



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANO ALFA SEPİYOLİTİN (LÜLETAŞI) KANSER VE SAĞLIKLI İNSAN  
AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK,  
GENOTOKSİK VE RADYOBİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çetin AKCA  
0000-0002-1027-1168

Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2020  
**Her Hakkı Saklıdır.**

## TEZ ONAYI

Çetin AKCA tarafından hazırlanan “Nano Alfa Sepiyolit (Lületaşı) Kanseri ve Sağlıklı İnsan Akciğer Hücreleri Üzerindeki In Vitro Sitotoksik, Genotoksik ve Radyobiolojik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

**Başkan** : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
0000-0003-1620-1918  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ  
0000-0002-3595-6286  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Figen ERSOY  
0000-0003-2267-069X  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İmza

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER  
0000-0002-0290-1166  
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa  
Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

İmza

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Ümit KUMBIÇAK  
0000-0002-1294-3706  
Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen-  
Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve  
Genetik Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN  
Enstitü Müdürü

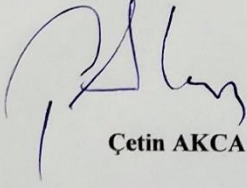
.....

**B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**20/01/2020**



**Çetin AKCA**

## ÖZET

Doktora Tezi

NANO ALFA SEPIYOLİTİN (LÜLETAŞI) KANSER VE SAĞLIKLI İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE RADYOBİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Çetin AKCA**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Bu çalışmada alfa sepiyolitten (lületaşı) mükemmel özelliklere sahip doğal nano lifler üretilmiştir. Üretilen bu doğal nano liflerin floresan özellik sergilediği, deneylerde kullanılan hücrelerin ve hücre çekirdeklerinin içerisine girebildiği, sitoplazmada veziküllerin içerisinde biriktiği çekilen TEM ve Lazer Konfokal Mikroskop görüntüleriyle gösterilmiştir. Bu çalışmanın birinci aşamasında nano alfa sepiyolitinin 160-5120 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları her iki hücre hattına uygulanmış olup, XTT, Trypan Blue ve Muse Count Viability Testleri ile ortalama IC<sub>(6,25;12,5;25;50;75)</sub> değerleri belirlenmiştir. Bu doz değerleri ancak yüksek dozlarda hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca nano alfa sepiyolitinin BEAS-2B hücrelerine göre A549 hücrelerinde seçici bir özellik sergilediği bulunmuştur. Bu çalışmada artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak nano alfa sepiyolitinin neden olduğu sitotoksik etkinin nedenleri incelenmiş olup; ROS testinde hücre içi ROS miktarı ve Komet testinde ise DNA hasarının doz artışına paralel olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca Annexin-V testi ile nano alfa sepiyolitinin BEAS-2B hücrelerini hem erken apoptoza hem de geç apoptoza sürüklediği, A549 hücrelerinde ise sadece geç apoptoza sürüklediği görülmüştür. Bu çalışmanın ikinci aşamasında nano alfa sepiyolitinin radyasyonla birlikte 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> dozlarının BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerindeki radyobiyojik etkileri incelenmiştir. Uygulanan 1Gy ve 2Gy dozuna göre kombine uygulanan dozların radyasyon duyarlılığını artırdığı görülmüştür. A549 hücreleri ile BEAS-2B hücrelerinin benzer dozları kıyaslandığında, A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ile birlikte önemli derecede radyosensitiv etki gösterdiği bulunmuştur. Burada doz artışı ile birlikte gerçekleşen sitotoksik etkinin ROS artışı ve DNA hasarı ile ilgili olduğu yapılan testler ile gösterilmiştir. Ayrıca nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun BEAS-2B hücrelerini hem erken apoptoza hem de geç apoptoza sürüklediği, A549 hücrelerinde ise daha çok geç apoptoza sürüklediği Annexin-V testi ile bulunmuştur. Birinci ve ikinci aşamadaki apoptoz bulguları ikili boya yöntemiyle de morfolojik olarak desteklenmiştir. Sonuçta nano alfa sepiyolitinin hem biyoyumlu hem de radyosensitiv bir madde olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Lületaşı, nano alfa sepiyolit, sitotoksikite, genotoksikite, radyobiyojik etki, in vitro

**2020, xii + 187 sayfa.**



## ABSTRACT

PhD Thesis

### INVESTIGATION OF IN VITRO CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND RADIOBIOLOGICAL EFFECTS OF NANO ALPHA SEPIOLITE (MEERSCHAUM) ON CANCER AND HEALTHY HUMAN LUNG CELLS

**Çetin AKCA**

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

In this study, natural nano fibers with excellent properties has been produced from alpha sepiolite (meerschaum). It has been demonstrated with the images of TEM and Laser Confocal Microscopes that these natural nanofibres produced have fluorescent properties, could enter into the cells and cell nucleus used in the experiments, and accumulate in the vesicles in the cytoplasm. In the first stage of this study, concentrations of nano-alpha sepiolite in the range of 160-5120µg/ml were applied to both cell lines, and the mean IC (6.25; 12.5; 25.50; 75) values were determined by XTT, Trypan Blue and Muse Count Viability Tests. These dose values were found to show cytotoxicity only on cells at high doses. In addition, it has been observed to show a selective feature in A549 cells compared to BEAS-2B cells. In this study, the causes of inhibition caused by nano alpha sepiolite due to increasing dose concentration were investigated. It was observed that the amount of intracellular ROS in the ROS test and DNA damage in the Comet test increased in parallel with the dose increase. In addition, it's been observed by Annexin-V test that while nano-alpha sepiolite drains BEAS-2B cells into both early apoptosis and late apoptosis, A549 cells are only dragged into late apoptosis. In the second part of this study, radiobiological effects of 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> doses of nano alpha sepiolite with radiation on the cells were investigated. It was seen that combined doses increased radiation sensitivity compared to 1Gy and 2Gy doses. When similar doses of A549 cells and BEAS-2B cells were compared, it was found that A549 cells showed significant radiosensitive effect with nano alpha sepiolite. It has been shown here that the cytotoxicity associated with the dose increase is related to ROS increase and DNA damage. In addition, thanks to Annexin-V test, it's been observed by that radiation together with nano alpha sepiolite drains BEAS-2B cells into both early apoptosis and late apoptosis, A549 cells are only dragged into late apoptosis. Apoptosis findings in the first and second stages were also supported morphologically by dual dye method. As a result, nano alpha sepiolite was found to be both a biocompatible and a radiosensitive substance.

**Key words:** Meerschaum, nano alpha sepiolite, cytotoxicity, genotoxicity, radiobiological, in vitro

**2020, xii + 187 pages.**

## TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca ılımlı ve eğitici yönüyle bize yol gösteren, tezin yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Tez çalışmalarını sırasında deneyimlerimden faydalandığım sevgili hocalarım Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİNÇ'a, Doç.Dr. Özgür VATAN'a,

Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarında güzel bir çalışma ortamı oluşmasında ve deney aşamalarında yardımları ile bana destek olan Doktora Öğrencisi Huzeyfe HURİYET'e ve tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Nano alfa sepiyolit liflerinin üretilmesinde her türlü desteği veren, Eskişehir Teknik Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Erhan AYAS'a, Araş.Gör. Aslı Asiye AĞIL'a ve Araş.Gör. Levent KÖROĞLU'na

Radyasyon deneylerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Sibel ÇETİNTAŞ'a, Medikal Fizik Uzmanı Sema TUNÇ'a,

Nano alfa sepiyolit karakterizasyon deneylerinde yardımcı olan Osmangazi Üniversitesi ARUM Araştırma Merkezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi İleri Teknoloji Merkezi çalışanlarına,

Bu tez çalışması U.Ü. Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi (Proje no: DDP(F)-2019/2) ve TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri Destekleme Birimi (Proje no:118Z799) tarafından desteklenmiş projeler kapsamında olup, bu nedenle U.Ü. Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimine ve TÜBİTAK'a

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çetin AKCA  
20/01/2020

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	6
2.1. Kil Mineralleri ve Sepiyolit .....	6
2.2. Sepiyolit'in Yapısı.....	7
2.2.1. Sepiyolit'in fiziksel özellikleri .....	12
2.2.2. Sepiyolit'in kimyasal özellikleri .....	13
2.2.3. Sepiyolit'in sorptif özellikleri.....	15
2.2.4. Sepiyolit'in katalitik özelliği .....	16
2.2.5. Sepiyolit'in reolojik özellikleri.....	17
2.3. Sepiyolit Çeşitleri.....	18
2.3.1. Alfa sepiyolit (Lületaşı) .....	19
2.3.2. Beta sepiyolit.....	20
2.4. Alfa Sepiyolit ve Beta Sepiyolit'in Kullanım Alanları .....	22
2.5. Sepiyolit'in Toksik Etkisi ile İlgili İn Vitro ve İn Vivo Çalışmalar.....	28
2.6. Nanoteknoloji.....	33
2.6.1. Nanotoksikoloji.....	34
2.6.2. Nanoyapıların hücre içi ros oluşumundaki rolü .....	36
2.6.3. Nanoyapıların toksitesini etkileyen faktörler.....	37
2.6.4. Nanomateryal toksisitesi ve testlerin yetersizliği.....	38
2.7. Radyasyon .....	39
2.7.1. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri.....	40
2.7.2. Radyosensitivite (radyasyona duyarlılık).....	43
2.7.3. Radyoprotektörler .....	45
2.8. Biyolojik Testler .....	45
2.8.1. XTT canlılık testi .....	46
2.8.2. Trypan blue canlılık testi.....	46
2.8.3. Muse count viability testi .....	47
2.8.4. Komet testi (tek hücre jel elektroforez yöntemi) .....	48
2.8.5. Reaktif oksijen türleri (ros) testi .....	49
2.8.6. Muse Annexin-V apoptoz testi .....	50
2.8.7. Apoptozun morfolojik olarak ikili boyama yöntemiyle görüntülenmesi.....	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	52
3.1. Alfa sepiyolit'in temin edilmesi .....	53
3.2. Alfa Sepiyolit'in Mikron Seviyesine Düşürülmesi ve Nano Alfa Sepiyolit Üretimi .....	53
3.3. Alfa Sepiyolit'in (Lületaşı) ve Nano Alfa Sepiyolit'in Karakterizasyon Çalışmaları .....	57
3.4. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Hücre İçi Girişi ve Lokalizasyonu .....	58
3.5. Kullanılacak Hücre Hatları ve Hücre Kültürü Şartları.....	59
3.6. Kontrol ve Doz Gruplarının Belirlenmesi.....	60

3.7. Deneylerde Kullanılan İn Vitro Testler.....	62
3.7.1. XTT canlılık testi .....	62
3.7.2. Trypan blue canlılık testi.....	62
3.7.3. Muse count viability testi .....	63
3.7.4. Komet testi .....	64
3.7.5. Hücre içi ros testi .....	64
3.7.6. Annexin-V testi ile apoptozun belirlenmesi.....	65
3.7.7. Apoptozun morfolojik olarak görüntülenmesi (ikili boyama) .....	66
3.7.8. Radyasyon deneyleri .....	66
3.8. İstatistiksel Analiz.....	67
4. BULGULAR .....	68
4.1. Alfa Sepiyolitın XRD Analiz Bulguları.....	68
4.2. Alfa Sepiyolitın XRF Analiz Bulguları .....	69
4.3. Alfa Sepiyolitın Mikron Seviyeye Düşürülmesi ve Tanecik Boyutunun Ölçülmesi.....	70
4.4. Nano Alfa Sepiyolit Üretimi ile İlgili SEM Bulguları .....	71
4.5. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Boyut Analizi Bulguları.....	76
4.6. Mikro ve Nano Alfa Sepiyolitın Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi .....	78
4.7. Nano Alfa Sepiyolit Liflerin Hücre İçi Girişi ve Lokalizasyonu Hakkında Bulgular.....	78
4.7.1. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme bulguları .....	78
4.7.2. Lazer taramalı konfokal mikroskop ile floresan görüntüleme bulguları.....	82
4.8. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Hayatta Kalış (% Canlılık) Oranına Etkisi .....	85
4.9. Nano Alfa Sepiyolitın ROS Oranına Etkisi .....	90
4.10. Nano Alfa Sepiyolitın Komet Deneyi Sonuçları.....	94
4.11. Nano Alfa Sepiyolitın Annexin-V Testi Apoptoz Bulguları.....	101
4.12. Nano Alfa Sepiyolitın Hücre Morfolojisindeki Neden Olduğu Değişikliklerin İkili Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi.....	110
4.13. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının Hayatta Kalış (% Canlılık) Oranına Etkisi .....	113
4.14. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının ROS Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	116
4.15. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının Komet Deneyi Sonuçları.....	121
4.16. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Annexin-V Apoptoz Bulguları .....	128
4.17. Nano Alfa Sepiyolit ile Birlikte Radyasyonun Hücre Morfolojisindeki Neden Olduğu Değişikliklerin Görüntülenmesi .....	141
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	144
KAYNAKLAR .....	165
EKLER.....	182
EK 1 Alfa Sepiyolitın XRD Analizi.....	183
EK 2 Alfa Sepiyolitın XRF Analizi.....	184
EK 3 Beta Sepiyolitın Bir Çeşidi Olan Alüminyumlu Sepiyolit .....	185
ÖZGEÇMİŞ.....	186

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

$\alpha$	Alfa
Å	Angstrom
$\beta$	Beta
$\leq/\geq$	Büyükdür/küçüktür işareti
°C	Derece Santigrad
Gy	Gray
e <sup>-</sup>	Serbest elektron
mV	Mili volt
mL	Mililitre
mA	Miliamper
µg	Mikrogram
V	Volt

