramının ortaya çıkmasından sonra gerçekleştirilen çalışmalarla, nanoteknoloji alanındaki bilimsel çalışmalar ivme kazanmış ve maddelerin 1-100 nm aralığında kontrolünün sağlanması ve bu boyut aralığında gerçekleşen olayların anlaşılması amaçlanmıştır [2].

Drexler 1986 yılında moleküler yapıdaki nanoteknolojinin dikkat çekici olanaklarını tartışmaya açmıştır. Zamanla nanoteknolojideki hızlı gelişmeler diğer teknolojik alanlarda olduğu gibi insan ve ekosistem için büyük yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceği konusunu da gündeme getirmiştir [3].

21. yy ile nanoteknoloji alanındaki hızlı ve farklı gelişmeler; bu teknoloji ürünlerinin günlük hayatımıza daha fazla oranda girmesine yol açmaktadır. Nanoteknolojik ürünleri günlük hayatımızda sık sık kullanmaktayız. Örneğin günümüzde sık sık tercih edilen dezenfektan ürünleri, bebek kir tutmaz kıyafetler, leke tutmayan masa örtüleri, koltuk kılıfları ve halıları, su tutmaz-ıslanmaz-nem önleyici-kirlenmez boyalar, güneş kremleri, diş macunları, deterjanlar, tıraş losyonları, tedavi amacı ile kullanılan çeşitli tıbbi ilaçlar ve cam ürünlerin ham maddeleri gibi birçok günlük hayatımızda rastladığımız malzemelerde kullanım sağlanmaktadır.

Günümüzde gıda ambalajları da dahil bir çok uygulamada nano materyallerin kullanımının artmasına rağmen, bu malzemeler ile ilgili kullanıcıların toksisite çekinceleri ve zararlı algıları, bu materyallerin kullanıldığı ürünlerin tercihlerini önemli oranda etkilemektedir. Çünkü oluşan bu nanokirlilik sonucu, yeryüzünde yaşayan organizmalar ve cansız yapılar, insan yapımı bu nanopartiküllere direkt ya da dolaylı olarak maruz kalabilmektedirler.

Günümüzde özellikle nano materyallerin elde edilmesinde sentetik uygulamalı yöntemler yerine, biyolojik kaynaklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmesi amacıyla oldukça çok

çalışma yapılmaktadır. Doğal ve biyolojik yöntemler ile elde edilen nano metaryallerin toksisite riskinin daha az olduğu bilinmektedir. Özellikle Çinko Oksit NP ve Gümüş NP gibi bazı malzemelerin doğal biyolojik sistemler kullanılarak sentezlenmesinde önemli gelişmeler sağlanmaktadır [4].

Nanopartiküllerin vücut tarafından kabulü ve canlı sistemlerin fizyolojik etkileri türden türe değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca fizyolojik etkiler; eşey durumları, yaşı, gelişim evresi, vücut direnci, mevsimsel farklılıklar gibi bir çok değişkene bağlıdır.

Bu çalışmada kullanılan Çinko Oksit NP (ZnONP), Gümüş NP (AgNP) ve Titanyum dioksit NP (TiO_2NP) nin TK-6 Lenfoblast hücrelerinde 5 farklı dozdaki etkinliklerine bakılmıştır. Her bir nanopartikül için 2 farklı inceleme metodu kullanılmıştır. Bunlardan biri, metallerin genotoksik etkilerini mikronükleus oluşumu sayesinde değerlendirmemizi sağlar, diğeri ise sitotoksik etkilerin gözlemlenip yorumlanabilmesi açısından önemli bir metodtur.

Genotoksik etkilerinin incelendiği kısımda TK-6 lenfoblast hücrelerinin mikronükleus oluşumunun nanopartiküllerin dozlarına bağlı olarak artışı sitokinezi bloklanmış mikronükleus tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Mikronükleus testi, mikronükleus artışlarını değerlendiren metotlardan birisidir ve pratik olması, maliyetinin düşük olması ve değerlendirmesinin kolay olması gibi avantajları vardır [5].

Sitotoksik etkilerin inceleneceği kısımda ise kromozom hasarı, apoptotik ve mitotik indeks, hücre apoptozu vb etkilerinin olup olmadığını in vitro ortamda belirlenecektir. Nanopartiküllerin farklı dozlarına karşılık gelen mikronükleus sıklıklarına regresyon analizi uygulanarak elde edilen doz-cevap eğrilerinden yararlanılarak kullanılan nanopartiküllerin toksik doz seviyeleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

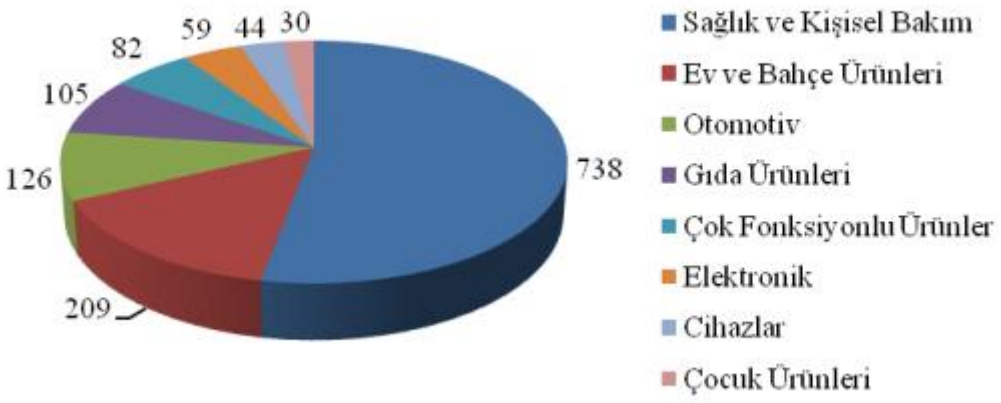
2.1.NANOPARTİKÜLLER

Nano, latinceye “nanus” olarak geçmiştir. “Nanus” un kelime anlamı ise cüce, uzantısı ise çok küçük, küçücüktür [6]. 1 nanometre (1nm), ölçüm olarak metrenin milyarda biri anlamına gelir ve “1 nm=10^{-9} m” şeklinde gösterilebilmektedir [7]. Nanopartiküller, boyutsal açıdan 1 ile 100 nm arasında boyutları olan parçacıklar olarak literatüre geçmektedir [8].

Nanometaryaller çok küçük parçacık hacmi yapısına sahip oldukları için canlı ve cansızlar tarafından kolayca absorbe edilebilirler. Ayrıca çok küçük yapıda oldukları için hücrelerde ve vücut içindeki kısımlarda rahatça dolaşabilirler. Bunların yanında, hücre iskeletine ve genetik materyale olan olumsuz etkileri önceki çalışmalarda gösterilmiştir [9].

2.1.1. Nanometaryellarin Kullanım Alanları

Günümüzde nanoteknolojik ürünlerin tüketiciler tarafından kullanılan kısımlarının büyük bölümünü, sağlık ve kişisel bakım ürünleri oluşturmaktadır (Şekil 2.1).

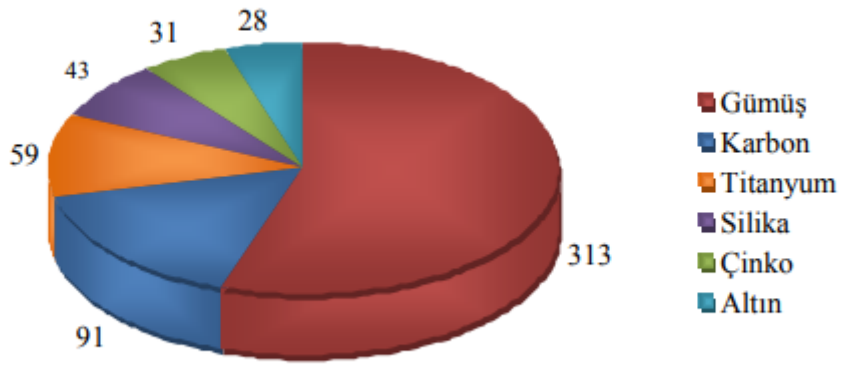


Şekil 2.1: Nanometaryal içeren tüketici kullanım ürünleri [10]

Ev ve bahçe ürünlerinde kullanılan boya sanayisinde de nanoteknolojik ürünler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu boyama maddelerine teknolojinin getirdiği imkanlar çerçevesinde dış cepheler ve gerekli durumlarda iç cephelerde kullanılmak için kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku giderme ve antimikrobiyal özelliklere sahip olan boyalar geliştirilmiştir.

Otomotiv sektöründe ise hafif motor ve çerçeve maddelerinin yapımı, dirençli boyaların üretimi, aşınmaya karşı koruyucu tabakalar üretilmesinde yine nanoteknolojik ürünlerden yararlanılmıştır. Gıda sektöründe kullanılan nanoteknoloji ise; gıdaların ambalajlanması, raf ömürlerinin uzatılması ve kalitesinin korunması için doğada çözünebilir, antimikrobiyal özellikte ve nanokompozit gıda malzemelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. [11]

Nanomateryallerin üretimi için organik ve organik olmayan materyaller günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde nanoteknolojik ürünlerde en yaygın kullanılan materyal ise gümüştür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Nanoteknoloji kullanım ürünlerinde en sık tercih edilen metaller [12]

Günümüzde nanoteknoloji bilimi çok hızlı ilerlemektedir. Ancak birçok teknolojiye göre daha yeni bir durum olması sebebi ile her nanomalzemenin olası bir yeni davranışı içermesi sebebi ile bu malzemelerin teşkil ettiği riskler tam olarak anlaşılmış değildir.

Teknolojinin uzun vadeli ilerleyebilmesi adına risklerin anlaşılması, ölçülmesi ve azaltılması mutlaka gereklidir. Bu yüzden çeşitli nanometaryaller ile günümüzde deneysel çalışmalar hala devam etmektedir.

Nanoteknolojinin olumlu etkisi, kendi yaşamlarımızdan ekonomik sektörlere kadar farklı alanlarda gösterilebilir. Çeşitli faydaları ve uygulama alanları Tablo 2.1 üzerinde gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Nanoteknolojik ürünlerin bazı kullanım alanları ve faydaları [13].

	Uygulama ve Kullanım Alanları	Faydaları
Geliştirilmiş Üretim	daha hızlı elektronik ürünler elde etme, yeni üretim malzemeleri geliştirme	kontrollü üretim süreç- leri, düşük maliyetli ve ekonomik olarak yüksek üretim oluşumu
Tarım	kontaminasyonu gidermek için nanoparçacıkların belirlenmesi, nem sensörleri ve patojenlerin saptanmasına yönelik kullanım	daha yüksek mahsul verimi oluşturmak, böcek ilacı kullanımının azaltılması ve gelişmiş su yönetimini sağlayabilmek.
Otomotiv	yağlayıcı / hidrolik katkı maddeleri,katalitik konvertörlerde nanoparçacık kullanımı, yakıt hücreleri, hidrojen depolama birimleri	CO_2 salınımının azaltılması, hafif malzemelerin üretimi, daha düşük yakıt tüketimine geçiş sağlanması
İnşaat	termal yalıtım, enerji depolama cihazları	daha az enerji ihtiyacı, CO_2 salınımının azaltılması
Kozmetik	temiz güneş kremleri, güzellik bakım ürünleri, farmokolojik kozmetik ürünleri, farmasötik besin maddeleri	UV koruması, ilaçlı cilt bakım ürünlerinde gelişmiş ilaç salımı sağlanması
Elektronik	iletken nanomalzemelerle gelişmiş ekran teknolojileri, kuantum bilgisayar teknolojileri, veri depolama, basılabilir ve esnek elektronikler, veri depolama için manyetik nanoparçacıklar	daha hızlı, daha küçük ve gelişmiş avuç içi boyutlı cihazlar
Çevre	Hava ve su filtrasyonu, atık ve su arıtma sistemleri, tehlikeli malzemelerin eliminasyonu, bina içi çevresel sistemler	CO_2 salınımının azaltılması ve çevresel temizliğin sağlanması

Şekil 2.1 (devam):		
Gıda ve içecek ambalajları	gelişmiş bariyer özellikleri ve ısı dayanıklılığı, antimikrobiyal ve mantar önleyici ambalajlama, biyobozunur ambalajlama	takip, kalite izleme ve taklit koruma, ürün hakkında gelişmiş bilgi elde edilmesi ve çevreye duyarlı üretim sağlama
Sağlık Hizmetleri	nanoparçacıklarla ilaç salımı, nanogümüş yara kaplamaları, floresan biyolojik etiketler	daha iyi hasta bakımı ve biyolojik süreçlerin anlaşılması
Güvenlik	Kişisel koruyucu ekipmanları, daha güçlü malzemeler	çalışan izleme, gelişmiş görüntüleme ile daha iyi test süreçleri, yeni karakterizasyon yöntemleri
Tekstil	kirlenmeye karşı dayanıklı kumaşlar, sensörler ve kendi kendini temizleme özelliklerine sahip yeni giyilebilir ürünler	hastane giysileri, acil durum kıyafetleri ve kişisel koruyucu ekipmanları, kişiye özel dikim

2.1.2. Nanometaryallerin Sınıflandırılması

Nanomateryalleri genel olarak üç farklı gruba ayırabiliriz;

- Karbon bazlı nanomateryal
- Metalik oluşumlu nanopartiküller
- Metal oksit nanopartiküller

2.1.2.1.Karbon bazlı nanomateryal

Özellikle fullerenler (60 ve daha fazla karbon atomuna sahip yapılar) fiziksel, kimyasal ve elektrik özelliklerinden dolayı pek çok nanomateryalin geliştirilmesinde baş materyal olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu yapılar, kozmetik, gıda katkıları, kayganlaştırıcılar, yakıt pilleri, mikroreaktörler, ilaç dağıtım araçları, yapı malzemeleri ve teknolojik ekipmanlar ile tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [14].

Güçlü ve sağlam fiberler olarak da bilinen karbon nanotüpleri, bir çok özelliklere sahip grafitik karbonun moleküler ölçekli tüp şeklindeki yapılarını oluştururlar. Karbon nanotüpleri, özellikle materyal bilimi alanında endüstriyel ve akademik çalışmalarda tercih edilmektedir [15]

2.1.2.2.Metalik oluşumlu nanopartiküller

Hedeflendirilmiş bölgelere ilaç taşınmasında metalik oluşumlu nanopartiküller sıklıkla tercih edilirler. Bu teknoloji sayesinde farklı çeşit hastalıkların tedavisinde yeni bir boyut oluşturmuştur. Nanoteknolojik anlamda bu yapılar biyomedikal alanında, çeşitli mühendisliklerde çok yaygın kullanılmaktadır.

Yakın zaman aralığında metalik nano yapıların manyetik, katalitik, elektriksel ve optik özelliklerine bakılarak bu yapıların şekil ve boyutlarının kontrol edilmesine ilgi gösterilmiştir. Metalik nanopartiküller tanısal bir çok analizde, radyoterapinin artırılması ve termal ablasyon gibi çeşitli uygulamalarda bir çok avantaj sağlayan çok amaçlı yapılardır [16].

Metalik nanopartilüllerin günümüzde biyoteknoloji, gen terapisi, hedeflenmiş bölgelere ilaç nakli, tanısal görüntüleme gibi çok geniş uygulama alanlarına sahiptir.

Nano taşıyıcı olarak kullanılan metalik nanopartiküller, aktif ve pasif olarak hedeflendirilebilirler. Bu teknoloji ile uygulandıklarında; ultrason, X-ışını, bilgisayarlı tomografi cihazları, pozitron emisyon tomografisi, manyetik rezidans görüntüleme gibi çeşitli tekniklerle kullanımlarında görüntüleme probları olarak davranacak şekilde geliştirilebilirler.