### Kısaltmalar

### Açıklama

ATCC	American Type Culture Collection (Amer. Tip Kül. Kol.)
BSA	Bovine Serum Albümin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
DCFH-DA	Diklorofloresin-Diasetat
DCFH	Diklorofloresin
DAPI	Diamidine-2'-Phenylindole
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
EFSA	European Food Safety Authority (Avr. Yiy. Güv. Oto.)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EtBr	Etidyum Bromür
RAW 264,7	Fare Kan Makrofajları
FBS	Fetal Bovine Serum
gr	Gram
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
H•	Hidrojen Radikali
HO <sub>2</sub> •	Hidroperoksi Radikalleri
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
OH•	Hidroksil Radikali
HCT-15	İnsan Kolon Adenokarsinomu
A549	İnsan Akciğer Kanseri Hücreleri
BEAS-2B	İnsan Sağlıklı Bronşiyal Epiteli
IARC	International Agency For Research On Cancer
K512	İnsan Kronik Miyeloid Lösemi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı
PMN	İnsan Polimorf Nükleikositleri
SKLU-1	İnsan Akciğer Adenokarsinoması
U251	İnsan Beyin Tümörü Hücreleri
U2OS	İnsan Osteokarsinoma Hücreleri
A.Z.	Kızdırma Kaybı
IC <sub>50</sub>	Kontrol Göre %50'lik İnhibitör Konsantrasyonu
CLSM	Lazer Konfokal Mikroskop
LMA	Low Melting Agarose
MTA	Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü
NP	Nanopartikül
nm	Nanometre
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tuzlu Fosfat Tamponu)
RNA	Ribonukleik Asit
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
AM	Sığır Alveoler Makrofajları
NaCl	Sodyum Klorür
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
WHO	World Healthy Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
XRD	X-Işınları Difraktometresi
XRF	X-Işını Floresans Spektrometresi
7-AAD	Yedi Aminoaktinomisin-D

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1.	Sepiyolit liflerinin kristal ve kimyasal yapısının gösterimi..... 9
Şekil 2.2.	Sepiyolit lifinin ayrıntılı yapısı..... 10
Şekil 2.3.	Sepiyolitin yapısını teşkil eden fiberlerin şematik görünümü..... 18
Şekil 2.4.	Çeşitli sepiyolit örnekleri..... 22
Şekil 2.5.	Alfa sepiyolitin kullanım alanları..... 23
Şekil 2.6.	Beta sepiyolitin kullanım alanları..... 27
Şekil 2.7.	Nanoölçekli nanometaryeller..... 33
Şekil 2.8.	Nanoyapıların hücre içerisine alınım mekanizmaları ve hücreye etki şeması..... 35
Şekil 2.9.	Elektromanyetik spektrum..... 40
Şekil 2.10.	İyonize radyasyonun direkt ve indirekt etkisi..... 41
Şekil 2.11.	Suyun hidrolizi..... 42
Şekil 2.12.	Suyun hidroliz aşamaları..... 42
Şekil 2.13.	Trypan blue ile canlı ve ölü hücrelerin boyanması..... 47
Şekil 2.14.	Muse Count Viability Testi ile canlı ve ölü çekirdeğin boyanması... 47
Şekil 2.15.	Farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntülerinin komet yöntemi ile belirlenmesi..... 49
Şekil 2.16.	ROS testinin mekanizması..... 50
Şekil 3.1.	Alfa sepiyolitin madenden ilk çıkarılmış, temizlenmiş ve toz hali..... 53
Şekil 3.2.	Nano alfa sepiyolitin üretim aşamaları ..... 55
Şekil 4.1.	XRD ile alfa sepiyolitin içerik analizi..... 68
Şekil 4.2.	Nano alfa sepiyolit ve alfa sepiyolitin XRD analizi..... 69
Şekil 4.3.	Nano alfa sepiyolit üretimi ile ilgili SEM görüntüleri..... 73
Şekil 4.4.	Nano alfa sepiyolit üretimi ile ilgili SEM görüntüleri..... 74
Şekil 4.5.	Nano alfa sepiyolit üretimi ile ilgili SEM görüntüleri ..... 75
Şekil 4.6.	Nano alfa sepiyolitin TEM görüntüleri..... 76
Şekil 4.7.	Lif boyut analizi..... 77
Şekil 4.8.	SEM ve TEM cihazı ile belirlenmiş lif uzunluklarının yüzdelik dağılımı..... 77
Şekil 4.9.	SEM ve TEM cihazı ile belirlenmiş lif çaplarının yüzdelik dağılımı 78
Şekil 4.10.	Nano alfa sepiyolit liflerinin BEAS-2B hücrelerine alınımı..... 80
Şekil 4.11.	Nano alfa sepiyolit liflerinin A549 hücrelerine alınımı..... 81
Şekil 4.12.	Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içi lokalizasyonun Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile tespit edilmesi..... 83
Şekil 4.13.	Nano alfa sepiyolit liflerinin BEAS-2B ve A549 hücrelerinde hücre içi lokalizasyonu..... 84
Şekil 4.14.	Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde farklı testler ile elde edilen IC değerleri ..... 86



Şekil 4.15.	Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen A549 hücrelerinde farklı testler ile elde edilen IC değerleri .....	87
Şekil 4.16.	Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen BEAS-2B ve A549 hücrelerinde üç test ile elde edilen ortalama IC değerleri.....	88
Şekil 4.17.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüleri.....	91
Şekil 4.18.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüleri.....	92
Şekil 4.19.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdelik ROS değerleri.....	93
Şekil 4.20.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdelik ROS değerleri.....	94
Şekil 4.21.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri.....	96
Şekil 4.22.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri.....	97
Şekil 4.23.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri.....	98
Şekil 4.24.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri.....	99
Şekil 4.25.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri.....	100
Şekil 4.26.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri.....	101
Şekil 4.27.	BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolitinin 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi.....	103
Şekil 4.28.	A549 hücrelerinde nano alfa sepiyolitinin 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi.....	104
Şekil 4.29.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi.....	105
Şekil 4.30.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi.....	106
Şekil 4.31.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi.....	107

Şekil 4.32.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi.....	108
Şekil 4.33.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi.....	109
Şekil 4.34.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi.....	110
Şekil 4.35.	Nano alfa sepiyolit in BEAS-2B hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.....	111
Şekil 4.36.	Nano alfa sepiyolit in A549 hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.....	112
Şekil 4.37.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT testi canlılık yüzdeleri.....	114
Şekil 4.38.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT testi canlılık yüzdeleri.....	115
Şekil 4.39.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerlerinin morfolojik görüntüsü.....	117
Şekil 4.40.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerlerinin morfolojik görüntüsü.....	118
Şekil 4.41.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS testi yüzdeleri.....	119
Şekil 4.42.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS testi yüzdeleri.....	120
Şekil 4.43.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri.....	123
Şekil 4.44.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri.....	124
Şekil 4.45.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri.....	125
Şekil 4.46.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri.....	126

Şekil 4.47.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri.....	127
Şekil 4.48.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri.....	128
Şekil 4.49.	BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi.....	131
Şekil 4.50.	A549 hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi.....	132
Şekil 4.51.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi.....	134
Şekil 4.52.	BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi.....	135
Şekil 4.53.	BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi.....	136
Şekil 4.54.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi.....	138
Şekil 4.55.	A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi.....	139
Şekil 4.56.	A549 hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi.....	140
Şekil 4.57.	Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun BEAS-2B hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.....	142
Şekil 4.58.	Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun A549 hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi	143
Şekil 5.1.	Nano alfa sepiyolit özellikleri.....	164

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Bazı lületaşı (alfa sepiyolit) ve sedimanter sepiyolitlerin (beta sepiyolit) kimyasal bileşimleri .....	14
Çizelge 3.1. Çalışmamızda gerçekleştirilen iş basamakları ve yerler.....	52
Çizelge 3.2. Nano alfa sepiyolit'in üretim aşamaları tablosu.....	56
Çizelge 3.3. Deney dozlama planları.....	61
Çizelge 4.1. XRD ile alfa sepiyolit'in içerik analizi.....	68
Çizelge 4.2. Alfa sepiyolit'in XRF ile kimyasal analizi.....	70
Çizelge 4.3. Çeşitli öğütme işlemleri ve tanecik boyut ölçümü.....	70
Çizelge 4.4. SEM ve TEM cihazı ile lif boyut analizi (nm).....	77
Çizelge 4.5. Nano alfa sepiyolit lifleri ile muamele edilen BEAS-2B ve A549 hücrelerinde canlılık testleriyle elde edilen IC değerleri ve standart sapmaları.....	89
Çizelge 4.6. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdelik (%) ROS değerleri ve standart sapmaları.....	90
Çizelge 4.7. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hata (S.H) değerleri.....	95
Çizelge 4.8. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri.....	102
Çizelge 4.9. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyonları grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT canlılık yüzdeleri ve standart sapma değerleri.....	114
Çizelge 4.10. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS değerleri yüzdesi ve standart sapma (S.S) değerleri .....	116
Çizelge 4.11. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hataları (S.H).....	122
Çizelge 4.12. BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri....	130

## 1. GİRİŞ

Kıymetli bir taş olan lületaşı içerdiği yüksek miktardaki sepiyolit oranından dolayı madencilik dilinde sepiyolit olarak bilinen bir çeşit kil mineralidir (Algan 2015). Yüzyıllardır lüle (pipo) yapımında kullanıldığı için lületaşı isimlendirilmesi ile birlikte “Eskişehir taşı” (Tunçdilek 1955), batılı ülkelerde ise dış görünümü deniz köpüğüne benzetildiği için “meerschaum” olarak da adlandırılmıştır (Algan 2015). Lületaşı içeriğinde yüksek miktarda bulunan sepiyolit minerali, adını Yunanca da mürekkep balığının parlak ve gözenekli kemiği “sepio” ya benzemesi sebebiyle verilmiş olup (Türkyılmaz 2005, Algan 2015) kimyasal formülünün  $Si_{12}Mg_8O_{30}(OH)_4(H_2O)_{48}(H_2O)$  olduğu bildirilmiştir (Brauner and Preisinger 1956). Tabiatta oluşum şekilleri bakımından iki değişik formda bulunmaktadır. Bunlardan yumrular (nodüller) şeklindeki oluşumlar lületaşı tipini ( $\alpha$ -sepiyolit), yassı ve yuvarlak partiküller veya agregalar şeklinde oluşumlar ise tabakalı sanayi tipi sepiyoliti ( $\beta$ -sepiyolit) ifade etmektedir (Taşlıgil ve Şahin 2011).  $\alpha$ -sepiyolit (lületaşı) ve  $\beta$ -sepiyolit (tabakalı sanayi sepiyoliti) kalitesini belirleyen en önemli husus içerisindeki sepiyolit mineralinin yüksek saflıklarda olması gerektiği vurgulanmıştır (Sabah ve Çelik 1999). Sepiyolite eşlik eden diğer minerallerin ise genelde dolomit ve smektit grubu killer ile manyezit, paligorskit ve detritik mineraller olduğu açıklanmıştır (Sabah ve Çelik 1999, Can 2008).

$\alpha$ -sepiyolit ve  $\beta$ -sepiyolit içerisinde teşekkül ettiği kayaçlar, teşekkül şekli, jeolojik yaşı, kayaç içinde rengi ve şekli, kurduktan sonra işlenebilmesi, liflerin şekli, genişliği ve uzunluğu arasında farklılıklar bulunduğu açıklanmıştır (Akıncı 1998). Bununla birlikte sepiyoliti oluşturan lif uzunlukları değişken olup, dünyanın pek çok yerinde nanometreden santimetreye kadar farklı uzunluklara sahip sepiyolitler olduğu bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999).

Sepiyolit yapısında bulunan mikroporların oluşturduğu yüksek yüzey alanı, lifsi yapıda bulunması ve bu lifli yapının kendine has özellikleri olan kristal morfolojisi, kompozisyonu, yüzey aktivitesi ile birlikte çok düşük dozlarda viskoziteyi artırarak, çözelti içerisinde çökmeden kalabilmesi gibi sıra dışı özellikleri mevcut olduğu açıklanmıştır (Sabah 1998, Lemic ve ark. 2005). Bu sıra dışı özellikler nedeniyle, teknolojik uygulamalara baz teşkil eden sorptif, katalitik ve reolojik sayısız kullanım alanına sahip olduğu bildirilmiştir (Alvarez 1984, Galan 1996, Murray 2000).

Sepiyolitın makro ve mikro boyuttaki formları farklı alanlarda kullanılmakla birlikte (Liu ve ark. 2004) nanobilim araştırmalarındaki ilerlemelere paralel olarak sepiyolitın nano boyuta indirgenmesi, karakterizasyonu ve potansiyel kullanımına yönelik çalışmaların önem kazandığı görülmektedir. Günümüzde bir çok farklı özellikleri nedeni ile nanolifler biyomedikal ürünlerin (tıbbi protez, ilaç dağılımları, yara rtcler, cilt bakım ürünleri, doku şablonu) retimi (şenol ve ark. 2005, Süpüren ve ark. 2007, Yılmaz 2011, Oktay 2015, Eml 2016), filtrelerin yapımı (Kozanoğlu 2006), kompozitlerin geliştirilmesi (Andrady 2008) sensör uygulamaları (Ramakrishna ve ark. 2005, akıroğlu 2015), koruyucu ve yüksek performanslı giysiler (Hatiboğlu 2006), enerji, elektrik ve optik uygulamaları (Daşdemir 2006) gibi bir çok alanda kullanılabileceği açıklanmıştır. Ayrıca literatür taramalarında nano boyuta indirgenen sepiyolitın, özellikle biyomedikal alanda indikatör ve nano taşıyıcı olarak kullanılabilişliğine dair araştırmaların başlatıldığı bildirilmiştir (Erdem ve ark. 2012, Arous ve Polleti 2012, Castro-Smirnov ve ark. 2016).

Sepiyolit lifleri sahip olduğu büyük yüzey alanları ve kk gözenek boyutları (Can ve elik 2010) ile bu kullanım alanlarına aday ve iyi bir doğal lif olduğu değerlendirilmektedir. Bu üretilen doğal nano lifler ile özel uygulamalara sahip materyallerin geliştirilmesine olanak sağlayabileceği bildirilmiştir (Süpüren ve ark. 2007). Tüm bu gelişmelerden yola çıkararak doğal olarak yapısında nano lif bulunduran sepiyolitlerden bu liflerin üretimi için çeşitli yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Yapılan alışmalarda Zhang ve ark. (2005) ile Darvishi ve Morsali (2010) tarafından geliştirilen solvotermal yöntemi kullanarak sanayi sepiyolitinden nano liflerin üretimi gerçekleştirilmiş olduğu bildirilmiştir. Yine, Can ve elik (2010) sepiyoliti oluşturan lif demetlerini suda bir mekanik karıştırıcı ile dağıtarak ortalama lif boyutlarını 249\*29\*1127 nanometreye (genişlik\*ykseklik\*uzunluk) indirgeyebildiklerini bildirmişlerdir. Castro-Smirnov ve ark. (2016) tarafından sepiyolit 10mM Tris-HCl asit zltisinde 30 saniye sonike veya 10 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılarak serbest lifler elde edilmiştir. ınar ve elik (2006) atritör ve bilyalı değerirmende yaptıkları kuru ve yaş öğütmenin, sepiyoliti liflerine ayırmak için uygun bir yöntem olmadığını belirtmiş olup, farklı yöntemlerin gerçekleştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Hassan ve ark. (2015) %37'lik HCl asit zltisinin çeşitli pH'larını kullanarak sepiyoliti serbestleştirmeyi denemişlerdir. Tüm bu çalışmalara rağmen bazı tabakalı sanayi sepiyoliti ( $\beta$ -sepiyolit) tipleri suda dağılma zellikleri (Sabah ve elik

1999) gösterdiği için liflerine ayrılan bazı çalışmalar olmasına rağmen tüm sepiyolit çeşitlerinde uygulaması zor olduğu görülmüştür. Ayrıca lületaşının şimdiye kadar liflerine ayrıldığını gösteren herhangi bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

Ülkemizin ve özellikle Eskişehir'in dünyaya açılan penceresi olma potansiyelini taşıyan alfa sepiyolit sadece pipo ve süs eşyası yapımında kullanıldığı için giderek değerini kaybetmektedir. Nitekim TÜBİTAK 2005 yılında bu milli değerın gün yüzüne çıkartılması amacıyla alfa sepiyolit ile ilgili bilimsel ve teknolojik araştırmalara yoğunluk kazandırılması gerektiğini belirten bir rapor hazırlamış olduğu bildirilmiştir (Taşlıgil ve Şahin 2011). Alfa sepiyolitın başka formu olan beta sepiyolit ve benzeri nanokiller ile son yıllarda biyomedikal alanda, ilaç dağıtım sistemlerinde (Campbell ve ark. 2010, Ha ve ark. 2011), diş yapıştırıcılarında (Solhi ve ark. 2012), doku mühendisliğinde (Ambre ve ark. 2013) ve immünosensörlerde (Feng ve ark. 2013) kullanılmaya başlanmış olmakla birlikte lifsi yapıya sahip bu kil minerallerinin çevre ve canlılar üzerindeki olumsuz etkileri hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlı olduğu açıklanmıştır (Silva ve ark. 2015).

Yapılan literatür taramalarında sepiyolitın biyolojik sistemler üzerindeki etkilerine dair çeşitli çalışmalara rastlanılmıştır. Ancak yapılan bu çalışmaların çoğunluğunun ham sepiyolit ile ilgili olduğu, sepiyoliti oluşturan nano lifler üzerindeki araştırmaların çok az olduğu görülmüştür. Bu nedenle sınırlı sayıdaki literatür verisinin sepiyolitın toksijenik veya karsinojenik olduğunu söylemek için yeterli olmadığı, daha detaylı ilave çalışmaların yapılması gerektiği IARC (International Agency For Research On Cancer) ve EFSA'nın (European Food Safety Authority) raporlarında vurgulanmıştır (Anonim 1997, Anonim 2013). Bu gelişmeler ışığında, sepiyolitın sahip olabileceği olası risklerin daha net olarak ortaya koyulabilmesi için farklı biyoyumluluk testlerinin yürütülmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Yukarıda verilen literatür bilgisi üzerinde genel bir değerlendirme yapıldığında farklı ülke ve kaynaklardan temin edilen, kimi zaman kaynağı belirtilmeyen, kimi zaman da genel özelliklerine ( $\alpha$ ,  $\beta$  formu, tam boyut vb.) değinilmeyen sepiyolitler ile gerçekleştirilmiş olan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmaların gerçekleştirildiği görülmektedir. Sınırlı sayıdaki veriye dayanılarak, lif boyutu 5 mikrondan küçük olan sepiyolit formlarını zararsız ve non-karsinojenik olarak tanımlamış olmakla birlikte karsinojenik sınıflandırma için yeterli veri bulunmadığını da bildirmiştir (Anonim 1997). Gerek yakın



bir zamanda sepiyolit nano boyutlarda hücre içerisine kolaylıkla girebileceğinin gösterilmiş olması gerekse olası uygulama alanlarında görülen genişlemeye bağlı olarak, potansiyel karsinojenik, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin daha kapsamlı olarak araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir (Anonim 2013, Stockmann-Juvala ve ark. 2014). Özellikle ham sepiyolit ile yapılan biyoyumluluk testleri yeterli görünmezken, ham sepiyoliti oluşturan nanolifler ile ilgili veriler yok denecek kadar azdır. Ayrıca hem ham sepiyolit hemde nano sepiyolit ile ilgili yapılan çalışmalarda sepiyolit karakterini ortaya koyacak karakterizasyon işlemlerinin tam yapılmadığı veya eksik yapıldığı görülmektedir.

Doğal kil minerallerinin değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken en önemli husus söz konusu minerale temel özelliklerini veren coğrafik kökenidir. Dünyada farklı lokalizasyonlardaki rezervlerden elde edilen sepiyolit örneklerin lif ve iç örgü ve yüzey yapıları karşılaştırıldığında, her kaynağın sepiyolitinin kendine özgü bazı özelliklerinin olduğu görülmüştür (Suarez ve Garcia-Romero 2012, Garcia-Romero ve Suarez 2013). Bu nedenle sepiyolit ile ilgili çalışmalar söz konusu olduğunda, coğrafik lokasyon sepiyolit sadece bileşimi ve saflığını değil aynı zamanda lif parçacık boyutlarını da etkileyebileceği için farklı coğrafyalarda bulunan her sepiyolit rezervlerin kendi özgün nano özelliklerinin belirlenmesinin önem arz ettiği bildirilmiştir (Pietrement ve ark. 2018).

Bu çalışmada üretilen ve karakterizasyonu gerçekleştirip fizikokimyasal özelliklerini ortaya konulacak olan nano alfa sepiyolit dünyanın en kaliteli kaynağını oluşturan ülkemiz alfa sepiyolit rezervlerinden (Eskişehir) köken alacak olması sebebiyle özgün değere sahiptir. Nanobilim araştırmalarının sağladığı en temel kazanım, nanoboyuta indirgenen maddelerin yüzey alanlarındaki artışa bağlı olarak yapı ve reaktivitelerinde gözlenen değişiklikler yanında, hücre içerisine daha kolay girişi ve dolayısıyla hücre içindeki makro-moleküllerle etkileşime girebilmeleri nedeniyle yeni kullanım alanlarına olanak sağlanmasıdır. Yukarıda belirtildiği üzere ülkemizde üretilen alfa sepiyolit kullanım alanı oldukça sınırlıdır ve ekonomik değeri giderek azalmaktadır. Nano boyuta indirgenen ülkemiz menşeli alfa sepiyolit yeni medikal ve teknoloji alanlarında kullanım potansiyeline sahip olması ile ülke ekonomisine katkısının artacağı düşünülmektedir.

Ayrıca TR 2016/01282 numaralı patentte Akca ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen deneylerde alfa sepiyolit (lületaşı) ile oluşturulan bir zırh materyalinin radyasyonu ne derecede engelleyebileceği araştırılmış olup kurşun ve alüminyum ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta alfa sepiyolit radyasyonu soğurabildiği ve radyasyon engellemede kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle ilk defa bu araştırmada alfa sepiyolitten üretilen nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisinde radyasyonla muamele sonucunda nasıl bir davranış sergileyebileceği, radyasyona karşı hücrede duyarlılığı artırıp artırmayacağı, hücreyi radyasyona karşı koruyup koruyamayacağı konusu hakkında deneyler gerçekleştirilecektir. Yukarıda bahsedilen gerekçeler doğrultusunda bu çalışmada amaçlanan;

1. İlk defa alfa sepiyolit kendisini oluşturan nano liflerine ayrılması, bu ayırma işleminde çeşitli fiziksel yöntemlerin keşfedilmesi ve detaylı olarak karakterize edilmesi,
2. Birbirinden ayrılan ve boyutları tespit edilen nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içi girişi ve lokalizasyonu hakkında fikir edinilmesi,
3. Oluşturulacak nano alfa sepiyolit biyoyumluluğunun in vitro test yöntemleri ile araştırılması,
4. Nano alfa sepiyolit olası antikanser etkilerinin in vitro test yöntemleri kullanılarak araştırılması,
5. Nano alfa sepiyolit radyasyona maruz bırakılacak olan sağlıklı ve kanserli insan hücreleri üzerindeki olası radyobiyojik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kil mineralleri ve Sepiyolit

Sepiyolit bir kil minerali olup, kil ise sedimanter kayaçların ve toprakların tane büyüklüğünün 4 mikrondan (Aydın 2010) veya bazı kaynaklara göre ise 2 mikrondan (Angur 2016) daha küçük taneciklerine verilen ad olduğu açıklanmıştır. Kil minerallerinin ıslatıldığında plastiklik etkisi gösteren, şişebilme, büzülebilmeye, iyonları ve molekülleri adsorbe ve desorbe etme yeteneğine sahip olan maddeler olduğu bildirilmiştir (Brigatti 2006, Aydın 2010). Tanecik çapı veya boyutu küçüldükçe, kilin yüzey alanı mükemmel bir şekilde genişlemekte olduğu, kil minerallerinin yüzeyleri negatif, kenar ve köşeleri ise pozitif elektrikle yüklü olduğu, bu özellikleri nedeniyle kil minerallerine zıt elektrik yükleri çektilerilerek, toprakta bitki besin elementleri olan katyon ve anyonların kil yüzeylerinde ve kenarlarında tutulması sağlandığı bildirilmiştir (Aydın 2010). Killerin sahip olduğu büyük özgül yüzey (birim hacimdeki yüzey alanı) sebebiyle toprakta büyük bir adezyon ve kohezyon kuvveti oluşturduğu ve böylece suyun toprakta tutulmasını sağladığı bildirilmiştir (Brigatti 2006, Aydın 2010). Killerin bu mükemmel özelliklerini sergileyen en önemli temsilcisi ise paligorskit-fillosilikat killer grubuna ait sepiyolit olduğu bilinmektedir.

Sepiyolit kilinin adı ilk defa 1847 yılında Glocker tarafından kullanılmış olup Yunanca da mürekkep balığının parlak ve gözenekli kemiği “sepio” ya benzemesi sebebiyle verilmiş olduğu çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (Jones 1988, Türkyılmaz 2005, Algan 2015). Sepiyolit killere bir veya birden fazla kil minerali eşlik edebildiği, bunların dolomit, manyezit, poligorskit ve dentritik mineraller olduğu ve bu minerallerin dışında kil dışı karbonat mineralleri kuvars, feldspat ve fosfat içeren minerallere de rastlanmış olduğu bildirilmiştir (Yenişol 1992).

Ayrıca sepiyolitinin fiziksel olarak incelendiğinde renklerinin çok farklı olduğu görüldüğü, bu farklılığın sepiyolit içerisinde minerallerle birlikte yer alan organik maddelerden kaynaklandığı açıklanmış olup, bu oranın genellikle %10'un altında olduğu bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999). Safa yakın yani organik madde içermeyen sepiyolitlerin içerisindeki sepiyolit oranının ise % 90'dan fazla olduğu, dolomit içeren dolomitli sepiyolitlerin ise çoğunlukla % 50 ve daha fazla oranlarda sepiyolit içerdiği, dolomit

dışında sepiyolit içerisinde başlıca bileşen olarak, değişik oranlarda illit, detritik kuvars ve volkanik cam da bulunabileceği bildirilmiştir (Yeniyol 1992, Sabah ve Çelik 1999).

Dünyada ve ülkemizde tanımlanmış pek çok farklı oluşum şekillerine sahip sepiyolit türleri mevcuttur. Her ne kadar magnezyum sepiyolitleri yaygın bir tür olsa da sepiyolit diğer türleri de belirlenmiştir (Sabah 1998). Bunlardan bazılarının; demirli sepiyolit-xylotile (Alvarez 1984), nikelli sepiyolit, laflinitli-sodyumlu sepiyolit (Fahey ve Axelrod 1948), manganlı sepiyolit, alüminyumlu sepiyolit (Weaver ve Pollard 1973) ve alüminyumlu-demirli sepiyolit (İrkeç 1995) olduğu açıklanmıştır.

Sepiyolit levha yapısına sahip diğer kil minerallerine göre çok özel şartlarda yataklanmalar sonucunda oluşum gösterdiği için daha nadir alanlarda bulunduğu belirtilmiştir (Singer ve Galan 1984). Bu nedenle dokusal özellikleri, kristal yapılarının sağladığı farklı yüksek özgül yüzey alanları ile absorpsiyon özelliği, porozitesi, kristal morfolojisi ile bileşimine bağlı uygun nitelikli fizikokimyasal özellikleri, bu minerali tüm dünyada kıymeti gittikçe artan bir hammadde konumuna getirmiştir (Singer ve Galan 1984).

## **2.2. Sepiyolit Yapısı**

Sepiyolit, kristalize olmuş kil mineralleri arasında yaygın ve önemli bir yere sahip olan Sepiyolit-Paligorskit grubuna ait, magnezyum hidrosilikatten ibaret doğal bir kil mineralidir (Vicente Rodriguez ve ark. 1994, Sabah ve Çelik 1999). Ancak, amfibol tipi çift zincir yapısının oluşturduğu zincir kafes tipi (lifsı yapı) nedeniyle, yine bu grup içinde yer alan, tabaka (düzlem) kafes tipi minerallerden ayrılmakta olduğu açıklanmıştır (Vicente Rodriguez ve ark. 1994).