2.1.2.3.Metal Oksit Nanopartiküller

Metal Oksit Nanopartikülleri , kimya, fizik ve malzeme biliminin bir çok alanında önemli roller oynamaktadır. Metal elementleri çok çeşitli oksit bileşikleri oluşturabilirler. Bunlar, metalik özellikte , yarı iletken veya izolatör karakteri gösterebilen elektronik yapıya sahip çok sayıda yapısal geometriyi benimser [18].

Teknolojik uygulamalarda, metal oksit nanoparçacıkları, mikroelektronik devrelerin, sensörlerin, piezoelektrik cihazların, yakıt hücrelerinin, yüzeylerin paslanmaya karşı pasifleştirilmesi için kaplamaların ve katalizörlerin imalatında kullanılır. Gelişmekte olan nanoteknoloji alanındaki amaç, yığın halinde veya tek parçacık türlerine göre farklı özelliklere sahip nanoyapılar veya nano diziler yapmaktır [19].

Nanoteknolojik anlamda en sık kullanılan nanopartiküllerden metal oksit yapıda olanlar; TiO_2, ZnO, CuO, Fe_2O_3 ve SiO_2 dir. Tüm geçiş hattında bulunan metal oksitler arasında CuO ve ZnO üstün özelliklere sahip olması nedeni ile çok çeşitli uygulamalarda kullanım alanı bulan en önemli metal oksit nanoparçacıklarıdır.

2.2. NANOPARTİKÜLLERİN TOKSİK ETKİLERİ

İnsanlık yaşamı boyunca, dünyanın evrimsel gelişiminin de etkisiyle volkanik patlamalar, toz fırtınaları, fotokimyasal reaksiyonlar gibi doğal yollu ve hava ile taşınan çok çeşitli nanopartiküllere maruz kalmıştır. Günümüzde ise insanlığın kendi yarattığı teknolojik gelişmeler sonrası egzoz dumanı, sanayi artıkları, sigara, kozmetik ürünler, milli güvenlik sanayisi vb. gibi çok farklı nanopartiküllere maruz kalması artış göstermektedir [20].

Nanoteknoloji alanında ki hızlı gelişmeler sonucunda nanopartiküllerin, solunum , sindirim, deri teması ile emilim , enjeksiyon ile vücuda verilmesi vb. yollar ile alınması ile canlının bu yapılara maruziyeti yıllar içerisinde sürekli artış göstermektedir. Bu yapıların araştırılması ve nanopartiküllerin güvenilirliğinin ve mevcut zararlarının tespitinin yapılması günümüz dünya şartlarında bir zorunluluk haline gelmiştir.

Yapılan bir çok araştırmada, çok küçük ebatlarda olmaları sebebiyle nanopartiküllerin solunum sistemi ile alınması halinde, solunum sisteminin bütün bölgelerine difüzyon mekanizmasıyla yerleşebileceği gösterilmiştir. Ayrıca bu partiküllerin hücre içine kolayca girebileceği, hücreler arasında hızlı bir şekilde geçiş yapabileceği ve epitel ve endotel hücreler vasıtasıyla kan ve lenf dolaşımına katılabileceği, son olarakta kemik iliği, lenf nodları, dalak ve kalp gibi çok önemli ve hassas organlara ulaşabileceği gösterilmiştir. Bu nanopartiküllerin, nöronların akson ve dendritleri aracılığıyla merkezi sinir sistemi ve gangliaya kadar ulaşabildikleri de tespit edilmiştir [21].

Nanopartiküllerin etki alanlarının tespiti için yapılan çalışmalarda bu yapıların endositoz ve biyokinetik kabiliyetlerinin; ebatlarına, yüzey kimyasına ve yüzey modifikasyonuna göre değişiklik gösterebileceği belirlenmiştir. Ebatı küçülen nanopartikülün yüzey alanı büyür ve daha büyük partiküllülerine kıyasla biyolojik olarak daha aktif hale gelirler.

Nanomateryallerin ebatları, şekilleri, kimyasal özellikleri, yüzeyinin kaplı olup olmaması, hangi yapı ile kaplı olması vb. gibi durumlara bağlı olarak hücresel düzeyde inflamasyon, otofaji, nekrozis ve apoptozise sebep olabilecekleri bildirilmiştir [22].

Bir çok bilimsel çalışma nanoboyutlu materyallerin toksik etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Örneğin, titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalan ratlarda, normal ebatlarda ki partiküllere maruz kalan gruptakilere kıyasla, pulmoner inflamasyon oluştuğu ve daha çok toksik etkilerin meydana geldiği tespit edilmiştir [23].

Nanopartiküllerle yapılan bir çok araştırmada bu partiküllere maruziyetin toksik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir fakat yapılan bazı araştırmalarda toksik etkilerin oluşmadığı da bildirilmektedir. Jeng ve Swanson un 2006 yılında yaptığı bir araştırmada; Fare nöroblastoma hücrelerine 30-45 nm boyutlarındaki TiO_2, ZnO, Fe_3O_4, Al_2O_3 ve CrO_3 nanopartiküllerinin 100 μg/mL ve daha büyük dozlarının kullanıldığı bir araştırmada, ZnO nanopartiküllerinin hücre morfolojisinde anormalliklere ve mitokondriyal fonksiyonda azalmalara sebep olduğu ancak diğer nanopartiküllerin hücreler üzerinde ölçülebilir toksik etki göstermediği saptanmıştır [24].

İnsan epidermal keratinositleri, 20-80 nm aralığındaki karbon kaplı ve kaplı olmayan Gümüş (Ag) nanopartiküllerinin 0.34 μg/mL ile 1.7 μg/mL arasındaki dozları ile 24 saat muamele edildiğinde, hücrelerin canlılıklarında doza bağlı bir azalış tespit edilirken, karbon kaplı Ag nanopartiküllerinin toksik etki oluşturmadıkları tespit edilmiştir [25].

Bu yapılan çalışmalar, insan hayatındaki kullanım alanları gittikçe artış gösteren nanopartiküllerin bir kısmının toksik etkiler oluşturabileceğini, bazılarının ise her hangi bir toksik etki oluşturmayacağını göstermektedir. Fakat, günümüzde kullanılan nanopartiküllerin çokluğuna rağmen, bunların toksik etkileri konusunda yapılan çalışmaların sayısı yeterli değildir. Bu sebeple farklı nanopartiküllerin çeşitli toksisite testleri ile değerlendirilmesi ve bunların canlılar üzerindeki etkileri göz önünde bulundurularak üretim şekillerinin ve miktarlarının revize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.NANOPARTİKÜLLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİ

Nanopartiküller boyut olarak çok küçük olmaları nedeniyle ökaryotik canlıların biyolojik bariyerlerini kolayca aşabilmekte ve hücre içerisine ulaşabilmektedirler. Hücre içerisine ulaşan nanopartiküller yalnızca sitoplazmaya değil, sitoplazma içerisinde bulunan organellere ve çekirdeğe kadar taşınabilmektedirler. Çekildek içerisindeki DNA ile etkileşimleri ile gen mutasyonları meydana getirebilirler. Kromozomlar ile etkileşimleri sonucunda ise kromozom sayısı ve yapısında hasarlar meydana getirebilirler. Bu nanoparçacıkların DNA ve kromozomlara etkileri direkt ve indirekt şekillerde olabilir [26].

Yapılan araştırmalarda kültür ortamındaki hücrelerde ve gerekse in vivo koşullarda deney hayvanlarında yürütülen araştırmalarda, bazı nanopartiküllerin DNA hasarları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, kardeş kromatidlerde değişim, mikronukleus gibi anormallikleri tetiklediği belirlenmiştir [27][28][29].

Nanopartiküllerin hücre zarından ve çekirdeğinden geçişinde, hücrelere, dokulara absorbsiyonunda ve oluşturduğu genotoksik hasarların düzeyinde, partikülün büyüklüğü ve morfolojisi, kimyasal yapısı, yüzey alanı, yüzeyin kaplı olup olmaması ve kaplı ise kaplamaların kimyasal özellikleri gibi faktörler önemli rol oynamaktadır [30].

Nanopartiküllerin toksik etkileri belirlenirken; kullanılan partikül türüne, temas edilen hücre tipine, dokuların ve kültür ortamlarının farklılıklarına göre de farklılıklar gösterebilmektedir.

2.4. ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜ

Çinko oksit (ZnO) çok amaçlı inorganik malzeme olup, ZnO nanopartikülleri boya, pigment, metalurji katkı maddeleri, kauçuk, alaşımlar, seramik, kimyasal lifler, elektronik, katalizör, tıbbi tanı, kozmetik, kişisel bakım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda en çok kullanılan malzemelerden biridir [31][32].

ZnO, antimikrobiyal özellikleri sayesinde multivitaminler gibi besin takviyesi olarak da kullanılabilmektedir [33]. ZnO nanopartikülleri aynı zamanda UV dalga boyu aralığındaki soğurma özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır [34][35].

Yapılan bir çok çalışmada, çinko oksit nanoparçacıklarının mor ötesi ışınlarına karşı koruyucu etkisi olduğu, antioksidan ve antibakteriyel etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, gıda ambalajlarında kullanılarak gıdaların raf ömrünün uzatılmasında, güneş koruyucularında UV filtresi olarak ve diş macunlarında kalınlaştırıcı olarak kullanılmaktadır [36].

2.5. GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜ

Gümüş Nanopartikülleri, tüketiciler için kullanılan alanda en hızlı büyüyen ve ticari olarak çok tercih edilen, dünya da ticari pazara girmiş bir nanometaryaldir. Öncelikli kullanım alanları ise; sağlık, tekstil, plastik, gıda ambalajı, gıda takviyeleri, hava spreyleri, deterjan, sabun, şampuan, diş macunu, hava filtreleri, buzdolabı kaplamaları, temizlik, tıbbi uygulamalar,

elektrik , bilgisayar teknolojisi üzerinedir. Bu tarz geniş bir kullanım alanına sahip olduğu için canlı oluşumlar ve evren adına sahip olduğu özelliklerin ve doğaya karşı etkilerinin tespit edilmesi gereken bir ürün olmuştur.

Gümüş nanopartikülünün bir başka potansiyel tıbbi uygulamalarından bazıları şunlardır; infüzyon portları, endovasküler stentler, ürolojik stentler, endoskoplar, periton diyaliz cihazları, subkutan manşetler, diş malzemeleri, kontakt lens kaplaması gibi uygulamalarda tercih edilmektedir [37][38].

Gümüş bazlı bileşikler birçok antimikrobiyal ve dezenfektan uygulamasında kullanılmıştır. Gümüş iyonlarının ve gümüş bazlı bileşiklerin oldukça toksik olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Gümüş, sıklıkla antimikrobiyal etkinliği artırabilmek için nitrat (NO_3) formunda kullanılır fakat Gümüş nanopartikülleri, Gümüş Nitrat ($AgNO_3$) a göre maruz kalacak mikroorganizmalar için mevcut olan yüzey alanında dikkate değer bir artış tespit edilmiştir [39].

Ayrıca bazı çalışmalarda Gümüş NP'lerin bakteri hücre zarına bağlandığını, geçirgenlik ve solunum gibi uygun işlevlerini bozduğunu ortaya koymaktadır [40].

2.6.TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLÜ

Titanyum, doğada en fazlaca bulunan dokuzuncu elementtir ve geniş bir yayılım profiline sahiptir. Yeryüzünde ki ortalama konsantrasyonu 4400 mg/kg'dır. Oksijene ve diğer elementlere olan yüksek afinitesi nedeniyle, doğada serbest halde bulunması mümkün değildir.

TiO_2 , metalik titanyumun oksitlenmiş formudur. Yanıcı olmayan ve kokusuz özellikteki beyaz toz şeklindedir. Oda sıcaklığındaki moleküler ağırlığı; 79,87 g/mol, kaynama noktası; 2972 **°C**, erime noktası; 1843 **°C**, bağıl yoğunluğu; 4.23 g/cm^3 şeklindedir. TiO_2, ışığı iyi bir şekilde kırmasından ve fazlaca parlak olmasından dolayı, beyaz pigment olarak kullanılmaktadır [41].

TiO_2 nanopartikülleri, kozmetik teknolojileri, temizlik uygulamaları, bilgisayar üretimi gibi pek çok teknolojik uygulamada, tıp ve sağlık alanlarında, çevre ve enerji teknolojisi uygulamalarında, savunma sanayisi sistemlerinde vb. bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda güneş kremlerinde, kozmetikte, gıda ve ilaç katkı maddesi olarak, diş macunlarında ve oral kapsüllerde kullanılır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, gıda sınıfı TiO_2'nin (E171) en az bir boyutta yaklaşık % 36 oranında 100 nm'den küçük parçacıklardan oluştuğu bildirilmiştir [42].

TiO_2 nanopartiküllerinin bu kadar yaygın kullanımı ve insanların bu partiküllerle yakından teması, araştırmacıları bu partiküle ait toksik ve genotoksik hasarları araştırmaya yönlendirmiştir. Bu partiküle ait yapılan çalışmalarda, hem toksik hem de genotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir öte yandan bazı çalışmalar ise herhangi bir toksik veya genotoksik etkisinin olmadığını ifade etmektedir [43].

2.7.YAPILAN TOKSİSİTE ÇALIŞMALARI;

2.7.1. Gümüş ve Çinko Oksit Nanopartikülünün Canlılar üzerinde gerçekleştirilen toksisite çalışmaları

Gümüş, atom numarası 47, atom ağırlığı 107,87 g/mol, yoğunluğu 10,49 g/cm3, erime sıcaklığı 960,8°C, kaynama sıcaklığı 2210°C olan ve periyodik cetvelde 1B grubunda yer alan günlük yaşamda insanlar tarafından sık sık kullanılan, hayatı kolaylaştıran bir metaldir. Periyodik cetvelde (Ag) sembolü ile gösterilmektedir. Yer kabuğunda en çok bulunan elementler arasında 68.sıradadır. Dünya üzerinde en çok Kuzey ve Güney Amerika'kıtalarında bulunmaktadır..Doğada genellikle +1 ve +2 değerlikli durumları mevcuttur.

Çinko, oksijen ile temas edince yeşilimsi/mavimsi bir alev ile yanarak beyaz renkli çinko oksit (ZnO) dumanını meydana getirir. Çinko oksit toz halinde bulunan bir üründür. Çinko Oksit (ZnO), atom ağırlığı 81.39 g/mol, yoğunluğu 5.1 gr/cm^3, erime sıcaklığı 1975 °C, kaynama sıcaklığı 2360°C olan, beyaz renkli bir katıdır.Dünyada bir çok alanda geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Çinko oksit NP'ler kimyasal ve biyolojik türlere karşı fotokatalitik ve foto oksitleyici özelliklere sahiptirler. Son zamanlarda, çinko oksit NP'ler kanser terapisi üzerindeki etkileri ile dikkatleri üzerine çekmiştir. Çinko oksit NP'lerin, kanser hücrelerini seçici olarak öldürülmesini tetiklediği bildirilmiştir [44].

Gümüş bir iz element olarak tanımlanmasa da, insan vücudunda düşük konsantrasyonlarda bulunabilir (2,3 mikrogram/L). Bu konsantrasyonlarda insan vücudunda bulunma nedenleri ise; gümüşün besinlerle sindirim yoluna, içme suyu ile vücuda alınmasıdır. Öte yandan, soluma ve mesleki maruziyetler de insan vücuduna girme nedenlerindendir [45].