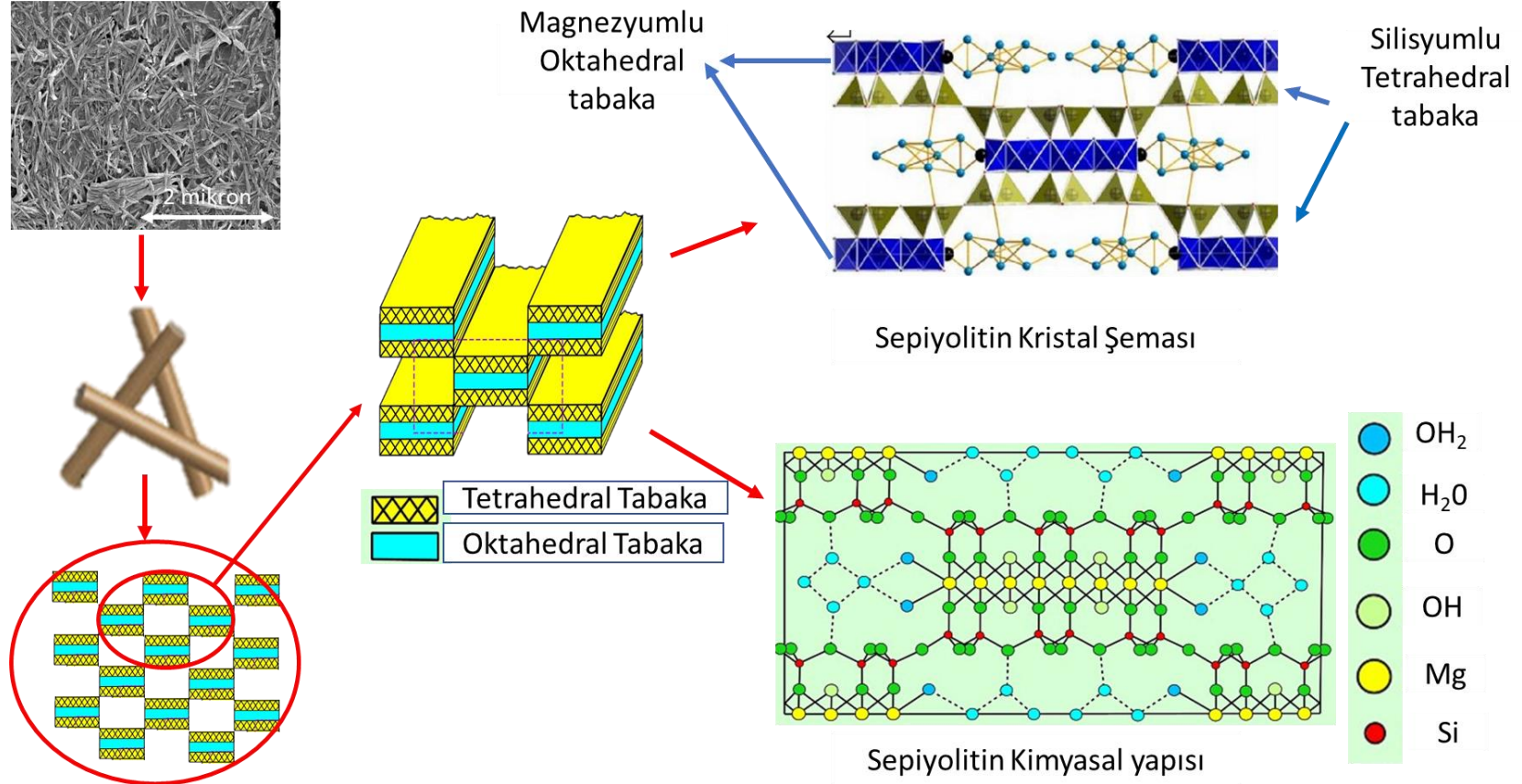
Sepiyolit mineralinin iğne şeklindeki liflerin demetlenmesi sonucu oluştuğu (Sabah 1998), bu sepiyolit liflerinin tetrahedral ve oktahedral adı verilen tabakalarının üst üste istiflenmesi sonucu meydana geldiği ve bu tabakalar boyunca devam eden kanal boşluklarına sahip olduğu bildirilmiştir (Nagy ve Bradley 1955, Vicente Rodriguez ve ark. 1994).

Sepiyolit liflerinin oluşumunda yer alan tetrahedral tabakanın merkezinde silisyum, köşelerinde ise oksijen veya hidroksil iyonları bulunan birinci yapıtaşı düzgün dörtyüzlü şeklinde olduğu veya diğer adıyla silika tabakası olduğu bildirilmiştir (Toprakezer 2009). Diğer tabaka oktahedral ise merkezinde magnezyum, köşelerinde ise oksijen veya hidroksil iyonları bulunan düzgün sekizyüzlü şeklinde olduğu ve oktahedral tabakaların iki tetrahedral tabaka arasında yer aldığı açıklanmıştır (Nagy ve Bradley 1955).

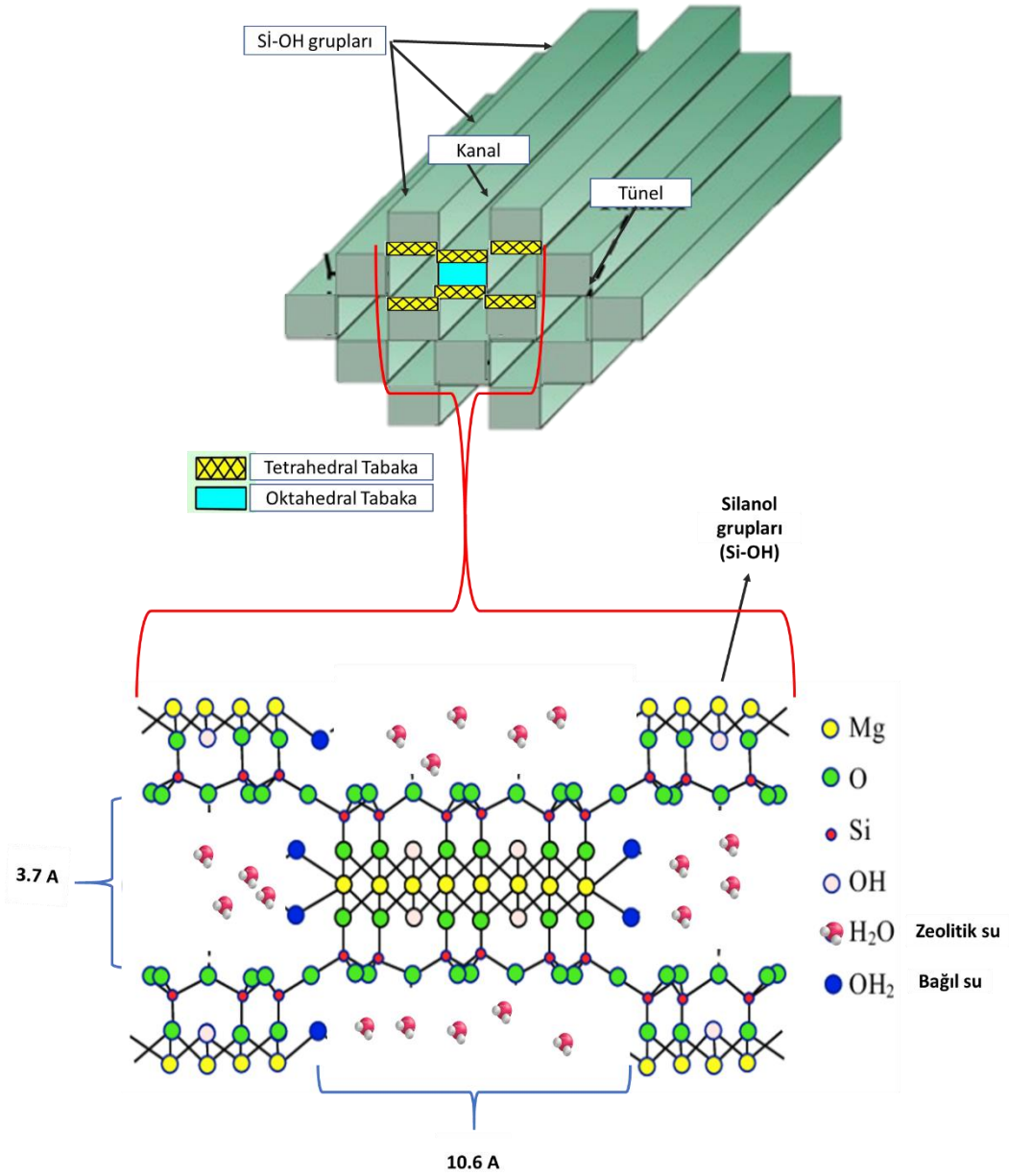
Tetrahedrallar ve oktahedrallar üst üste gelip aralarındaki oksijen köprüleri ile birbirlerine bağlanmaları sonucunda tabakalı bir yapı meydana geldiği açıklanmıştır (Jones ve Galan 1988). Bu farklı karakteristiklere sahip kristal yapıların (Tetrahedrallar ve oktahedrallar) eşsiz özelliklere sahip sepiyolit liflerini oluşturduğu görülmüştür. ABD Jeolojik Araştırma Merkezi tarafından çizilen sepiyolit liflerinin kimyasal yapısını gösteren (Anonim 2001a) ve Tang ve ark. (2012) tarafından sepiyolit liflerinin kristal yapısını gösteren şekiller birleştirilerek liflerinin ayrıntılı yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

Bu sepiyolit yapısındaki iki tabaka silika tetrahedral birimi, oksijen atomları vasıtasıyla, merkezi olarak bulunan bir magnezyumlu oktahedral tabakaya bağlanması ve her altı tetrahedral birimden sonra bu tabakaların tepe oluşturan yönelimleri tersine dönmesi nedeniyle, lif eksenine boyunca kanal yapısının oluşmasına neden olduğu ve bu özelliğin sepiyolit mineralinin yüksek adsorpsiyon yeteneği kazandırdığı açıklanmıştır (Nagy ve Bradley 1955, Brauner ve Preisinger 1956, Alvarez 1984).

Sepiyolit lifin yapısında kristal su, zeolitik su ve hidroksil su olmak üzere üç çeşit su bulunmakta olup, bu su molekülleri liflere çok önemli özellikler kazandırmıştır (Şekil 2.2). Bu su moleküllerinden birincisine bağlı su veya kristal su adı verilmiştir. Burada asidik olan iki su molekülü oktahedron tabakalarının kırık bağ yüzeylerinde bulunan bir magnezyum iyonu ile bağlanmıştır. İkinci su molekülü tünellerde bulunan, bağlı su moleküllerine hidrojen bağı ile bağlanmış zeolitik su molekülleridir. Zeolitik su moleküllerinin tünellerin hidrofilik karaktere sahip olmasında etkili olduğu açıklanmıştır (Galan 1996).



Şekil 2.1. Sepiyolit liflerinin kristal ve kimyasal yapısının gösterimi (Anonim 2001a, Tang ve ark. 2012)



Şekil 2.2. Sepiyolit lifinin ayrıntılı yapısı (Anonim 2001a)

Sepiyolit yapısındaki üçüncü tip su molekülü ise, yapı suyu olarak adlandırılan hidroksil suyudur. Hidroksil suyu yapıdaki oktahedral tabakanın ortasında magnezyum (bünye suyu) koordinasyonunda yer alan hidroksil gruplarının bozunması sonucu oluşan su molekülüdür. Ayrıca sepiyolit yüzeyinde adsorplanmış su moleküllerinin bulunduğu açıklanmış olup, bu su moleküllerinin adının higroskopik su (kaba nem) olduğu bildirilmiştir (Balcı 1995, Galan 1996, Sabah ve Çelik 1998, Yariv ve Michaelian 2002).



Sepiyolit nano fiber yapılarının çok yüksek yüzey alanlarına sahip olduğu bilinmektedir. Sepiyolitın tanımlanmış yapısal modeli dikkate alındığında, kristal yapılarındaki süreksizliklere bağlı kanalların  $3,6 \times 10,6 \text{ \AA}$ 'luk bir kesiti için belirlenen yüzey alanı, yaklaşık olarak  $800-900 \text{ m}^2/\text{gr}$  olduğu, teorik olarak bunun  $400 \text{ m}^2/\text{gr}$ 'sı dış yüzey,  $500 \text{ m}^2/\text{gr}$ 'sı de iç yüzey alanı olduğu bildirilmiştir (Serna ve Van Scoyoc 1978, Alvarez 1984, İrkeç 1995).

Ancak yüzey alanı hesaplamalarında kristal içi kanallara gönderilen gaz moleküllerinin çap, şekil ve polaritesi önemli olduğundan bu moleküler ile belirlenen yüzey oranları arasında farklılık ortaya çıkmıştır. Sepiyolitın değişik absorbantlar ile belirlenmiş yüzey alanları, etilpiridinyum bromür kullanılarak elde edilen yüzey alanı  $60 \text{ m}^2/\text{gr}$ , pridin ile  $275 \text{ m}^2/\text{gr}$ , BET ile  $276 \text{ m}^2/\text{gr}$ , hekzan ile  $330 \text{ m}^2/\text{gr}$ , etilen glikol ile  $470 \text{ m}^2/\text{gr}$  metodu ile yüzey alanı hesaplanmıştır (Ruiz-Hitzky ve Fripiat 1976).

Tüm nanoyapılarda olduğu gibi hücre yüzeyindeki yükler ve değişebilir iyonlar çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle sepiyolit fiberlerinin yüzeylerinin eksi yüklü, kenar ve köşelerinin artı yüklü olduğu bildirilmiştir (Aydın 2010). Bir diğer özellik ise yüzeylerindeki silika yapı birimlerinin dış tarafında bulunan katyon (pozitif yüklü iyon) değişim kapasiteleridir. Ancak bu yüzeylerindeki değişen iyonların silika yapısını etkilemediği bildirilmiştir (Alvarez 1984, İrkeç 1995).

Birçok mineralde killerin öğütülmesi ile birlikte kırık bağların sayısı artacağından katyon değişim kapasitesi arttığı bildirilmiş olup, katyon değişim kapasitesi değişiminin nedenleri üç şekilde açıklanmıştır. Birincisi silika-alümina birimlerinin kenarlarındaki kırık bağlar, değişebilir katyonlarla dengelenen doymamış yükler oluşturması, ikincisi dörtyüzlü örgüde  $\text{Al}^{+3}$ 'ün  $\text{Si}^{+4}$  ile, sekizyüzlü örgüde ise  $\text{Mg}^{+2}$ 'nin  $\text{Al}^{+3}$  ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelen örgü içi yer değiştirme, örgü içinde dengelenmeyen yükler oluşur ki bunlar da adsorplanan katyonlarla dengelenir, üçüncüsü açıktaki hidroksillerin hidrojeni, değişebilir katyonlarla yer değiştirmesi olduğu bildirilmiştir (Yurdakoç ve ark. 1989).

### 2.2.1. Sepiyolitın fiziksel özellikleri

Sepiyolit doğada beyaz, krem, gri, pembe, koyu kahverengi ve siyah gibi çeşitli renklerde bulunmaktadır. Bu farklı renk oluşumunun sebebi sepiyolitın içerisindeki organik madde oranına göre olduğu bildirilmiştir (Yeniyol 1992, Sabah ve Çelik 1999). Organik madde değişimi ise coğrafyanın tektonik hareketleri sonucu farklı maddelerin birleşmesinden kaynaklanır.

Sepiyolitteki renk çeşitliliği gibi sepiyoliti oluşturan liflerin uzunluklarında değişmektedir. Bu farklılığın sebebi olarak sepiyolitın bulunduğu yerin özellikleri ve oluşum biçimlerinin etkisi olduğu bildirilmiştir (Koshi ve ark. 1991, Anonim 1997). Örneğin, Çin ve Madagaskar sepiyolitlerinin lif uzunluğu birkaç milimetre hatta santimetreye kadar uzun olduğu, lifleri gözle görmenin mümkün olduğu (Sabah ve Çelik 1999), Vallecas/İspanya sepiyolitinin lif boyutları ise uzunluğu 800 nm, kalınlığı ise 25 nm olup ancak elektron mikroskobu yardımı ile görülebilir olduğu bildirilmiştir (Jones ve Galan 1988).

Sepiyolit, sepiyolit liflerinin birbirlerine çeşitli bağlar ile tutunarak oluşturduğu devasa bir yapıdır. Bu yapının içerisindeki sepiyolit liflerinde 10 Å mertebesinde genişliğe sahip gözenekli (poroz) bir yapıya sahip olduğu ve ortalama mikropor çapı 15 Å, mezopor yarıçapı ise 15-45 Å arasında değiştiği bildirilmiştir (Santarén ve Del Castillo 1993). Bu gözenekli yapılar nedeni ile oldukça geniş bir yüzeye sahip olmakla birlikte yüksek oranda silanol grupları ve su bulunmakta olduğu bildirilmiştir (Balci 1995, Çelik ve Karakaya 1998).

Sepiyolit malzemesinin ısı ya da asitle teması (Sabah ve ark. 2002) gözenekli yapının tahrip olması ile birlikte yüzey alanının değiştirilmesi mümkün olmaktadır. Sepiyolit yoğunluğu 2-2,5 g/cm<sup>3</sup> arasında, mohs sertliği 2-2,5 civarında, kuruma sıcaklığı 40°C, erime sıcaklığı ise 1400-1450°C civarlarında olduğu bildirilmiştir (Balci 1995, Çelik ve Karakaya 1998).

### 2.2.2. Sepiyolitın kimyasal özellikleri

Sepiyolit killerinin oluştuğu minerallerin çoğunluğunu sepiyolit ( $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \times 6H_2O$ ) oluşturmakla birlikte, çeşitli oranlarda kuvars ( $SiO_2$ ), dolomit ( $CaMg(CO_3)_2$ ), kalsit ( $CaCO_3$ ), albit ( $(Na, Ca) Al(Si, Al)_3O_8$ ), manyezit ( $MgCO_3$ ), demirli manyezit ( $(Fe, Mg)CO_3$ ) gibi çeşitli minerallerinde bulunduğu bildirilmiştir (Can 2008). Sepiyolit killerin kalitesi içerisinde bulunan sepiyolit mineralinin saflık derecesine göre belirlendiği, içerisindeki sepiyolit minerali ne kadar yüksek ise o kadar kaliteli olduğu bildirilmiştir (Sabah 1998, Can 2008). Dünyadaki sepiyolitler içerisinde Eskişehir madenlerinden elde edilen sepiyolitın saflık düzeyinin ve kalitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Galan ve Singer 2011).

Sepiyolitın kimyasal olarak incelendiğinde genelde  $SiO_2$ ,  $MgO$ ,  $Al_2O_3$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $CaO$ ,  $Na_2O$ ,  $K_2O$ ,  $TiO_2$ ,  $FeO$ ,  $MnO$  bileşiklerinden oluştuğu görülmüştür. Bunların dışında farklı bileşiklerde olabileceği gibi, asbest içeren sepiyolit türleri de bulunduğu belirtilmiştir (İrkeç 1995, Can 2008). Başlıca sepiyoliti oluşturan temel oksitlerden  $SiO_2$  ve  $MgO$  olduğu gözlenmiş olup, teorik olarak  $SiO_2/MgO$  oranı 2,33,  $SiO_2$ 'in % 55,60 ve  $MgO$ 'in % 24,99 oranında olduğu, susuz bazda bu oranlar;  $SiO_2$  % 61,70 ve  $MgO$  % 27,60; genelde ise  $SiO_2$ 'in % 53,90-51,9 ve  $MgO$ 'in % 21-25 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999).

Yüksek kaliteli sepiyolitın yüksek miktarda  $SiO_2$ ,  $MgO$  içerirken, düşük miktarda  $CaO$  içermekte olduğu, düşük kaliteli sepiyolit türlerinde ise  $CaO$ ,  $Al_2O_3$  ve  $Fe_2O_3$  bileşikleri bakımından yüksek,  $SiO_2$ ,  $MgO$  bileşik oranları bakımından düşük olduğu belirtilmiştir (Sabah 1998, Can 2008). Bazı lületaşı (alfa sepiyolit) ve sedimanter sepiyolitlerin (beta sepiyolit) kimyasal bileşimleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Sepiyolitın yukarıda bahsedilen fiziksel ve kimyasal yapıları nedeniyle sahip olduğu yüksek yüzey alanı, lifsi ve gözenekli yapısı, fizikokimyasal aktivitesi gibi özellikleri (Tekin 2004), sepiyolitın sorptif, katalitik ve reolojik olmak üzere üç önemli başlık altında incelenmesine neden olmuştur.

**Çizelge 2.1.** Bazı lületaşları (alfa sepiyolit) ve sedimanter sepiyolitlerin (beta sepiyolit) kimyasal bileşimleri

Bileşim (%)	Alfa Sepiyolit (Lületaşı)			Beta Sepiyolit (Sedimanter-Sanayi Sepiyoliti)				
	Karatepe köyü, Esk. (Akca ve ark. 2016)	Sepetçi köyü, Esk. (Sankaya ve ark. 1985)	Konya-Yunak (Yeniyol ve Öztunalı 1985)	Toledo-Magana 2015 (Sigma-Aldrich, USA).	Anadolu Endüstri Mineraller A.Ş. (Can ve Çelik 2010)	İspanya-Vallecas (Singer ve Galan 1984)	(Can 2008)	Dolsan Kimya (Hayvan atlığı), EK-3
<b>SiO<sub>2</sub></b>	51,8	52,9	54,02	37,15	49,85	60,6	21,27	49,74
<b>MgO</b>	25,9	25,89	23,13	27,79	20,15	22,45	22,36	0,2322
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,475	0,27	0,19	12,01	2,38	1,73	0,4	36,8034
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,0994	0,36	0,51		0,87	0,62	0,22	0,8923
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0,394		0,02	2,16	0,1	0,16	0,03	
<b>CaO</b>	0,746	0,01	0,06	3,92	2,65	0,4	17,6	0,1589
<b>TiO<sub>2</sub></b>				3,6	0,13		0,02	1,5571
<b>K<sub>2</sub>O</b>	0,0356		0,02	3,72	0,36	0,58	0,09	0,0824
<b>MnO</b>				7,22			0,03	
<b>NiO</b>	0,248							
<b>SiO<sub>3</sub></b>	0,102							
<b>A.Z. (LOI)*</b>	20,2	20,55	21,63	2,43	23,5	13,22	36,3	10,553

\* A.Z. (LOI): Kızdırma kaybı

### 2.2.3. Sepiyolitın sorptif özellikleri

Sepiyolit kendisine özgün yapısı itibarıyla son derece yüksek bir sorpsiyon özelliğine sahiptir ve kendi ağırlığının yaklaşık 2-2,5 katı kadar su tutabileceği bildirilmiştir (Sabah 1998, Can 2008). Bu sorptik etkiyi kil minerallerinin kristal yapılarında bulunan üç tür aktif soğurma merkezi ile gerçekleştiği açıklanmıştır (Serratos 1979, İrkeç 1992, Jones ve Galan 1998). Birinci soğurma merkezinde, sepiyolitın tetrahedral silika tabakasındaki oksijen atomlarının zayıf elektron taşıyıcısı olduğu, ikinci merkezde ise magnezyum atomları ile koordine olmuş su molekülleri zayıf hidrojen bağlarının oluşması ve üçüncü merkez ise tetrahedral tabakanın dış yüzeylerinde Si-O-Si bağlarının kırılması sonucu oluşan lif ekseni boyunca uzanan Si-OH (Silanol) gruplarının olduğu bunların adsorbe türlerle etkileşime rahatlıkla geçebileceği bildirilmiştir (Serratos 1979, İrkeç 1992, Jones ve Galan 1998). Bu Si-OH grupları, lif ekseni boyunca 5Å aralıklarla dizilim göstermiş olduğu ve bunların sıklığı, kristalin doğal yapısı ile liflerin boyutları ile ilişkili olduğu ve sepiyolitın dış yüzeyinde adsorplanan reaktif organik moleküllerle etkileşimi kovalent bağ ile gerçekleştiği açıklanmıştır (Serratos 1979). Sepiyolitın silanol gruplarının çokluğu, tanecik boyutu ve kristalin kafesdeki hatalar ile orantılı olduğu bildirilmiştir (Santaren 1993).

Ayrıca sepiyolitın adsorplama kapasitesi partiküllerin gözenekli yapısı ile ilgili olup, özgül yüzey alanı mikro ve mezogözeneklerin duvarlarından kaynaklanmaktadır. Bu gözeneklerin genişliği 2 nm'den küçük olanlar mikrogözenek, 2 nm ile 50 nm arasında olanlara mezogözenek, 50 nm'den büyük olanlara ise makrogözenek adı verilmiştir (Gregg ve Sing 1982).

Sepiyolit mineralinin lif içerisinde bulunan bol nano gözenekli yapısı, lif yüzeyleri ve içerisindeki aktif sorpsiyon mekanizmaları ile yüksek derecede sorptik özelliklere sahiptir. Bu sorptik özelliklerin ısı muamelesi veya çeşitli asitler ile değiştirilebileceği gösterilmiştir (Sabah 1998). Sepiyolite ısı işlem uygulandığında bünyesinde bulundurduğu su molekülleri nedeniyle, değişik termal davranışlar göstererek yapısal ve morfolojik değişimlere uğradığı açıklanmıştır (Baykara ve ark. 1995). Sepiyolit mineralinin 20-200°C sıcaklık arasında higroskopik ve zeolitik su kaybına, 200-400°C sıcaklık arasında kristal suyun yarısının kaybına, 400-500°C sıcaklık arasında kristal suyun diğer yarısının kaybına, 550-875°C sıcaklık arasında dehidroksilasyon (hidroksil

iyonlarının ısıtmaya bağılı olarak kaybına) neden olduğu bildirilmiştir (Baykara ve ark. 1995). Sepiyolit yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığında yapısındaki mikrogözeneklerin yıkımına bağılı olarak adsorpsiyon özelliğinin azaldığı ve yüzey alanının küçüldüğü bildirilmiştir (Sarıkaya ve ark. 1985, Dandy ve Nadiye Tabbiruka 1975, Alvarez 1984).

Sepiyolit minerali, asitle muameleye karşı da duyarlı olup, bu işlem sonucu kristal yapısının kısmen tahrip olabileceği açıklanmıştır (Sarıkaya ve ark. 1985). Asit aktivasyonu ile sepiyolit yapısının bozulduğu, bunun nedenin sepiyolit mineralinin hidrojen iyonu saldırılarına karşı çok hassas olduğu bildirilmiştir (Balcı 1995). %5'lik HCl asit ile muamele işlemi sonucunda sepiyolit amorf bir yapı kazandığı için yüzey alanı arttığı bildirilmiş olup, bu amorf yapı oluşmasında öncelikle 10 Å'den küçük porların tahrip olarak 10-50 Å arasındaki por yüzdesinin arttığını ve buna bağılı olarak da sepiyolit yüzey alanında belirgin bir artış olduğunu tespit edilmiştir (Alvarez 1984).

Sepiyolit yapısının hem ısı hem de asit muameleleri sepiyolit yüzey özellikleri ve porozitesini değıştirebildiği, böylece mineralin en faydalı özelliklerinden (örneğin absorptif, kolloidal ve katalitik özellikler) bazılarını değıştirmekle mümkün olabileceği bildirilmiştir (Singer 1984, Sabah 1998).

#### **2.2.4. Sepiyolit katalitik özelliğı**

Sepiyolit katalitik aktivitesi yüzey aktiviteleri ile ilgili olup, yüzeyinde bulunan silikatler hem asidik hem de bazik merkezleri içermeleri nedeniyle asit-baz çift fonksiyonlu katalizör olarak bilinmektedirler (Çetişli 1985, Sabah ve Çelik 1999). Bu sepiyolit partiküllerinin yüzeyinde lif ekseni boyunca 5 Å ara ile sıralanan Si-OH grupları, belirli derecede asit özelliğe sahip olup ve katalizör ya da reaksiyon merkezi olarak davranabileceği, ayrıca doğal sepiyolitte SiO<sub>2</sub> mol oranının daha yüksek olmasında asidik özelliğı ile açıklanmıştır (Çetişli 1985). Sepiyolitteki asidik merkezler dehidratasyon (su kaybı), bazik merkezler ise dehidrojenasyon (hidrojen iyonlarının ayrılması) mekanizmalarında aktif merkezler olarak etkin olmaktadır. Heterojen katalizörlerin etkinlik, seçicilik, büyük yüzey alanı, mekanik sağlamlık ve termal duraylılık gibi önemli özellikleri, katalizör taşıyıcının gözenekli yapısı ile yakından ilgili olduğu bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999). Bu ve buna benzer özelliklerinden dolayı sepiyolit minerali, son zamanlarda katalizör taşıyıcı olarak tercih edilmektedir.