Çinko ve benzeri ağır metaller organizmalarda, hücre ve organlardaki gelişimin düzenlenmesinde çok özel fizyolojik rol oynamaktadır. Fakat sanayi devrimi ile birlikte endüstriyelleşme ve şehirleşmenin artmasıyla ağır metaller, çevre kirleticileri olarak görev

yapar ve yüksek oranda canlılar için toksisiteye sebebiyet verir. Bu yüzden organizmada meydana gelen aşırı ağır metal birikmesi nedeni ile çinko normal vücut metabolizmasını engelleyebilir, fizyolojik ve genetik süreçleri değiştirebilir ve kansere neden olabilir.

Çinko, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar (gen replikasyonu, transkripsiyonu, protein sentezi, hormonlara ve reseptörlere spesifik olarak bağlanma, sinyal iletimi) açısından 300 den fazla enzime ve fonksiyonel proteine dahil olur [46].

Çinko organizmanın bünyesinde yetersiz miktarlarda bulunduğunda büyümeyi sınırlandırabilirken, yüksek miktarları ise toksik etki gösterebilir [47].

MCF-7-hücreleri (insan göğüs adenokarsinoma hücre hattı) ile yapılan bir çalışmada, gümüş NP'nin, sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilere neden olduğunu, gümüş NP'nin doza bağımlı olmak üzere, yüksek dozlu konsantrasyonlarda daha az apoptotik daha fazla nekrotik etkiye neden olduğunu bildirilmiştir [48].

Foldbjerg ve diğ. [49] gümüş (Ag) NP'lerin, ROT üretiminde artışa ve sonuçta apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne yol açmasından dolayı hücreler tarafından alındığını düşünmüşlerdir. Antioksidan uygulamaları ROT üretimini azaltabilir ve hücre canlılığını büyük ölçüde artırabilir. Dahası, büyük DNA adüktlerinin oluşumu antioksidan tedavisi ile engellenebilir ve bu da ROT oluşumunun AgNP toksisitesinde önemli olabileceğini düşündürmüştür. Ag NP'lere 24 saat maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonundaki azalma, dozlara bağımlı bir şekilde gözlenmiştir [50].

Alarifi ve diğ [51] A375 hücrelerinde Çinko Oksit (ZnO) NP'lerinin neden olduğu sitotoksisite, oksidatif stres ve apoptozu araştırmışlardır. A375 hücreleri ZnO NP'lerine maruz bırakıldıktan sonra MTT ve laktat dehidrogenaz testleri sonucunda hücre yaşayabilirliğinde belirgin bir azalma göstermiştir ve faz kontrastlı görüntüler, bu NP'ler ile muamele edilen hücrelerin daha düşük yoğunlukta ve yuvarlak morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca ZnO NP'leri oksidatif stres oluşturması, ROT oluşması ve antioksidan glutatyonun tükenmesi ile kanıtlamışlardır [52].

2.7.2. Titanyum Dioksit Nanopartikülü ile yapılmış toksisite çalışmaları

TiO_2 NP'lerine uzun süreli maruziyetin, hücre bölünmesini azalttığı ve anormal kromatin yapısı ve ayrılmasına sebep olduğu, kısa süreli maruziyetin ise hücre canlılığını, büyümesini artırdığı saptanmıştır [53]

Nurkiewicz ve diğ. [54] ise, ratlar ile yapılan deneylerde, 24 saat süreyle, yaklaşık 21 nm'lik ve 1 μm'lik TiO_2 NP'nin ve mikropartikülünün toksisitesini incelemişlerdir.Bu çalışma ile, inhalasyon yolu ile verilen bu partiküllerin, omuz kası arterlerinde fonksiyon bozukluklarına sebebiyet verdiklerini bildirmişler ve TiO_2 NP'nin, mikropartikül formundan, yaklaşık altı kat daha toksik olduğunu saptamışlardır.

Bazı medikal uygulamalarda kullanılabilen TiO_2 NP ile elde edilen toksikolojik raporlar, bu materyalin ne kadar güvenilir olduğunu saptamamıza neden olmuştur. Bu konu hakkında, Liu ve diğ. [55] yaptığı çalışma örnek gösterilebilir. Bu çalışmada, 5 nm'lik anataz tip TiO_2 NP; 5, 10, 50, 100 ve 150 mg/kg olacak şekilde farelere, 14 gün süre boyunca hergün enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler, TiO_2 NP'nin karaciğer ve böbrek gibi organlara zarar verdiğini göstermiş ayrıca; kan şekeri ve lipid dengesine de zarar verdiğini göstermiştir .

Jugan ve diğ. [56] 12 ve 140 nm'lik TiO_2 partikülleri ile yaptıkları çalışma sonucunda, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücrelerinin (A549) DNA'sında tek zincir kırıklarının oluştuğunu ve oksidatif lezyonların arttığını, ayrıca, oksidatif stresin meydana geldiğini raporlamışlardır.

Bhattacharya ve diğ. [57] TiO_2 NP'ye karşı, insan akciğer fibroblast hücrelerinin, insan bronşiyal epitel olanlarına göre daha hassas olduklarını, bu hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkilerin daha yoğun görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Uchino ve diğ. [58] 30 nm'lik anataz tip TiO_2 NP'nin, 50 μg/ml'lik dozda, yüksek miktarda OH. radikalinin oluşmasını tetiklediğini, ayrıca TiO_2 NP'nin kristal halinin, bu radikalin oluşumunda belirleyici bir rol aldığını raporlamışlardır.

2.7.3. Bazı Önemli Nanopartiküllerin Canlılara Etkisi Üzerine Gerçekleştirilen Çalışmalar

Günümüzde yapılan bir çok çalışmada genellikle genetik materyalin hasar görmesinin karsinojenezin indüksiyonunu veya yükselmesini tetiklediği bildirilmektedir; bu nedenle NP'lerin genotoksisitesini değerlendirmenin önemli bir yönü, DNA'ya zarar verme potansiyelini içerir [59].

Titantum Dioksit üzerine yapılan çalışmalar sonrasında, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, sıçanlarda akciğer kanseri indüksiyonuna bağlı olarak deney hayvanlarında yeterli kanıtla TiO_2'yi insanlar için muhtemel kanserojen (sınıf 2B) olarak sınıflandırmıştır [60].

Bir diğer çalışma da Au-NP'lerin hücresel zarın fosfolipid iki tabakasını geçebildiğini ve hücre içi bölmelerde lokalize olduğunu göstermiştir [61].

Demir oksit NP'leri aynı anda çeşitli işlevler sunabildiği için radyosensitizer olarak kullanılır [62]. Radyosensitizer, tümör hücrelerini radyasyon terapilerini daha duyarlı yapan bir ilaçtır. Bazen radyasyona duyarlılaştırıcı veya radyo arttırıcı olarakta bilinir. Khoei ve arkadaşları amino grubu ile kaplanmış piyasada bulunan demir oksit NP'lerinin, sitoplazmada lokalize olan insan prostat kanseri hücre hattı (DU145) hücreleri tarafından alındığını ve MV X-ışını ışınlarına maruz bırakıldığında hücrelerde radyasyona duyarlılaşmaya neden olduğu kaydedilmiştir [63].

Ahamed ve diğ. [64] nikel ferrit NP'ler ile çalışmış ve doza bağımlı sitotoksisite, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve antioksidan olan glutatyonun (GSH) tükenmesi ile kanıtlanan oksidatif stres oluşturduğunu çalışmaları ile kaydetmişlerdir.

2.8. KANSER VE NANOTEKNOLOJİ İLİŞKİSİ

Ulaşılabilen tarih boyunca kanser, insan ve hayvanlarda sık görülen bir problem olarak karşımıza çıkmıştır. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar MÖ 3000 li yıllara kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen "canker'' veya ''carcinos'' kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ilk defa MÖ 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Hipokrat tarafından kullanılmış, Yunan doktor Galen ise şişme anlamına gelen "oncos" terimini kullanmıştır [65].

Kanser genellikle büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımı sonucu oluşur ve somatik genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır [66].

Kanser hücreleri kendi metabolizmalarını ayarlayabilen zeki hücrelerdir. Normal hücre bölünmesinde hücreler, hücre dışı membrandan sinyal alırlar ve büyüyüp bölünerek sayılarını artırırlar.Bölünme öncesi hücre, etrafını kontrol eder, eğer ortamda yeterli besin ve büyüyecek alan varsa yani şartlar bölünmek ve çoğalmak için elverişli ise büyüme ve sonrasında bölünme başlar.

Hücreler önceden belirlenen boy ve sayıya gelene kadar büyürler ve birbirleri ile temasa geçtikleri anda bölünmelerini durdururlar (Hücrelerin kontak inhibisyonu). DNA'nın veya hücrenin elemanlarından birinin hasarlı olması durumunda hücreler büyümeyi ve bölünmeyi durdurarak, hasarlı bölümün tamir edilebilmesi için G_0 fazı adı verilen evreye geçerler. Hücre

burada eğer tamir edilebilirse tekrar dolaşıma kazandırılır ve yaşamına devam eder. Fakat hücre, tamir edilemeyecek kadar hasarlı ise apoptoz adı verilen mekanizma ile programlı bir şekilde ölüme gönderilir veya immün sisteme ait hücreler hasarlı hücreyi ortadan kaldırır. Böylece bu mekanizma ile hasarlı DNA veya yapılara sahip hücrelerin gelecek nesillere aktarımı engellenmiş olur.

Eğer bir hücre kanserleşme özelliği gösteriyor ise normal hücrelerin sahip olamadığı birçok yeni özelliğe sahip olurlar. Örneğin; Hücre yüzeylerinde bulunan reseptörler daha şık ve daha çok sinyal alırlar, kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı sağlayan kendi asinyal sistemlerini oluştururlar, Kontal inhibisyonuna aykırı davranarak yandaki hücre ile temas haline geçseler bile büyüme ve çoğalmaya devam ederler, kendilerine yeterli besin ve oksijen sağlayabilmek için çevresinde bulunan stromada yeni damar sistemi oluşturabilirler, telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde kendilerinin sayısını artırabilirler, dolaşım sistemi aracılığı ile metastaz yapabilirler, kanser hücreleri zamanla şekillerini değiştirebilirler ve genetik, epigenetik olarak kararlı değillerdir.

Kansere sebep olarak birçok etken gösterilebilir. Çevresel faktör olarak sebeplerine bakıldığında; maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, ilaçlar ve yağlı yiyecekler, bazı küfler (alfatoksinler), iyottan fakir diyet, kırmızı etten zengin diyetler, yanmış yağları içeren besinler riski artıran sebeplerdendir. Ayrıca, sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar, naftalin, ağır metaller, çeşitli elementler ve asbestos benzeri yapılarda kimyasal kanser yapıcı etkenlerdir.

Bu maddelerin günlük hayatta kullanımı ve insanların sanayileşme ve dışa dönük beslenme tarzlarından dolayı sık sık karşılaştıkları ürünler zaman içerisinde kansere yakalanma olasılığını artırır. Eğer hücrede DNA'nın yapısında meydana gelebilecek hataları düzeltecek bir mekanizma çalışmıyorsa, her hücre bölünmsesi sonrası (DNA'nı kendi kopyası yapılacağından) var olan mutasyonlara yenileri ekenecek ve başlamış olan kötüye gidiş kısa bir süre sonra metastazlara yol açacaktır [67].

Journal of American Chemical Society'de yayımlanan ve meme kanseri üzerine yapılan çalışmada özel olarak geliştirilmiş nanopartiküllerin, vücudun kendi bağışıklık sistemini, tümörlü doku ile savaşması için harekete geçirebildiği sonucuna ulaşıldı. Farelerle yapılan bu deneylerde, nanopartikül bazlı bu tedavi, sadece hedeflenmiş göğüs kanseri tümörlerinde değil aynı zamanda vücudun diğer bölümlerindeki metastazları da yok ettiği tespit edildi [68],[69].

Nanopartiküllerin kanser tedavisinde kullanımı için bazı aşılması gereken problemler vardır. Örneğin canlı yapısında bulunan bağışıklık sistemini kolayca geçebilmek mümkün değildir. Eğer bir nanopartikül çok büyük ebatlı ise kanda bulunan savunma hücreleri tarafından yok edilebilir. Diğer bir problem ise kan proteinleri olarak gösterilebilir. Bu yapılar nanopartikülleri kaplama eğilimi gösterirler ve böylece nanopartikülleri kolay bir şekilde parçalanmasını sağlarlar.

Nature comunications dergisinde yayınlanan bir araştırmaya göre; nanopartiküllerin, makrofaj hücrelerinden kaçabilmelerini sağlayabilmek için 20 nm ile 40 nm büyüklüğünde küçük nanoparçacıklar elde edilip, üretilen bu nanopartiküllerin kan dolaşımında daha uzun süre parçalanmadan kalabilmelerini sağlamış ve hedef hücrelere kolayca ulaşabilmeleri için partikülleri polietilen glikol ile kaplayıp onları tümörler için bir katile dönüştüren güçlü ışık emici klor bazlı moleküller eklemeyi başarmışlardır. Geliştirilen bu teknik ile hücrelere gönderilen kızıl ötesi ışınlar ile etkileşime giren klor bazlı moleküller singlet oksijen (hücrede strese ve sonrasında hücre ölümüne sebep olabilen radikal bir oksijen türü) oluşturur ve normal şartlarda toksik olmayan bu yapılar toksik etki göstermeye başlar [70]

2.9. MİKRONÜKLEUS

Mikronüklus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumla genellikle hücre siklüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadırlar[71]. Mikronükleuslar, hücrelerin genotoksik belirleyicileridir. Bu güne kadar Mikronükleus ile hücrelerdeki hasarı ve sayı değişimlerini gösteren birçok çalışmalar yapılmıştır.

MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir [72].

Mikronukleuslar, hücre mitoz bölünme geçirdiği zaman görülür. Esas çekirdeğe dahil değillerdir. Tam bir kromozomdan köken alabilirler veya asentrik fragmanlardan köken alabilirler. Mikronukleus sayısının artması, kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişikliklerin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Bu duruma mutajenik faktörlerin indirekt olarak sebep olduğu varsayılmaktadır [73]. MN testi, insanda genotoksik maruziyeti değerlendiren, in vitro uygulanan bir testtir [74].

2.9.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları

Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom parçalarının ya da kromozomların ortamda varlığını sürdürmesi sonucu oluşan yapının adıdır. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleus yanlarında yer alan nükleer materyaldir [75].

MN oluşumunun asıl kaynağını DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da harabiyet oluşmaktadır [76].

Oluşum mekanizmaları göz önünde bulundurulacak olursa; bütün kromozom kökenli mikronükleus oluşumu ve asentrik kromozom parçalarının oluşumu gibi birden fazla oluşum mekanizması vardır. Asentirik oluşumlara bakıldığında genellikle DNA'da meydana gelebilecek tek zincir kırıkları, tamir mekanizmalarında görülebilecek sorunlar sebebiyle çift iplik kırığına dönüşebilir ve kopan parçalar mikronükleusu oluşturabilir. Bunlar dışında özellikle radyasyon benzeri doğrusal bir çizgide hasar oluşturabilen ajanlar, DNA üzerinde direkt olarak çift zincir kırığına sebebiyet verebilir [77].

Bütün kromozom kökenli oluşum da ise Anafaz evresinde kromozomlar kutuplara doğru çekilirken, bütün bir kromozom herhangi bir kutba gidemeyip mikronükleus oluşturabilir. İğ iplikleri, sentromer ve sentrozomların yapısındaki bozukluklar ile birlikte mitoz kontrol noktalarındaki sorunlar ve anormal şekilli sentrozom artışı gibi etmenler bu tür mikronükleus oluşumuna sebebiyet verebilir [78].