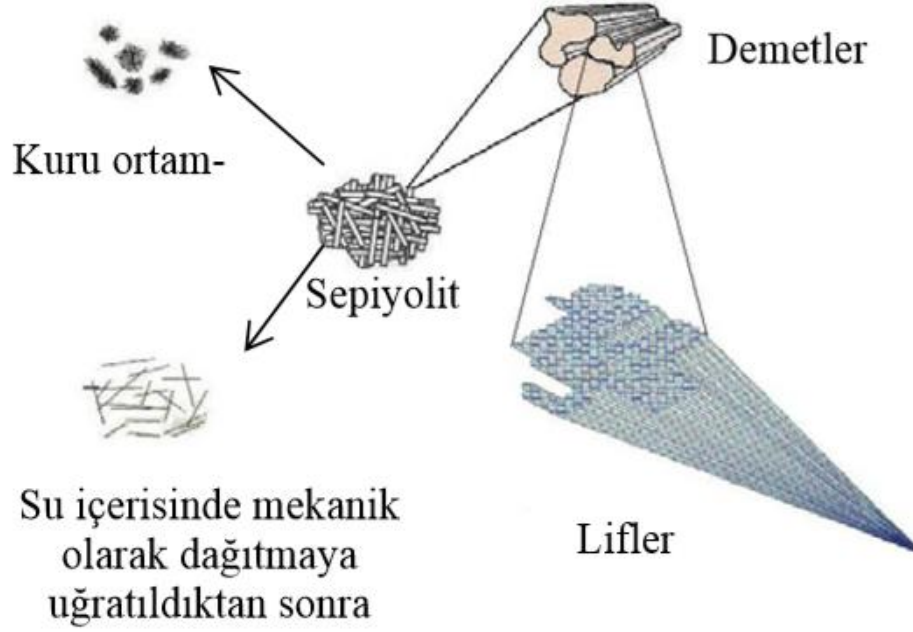
### 2.2.5. Sepiyolitın reolojik özellikleri

Reoloji, sıvıların akışını inceleyen bilim dalı olup çeşitli maddelerin reolojik özellikler sergilemesi nedeniyle çeşitli ürünler geliştirme açısından önem taşıdığı bilinmektedir. Aynı ölçüde olmayan lif mineral yapısının yanı sıra bünyesindeki serbest katyonların miktarı ve yüzey özellikleri sepiyolitın reolojik davranışında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Angur 2016). Sayısız büyüklükte iğne şekilli demetlerden (bundle) oluşan sepiyolit mineralleri düşük katyon değişim kapasitesi ve zincir tipi yapısı nedeniyle su içerisinde şişme göstermediği açıklanmıştır (Santaren 1993). Sepiyolit fiber yapılı demetlerin yüzeyindeki silanol grupları arasındaki Van der Waals kuvveti ve hidrojen bağları ile birbirine çok güçlü bir şekilde tutunduğu bilindiği için fiberlerin birbirlerinden ayrılması ancak mekanik yöntemlerle sepiyolitın liflerine ayrılabilceği açıklanmıştır (Can 2008). Ancak, iğne şekilli olan bu demetler bir mekanik karıştırma işlemiyle suda dağıtmaya tabi tutulursa birçok tanecik bu demetlerden ayrılarak serbest hale gelmektedir. Serbestleşen taneciklerin üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturarak ortamdaki suyu hapsediği ve viskoz bir yapı kazanmasına neden olduğu açıklanmıştır (Santaren 1993, Can 2008). Sürekli ve daha yoğun bir mekanik karıştırma ise demetlerin boyut ve sayısını azaltarak serbest tanecik sayısının daha da artması ile birlikte daha fazla suyun adsorplanarak tutulmuş olacağı bildirilmiştir (Can 2008). Sepiyolitteki liflerin bu dağıtım işlemi sonucunda jelleşme meydana geldiği ve bu jelleşmenin ozmotik şişme gerektirmediğinden dolayı sepiyolit jelleri suda ve diğer çözücülerde değişebilir iyonlar ve elektrolitler içermeksizin hazırlanabildiği, bu nedenle sepiyolitın bu özellikleri ile diğer killere göre büyük avantajlar sağladığı bildirilmiştir (Santaren 1993).

Su içerisinde mekanik olarak dağıtmaya uğratılmış olan sepiyolit lifleri, birbirlerini desteklemek suretiyle çökmeyi engellediği bildirilmiştir (Santaren 1993). Bu özelliğinden dolayı süspansiyon ajanı olarak kullanılabilceği, eğer sepiyolitten ayrı olarak süspansiyonda başka parçacıklar varsa bu parçacıklar sepiyolit fiberlerinin oluşturduğu ağ içerisinde hapsediği bildirilmiştir (Santaren 1993). Sepiyolit taneciklerinin şekil ve boyut farklılığı ve yüzey özellikleri bu mineralin reolojisini belirlediği, bu özellikler ile doğal olarak, sepiyolitın çok yararlı bir süspansiyon, tiksotropi malzemesi ve kalınlaştırıcı (thickener) olarak kullanılabilceği ve sepiyolitın diğer killere göre tuzlu ortamlarda daha fazla dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir (Angur 2016).



Elektron mikroskopunda yapılan incelemelerde, sepiyolit iğne şeklindeki partiküllerinin aglomera yapıda olduğu ve bunların çalı-ot yığınlarına benzer geniş lif kümeleri oluşturduğu gözlemlenmiş olduğu açıklanmış olup, sepiyolit yapısını teşkil eden fiberlerin şematik görünümü Şekil 2.3’de gösterilmiştir (Can ve Çelik 2010).



**Şekil 2.3.** Sepiyolit yapısını teşkil eden liflerin şematik görünümü (Can ve Çelik 2010)

### 2.3. Sepiyolit Çeşitleri

Tabiatta sepiyolit zenginleşmeleri, mineralojik anlamda aynı, fakat jeolojik oluşum koşulları açısından farklılık göstermektedir. Bu nedenle sepiyolit iki değişik polifonik yapıda çökmüş olduğu bildirilmiştir (Sabah 1999). Bunlardan birincisi; uzun lif demetleri şeklinde bulunan alfa sepiyolit (lületaşı) ya da parasepiyolit, ikincisi; küçük, yassı, yuvarlak partiküller veya amorf (şekilsiz) agregalar halinde oluşan sanayi sepiyoliti (tabakalı sepiyolit, sedimanter sepiyolit) olarak da adlandırılan beta sepiyolittir (Alvarez 1984, Sabah 1999).

### 2.3.1. Alfa sepiyolit (Lületaşı)

Alfa sepiyolit, sepiyolit killeri içerisindeki en kaliteli kıymetli taş olup, dış görünüş ve rengi ile deniz köpüğünü andırdığı için “meerschaum” olarak da bilinmektedir. Dünyanın birçok yerinde sepiyolit olarak bilinen lületaşını farklı adla kullanılmasının nedeni fiziksel özelliğinin mükemmel olması (Sabah ve Çelik 1999) ve oldukça saf formunu tarif etmek için (Buie 1983) kullanıldığı anlaşılmaktadır. Kolay işlenebilmesi, son derece beyaz olması, içinde boşluk, yabancı madde, kılcal damarcıkların bulunmaması, suya atıldığı zaman dağılmaması (Akıncı 1998) gibi sebeplerden dolayı diğer formlarından üstündür. Açıklanan nedenlerden dolayı ekonomik değeri yüksek bir taş olup, sadece pipo ve süs eşyası yapımında kullanılmakta olan lületaşının sağlık ve teknolojik kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmadığı görülmüştür. Doğada amorf, kompakt halde ve değişik boyda patates yumruları şeklinde bulunabilmektedir.

Türkiye dışında Somali, Yunanistan, Avusturya, İspanya, Rusya, Fransa, Kenya, Fas, Madagaskar gibi birçok ülkede alfa sepiyolit üretimi yapılmakla birlikte bu ülkelerin rezerv miktarları ve üretilen taşların kalitesi oldukça düşük olduğu açıklanmıştır (Sabah 1999). Somali’de, iyi kaliteli, düşük yoğunluklu ve yüksek poroziteli alfa sepiyolit ile birlikte sedimenter sepiyolit oluşumların da mevcut olduğu, Tanzanya lületaşı hakkında ayrıntılı bilgi bulunmamakla beraber, çeşitli kalitelere beyaz, açık yeşil ve açık kahverengi renklerde olduğu, Meksika’daki nodüllü veya bloklu yapıdaki iki yatak ticari olarak işletilmeye elverişsiz olduğu, Kenya’daki yatakların ekonomik olarak işletilebilecek rezervlere sahip olduğu ancak Kenya yumrulu sepiyolitleri düşük kaliteleri ile Türk lületaşlarıyla karşılaştırılmaz nitelikte olduğu ve Türk lületaşları kalitelerinin üstünlüğü ile dünyada rakipsiz olduğu bildirilmiştir (Can 1992, Anonim 2001b, Balkan 2006). Ancak dünya lületaşı rezervlerinin %70’lik kısmının ülkemizde buldurmamıza rağmen (Akıncı 1998) bugün lületaşı ve lületaşı işletmeciliği adeta unutulmaya yüz tutmuş durumdadır. Ayrıca lületaşının teknoloji ve sağlık alanında kullanımı ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamış olduğu bildirilmiştir (Can 1992, Anonim 2001b).

Lületaşı, Türkiye’de Eskişehir yöresinde ve Konya-Yunak civarlarında yataklanma göstermiş olduğu, Eskişehir’ in doğusunda Sepetçi, Margı, Sarısu, Kayı, Gökçeoğlu ve Türkmentokat bölgesi ile batısında Nemlidutluca bölgeleri lületaşı açısından en önemli bölgeler olduğu ve bu bölgelerdeki bazı üretim alanlarının (Sarısu, kayı köyü ve

Gökçeoğlu bölgesi) toplam rezervleri 26.019 ton olduğu açıklanmıştır (Anonim 2001b). Lületaşının Eskişehir'den geçen fay hattının bulunduğu değişik ortamlarda yer altı kaynak sularıyla bir araya gelmesi sonucu olduğu için dünyada sadece Türkiye'de bol miktarda bulunmasını ve farklı tiplerde oluşmasını sağladığı bildirilmiştir (Korkmaz 1987). Dünyadaki sepiyolitler içerisinde Eskişehir madenlerinden elde edilen sepiyolit safılık düzeyinin ve kalitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Galan ve Singer 2011). Alfa sepiyolit suda yüzdüğü halde, beta sepiyolit kilinin suda kolayca dağılabileceği, beta sepiyolit kilin SiO<sub>2</sub> ve MgO içeriği, lületaşına oranla daha az, buna karşılık Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO içeriği ve ateş kaybının daha fazla olduğu açıklanmıştır (Sabah 1998).

### **2.3.2. Beta sepiyolit**

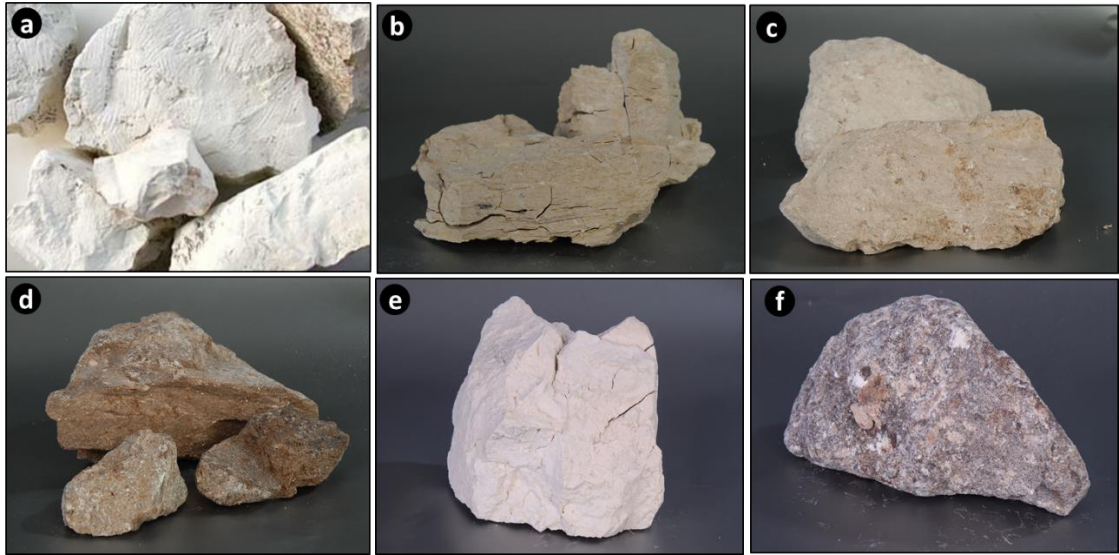
Beta (β)-sepiyolit, alfa sepiyolitinin yaygın bir türevi olan süs eşyası yapımında kullanılmayan tabakalı sepiyolit tipi olup laminalı (pulsu) bir yapı göstermektedir. Bu tip sepiyolit sanayi sepiyoliti olarak tanınmaktadır. Beta sepiyolitinin fiziksel olarak diğer türüne göre çok farklı olduğu, ıslatıldığında suda dağılabileceği ve kolay işlenemeyen bir yapısı mevcut olduğu, renginin kahverengi, gri, pembe, açık sarı, beyaz veya krem olabileceği bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999).

Beta sepiyolitinin dünyadaki rezervleri alfa sepiyolite göre çok daha fazla olduğu, ancak beta sepiyolit diğer endüstri minerallerine kıyasla dünyadaki kaynakları son derece kısıtlı olan ve ekonomik yatakları sadece İspanya ve Türkiye ile sınırlı olan bir ham madde olduğu bildirilmiştir (Can 1992, Anonim 2019h). Ancak çeşitli oluşumlara da Kenya, ABD, Çin, Kenya, Namibya ve Tanzanya gibi ülkelerde bulunduğu açıklanmıştır (Anonim 2019h). Dünya sedimanter sepiyolit üretiminin büyük bir kısmı İspanya tarafından karşılanmakta olduğu, İspanya'dan sonra dünyanın en büyük sepiyolit rezervlerinin Türkiye'de olduğu ve 3 ayrı kalitede sedimanter kökenli sepiyolitinin varlığı tespit edilmiş olduğu açıklanmıştır (Tekin 2004).

İspanya dışında Çin Halk Cumhuriyeti'nde bazı ekonomik sepiyolit yataklarının varlığı bilinmekle beraber, bu sepiyolit oluşumları rezerv olarak sınırlı olup uzun lifsi yapıda ve asbest içermesi nedeniyle zaman zaman Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) normlarını karşılamadığı açıklanmıştır (Anonim 1997). Finlandiya ve Çin gibi bölgelerde hidrotermal sepiyolit (dağınık, tortul olmayan) 20 mikrondan daha uzun çok kristalli

liflerle karakterize olduğu (Lopez-Galindo ve Sanchez Navas 1989, Santarén ve Alvarez 1994) ve rezervleri konusunda bilgi olmadığı, ancak bir miktar üretim yapılarak Japonya'ya gönderildiği bilinmektedir (Balkan 2006). Kenya, Namibya ve Tanzania gibi bazı Afrika ülkelerindeki sepiyolit kristallerindeki farklılıklar bulunmakta olduğu ve daha düşük reolojik özellikler sergilemekte olduğu açıklanmıştır. Açıklanan bu nedenlerden dolayı ancak basit absorbtif amaçlara uygun kullanım alanları olduğu bildirilmiştir (Anonim 2019h).

Türkiye'nin ekonomik olarak değerlendirilebilecek sanayi veya tabakalı tip sepiyolit yatakları, Eskişehir (Sivrihisar, Yunusemre, Mihallıçık), Çanakkale, Bursa, Kütahya ve Isparta 'da bulunmaktadır (Yeniyol ve Öztunalı 1985). Alfa Sepiyolit ve sanayi sepiyolit elementleri ve fiziksel özellikleri bakımından farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Brauner ve Preisinger 1956, İrkeç 1991). Eskişehir civarındaki bazı bölgelerin tabakalı sepiyolit rezervleri Yörükçayır (4.680.000 ton), Kepeztepe (3.200.000 ton), Çerkezkireç (32.000.000 ton), Söğütlük (16.800.000) olmak üzere toplam rezerv 56.680.000 ton olduğu bildirilmiştir (İrkeç 1996, Sabah 1998).



**Şekil 2.4.** Çeşitli sepiyolit örnekleri a) Alfa sepiyolit (Anonim 2019a) b-c-d-e) Farklı renkteki beta sepiyolit çeşitleri (Anonim 2019b)

#### 2.4. Alfa sepiyolit ve Beta Sepiyolitın Kullanım Alanları

Hem alfa sepiyolit hem de beta sepiyolit sahip olduğu yüksek yüzey alanı, lifsi ve gözenekli yapısı, fizikokimyasal aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı adsorban killer arasında yaygın bir kullanım alanına sahip olduğu açıklanmıştır (Tekin 2004, Sabah 1998). Açıklanan bu özellikler nedeniyle sepiyolit mineralinin teknolojik uygulamaları, sepiyolit mineralinin sahip olduğu sorptif, katalitik ve reolojik özelliği ile ilgili olup, bu nedenle çok değişik amaçlarda kullanılabildiği bildirilmiştir (Sabah ve Çelik 1999).

Alfa sepiyolitın gözenekleri sayesinde suyla ıslatıldığında yumuşamakta olup, şekil verilebilmektedir. Ayrıca yüksek ısıya dayanabilmesi nedeniyle pipo (Korkmaz 1987), sigara ağızlığı ve bunların nikotin ve zifir emici bölümlerinin yapımında, kolye, bilezik, iğne, küpe ve biblo gibi süs eşyaları yapımında kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.5) (Ürersoy 1989, Balkan 2006). Alfa sepiyolitın adsorban olarak, çevre koruma amacıyla gaz ve sıvıların arıtımında kullanılmadığı, bunun nedeninin az bulunuşu ve pahalı oluşu ile ilgili olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.5. Alfa sepiyolitın kullanım alanları

Ancak beta sepiyolit ise su ile karşılaştığında dağılma özelliği (Sabah 1998) gösterdiği için süs eşyası ve pipo yapımı için uygun olmadığı bilindiği için sadece sanayiye yönelik alanlarda kullanılmaktadır. Sepiyolit, sahip olduğu sorptif, katalitik ve reolojik özellikleri nedeniyle sanayide çok değişik amaçlarla kullanılabilir. Şekil 2.6'da beta sepiyolitinin sahip olduğu özelliklere göre kullanım alanları özetlenmiştir.

Sepiyolitinin kendi içerisindeki mikro ve mezoporları ile oluşturduğu kendine özgü yüzey alanı ve yapısında bulunan üç aktif absorpsiyon özelliğinden dolayı başlıca sorptif kullanım alanları şunlardır;

Koku giderici olarak evcil hayvanlar ve ahır hayvanlarının atıklarının emilmesi ve koku giderilmesi için zeminlerde pet-litter ve cat-litter olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Murray 1986, Clarke 1989), Sepiyolit, karma yemlere ilave edilen vitaminler, mineraller ve antibiyotikler gibi katkı maddeleri için ideal bir taşıyıcı olması sebebiyle yem unsurlarının ayrılmasını önlediğinden homojenizasyonu sağlayıcı bir özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Galan 1996).

Nemi absorblama kapasitesinden dolayı mantar gelişimini önlediği bildirilmiştir (Bocuzzi ve Escribano 2011). Zararlı bileşikleri bağlayarak onların vücuttan atılmalarını, ishal enfeksiyonlarını önlemek için, mikotoksinler ve ağır metaller için adsorbant olarak kullanılmakta olduğu açıklanmıştır (Slamova ve ark. 2011).

Sepiyolit ayrıca tarımda kimyasallar ve böcek ilaçları için emici ve adsorbant (tarım ve böcek ilaçları taşıyıcısı) olarak kullanılmaktadır. Aktif kimyasal ile karıştırılan sepiyolitlerden zamanla kimyasalların salınımı gerçekleşmekte olduğu açıklanmıştır (Alvarez 1984, Murray 1986, Clarke 1989, Russell 1991, Anonim 1997).

Sepiyolitinin diğer kullanımları arasında bitkisel ve mineral yağların renginin giderilmesi veya beyazlatılması olduğu açıklanmıştır (Alvarez 1984). Bazı yağlarda (madeni esaslı yağlar, nebati yağlar ve parafinlerin rafinasyonu) yağın içerdiği özel koku ve aroma arzu edilirse de, genel olarak ham yağda bulunan renk ve koku maddelerinin, yağlardan uzaklaştırılması, fazla serbest asitliğin giderilmesinin gerçekleştirilmesinde kullanılabilir.

Atık su arıtma sistemlerinde, atık suların saflaştırılması ve bazı değerli kimyasalların killerle geri kazanımını, hava kirliliğinin azaltılmasında, gaz ve sıvıların temizlenmesinde (Alvarez 1984, Sabah 1998, Yılmaz 2007) ve fabrikalarda, servis istasyonlarında ve diğer yerlerde yağ ve yağ dökümlerinin emilmesi için zemin süpürme bileşeni olarak kullanılmakta olduğu açıklanmıştır (Murray 1986, Clarke 1989).

İlaç sanayisinde sepiyolitik kil ilaçların bozulmasına sebep olan demiri denetleyebilmesi bakımından (özellikle hidrokortizon gibi ilaçların oksitlenerek bozulmasını önlediğinden) eczacılıkta, ilaç sektöründe dolgu malzemesi, gastrointestinal sistemle ilgili ilaçlarda toksin ve bakteri emici formülasyonlarda kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Kabakçı 2004, Yılmaz 2007). Yüksek iyon değiştirme kapasitesine sahip özelliği sayesinde deterjan ve temizlik malzemelerinde leke çıkarmak ve sert suların yumuşatılması işlemlerinde kullanım alanı yaygın olduğu bildirilmiştir (Alvarez 1984, Clarke 1989, Balkan 2006).

Karbonsuz kopya kağıtları ve sigara filtrelerinde, otomotiv sanayinde ekzos filtrelerinde, otomobil sanayisinde yakıt temizleme ve korozyona dayanıklı oto boyası imalinde sepiyolit kullanıldığı bildirilmiştir (Alvarez 1984, Clarke 1989).

Katalitik özelliklere de sahip olduğu bilinen sepiyolit büyük yüzey alanı, mekanik dayanım ve termal duraylılığından dolayı olefinlerde doymun olmayan C=C bağlarının hidrojenasyonu, otomobil ekzosları ve fabrika bacaları için katalitik seramik filtre imali, etanolden butadien üretimi, metanolden hidrokarbon üretimi, sıvı yakıtların hidrojenasyonu gibi kullanım alanları mevcut olduğu bildirilmiştir (Can 1992, Anonim 2019h)

Sepiyolit reolojik özellikleri ile, su veya diğer sıvılarla, nispeten düşük konsantrasyonlarda yüksek viskoziteli ve duraylı süspansiyonlar oluşturması nedeni ile birçok kullanım alanı mevcuttur. Sepiyolit tuzlu suda (yüksek elektrolit konsantrasyonlarda) ve yüksek sıcaklıklarda stabil kalabildiği için (çünkü sepiyolit çamurunun viskozitesi ve jel mukavemeti, elektrolitik içerikteki değişikliklerden etkilenmez) petrol sondajlarında kullanılan sondaj çamurlarında tercih edilen bir kil minerali olduğu bildirilmiştir (Alvarez 1984, Murray 1986, Clarke 1989)

Yollarda, çatılarda döşeme altı malzemesi olarak kullanılan asfalt kaplamaların bir kısmı asbest içerir. Bu nedenle kullanılan asbestin sağlığa zararlı etkileri bilindiğinden, onun yerine ikame edilecek malzemeler üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, kalınlaştırıcı ve tiksotropik özelliklerine ilaveten sağlığa zararlı hemen hiç etkisi olmayan en uygun maddenin sepiyolit olduğu tespit edilmiştir (Sabah 1998).

Sepiyolit kalınlaştırıcı ve tiksotropik (süspansiyonda katı tanelerin çökmeye karşı gösterdikleri direncin, süspansiyonun hareketlenmesiyle azalıp, durgun halde iken artması) özellik sergilediğinden kozmetik ürünlerinde (akışkan emülsiyonlar, maskeler, diş macunu, krem ve rujlar gibi) çok fazla kullanım alanı mevcut olduğu açıklanmıştır (Alvarez 1984, Clarke 1989).

Sepiyolit, partikül şekli nedeniyle kolayca floküle (çok ince tanecikli olduğu için çöktilemeyen bir kolloiddeki katı taneciklerini, uygun maddeler katarak bir araya yaklaştırıp, büyüterek çöktürme işlemi) edilmez ve boyalarda, ilaçlarda, farmasötiklerde ve kozmetiklerde askıya alma maddesi olarak kullanım alanı mevcut olduğu bildirilmiştir (Murray 1986, Clarke 1989).

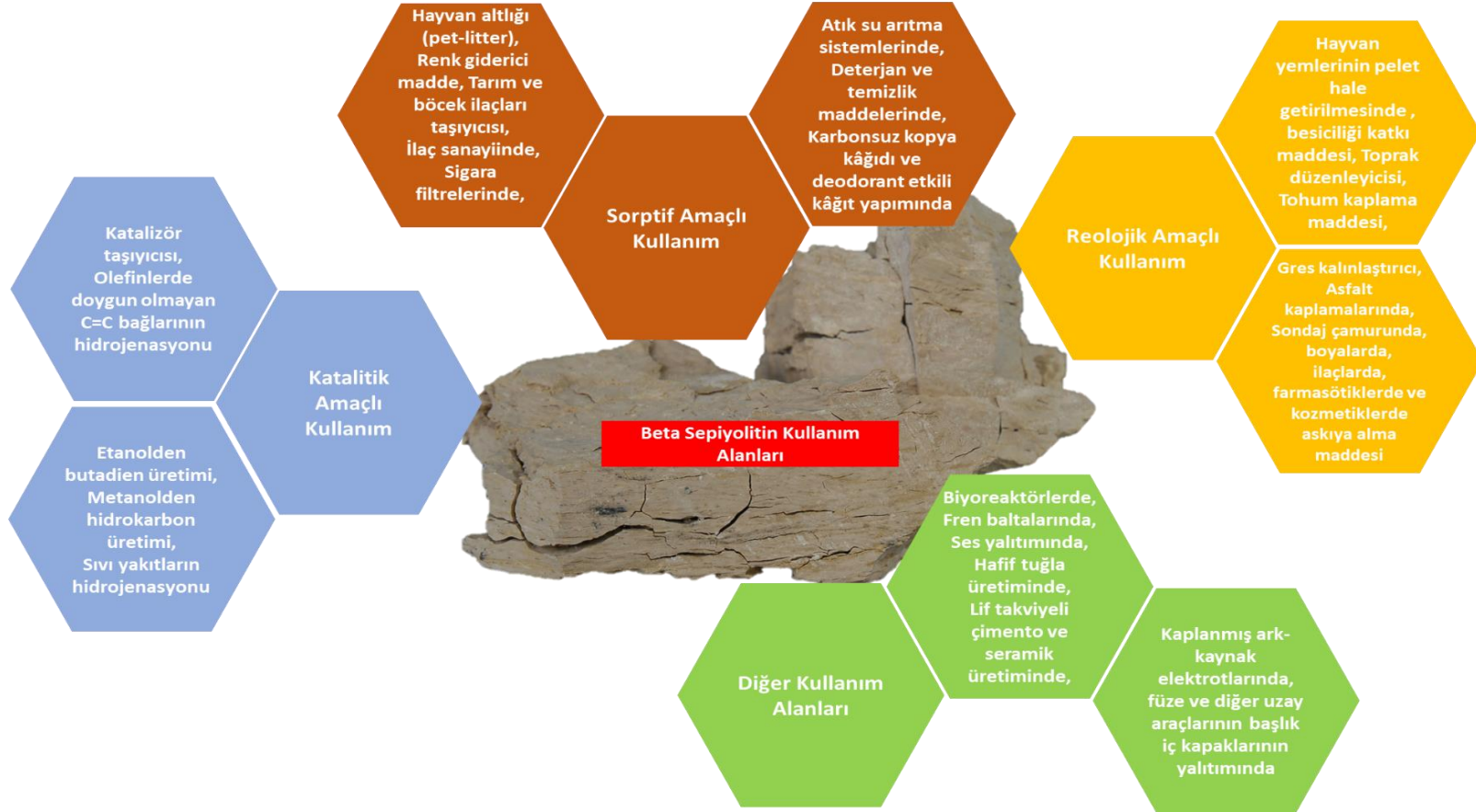
Yüzey aktif maddelerle yüzeyi hidrofobik hale getirilen ve bu sayede madeni yağlarda iyi bir dağılma özelliği gösteren sepiyolit yüksek viskoziteli gres yağı elde edilmesinde kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Alvarez 1984, Sabah 1999). Sepiyolit bağlayıcı özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Alvarez 1984). Bu özelliği sayesinde balık, kümes hayvanları ve küçük baş hayvan yemlerinin pelet hale getirilmesinde kullanılmaktadır (Slamova ve ark. 2011).