2.9.1.1.Mikronükleus Tekniği

Mikronükleus testi, kromozom aberasyonlarının tespitinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Mikronükleus testi; mitotik hücrelerin anafaz esnasındaki kromatid kırıkları veya kromatitteki değişimlerini gözlemleyebilme esasına dayalıdır. Bu testin en önemli kullanımı kullanılan kimyasalın bilinmeyen mutajenik potansiyelini ölçmek ve farklı dozlarda oluşturabileceği etkilerini belirleyebilmektir [79].

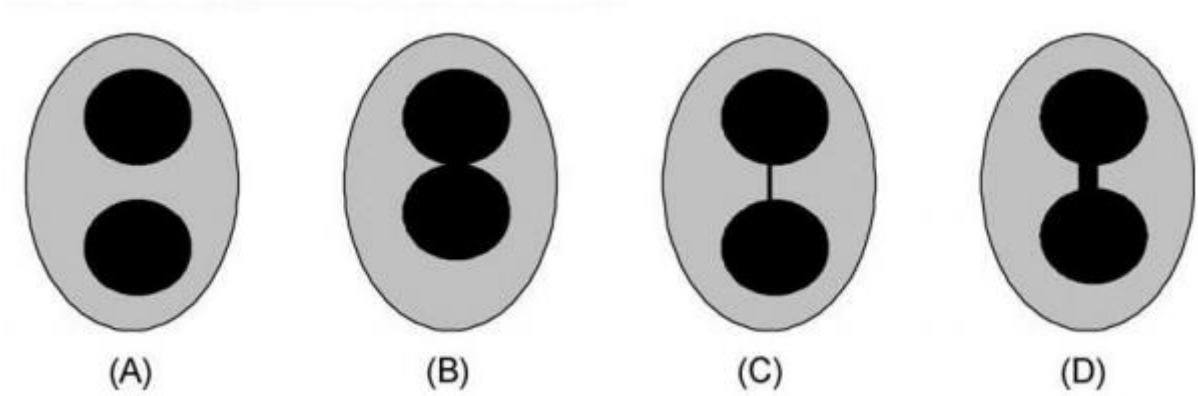
İnsan lenfositlerinde yapılan MN testi kromozom kayıplarını, kırıklarını belirlemede kullanılabilir. Mikronükleus yapıları sadece binükleat hücrelerde skorlanır. Mikronükleuslar, sitokinezin bloke edilmesi sonucunda elde edilmektedir. .Sitokinezin bloke edildiği hücrelerde binükleat hücrelerin saptanması için ise aşağıdaki kriterleri sağlaması önem teşkil eder.

1. Hücreler iki çekirdekli olmalıdır.
2. İki çekirdekli bir hücredeki iki çekirdek, sağlam nükleer membranlara sahip olmalı ve aynı sitoplazmik sınır içinde yer almalıdır.
3. İki çekirdekli bir hücredeki iki çekirdek, boyut, boyama modeli ve boyama yoğunluğu açısından yaklaşık olarak eşit olmalıdır.
4. Bir BN hücresi içindeki iki çekirdek, en büyük çekirdek çapının dörtte birinden daha geniş olmayan ince bir nükleoplazmik köprü ile bağlanabilir.
5. Bir BN hücresindeki iki ana çekirdek birbirine dokunabilir, ancak ideal olarak birbiriyle örtüşmemelidir. Örtüşen iki çekirdeğe sahip bir hücre, yalnızca her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa puanlanabilir.
6. İki çekirdekli bir hücrenin sitoplazmik sınırı veya zarı sağlam olmalı ve bitişik hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilir olmalıdır [80].

2.9.3. Mikronükleus Testi Değerlendirmesi

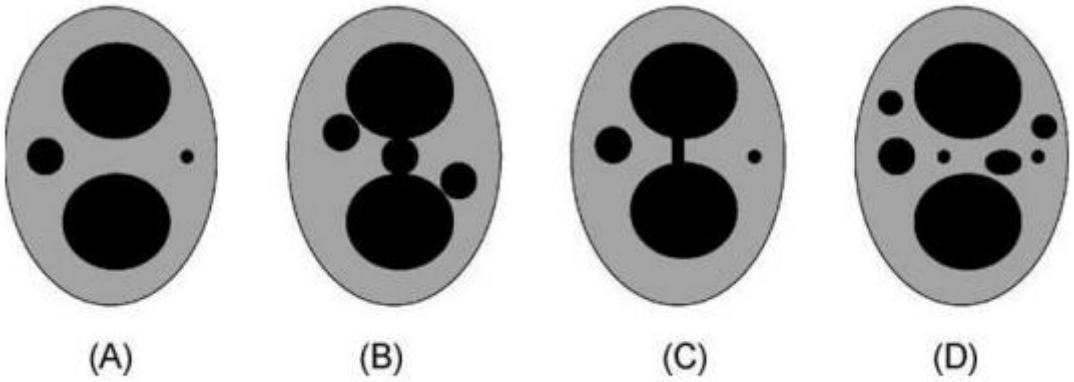
Mikronükleus tekniğinde; skorlanacak mikronükleusların çapı, çekirdeklerin çapının 1/16'sından daha küçük, 1/3'ünden de daha büyük olmamalıdır. Mikronükleuslar çekirdeğe bağlı, çekirdekle üst üste durumda olmamalı, çekirdeğe dokunur halde bulunuyorlar ise de yapıları çekirdekten ayrı olarak görünür halde olmalıdır. Çekirdekler ve mikronükleus genellikle aynı oranda boyanmakla birlikte, mikronükleuslar bazen daha koyu boyanabilirler fakat ışığı kıramazlar. Hücreler değerlendirilirken bu özellikleri göz önünde bulundurulmalı ve ışığı kırabilen boya kalıntısı gibi parçacıklarla karıştırılmamaya özen gösterilmelidir [81].

Çalışmada kontrol grupları ve test materyalleri için 2000 binükleat hücreye yakın hücre değerlendirilmelidir ve analizlerin yapılabilmesi için yukarıda anlatılan kriterlere uymayan binükleat hücrelerle birlikte, tek, ikili, üçlü ve daha fazla çekirdeğe sahip hücreler de ayrıca skorlanmalı ve değerlendirilmelidir.



(A) İdeal binükleat hücre, (B) çekirdekleri birbirine dokunan binükleat hücre, (C) çekirdekler arasında dar nükleoplazmik köprüye sahip iki çekirdekli hücre; (D) nispeten geniş nükleoplazmik köprüye sahip iki çekirdekli hücre. Örtüşen iki çekirdeğe sahip hücreler, nükleer sınırların ayırt edilebilmesi durumunda çift çekirdekli hücreler olarak değerlendirilebilir.

Şekil 2.3: Skorlanabilir binükleat hücre kriterleri [80].



(A) Biri üçte biri ve diğeri hücre içindeki ana çekirdeklerden birinin dokuzda biri çapında iki mikronükleuslu hücre.

(B) Mikronükleus ana çekirdeklere dokunuyor ancak üst üste binmiyor.

(C) Ana çekirdekler ile iki mikronukleus arasında nükleoplazmik köprüye sahip iki çekirdekli bir hücre.

(D) Çeşitli boyutlarda altı mikronükleuslu iki çekirdekli bir hücre; bu tip hücre nadiren görülür.

Şekil 2.4.: Skorlanabilir mikronükleus kriterleri [80].

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 36344 numaralı başlık olarak degerlendirilmeye alınmıştır. Projede hücre olarak, insan kökenli TK-6 Lenfoblast hücre soyu kullanılmıştır. Bu hücrelere Çinko Oksit Nanopartikülü (ZnO NP), Titanyum Dioksit Nanopartikülü (TiO_2 NP) ile Gümüş Nanopartikülü (Ag NP) verilerek hücrelerde belirli dozlarda genotoksik ve sitotoksik hasarlar belirlenerek bu kimyasallar için doz-cevap eğrileri belirlenmiştir. Hücre flasklarına 5 ml'de 2.5 x 10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.1.DENEY MATERYALLERİ

3.1.1. Çinko Oksit Nanopartikülü (ZnO NP)

Çinko Oksit Nanopartikülü, Sigma-Aldrich firmasından %97 den daha büyük bir saflıkta ve katı formda temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 81.39 gr/mol dür. Uygulanacak dozlar için 10000, 1000 ve 100 µM'lık stok konsantrasyonlar hazırlanmış, çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Doz olarak hücrelere; 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml lik dozlar uygulanmıştır.

3.1.2. Gümüş Nanopartikülü (Ag NP)

Sigma-Aldrich firmasından %99,99 saflıkta ve katı formda temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 107.87 gr/mol dür. Uygulanacak dozlar için 10000, 1000 ve 100 µM'lık stok konsantrasyonlar hazırlanmış, çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Doz olarak hücrelere; 2.5, 5, 10, 25 ve 50 µg/ml lik dozlar uygulanmıştır.

3.1.3. Titanyum Dioksit Nanopartikülü (TiO_2 NP)

Sigma-Aldrich firmasından %99,7 saflıkta ve katı formda temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 79.87 gr/mol dür. Uygulanacak dozlar için 10000 ve 1000 µM'lık stok konsantrasyonlar hazırlanmış, çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Doz olarak hücrelere; 25,50,75,100,125 µg/ml lik dozlar uygulanmıştır.

3.2.HÜCRE KÜLTÜRÜ VE MEDYUM HAZIRLAMA

Toksikoloji çalışmalarına uygun olan TK-6 lenfoblast hücrelerinin in vitro çalışmalarda devamlılığı için haftada iki kez olmak üzere deney süresince hücre pasajı yapıldı. RPMI-1640 Hepes medyumu ve %10 Fetal bovine serum kullanıldı. %5 CO_2 içeren 37°C etüvde muhafaza edildi.

3.2.1. Medyum Hazırlama

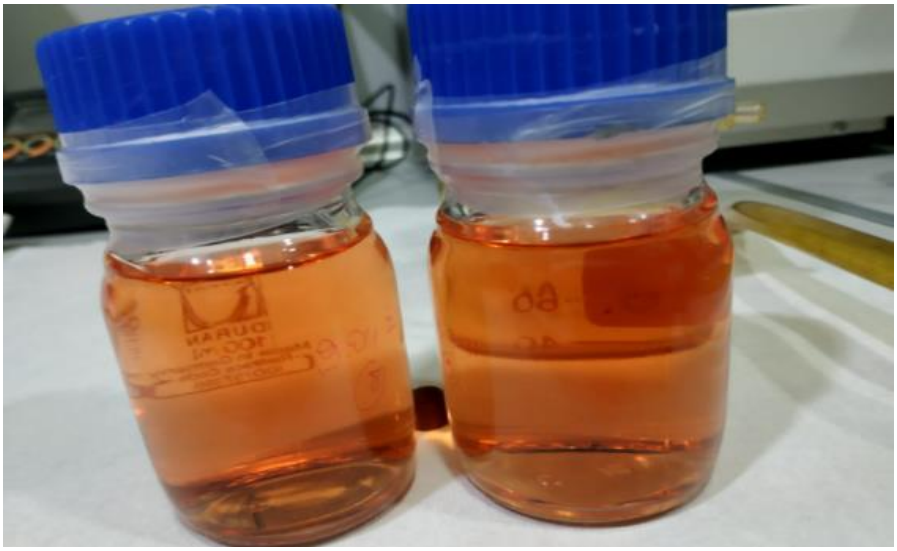
Bu aşamada daha önce otoklav ile steril edilen malzemeler karıştırma makinasının üzerine kondu. 1000 ml lik balon joje ve içerisinde bulunan manyetik karıştırıcı ile birlikte cihaz karıştırılmaya bırakıldı. Üzerine 250 ml steril saf su eklendi ve içerisine RPMI-1640 Hepes medyumu toz şekilde ilave edildi. 45 dk lık periyotlar ile içerisine 250 ml'lik steril saf su eklendi. Son turda balon jojenin içerisine 2000 miligram sodyum bikarbonat eklendi ve 250 ml'lik steril saf suyun son turu eklendi. En son olarak 0.2 ml Cytreptomysin ve 0.2 ml Penicilin eklendi ve 1 saat medyumun manyetik karıştırıcı ile karıştırılması beklendi. Bu işlemler UV ışık altında yapıldı.

Karıştırılma işlemi bittikten sonra içerisine milipore filtre yerleştirilmiş bir filtre düzeneğinden hava kompresörü kullanarak geçirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Medyum filtresi ve hava kompresörü

Filtreden geçirilen medyumlar, üzerine tarih ve numaralar yazılmış siteril şişeler içerisine aktarıldı ve buzdolabında +4 derecede muhafaza edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: 100 ml' lik steril şişelere aktarılan RPMI-1640 Hepes medyumu

3.2.2. Hücre pasajı

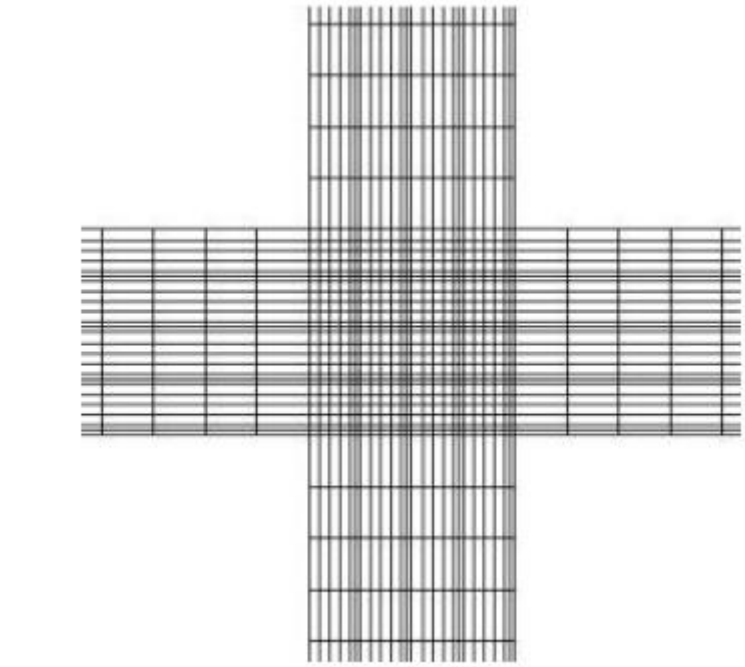
Hücre pasajı, hücreler için uygun yaşam şartını oluşturabilmek için haftada iki gün yapılmalıdır. Hücre pasajına başlanmadan önce mutlaka önceden hazırlanan RPMI-1640 Hepes medyumu ile %10 Fetal bovine serum etüve koyulur ve 37 santrigrat derecede stabil olana kadar beklendi.

Hücre pasajı pipetajlanıp içerisinden alınan 5 ml lik kısım 200 G de 8 dakika santrifüj edildi. Bir başka tüp içerisine az miktarda alınan kültür örneğinden sayım yapılabilmesi için hemositometre lamı üzerine bir miktar hücre kültüründen alınan örnek damlatıldı ve sayım için mikroskoba yerleştirildi(Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Hemositometre lamı

Mikroskopta sayım yapılabilmesi için mikroskop altında 0,1 mm^3 hacimde sayım yapılarak bu hesaplama yardımıyla numunenin bir ml'sinde bulunan hücre sayısını belirlenmektedir.



Şekil 3.4: Hemositometrenin sayım yapılan kareleri

Sayım işlemi için hemositometre üzerinde bulunan sayım bölgelerinden faydalanılır (Şekil 3.4). Sayım bölgesinin toplam alanı 1 mm^2 dir. Lamel yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de 0,1 mm olur. Sayım işlemini daha da kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür.

Hücre sayımı sonucu elfe edilen hücre sayısı verileri ile yeni flaska ekilecek hücre oranı belirlendi ve flaska yeterli hücre eklenip üzeri medyum ile tamamlandı. Hücre içerisinde bulunan toplam sıvının %10 kadar serum eklendi. Elde edilen flask etüve yerleştirildi.

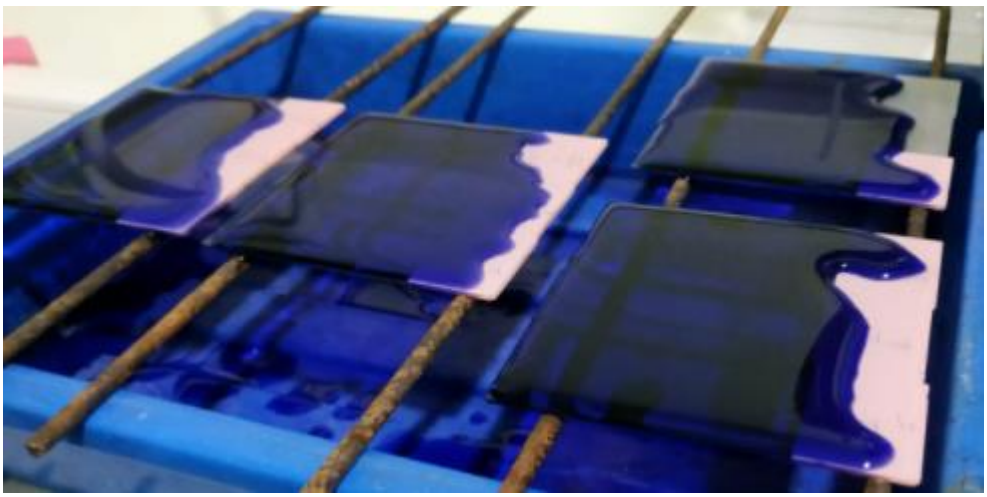
3.3.DENEY SÜRECİ

Kültüre alınan hücrelere toksikolojik hasarına bakabilmek için deneyin başlangıcı olan 0. Saatte Çinko Oksit NP (ZnO NP), Titanyum Dioksit (TiO_2) ve Gümüş NP (Ag NP) uygulanmıştır. 30 dk CO_2 içeren etüvde bekletildikten sonra kültürlere 1 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi hücreler için hazırlanmış medyum ile yapıldı. Flaskların içerisine kullanılan toplam hacmin %10 u kadar serum eklendi. Deneyin 4. Saatinde hücrelerdeki sitokinezi durdurmak için 3 µg/ml Cytochalasin-B uygulaması yapıldı. Hücreler tekrardan CO_2 içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.5).

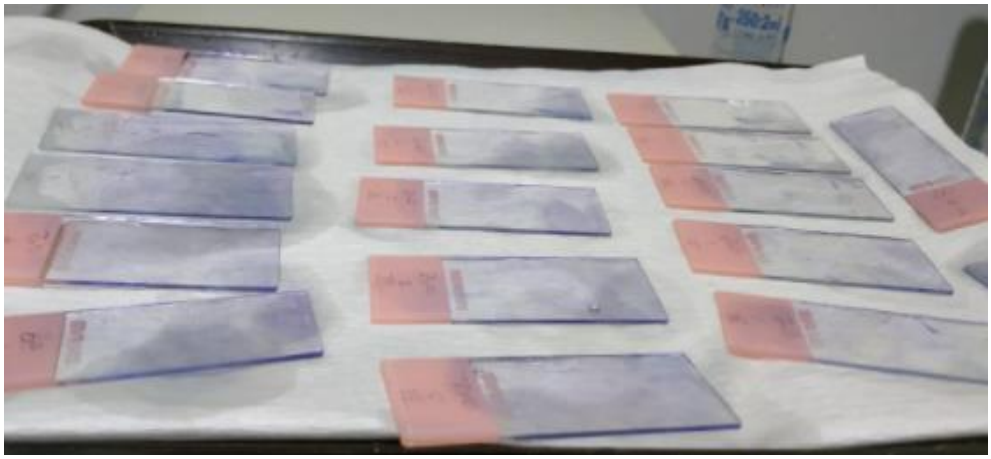


Şekil 3.5: Deney sonrası flasklardaki hücre kültürü görüntüsü

Deneyin 48. Saatinde inkübasyon süresi sonlandı ve fiksasyon işlemlerine geçildi. İnkubasyon süresi dolan hücreler, deney tüplerine alındı 200 g'de 8 dk santrifüj edilerek süpernatan kısımları atıldı ve tüplere 0,075 M soğutulmuş 5 ml'lik KCl çözeltisi eklenip 8 dk santrifüjleme işlemine devam edildi. Bu işlem sonunda süpernatant kısmı tekrar atılıp pellete 7:1 oranında soğuk metanol-asetik asit karışımı uygulandı. Uygulama esnasında deney tüpleri, hücrelerin birbirinden tamamen ayrılabilmesi için vortex ile muamele edildi. 2 tekrar halinde uygulandıktan sonra buzlu lamlara hücreler damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruma gerçekleştikten sonra fosfat tamponlu %5'lik Giemsa boyası ile hücre preperatları 5 dk muamele edildi (Şekil 3.6). Süre sonunda preperatlar saf su ile yıkanarak en az 24 saat kurumaya bırakıldı (Şekil 3.7). Lamlar tamamen kuruduktan sonra Entellan ile üzerine lamel kapatıldı, 24 saat kurumaya bırakıldı ve sayıma hazır hale getirildi.



Şekil 3.6: Boyama esnasında %5'lik Giemsa boyasında bekletilen preperatlar.



Şekil 3.7: Boyama işlemi biten ve kurumaya bırakılmış preperatlar.

Bu işlemler Çinko Oksit NP, Gümüş NP ve Titanyum Dioksit NP için farklı dozlarda ayrı ayrı tekrar edildi. Kullanılan dozların her seti 3'er kez tekrar edildi.

Çinko Oksit NP nin hücrelere etkisi deneyinde ilk olarak etki edilen dozları belirleyebilmek için toplam 12 flask ile 5 µg/ml ile 500 µg/ml lik dozlar uygulanmıştır. Etki görülen dozlar üzerinden her deneyde 5 doz kullanılacak şekilde deney 3 kere tekrar edilmiştir. Fazla deformeye sebebiyet verecek yüksek dozlu yapılar diğer setlerde kullanılmamıştır. ZnO NP için belirlenen dozlar 5, 10 ,20, 30 ve 50 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Gümüş NP nin hücrelere etkisi deneyinde ilk olarak etki eden dozları belirleyebilmek için toplam 12 flask ile 2,5 µg/ml ile 300 µg/ml lik dozlar uygulanmış ve etki görülen dozlar üzerinden her deneyde 5 doz kullanılacak şekilde deney 3 kere tekrar edilmiştir. Ag NP için belirlenen dozlar 2,5; 5; 10; 25 ve 50 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Titanyum Dioksit (TiO_2 NP) nin hücrelere etkisinin araştırıldığı deneyde ilk olarak etki eden dozlar belirlenmiş, daha sonra bu dozlar üzerinden 5 doz kullanılarak deney 3 kere tekrar edilmiştir. TiO_2 NP için belirlenen dozlar 25, 50, 75, 100 ve 125 µg/ml olarak belirlenmiştir.

3.4. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

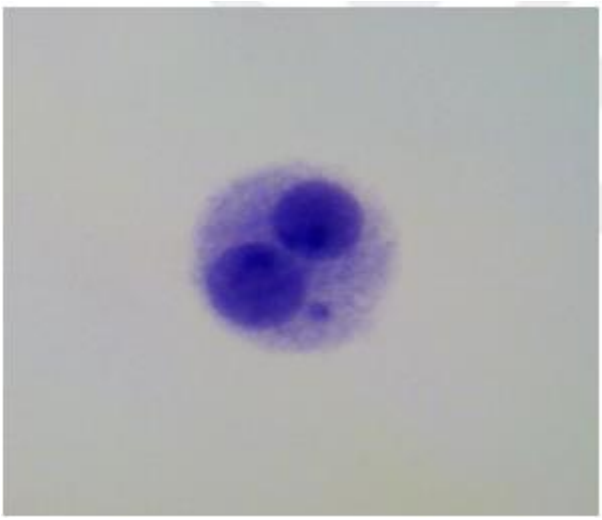
Sayım işlemleri Nikon E100 ışık mikroskobunda gerçekleştirilmiştir. Hücreler x400 büyütmede incelenmiş, mikronükleusların teyidi x1000 büyütmede gerçekleştirilmiştir. Uygulanan kimyasal dozların etkisine kültür sonrası elde edilen BN hücrelerdeki MN frekansları kendi aralarında değerlendirildi. Her bir doz için 2000 binükleat hücre sayılmaya çalışılmış ve içerdikleri mikronükleuslar değerlendirilmiştir.

Ayrıca gözlemlenen bir, üç, dört, beş ve daha fazla çekirdeğe sahip hücrelerin yanı sıra skorlanabilir binükleat sınıflandırmasına girmeyen iki çekirdekli hücreler de kayıt altına alınmıştır. Mikronükleus içeren hücrelerin preparat üzerindeki koordinatlarıyla belirlenmiş, değerlendirilen bütün preparatlar için proliferatif indeks (Pİ) ayrı ayrı hesaplanmış, her bir dozun ve kontrol grubunun Pİ değeri birbiriyle karşılaştırılıp doza göre sağ kalım grafikleri elde edilmiştir.

$$Pİ = (M1 + 2M2 + 3 M3 + 4 M4 + 5M5) / N$$

(Denklem 3.1.)

M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks, N; toplam hücre sayısı [82].



Şekil 3.8: TiO_2 nanopartiküllerininTK-6 hücre lenfositlerinde oluşturduğu 1 mikronükleuslu binükleat hücre.

Değerlendirme için Fenech ve diğ. (2003)'nin "HUMN Projesi" (Human MicroNucleus Project) araştırmasında belirlenen kriterlere göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.9). Bu araştırma ile oluşturulan platform ile farklı araştırmacı veya kurumların çalışmalarını diğer araştırmalar ile karşılaştırılabilmesi hedeflenmiştir. Bu projeye göre skorlanabilen BN lenfosit belirleme kriterleri şu şekildedir:

1. Hücre 2 çekirdek bulundurmalıdır.

2. Çekirdeklerin zarları sağlam ve belirgin olmalı, iki çekirdek de aynı sitoplazma sınırları içinde bulunmalıdır.

3. Çekirdeklerin büyüklüğü ve boyanma yoğunlukları yaklaşık eşit olmalıdır.

4. Eğer çekirdekler arasında nükleoplazmik köprü var ise, genişliği çekirdeklerin çapının 1/4'ünden daha geniş olmamalıdır.

5. Çekirdekler birbirleri ile temas edebilirler; eğer birbiri üzerine denk gelmiş durumda iseler çekirdek sınırları açıkça görünür halde olmalıdır.

6. Hücrelerin sitoplazmaları tam, açıkça görünür ve diğer hücrelerden ayrılabilir durumda olmalıdır [80].

Projenin mikronükleus skorlama kriterleri de şu şekildedir:

1. Mikronükleusun çapı, çekirdeklerin çapının 1/16'sından daha çok, 1/3'ünden de daha az olmalıdır.

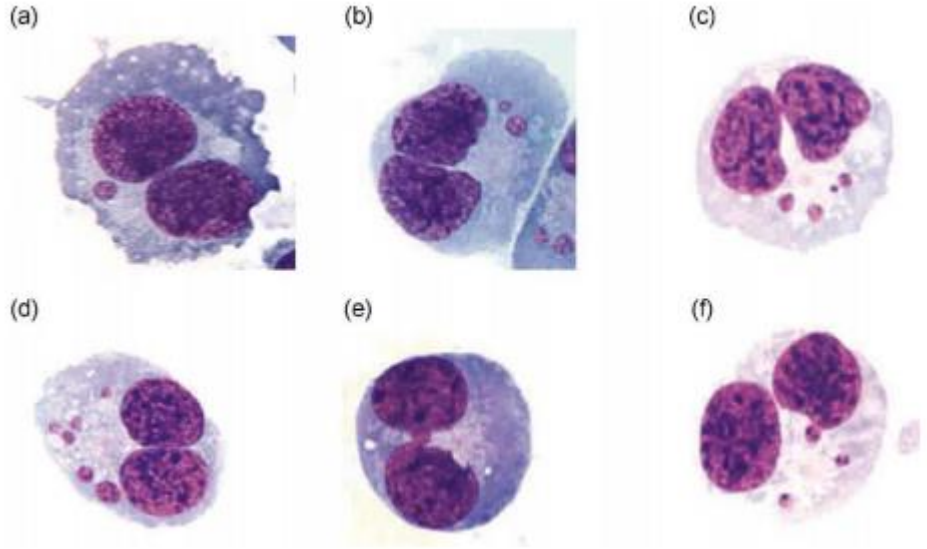
2. Belirlenen mikronükleuslar yuvarlak veya oval şekilde olmalıdır.

3. Mikronükleuslar ışığı kıramaz. Bu durum göz önünde bulundurularak, gözlemlenen mükronükleuslar boya partikülleri veya boyanmış toz zerrecikleri gibi ışığı kıran parçacıklardan ayrıştırılmalıdır.

4. Gözlemlenen mikronükleuslar çekirdeklere bağlanmış veya çekirdekle birleşmiş halde bulunmamalıdır.

5. Mikronükleuslar çekirdek ile temas edebilir fakat çekirdekle üst üste gelmemelidir ve çekirdekle mikronükleusun sınırları tam olarak ayrıştırılmalıdır.

6. Mikronükleuslar genellikle çekirdekle aynı oranda boyanmış olmalıdır fakat bazen daha koyu boyanmış olabilirler [80].



Şekil 3.9: Işık mikroskobu altında binükleat hücrelerde gözlemlenen ve değerlendirilebilir durumda olan mikronükleuslar [80].

3.5. İSTATİSTİKSEL METOT

Deneyler sonucu elde edilen veriler Graphpad programıyla değerlendirilmiştir. Pİ verilerinin istatistik karşılaştırılmalarında regresyon analizi kullanılmıştır. Farklı her bir metal için ayrıca grafik oluşturulmuş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Buradaki amaç, söz konusu metallerin TK-6 hücrelerinin çoğalmasına etkilerinin farklı dozlarda korelasyon gösterip göstermediğinin değerlendirilebilmesidir. Mikronükleus oluşumlarının değerlendirilmesi için regresyon analizi uygulanmıştır. Her bir metalin her bir dozu, kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

Çinko Oksit NP ye ait veriler Tablo 4.1 üzerinde gösterilmiştir. Tüm dozlarda BN sayısı olarak maksimum 2000 hücre sayılmaya çalışılmıştır.

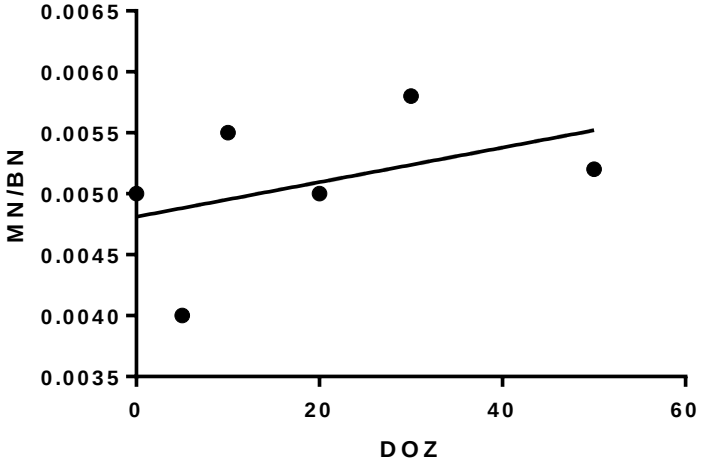
Tablo 4.1: Çinko Oksit Nanopartikülü Sayım Sonuçları.

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz µg/ml	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	2000	10	0.0050	1398	425	1025	823	174	1.61
2	5	2000	8	0.0040	1481	400	1118	645	155	1.54
3	10	2000	11	0.0055	1512	315	1216	750	153	1.60
4	20	2000	10	0.0050	1401	381	1084	811	140	1.60
5	30	1869	11	0.0058	1376	398	976	850	172	1.65
6	50	1912	10	0.0052	1445	450	1053	779	161	1.62

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks

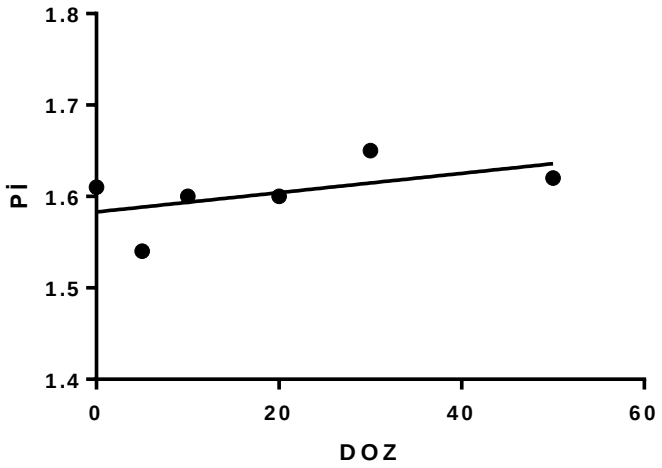
Tablo 4.1'de hücreye verilen farklı çinko oksit dozları sonrası sayılan MN'ler gösterilmektedir. Doz arttıkça hücrelerdeki BN sayıları azalması sebebiyle belirlenen 2000 MN sayısına ulaşılamamıştır. Ayrıca artan doz ile birlikte sitoplazma bütünlüğü bozulmuş hücreler sayım kriterlerine uymadığı için göz ardı edilmiştir.

Doz- Cevap eğrisinde bir korelasyon görülmemesine rağmen doz arttıkça BN ve diğer hücre sayılarındaki azalma meydana gelmesinin sebebi ise laboratuvar şartlarında pipetajlama ve fiksasyon aşamalarının ve Çinko Oksit Nanopartikülünün hücrelere maruziyet süresi ile ilgisi bulunmaktadır. İşlem sırasında kontrol dozundan başlayarak işlem yapılmaktadır ve 5. Doz miktarına geldiğimizde muamele süresinin biraz üzerine çıkılmaktadır. Deney setlerinin asıl dozlarını belirlemeden öncesinde uygulanan yüksek dozlarda ve yarım saatlik muamele süresinin uzatıldığı durumlarda sitoplazma deformasyonu artmış, tanımlı hücre kriterlerine uygun hücre profili seçmemiz zorlaşmıştır.



Şekil 4.1: Çinko Oksit Nanopartikülü MN/BN- Doz **(µg/ml)** ilişkisi.

Belirlenen dozlarda MN/BN oranında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Lineer çizim yöntemi ile çizilen grafikte Çinko Oksit MN/BN oranı için hesaplanan r^2 değeri 0,18 bulunmuştur.



Şekil 4.2: Çinko Oksit Nanopartikülü Pİ – Doz **(µg/ml)** ilişkisi.

Yapılan grafik çalışmalarında Çinko Oksit Nanopartikülünün Pİ değerleri için belirlenen r^2 değeri 0,29 olarak hesaplanmıştır. Deney sonuçlarına ait verilerin eğrileri, istatistiksel olarak Çinko Oksit için en iyi fit veren lineer çizimde uygulanmıştır. Tercih edilen doz miktarları arttıkça MN/BN ve Pİ değerlerinde anlamlı bir artış meydana gelmemiştir.

Gümüş NP ye ait sayım verileri Tablo 4.2 üzerinde gösterilmiştir. Preperatlarda maksimum 2000 BN hücresi sayılmaya çalışılmıştır.

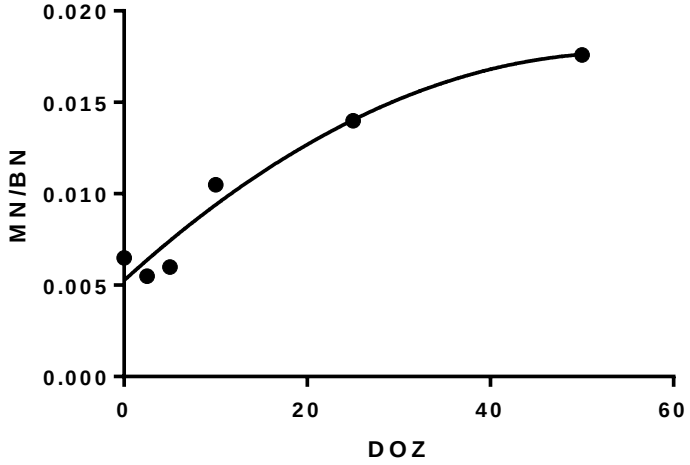
Tablo 4.2: Gümüş Nanopartikülü Sayım sonuçları.

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz µg/ml	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	2000	13	0.0065	1538	303	645	659	158	1.41
2	2.5	2000	11	0.0055	1411	341	812	500	98	1.47
3	5	2000	12	0.0060	1301	320	591	712	161	1.44
4	10	1712	18	0.0105	1105	348	550	691	151	1.52
5	25	1348	19	0.0140	1214	405	585	747	103	1.64
6	50	1192	21	0.0176	1091	362	715	819	141	1.82

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks.

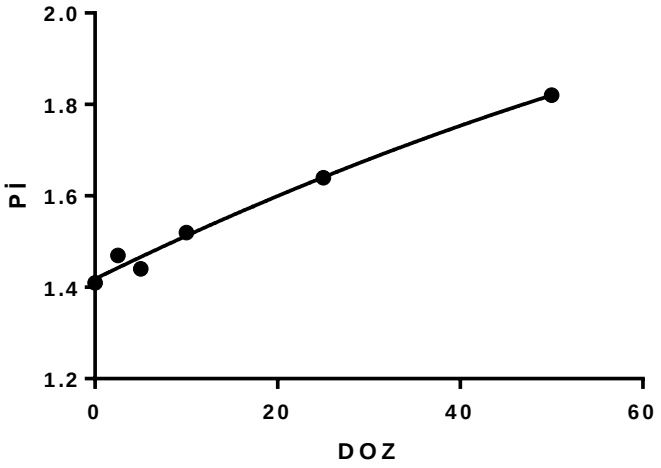
Tablo 4.2'de hücreye verilen farklı gümüş nanopartikülü dozları sonrası sayılan MN'ler gösterilmektedir. Doz arttıkça hücrelerdeki BN sayıları azalması sebebiyle belirlenen 2000 MN sayısına ulaşılamamıştır. Bunun sebebi olarak artan dozlar ile birlikte sitoplazma ve çekirdek bütünlüğünün azalması ve hücre seçim kriterlerine uygunsuzluk gösterilebilir.

Çinko Oksit Nanopartikülünde uygulanan aynı laboratuvar şartları Gümüş ve Titanyum Dioksit molekülleri içinde geçerlidir fakat onlarda ki korelasyon MN/BN ve Pİ değerlendirmeleri için anlamlıdır. Son dozlarda maruziyet süresi 30 dakikalık sürenin dışına çıksa da aynı zamanda doza bağlı MN/BN oranında da artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.3: Gümüş Nanopartikülü MN/BN- Doz (µg/ml) İlişkisi.

Gümüş Nanopartikülü için GraphPad programı yardımı ile ikinci derece quadratic modelde grafik çizilmiştir. Belirlenen dozlarda MN/BN oranında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir. Gümüş Nanopartikülü MN/BN oranı için hesaplanan r^2 değeri 0.95 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4: Gümüş Nanopartikülü Pİ –Doz **(µg/ml)** İlişkisi.

Yapılan grafik çalışmalarında Gümüş Nanopartikülünün Pİ değerleri için belirlenen r^2 değeri 0,98 olarak hesaplanmıştır. Deney sonuçlarına ait verilerin eğrilerinde, istatistiksel olarak Gümüş NP için en iyi fit veren çizim uygulanmıştır. Tercih edilen doz miktarları arttıkça MN/BN ve Pİ değerlerinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Yani Doz-Cevap eğrileri dikkate alındığında kimyasal ile dozlar arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir.

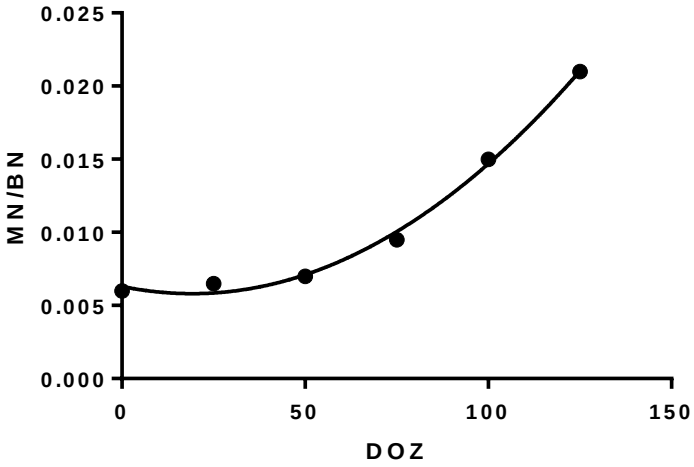
TiO_2 NP ye ait sayım verileri Tablo 4.3 üzerinde gösterilmiştir. Preperatlar üzerinde her doz için maksimum 2000 BN hücresi sayılmaya çalışılmıştır.

Tablo 4.3: Titanyum Dioksit Nanopartikülü Sayım Sonuçları.

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz µg/ml	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	2000	12	0.0060	1273	251	802	602	125	1.42
2	25	2000	13	0.0065	1195	217	852	503	142	1.40
3	50	1713	12	0.0070	893	193	645	496	108	1.41
4	75	1465	14	0.0095	945	231	712	455	118	1.51
5	100	1265	19	0.0150	715	191	512	394	92	1.46
6	125	854	18	0.0210	572	124	382	351	72	1.57

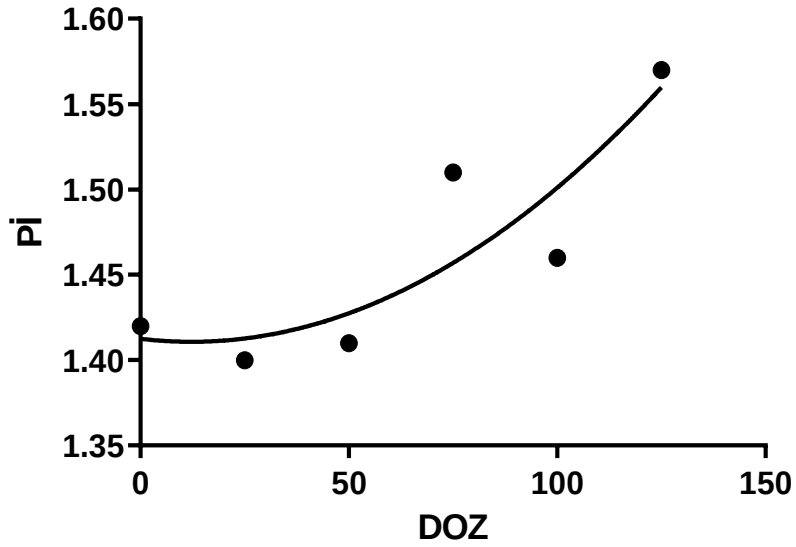
BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks.

Tablo 4.3'de hücreye verilen farklı Titanyum Dioksit nanopartikülü dozları sonrası sayılan MN'ler gösterilmektedir. Doz arttıkça hücrelerdeki BN sayıları azalmaktadır. Bunun sebebi olarak; diğer nanopartiküllerde olduğu gibi artan dozlar ile birlikte sitoplazma ve çekirdek bütünlüğünün azalması ve hücre seçim kriterlerine uymayan hücre parçaları sayısında artış meydana gelmesidir.



Şekil 4.5: Titanyum Dioksit Nanopartikülü MN/BN-Doz **(µg/ml)** İlişkisi.

Titanyum Dioksit Nanopartikülü için GraphPad programı yardımı ile ikinci derece quadratic modelde grafik çizilmiştir. Belirlenen dozlarda MN/BN oranında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir, r^2 değeri 0.99 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6: Titanyum Dioksit Nanopartikülü Pİ –Doz (µg/ml) İlişkisi.

Yapılan grafik çalışmalarında Titanyum Dioksit Nanopartikülünün Pİ değerleri için belirlenen r^2 değeri 0,76 olarak hesaplanmıştır. Deney sonuçlarına ait verilerin eğrilerinde, istatistiksel olarak Titanyum Dioksit NP için en iyi fit veren ikinci derece quadratic çizim uygulanmıştır. Tercih edilen doz miktarları arttıkça MN/BN ve Pİ değerlerinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Yani Doz-Cevap eğrileri dikkate alındığında kimyasalın dozları ile kromozom hasarı ve Pİ arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir

TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda yapılan çalışmalar nanomateryallerin sahip olduğu boyut, şekil, yüzey alanı, çözünebilme kapasiteleri, asidik- bazik ortam tepkimeleri gibi fizikokimyasal özelliklerinin biyolojik yapı üzerinde etkili olabileceklerini göstermektedir. Kullanım alanı dünyaca yaygınlaşan nanomateryal tabanlı ürünlerin oluşturabileceği zararlar ve riskler bilim dünyasında zamanla endişe yaratmaya başlamıştır.

Nanoteknolojik ürünler hayatımıza bu denli yaygın şekilde girmeye başladığı için ortaya çıkabilecek risklerin belirlenmesi için gerekli çalışmaların yapılması önem kazanmıştır. Günler geçtikçe yaşamın her kısmında nanoteknolojik ürünler ile ilgili yatırımlar artmaktadır. Ancak üretimi yapılan ürünlerin toksisitesi, genotoksik ve sitotoksik hasarları ile ilgili çalışmalar halen yetersizdir [83].

Tez çalışmasının konu belirleme kısmında; Dünyada artan üretim ve tüketim fazlalığı, plastik maddelere ve dolayısıyla kimyasallara olan ekstra ihtiyaç, maruz kalınan kimyasalların oluşturduğu klinik çalışmalar, aynı zamanda da nanopartikül ürünlerin daha rahat üretilmesi ve daha konforlu bir kullanım yelpazesi sunması belirleyici olmuştur.

Bu kapsamda yapılan literatür ve laboratuvar çalışmaların da; farklı nanomateryallerin sitotoksik ve genotoksik etki mekanizmaları aynı olmamakla birlikte, her elementin kendisine özgü atomik özellikleri ve oluşturdukları moleküler yapıların kendilerine özgü bir fizyokimyasal davranış içerisinde bulunduğu bilinmektedir [84].

Bununla birlikte, günümüzde, piyasada 1800'den fazla nano ürün bulunmakta ve bu ürünlerin %37'lik kısmını metal ve metal oksit türevi nanopartiküller oluşturmaktadır. Bu partiküller arasında sosyal yaşamda en çok kullanılan üçü sırasıyla; TiO_2, SiO_2 ve ZnO şeklinde sıralanmaktadır [85].

Hücreye giren nanopartikül yapıları, hücre içerisinde serbest hareket edebilmekte, maruz kalınan doz yoğunluğuna bağlı olarak organel ya da DNA'ya hasar vererek hücrenin ölümüne neden olabilmektedir [86]. Tez çalışma nanopartiküllerini genel anlamda düşündüğümüzde belirli bir doza kadar MN oluşumunda anlamlı bir değişim meydana gelmemektedir

Titanyum dioksit incelemesinde TK-6 lenfoblast hücreleri için belirli süre muamelesi sonucunda meydana gelen sitolojik ve genotoksik etkiler incelenmiştir. Doz belirleme aşamasında literatür taranmış ve uygun görülen dozlarda 12 farklı doz birimi uygulanmıştır. Fakat 125 µg/ml nin üzerinde ki dozlarda sitoplazma ve çekirdek zarı deformasyon hasarları çok belirginleşmiş ve MN bulma kriterlerine uygun hücreler bulmakta zorluk çekilmiştir.

Doz süreleri için belirleme yapılırken; in vitro ortamdaki TK-6 lenfoblast hücreleri normal insan lenfositlerine göre daha hassas yapıya sahip oldukları için, kimyasallara muamele süresi yarım saat ile sınırlandırılmıştır. Yarım saatlik muamele süresi belirlenmesi yapılmadan önce belirli dozlar ile 1 saatlik, 2 saatlik muameleler de yapılmıştır. Fakat muamele süresi arttıkça meydana gelen hücresel dezenformasyon sonrası MN kriterlerine uygun hücreler bulunmakta zorluk çekilmiştir. Bu yüzden 0, 25, 50, 75, 100 ve 125 µg/ml lik dozlar yarım saat boyunca hücrelere uygulanmıştır.

Genel olarak genotoksik etki düşünüldüğünde hücreler ilk mitoz bölünmeleri esnasında, nanomalzemeyi çekirdeğe ulaştırmış hücrelerde direkt etki görülmesede ikincil genotoksik etkiyi yükselen dozlarda yansıtmıştır [87]. TiO_2 NP deney düzeneğine göre Pİ değerinde ve MN/BN oranında anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Yapılan regresyon analizi sonucunda özellikle 75 µg/ml lik dozdan itibaren belirgin bir korelasyon artışı meydana gelmiştir. Kısa süreli maruziyetlerde dahi TiO_2 NP'ye maruz kalan hücreler hem genetiksel olarak hem de sitoplazma ve organel bütünlüğü olarak etkilenmişlerdir.

Tasarlanmış nanomalzemelerin neden olduğu kromozom hasarına ilişkin bir çok çalışma, genellikle mikronükleus testi ile gerçekleştirilmiştir [88]. Çalışmadaki sonuçlar bize metal oksit özelliği taşıyan TiO_2 nin küçük dozlar da dahi (25-125 µg/ml) mikronükleus sıklığını artırdığını göstermiştir. Ayrıca nano boyutlu TiO_2 'nin genotoksik etkilerine dair kanıtlar mevcuttur. Nano boyutlu TiO_2'nin çeşitli formları in vitro ortamlardaki hücrelerde DNA hasarına neden olmuştur [89].

Nanoboyutlu TiO_2 anataz, hücre hatları ile yapılan çoğu çalışmada mikronükleuslara sebep olmuştur [90]. Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda anataz forma sahip TiO_2 NP'lerinin daha toksik olduğuna dair veriler tespit edilmiştir [94]. Bu yapılan tez çalışmasında TiO_2 NP nin anataz formu literatür çalışmalarına istinaden özellikle tercih edilmiştir. Deney sonrası yapılan değerlendirmede mikronükleus oluşum sıklığı (r^2=0.99) ile doz arasında anlamlı bir

ilişki olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 75 µg/ml dozu ve daha yüksek dozlara çıkıldıkça hem MN artışı hem de MN/BN hücre sıklığında bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu rakamlar literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

İki farklı metal oksit olan SiO_2 ve TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla, bu partiküllerin 0,5 ve 1 µg/mL'lik konsatrasyonlarının insan lenfositlerine uygulandığı bir araştırmada, her iki nanopartikülün, hem mikronükleus ve diğer nüklear anormallikleri tetiklediği hem de yüksek konsantrasyonların proliferasyon indeksinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir [93]. MN frekansındaki artış ile çeşitli kanserlerin oluşumu arasında pozitif bağlantı olduğu belirlenmiştir [83].

Yapılan bu gibi bir çok çalışmalar ışığında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, sıçanlarda akciğer kanseri indüksiyonunu dayanak olarak kabul ederek, deney hayvanları için yeterli kanıtla TiO_2'yi insanlar için olası kanserojen (sınıf 2B) olarak sınıflandırmışlardır [91][92].

TiO_2 NP ile yapılan laboratuvar çalışmasında uzun vadede TiO_2 NP ye maruziyette MN frekansında ki artışa bağlı olarak hücrelerde farklı kanser gruplarına ait olgular saptanabilir. Tabiki bu kanser olgularının oluşmasındaki asıl sebebin TiO_2 NP kaynağı ile ilişkili olup olmadığı yağılacak ayrıntılı testler ile belirlenmesi gerekmektedir.

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri günlük hayatta; boya, pigment, metalurji katkı maddeleri, kauçuk, alaşımlar endüstriyel alanlarda en yaygın kullanılan malzemelerden biridir [95]. ZnO nanopartikülleri belirli UV dalga boyu aralıkları arasında soğurma özelliklerine sahip olması nedeni ile güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [96].

Diğer yandan ZnO, günümüzde genellikle düşük toksisiteli malzeme olarak kabul edilmektedir. Çünkü çinko insan vücudunda bulunması gereken temel bir eser elementtir ve gıdalarda geniş kapsamlı olarak rastlanılmaktadır ve ayrıca bir besin takviyesi olarak normal hayatta kullanılmaktadır. Bu nedenle çinko nanopartiküllerin toksisite değerlendirmesi fazla ilgi çekmemektedir [95]. Çinko oksitin toksik olmadığı çok yaygın olarak kullanılır bu yüzden ZnO nanopartikülleri hakkındaki toksikolojik çalışmalar çok yavaşlamıştır [97]. Günümüzde Çinko Oksit NP toksisite çalışmalarına daha fazla yer verilmelidir.

Yapılan çalışmaların yetersiz olması ve sürekli dışarıdan aldığımız Çinko kaynaklarının hayatımızın vazgeçilmez bir parçası haline gelmesi sebebi ile bu tez çalışmasında Çinko Oksit NP'ye ve onun yarattığı etkilerin tespitine yönelik çalışma da yapılmıştır..

Bazı araştırmacılar, ZnO NP'larının toksik olmadığını öngörmekle birlikte, diğer araştırmacılar farklı bir çok insan hücre kültürlerinde yüksek konsantrasyonlarda hem sitotoksik hem de genotoksik etkilerinin olduğunu belirtmektedirler[99][100][101]. Yapılan birkaç in vitro çalışmada insan hücrelerinde ZnO nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerini (ROS) tetikleyerek apoptozise neden olduğu tespit edilmiştir [98].

In vitro genotoksik ve sitotoksik etkilerin çalışıldığı bir çok çalışmada, ZnO NP'ların hücreler tarafından alınmadığı vurgulanmıştır. Tez çalışmasında yer verilen ZnO NP dozlarına bakıldığında (0, 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml); MN/BN sıklıkları kullanılan dozlar için anlamlı bir fark yaratmamıştır (r^2=0.18). Kullanılan dozlar ile MN sıklığı arasında anlamlı bir korelasyon yoktur. Buna rağmen tez çalışmasında küçük dozlar kullanılmasının sebebi günlük hayattta sürekli hayatımızın bir parçası olan Çinko Oksit NP'nin bu dozları ile canlıların sık sık karşılaşmasıdır.

Yapılan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde doz-MN/BN oranının anlamlı bir farklılık göstermemesinin nedeni olarak; maruziyet süresinin yarım saatle sınırlı kalması, hücrelerin in vivo ortamlardaki gibi daha farklı ajanlara maruz kalmaması, hücre soyunun en verimli dönemlerinde olması ve belirli bir miktar nanopartikülü tolere etmesi gösterilebilir. Çalışma değerlendirme aşamasında hücreler sayılırken genellikle sitoplazma ve çekirdek bütünlüğü önem arz etmektedir. İkincil deformasyonu anlayabilmek adına daha ayrıntılı testlerin yapılmasına ihtiyaç vardır.

Literatürde Çinko Oksit Nanopartikülünün lenfositler ile yapılan çalışmalarında özellikle 30 µg/ml ve sonrası dozlarında 48 ve 72 saatlik doz muamelelerinde anlamlı hasarlar meydana gelse de bu tez konusu için yapılan çalışmada yarım saatlik kimyasal maruziyette belirlenen dozlarda anlamlı bir farklılık çıkmamıştır.

Gümüş nanopartikülleri (AgNP), günümüzde üretilen tüm nanopartiküllerin yaklaşık %55'ini kapsayarak aktif olarak kullanılan nanomalzemelerin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Özellikle; antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikteki malzemelerde, tekstil ve biyositlerden kişisel bakım ürünlerine kadar geniş bir yayılış göstermektedirler [102].

Dünya genelinde meydana gelen COVİD-19 salgını ile özellikle dezenfektanlar ve antiviral özellikteki temizlik ürünleri ile birlikte gümüş nanopartiküllerine olan maruziyet süresi, ihtimali ve devamlılığında artış meydana gelmiştir. Tez çalışmasında Ag NP nin kullanılma amacı; özellikle son dönemde hayatımızın bir parçası olan temizlik ürünleri vb. gibi birçok alanda kullanılan gümüş nanopartiküllerinin meydana getirdiği toksik etkileri incelemektir.

Arora ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2008) insan bağ doku kanser hücreleri ve insan deri kanseri hücreleri ile 7-20 nm boyutlu AgNP'leri arasında ilişki olduğunu göstermiştir.. Elde edilen veriler doğrultusunda insan bağ doku kanser hücreleri için IC50 değeri 10,6 µg/ml, insan deri kanseri hücreleri için IC50 değeri 11,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır [103].

Sukirtha ve arkadaşları (2012), AgNP'lerin HeLa hücrelerinin poliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için çeşitli analizler yapmışlardır. AgNP'lerin doz konsantrasyonundaki artışı HeLa hücrelerinde hem sitotoksik hem de genotoksik etkinin artmasına neden olmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda AgNP uygulamasında IC50 değeri HeLa hücreleri için 300 µg/ml olarak hesaplanmıştır [104].

Bu tez çalışması sonucu elde edilen sonuçlara bakıldığında Ag NP için özellikle 10 µg/ml ve sonraki dozlarda sitoplazma bütünselliği ve çekirdek zarı bütünselliği azalmaya başlamış bununla bağlantılı olarakta MN/BN-doz ilişkisi eğrisinde anlamlı bir korelasyon tespiti yapılmıştır (r^2=0.95). Artan doz miktarı ile mikronükleus miktarında artış meydana gelmiştir. Yani artan konsantrasyon ile birlikte hücrede meydana gelen hasar anlamlıdır. Dolayısı ile küçük dozlarda bile olsa AgNP hücre içerisine alınabilir. Bununla birlikte uzun süreli maruziyet ile birlikte toksikolojik açıdan bir risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

Kullanılan nanopartiküller her ne kadar hayatımızda çok sık kullanılsada hücreler için maruziyet-tepki süreçleri farklılık gösterebilmektedir. Özellikle yumuşak doku olarak adlandırılan ve dış dünya ile temas eden bölgelerde maruziyet daha fazladır. Bu yüzden genellikle literatür çalışmalarında akciger hücreleri kullanılmıştır. Fakat bu çalışmalarda in vivo ortamda durum sabitlemesi yapılamadığı için ortamda maruziyet yapıcı kimyasal dışında bir çok farklı değişkende mevcuttur.

Günlük hayattaki nanopartiküle maruziyet en fazla deri yolu ile vücuda giriş yapmaktadır. Kullanılan deterjanlar, parfümler, kozmetik ürünleri, güneşe maruziyet, temizlik ürünleri ve dezenfektan ürünleri gibi yolaklar kullanılarak bir çok farklı ayrı bölgeden vücuda giriş

sağlanmaktadır. Vücuda alım oranları ise canlının sıcaklık degerine, vücudunda bulunan gözenek yapısına ve temas sürelerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Artan Dünya nüfusu ve sanayileşme ile birlikte nanopartiküllerin hayatımızdaki önemide gün geçtikçe artmaktadır. Kimyasalların verdiği hasarların anlaşılabilmesi adına daha sık ve daha ayrıntılı testlerin yapılması gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

[1]. Feyman RP. The pleasure of finding things out. Helix Books Perseus Publishing, ISBN: 0-7382-0349-1 Cambridge, Massac- husetts, 1999: 151-70.

[2]. Zhang, L., Gul, X.F., Chan, M.J., Wang, Z.A., Langer, S.R., Farokhza, D. (2008) Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. Translational Medicine, 8(5), 761-769

[3]. Seaton A, Donaldson K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. Lancet 2005; 365: 923-4.

[4]. Kalemtas A. Gıda Ambalajlarında Nanoteknoloji Uygulamaları, Research Gate Article, December 2019

[5]. Fenech, M. and Morley, A.A., 1986, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 161 (2), 193-198.

[6]. Pal, L.S., Jana, U., Manna, K.P., Monahta, P.G., Manavalan, R. (2011) Nanoparticle: An Overview of Preparation and Characterization. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(6), 228-234.

[7]. Köksal, F., Köseoğlu, R. (2014) Nanobilim ve Nanoteknoloji. Nobel Akademik Yayıncılık, 1, 1.

[8]. Auffan, M., Rose, J., Bottero, Y.J., Lowry, V.G., Jolivet, P.J., Weisner, R.M. (2009) Towards a Definition of Inorganic Nanoparticles from an Environmental, Health and Safety Perspective. Nature Nanotechnology, 4, 634-641

[9]. Pernodet, N., Fang, X. H., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., Rafailovich, M. (2006) Adverse Effects of Citrage/gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts. Small, 2(6), 766-773.

[10]. Demirtaş-Korkmaz F, Titanyum dioksit ve Çinko Oksit Nanopartiküllerinin in vitro İnsan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi,Gazi Üniversitesi, Ankara 2012

[11]. Sozer, N., Kokini, J.L., "Nanotechnology and its applications in the food sector", Trends in Biotechnology, 27: 82-89 (2009)

[12]. Demirtaş-Korkmaz F, Titanyum dioksit ve Çinko Oksit Nanopartiküllerinin in vitro İnsan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi,Gazi Üniversitesi, Ankara 2012

[13]. Nanoteknoloji 1 Nanoteknolojinin Temelleri, ISBN 978-975-6992-80-7 1.Baskı – Eylül 2018

[14]. Kato, S., Taira, H., Aoshima, H., Saitoh, Y., Miwa, N., "Clinical evaluation of fullerene-C60 dissolved in squalane for anti-wrinkle cosmetics", Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 10: 6769-74 (2010)

[15]. Doak, S.H., Liu, Y., Chen, C., "Genotoxicity and Cancer", Adverse Effects of Engineered Nanomaterials 1st ed., Edited by: Fadeel, B., Pietroiusti, A., Shvedova, A., Academic Press, USA, 243-261 (2012)

[16]. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. J PharmPharmacol. 2008; 60: 977–85.

[17]. Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. J PharmBioallSci 2010; 2: 282-9

[18]. Fernández-García, M., ve Rodriguez, J.A. (2011). Metal oxide nanoparticles. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, 1-22.

[19]. https://nanoteknoloji.org/metal-oksit-nanopartikulleri/

[20]. Bueza, C., Pacheco, I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointherphases, 2(4), 18-65.

[21]. Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives, 113(7), 823-839.

[22]. Atha, D. H., Nagy, A., Steinbrück, A., Dennis, A. M., Hollingsworth, J. A., Dua, V., Iyer, R. and Nelson, B. C. (2017). Quantifying engineered nanomaterial toxicity: comparison of common cytotoxicity and gene expression measurements. Journal of Nanobiotechnology, 15(1), 79.

[23]. (Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives, 113(7), 823-839.)

[24]. Jeng H.A. ,Swanson J. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. Journal of Environmental Science and Health Part A · December 2006

[25]. Ahamed, M., AlSalhi M. S., and Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. Chilinica Chemica Acta, 411, 1841-1848.

[26]. Haase, A., Dommershausen, N., Schulz, M., Landsiedel, R., Reichardt, P., Krause, B. C., Tentschert, J., and Luch, A. (2017). Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO2, ZrO2 and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. Archives of Toxicoogyl, 91(12), 3991-4007.

[27]. Oesch, F., and Landsiedel, R. (2012). Genotoxicity investigations on nanomaterials. Arch Toxicol, 86(7), 985-994.

[28]. Pietroiusti, A., Bergamaschi, E., Campagna, M., Campagnolo, L., Palma, G. D., Iavicoli, S., Leso, V., Magrini, A., Miragoli, M., Pedata, P., Palombi, L. and Iavicoli, I. (2017). The unrecognized occupational relevance of the interaction between engineered nanomaterials and the gastro-intestinal tract: a consensus paper from a multidisciplinary working group. Particle and Fibre Toxicology, 14(1), 47.

[29]. Gea M., Bonetta S., Iannarelli L., Giovannozzi A. M., Maurino V., Bonetta S., Hodoroaba V. D., Armato C., Rossi A. M., and Schiliro T. (2019). Shape-engineered titanium dioxide

nanoparticles (TiO2-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. Food and Chemical Toxicology, 127, 89-100.

[30]. Haase, A., Dommershausen, N., Schulz, M., Landsiedel, R., Reichardt, P., Krause, B. C., Tentschert, J., and Luch, A. (2017). Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO2, ZrO2 and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. Archives of Toxicoogyl, 91(12), 3991-4007.

[31]. Arığ E. Nanoyapıda Çinko Oksit Partiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Üretim Metalurjisi ve Teknolojileri Mühendisliği Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2010 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sebahattin Gürmen

[32]. Baek M, Chung HE, Yu J, Lee JA, Kim TH, Oh JM, Lee WJ, Paek SM, Lee JK, Jeong J, Choy JH, Choi SJ. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Excretion of Zinc Oxide Nanoparticles. International Journal of Nanomedicine. 2012; 7: 3081-3097.

[33]. Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH. Comparative Absorption, Distribution, and Excretion of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles After Repeated Oral Administration. Particle and Fibre Toxicology. 2013; 10: 9.

[34]. Eskin, Ata. Çinko Oksit (ZnO) ve Gümüş (Ag) Nanopartiküllerinin Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: pyralidae) üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi.doktora tezi, Marmara Üniversitesi, 2017

[35]. Manzo S, Miglietta ML, Rametta G, Buono S, Di Francia G. Embryotoxicity and Spermiotoxicity of Nanosized ZnO for Mediterranean Sea Urchin Paracentrotus Lividus. Journal of Hazardous Materials. 2013; 254-255: 1-9

[36]. Pritchard, D.K., 2004. Literature review explosion hazards associated with nanopowders, HSL/2004/12, 22 p.

[37]. Weisbarth, R. E., Gabriel, M. M., George, M., Rappon, J., Miller, M., Chalmers, R. and et al. (2007). Creating Antimicrobial Surfaces and Materials for Contact Lenses and Lens Cases. Eye Contact Lens, 33(6), 426-429.

[38]. Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W. and et al. (2009). Nano-Silver A Review of Available Data and Knowledge Gaps in Human and Environmental Risk Assessment. Nanotoxicology, 3(2), 109-138.

[39]. Prabhu, S. and Poulose, E. K. (2012). Silver Nanoparticles: Mechanism of Antimicrobial Action, Synthesis, Medical Applications, and Toxicity Effects. International Nano Letters, 2(32), 1-10.

[40]. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. and et al. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles.

(2005). Nanotechnology, 16, 2346–2353.

[41]. Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. (2013) Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of Current Toxicological Data. Particle and Fibre Toxicology, 10(15).

[42]. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and per- sonal care products. Environ Sci Technol 46:2242–2250

[43]. Gea M., Bonetta S., Iannarelli L., Giovannozzi A. M., Maurino V., Bonetta S., Hodoroaba V. D., Armato C., Rossi A. M., and Schiliro T. (2019). Shape-engineered titanium dioxide

nanoparticles (TiO2-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. Food and Chemical Toxicology, 127, 89-100.

[44]. Akthar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.M., Ahmad, J., Alrokoyan, S.A. (2012) Zinc oxide Nanoparticles Selectively Induce Apoptosis in Human Cancer Cells Through Reactive Oxygen Species. International Journal of Nanomedicine, 7, 845–857.

[45]. Lansdown, A.B.G. (2004) A Review of the Use of Silver in Wound Dressings: Facts and Fallacies. British Journal of Nursing, 13, 6–13.

[46]. Qiang, X., Hongxia, S., Yinghua, S., Dexiang, UG., Zhang, G. (2005) Apoptosis of Spodoptera litura Larval Hemocytes Induced by Heavy Metal Zinc. Chinese Science Bulletin, 50(24), 2856-2860.

[47]. Kayhan, E.F., Muşlu, N.M., Koç, D.N. (2009) Bazı Ağır Metallerin Sucul Organizmalar Üzerinde Yarattığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar. Journal of Fisheries Sciences, 153-162.

[48]. Çiftçi, H., Türk, M., Tamer, U., Karahan, S., Menemen, Y. (2013) Silver Nanoparticles: Cytotoxic, Apoptotic, and Necrotic Effects on MCF-7 Cells. Turkish Journal of Biology, 37(5), 573-581.

[49]. Foldbjerg R, Dang AD, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. Arch Toxicol. 2011;85:743-50.

[50]. Dağlıoğlu Y, Yılmaz H.Ö., Yılmaz O, Memeli Tümör ve Normal Hücre Hatlarında Nanopartikül Uygulamaları. Arşiv KaYNAK Tarama Dergisi, 2018;27(2):136-174doi:10.17827/aktd.346216

[51]. Alarifi S, Ali D, Y AO, Ahamed M, Siddiqui MA, Al-Khedhairy AA. Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. Int J Nanomedicine. 2013;8:189-99.

[52]. Dağlıoğlu Y, Yılmaz H.Ö., Yılmaz O, Memeli Tümör ve Normal Hücre Hatlarında Nanopartikül Uygulamaları. Arşiv KaYNAK Tarama Dergisi, 2018;27(2):136-174doi:10.17827/aktd.346216

[53]. Huang, S., Chueh, P.J., Lin, Y.W., Shih, T.S., Chuang S.M., "Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO2 long term exposure", Toxicology and Applied Pharmacology, 241: 182- 194 (2009).

[54]. Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W., Hubbs, A.F., Cumpston, J.L., Chen, B.T., Frazer, D.G., Castranova, V. (2008) Nanoparticle Inhalation Augments Particle-Dependent Systemic Microvascular Dysfunction. Particle and Fibre Toxicology, 5:1.

[55]. Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Xiao, Z., Ye, B. (2009) Pulmonary Toxicity Induced by Three Forms of Titanium dioxide Nanoparticles via Intra-Tracheal Instillation in Rats. Progress in Natural Science, 19, 573–579.

[56]. Jugan, M.L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., Carriere, M. (2012) Titanium dioxide Nanoparticles Exhibit Genotoxicity and Impair DNA Repair Activity in A549 Cells. Nanotoxicology, 6, 501–513.

[57]. Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P., Hoffmann, E., Dopp, E. (2009) Titanium dioxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and DNA-Adduct Formation but not DNA-breakage in Human Lung Cells. Particle and Fibre Toxicology, 6, 17.

[58]. Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M., Utsumi, H. (2002) Quantitative Determination of OH Radical Generation and Its Cytotoxicity Induced by TiO(2)-UVA Treatment. Toxicology In Vitro, 16, 629–635.

[59]. Doak SH, Manshian B, Jenkins GJ, Singh N (2012) In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 745:104–11

[60]. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. 2006. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. Lancet Oncol 7:295–296

[61]. D. B. Peckys and N. de Jonge, Nano Lett., 2011, 11, 1733– 1738) (Sharma M, Salisbury LR, Maurer IE, Hussain MS, Sulentic EVC. Gold nanoparticles induce transcriptional activity of NF-κB in a B-lymphocyte cell line. Nanoscale. 2013;5:3747.

[62]. Huang FK, Chen WC, Lai SF, Liu CJ, Wang CL, Wang CH et al. Enhancement of irradiation effects on cancer cells by cross-linked dextran-coated iron oxide (CLIO) nanoparticles. Phys Med Biol. 2010;55:469-82.

[63]. Khoei S, Mahdavi SR, Fakhimikabir H, Zadeh A.S., Hashemian A. The role of iron oxide nanoparticles in the radiosensitization of human prostate carcinoma cell line DU145 at megavoltage radiation energies 25 Feb 2014

[64]. Ahamed M, Akhtar JM, Siddiqui AM, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairy AA et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. Toxicology. 2011;283;101-8

[65]. Baykara O, Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi ISSN: 2146-9601 e-ISSN: 2147-2238

[66]. Futreal PA. Kasprzyk A. Birney E. Mullikin JC. Wooster R. Stratton M. (2001). Cancer and genomics. Nature 6822: 850-2

[67]. Yokus B. ve Ülker D.Ü..: Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2012: 1(2): 7-18

[68]. Photodynamic Therapy Mediated by Nontoxic Core–Shell Nanoparticles Synergizes with Immune Checkpoint Blockade To Elicit Antitumor Immunity and Antimetastatic Effect on Breast Cancer. *Journal of American Chemical Society*, (2016).

[69]. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.6b09538

[70]. Core-shell nanoscale coordination polymers combine chemotherapy and photodynamic therapy to potentiate checkpoint blockade cancer immunotherapy. *Nature Communications*, (2016)

[71]. Şekeroğlu V, Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. Turk Hij Den Biyol Derg: 2011; 68(4): 241 – 252

[72]. Yırtıcı Ü. Tartrazinin Cyprinus carpio'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

[73]. Demirel, S., Zamani A., 2002, MN Tekniği ve Kullanım Alanları, Genel Tıp Dergisi, 12 (3), 123-127

[74]. Üstüner, D., 2011, Kromozom Kırıkları ve Mikronukleus-Apoptoz Bağlantısı, Tubav Bilim Dergisi, Cilt:4 (1), 64-69.

[75]. Fenech, M., Crott, W.J, ‘’Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay’’, Mutation Research, 504: 131-136 (2002).

[76]. Fenech, M, ‘’The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry’’, Health Phys, 98(2): 234-243 (2010)

[77]. Fenech, M., 2000, The in vitro micronucleus technique, Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455 (1-2), 81-95

[78]. Gisselsson, D., 2008, Classification of chromosome segregation errors in cancer, Chromosoma, 117 (6), 511-519.

[79]. Civelek, M. C ve E vitaminlerinin kromozom hasarları üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. Temmuz 2018

[80]. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E., 2003, HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 534 (1-2), 65-75.

[81]. Fenech, M., 2000, The in vitro micronucleus technique, Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455 (1-2), 81-95.

[82]. Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989, Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, Enviromental and Molecular Mutagenesis, 13 (1), 34-43.

[83]. Atlı-Şekeroğlu, Z. 2013. Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 70(1): 33-42.

[84]. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. and Sutton, D. J., 2012, Heavy metal toxicity and the environment, Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, In: Luch, A. (ed.), Vol 1: Molecular Toxicology (Experientia Supplementum), Birkhäuser, Berlin, 133-164.

[85]. Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. Beilstein Journal of Nanotechnology, 6(1), 1769-1780

[86]. Buzea, C., Blandino, I.P., Robbie, K. 2007. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. Biointerphases, 2(4): 17 – 71.

[87]. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2007. The impact of trans- locations and gene fusions on cancer causation. Nat Rev Cancer 7:233–245.

[88]. Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. 2009. Geno- toxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparations and characterization of test material, potential artifacts and limitations- Many questions, some answers. Mutat Res 681:241

[89]. Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N. 1997. The photoge- notoxicity of titanium dioxide particles. Mutat Res 394:125–132

[90]. Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D. 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibro- blasts. Environ Health Perspect 110:797–800)

[91]. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. 2006. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. Lancet Oncol 7:295–296. 258.

[92]. Wang, X., Li, T., Su, X., Li, J., Li, W., Gan, J., Wu, T., Kong, L., Zhang, T., Tang, M., and Xue, Y. (2019). Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. Applied Toxicology, 6, 908-918

[93]. Vidya, P. V., George, A., and Chitra, K. C. (2017). An in vitro study on the induction of micronuclei and other nuclear anomalies in peripheral blood lymphocyte culture by metal oxide nanoparticles. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 4, 1-8

[94]. Saquib, Q., Al-Khedhairy, A. A., Siddiqui, M. A., Abou-Tarboush, F. M., Azam, A., and Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. Toxicology in vitro, 26, 351-361

[95]. Baek M, Chung HE, Yu J, Lee JA, Kim TH, Oh JM, Lee WJ, Paek SM, Lee JK, Jeong J, Choy JH, Choi SJ. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Excretion of Zinc Oxide Nanoparticles. International Journal of Nanomedicine. 2012; 7: 3081-3097

[96]. Manzo S, Miglietta ML, Rametta G, Buono S, Di Francia G. Embryotoxicity and Spermiotoxicity of Nanosized ZnO for Mediterranean Sea Urchin Paracentrotus Lividus. Journal of Hazardous Materials. 2013; 254-255: 1-9

[97]. Roy R, Singh SK, Chauhan LKS, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD. Zinc Oxide Nanoparticles İnduce Apoptosis by Enhancement of Autophagy Via PI3K/Akt/mTOR İnhibition. Toxicology Letters. 2014; 227(1): 29-40

[98]. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MAM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc Oxide Nanoparticles Selectively İnduce Apoptosis in Human Cancer Cells Through Reactive Oxygen Species. International Journal of Nanomedicine. 2012; 7: 845-857

[99]. Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. Crit Rev Toxicol. 2007;37(3):251-77

[100]. 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.

[101]. Hackenberg S, Zimmermann FZ, Scherzed A, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, et al. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. Environ Mol Mutagen. 2011;52(7):582-9.

[102]. Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environmental Science and Technology 42, 4447e4453.

[103]. Arora, S.,Jain, J.,Rajwade, J.M.,Paknikar, K.M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. Toxicology Letters, 179: 93-100

[104]. Sukirtha, R., Priyanka, M.K., Antony, J.J., Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P. 2012. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using Melia azedarach against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model.Process Biochem;47:273-9.

6. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burcu AKSOY
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fatih Eğitim Fakültesi
Bölümü	Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Biyoloji Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	23.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Genel Biyoloji