Hayvan besiciliği katkı maddesi olarak besicilikte yemle karıştırıldığında verim artışı sağlamakta ve hayvanlarda amonyum dengesini kontrol etmektedir. Avrupa Birliğinde tüm hayvan türleri için bağlayıcı, topaklanmayı önleyici ajan ve pıhtılaşma sağlayıcı olarak onaylanmıştır (Anonim 2013).



Tarımda toprak düzenleyicisi olarak; tohum kaplama ve gübre süspansiyonlarında, kâğıt, mukavva, filtre ve duvar kâğıdı, kauçuk sanayilerinde dolgu maddesi ve sıvı deterjan bileşimlerinde süspansiyon malzemesi, tuğla ve seramik ürünlerden yüksek teknolojik bal peteği görünümlü seramikler üretilmesinde kullanım alanları mevcut olduğu bildirilmiştir (Alvarez 1984, Clarke 1989).

Sepiyolit diğer uygulamaları ise, Japonya'da yürütülen araştırmalarla, atık sulardan biyogaz üretiminde metanojenik bakteri taşıyıcısı ya da biyoreaktör olarak kullanımı, buna karşılık kanserojen etkisinin asbeste kıyasla son derece düşük olması nedeni ile asbest yerine fren baltalarında kullanılması, ses yalıtımında, hafif tuğla yapımında, lif takviyeli çimento üretiminde ve seramik üretiminde ve kaplanmış ark-kaynak elektrodlarında kullanılmasında yaygın olarak sepiyolit kullanılmaktadır (Alvarez 1984, Clarke 1989, Ürersoy 1989, Can 1992, Sabah 1999, Tekin 2004, Yılmaz 2007).



Şekil 2.6. Beta sepiyolit kullanım alanları

## 2.5. Sepiyolit Toksik Etkisi ile İlgili İn Vitro ve İn Vivo Çalışmalar

Denizeau (1985) tarafından yürütülen bir in vitro genotoksisite çalışmasında ortalama 2,04  $\mu\text{m}$  (%86) uzunluğa, çapı 0,01-0,1  $\mu\text{m}$  (%96) sahip sepiyolit (Sherbrooke, Canada) fiberlerin 1-10 mg/ml dozlarında, 20 saat süre içerisinde primer sıçan hepatositlerinin DNA sentezinde bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir.

Wagner ve ark. (1987) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ratlara 12 ay boyunca haftanın beş gününde 6 saat boyunca 10 mg/m<sup>3</sup>, 6  $\mu\text{m}$  uzunluğundan ve 0,5  $\mu\text{m}$  çapından küçük sepiyolit tozu (Vallecas, İspanya) solunumuna maruz bırakılmıştır. Bu süreler sonunda tümör gelişiminde herhangi bir artış tespit edilmemiştir.

Rödelsperger ve ark. (1987) sıçanlara (Vicálvaro- Vallecas, İspanya) ortalama 1,2  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 0,05  $\mu\text{m}$  çapında 80 mg/hayvan sepiyoliti periton içi uygulanmıştır. Bu numunenin 180x10<sup>6</sup>/mg fiberinin uzunluğunun % 0,9'nun uzunluğunun 5  $\mu\text{m}$  eşit veya büyük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her hayvanın toplam doza karşılık olarak 5  $\mu\text{m}$  üzerindeki fiber sayısı 14x10<sup>9</sup> olarak bildirilmiştir. 32 sıçandan ikisinde karın tümörleri (sarkomlar veya mezotelyomalar) gözlenmiştir.

Yine Rödelsperger ve ark. (1987) sıçanlara Finlandiya sepiyolitinin (ortalama 2,9  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 0,05  $\mu\text{m}$  çapında) 10 mg'ı periton içi uygulanmıştır. Bu numunenin 55x10<sup>8</sup>/mg fiberinin uzunluğunun % 0,9'nun uzunluğunun 5  $\mu\text{m}$  eşit veya büyük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her hayvanın toplam doza karşılık olarak 5  $\mu\text{m}$  ve üzerindeki fiber sayısı 55x10<sup>9</sup> olarak bildirilmiştir. Bu sepiyolit numunesinin antofilit içeren amfibol madde içerdiğini belirtmişlerdir. Abdominal tümörler (sarkomlar veya mezotelyomalar, uterus tümörleri hariç) 36 hayvanın 24 tanesinde gözlemlenmiştir.

Hansen ve Mossman (1987) bir in vitro çalışmasının sonucunda, sepiyolit (1  $\mu\text{m}$  uzunluğunda) hem hamster hem de sıçan alveolar makrofajlardan süperoksit anyon salımını uyarmada nispeten etkili olduğunu göstermiştir.

Fukuda ve ark. (1988a) ratlarda intrapleural iğne uygulaması ile 20mg sepiyolit tozu hayvan başına enjekte edilmiştir. Bu ratlardan bir gruba Çin sepiyoliti (uzunluk, 1-100 µm; çap, 0.05-0.1 µm), diğer gruba Türkiye'den getirilen sepiyolit (uzunluk, 3-5 µm; çap, 0.01µm) uygulanmıştır. Türkiye sepiyoliti uygulanan 26 ratın hiçbirinde tümör gözlenmemiştir. Çin sepiyolitine maruz kalan 29 sıçanın üçünde plevral mezotelyumlarında hiperplasi (doku ya da organ hücrelerindeki sayıca artış ve büyüme), beşinde ise plevral mezotelyumlarında mesotelyoma (akciğer zarı kanseri) meydana gelmiştir.

Yine Fukuda ve ark. (1988b) farelerin bir grubuna Çin sepiyoliti (uzunluk, 1-100µm; çap, 0.05-0.1 µm), diğer grubuna Türkiye'den getirilen sepiyolit (uzunluk, 3-5 µm; çap, 0.01 µm) hayvan başına 5 mg ve 15 mg periton içine enjekte edilmiştir. Hem 5 mg hem de 15 mg uygulanan Çin sepiyolitleri sonucunda on farenin ikisinde peritoneal mesotelyoma, birinde ise peritoneal mezotelyumlarında hiperplasi meydana gelmiştir. Türkiye'den getirilen sepiyolit 15 mg uygulanan farelerde tümör gözlenmemiştir.

Pott ve ark. (1991) sıçanlara ortalama 1 mikron uzunluğunda, 0,06 mikron çapında sepiyolit (Vicálvaro- Vallecas, İspanya) 50 mg ve 250 mg hayvan başına periton içi uygulanmıştır. Bu uygulanan 50 mg sepiyolit fiberlerinin uzunluğunun 5 µm uzun olanların sayısının tüm fiber sayısına göre % 0,9'nu ( $7.56 \times 10^9$  fiber), çapının ise 2 µm küçük olduğu, yine uygulanan 250 mg sepiyolit fiberlerinin uzunluğunun % 0,9'nun ( $37,8 \times 10^9$  fiber) 5 µm'dan uzun, çapının ise 2 µm küçük olduğu belirtilmiştir. 50 mg ile enjeksiyon yapılan sıçanlarda tümör bulunmadığı, ancak yüksek doz grubunda 21 hayvanın ikisinde abdominal tümör (mesotelyoma ve sarkoma) gözlenmiştir.

Koshi ve ark. (1991) Çin hamster akciğer kanseri hücrelerine dört çeşit sepiyolit örnekleri (Çin, Japonya, İspanya ve Türkiye), 48 saat boyunca 10-300 µg/mL doz aralıklarında uygulanması sonucu poliploidiyi başlattığını bildirmiştir. Çin sepiyoliti yüksek derece kristallik içermekle birlikte uzunluğu 1-10 µm, çapı ise 0,01-0,1 µm'dur. Çin sepiyoliti diğer sepiyolit örneklerine göre poliploidi oluşturma özelliği güçlü olduğu tespit edilmiştir. Ancak diğer ülke sepiyolitlerin Çin'deki örneklere göre çok daha az etkili olduğu, Japonya sepiyolitinin 3-7 µm uzunluğunda, çapının 0,01-0,07 µm; İspanya ve Türkiye sepiyolitlerinin, uzunluğunun 3-5 µm, çapının ise 0,01 µm olduğu belirtilmiştir. Bu örneklerin hiçbirisi kromozomal sapmalarını uyarmadığı bildirilmiştir. Ayrıca Koshi ve

ark. (1991) sepiyolitın sitotoksik etkisinin, kristalite ve lif uzunluğu ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir.

Hem Lopez-Galindo ve Sanchez Navas (1989) hem de Santarén ve Alvarez (1994) sepiyolit ile ilgili yaptıkları değerlendirmede Finlandiya, Çin ve diğer bölgelerde dağınık, tortul olmayan (muhtemelen hidrotermal) sepiyolit tortuları olduğunu bildirmişlerdir ve bunlar 20 µm'dan daha uzun, çok kristalli liflerle karakterize olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda sepiyolitın kanserojen etkisinin oluşum şekli ile yakından ilişkili olduğu, sedimanter oluşumlu sepiyolitlerin genel olarak kanserojen olmadığı, buna karşılık hidrotermal kökenli oluşumların kanserojen etki yarattığını açıklamışlardır.

Governa ve ark. (1995) insan polimorf nükleikositleri (PMN) ve sığır alveoler makrofajları (AM) hücre hatlarında modifiye edilmemiş sepiyolitın ros artışına neden olmadığı bildirilmiştir.

Almanya Deutsche Forschungsgemeinschaft kurumu tarafından sepiyolit (lifli toz) tozları için maksimum işyeri konsantrasyonunu belirten bir değer belirlenmediği bildirilmiş olup, Almanya'da sepiyolit kanserojen potansiyele sahip olduğundan şüphelenilen bir madde olarak sınıflandırılmıştır (Grup 3) (Anonim 1996).

Uluslararası kanser araştırma birimi, insanlarda sepiyolitın kanserojen olduğuna dair yeterli kanıt bulunmadığını, 5 µm uzun sepiyolit liflerinin kanserojen olduğuna dair deneysel analizlerde sınırlı kanıtlar olduğunu, 5 µm dan küçük sepiyolit liflerinin deneysel analizlerin yetersizliğin dolayı kanserojen olduğuna dair yeterli kanıt olmadığını vurgulamıştır. Bu nedenle, sepiyolitın kanserojen bir madde olup olmadığı tam olarak net ortaya konulmadığı için grup 3 olarak sınıflandırılmıştır (Anonim 1997).

Devlet planlama teşkilatı (DPT) tarafından yayınlanan raporda, Japon Çalışma Bakanlığı-Endüstriyel Hijyen Milli Enstitüsünden tarafından gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda, İspanyol ve Türk sepiyolitlerinin düşük sitotoksik ve genotoksik etkisine rağmen Çin sepiyolitinin bu etkilerinin çok kuvvetli olduğunu ortaya koymuş olduğunu bildirmiştir (Anonim 2001b).

Toledo-Magana ve ark. (2015) amipli dizanteriye (*Entamoeba histolytica*) uygulanan sepiyolit nanokillerinin 1 mg/ml dozunda 72 saat sonra canlılık % 70 civarında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sepiyolit nanokillerine (10-1000 µg/ml) maruz kalan RAW 264,7 (Fare makrofajları, kan) hücre hatlatında 60 saat sonunda canlılık oranının % 60 düştüğü, fare kemik iliği makrofajlarında en yüksek inhibisyonun gerçekleştiği (60 saat, canlılık %20) ve insan periferik kan makrofajlarında ise (48.saat, %80 canlılık) çok etkilenmediği bildirilmiştir

J. Cervini Silva ve ark. (2015a) sepiyolitinin lipid peroksidasyonunu inhibe edebildiği, J. Cervini Silva ve ark. (2015b) fare kulak ödemeine karşı sepiyolitinin anti-inflamatuar olduğu, insan hücre hatları olan U251 (glioblastoma, beyin tümörü), SKLU-1 (akciğer adenokarsinoma), K512 (kronik miyeloid lösemi), HCT-15 (İnsan kolon adenokarsinomu) ve MCF-7 (İnsan insan beyaz meme adenokarsinomu) ise yüksek dozlarda sepiyolite maruz bırakıldığında ancak düşük sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir.

J. Cervini Silva ve ark. (2017) çeşitli ülkelerden elde edilen sepiyolitinin çeşitli hücre hatları üzerinde proliferatif veya anti-proliferatif etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Bu proliferatif veya anti-proliferatif etkinin sepiyolitinin gözenek boyutu ile ilişkisi olmadığı ancak en yüksek mikroporoziteye sahip (343 m<sup>2</sup>/g) sepiyolitinin (Sepetçi köyü, Eskişehir, Türkiye) U251 (glioblastoma, beyin tümörü) hücre hattı üzerinde % 100 inhibisyona neden olduğu, SKLU-1 (akciğer adenokarsinoma) hücre hattı üzerinde ise % 22,8 proliferatif etkiye neden olduğu bulunmuştur.

Castro-Smirnov ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sepiyolit nanofiberlerinin taşıdıkları silanol grupları nedeniyle DNA'ya direkt olarak bağlanabilecekleri gösterilmiştir. Castro-Smirnov ve ark. (2017) sepiyolitinin makropinositoz yoluyla memeli (V79 hamster) hücrelerine spontan bir şekilde girebileceği, hatta bir hücreye girdikten sonra bu hücreden diğer hücreye transfer edilebileceğini gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada MTT testi kullanılarak sepiyolitinin U2OS insan osteokarsinoma hücrelerinin canlılığında doza bağlı olarak %20'ye varan bir azalmaya yol açtığı da bildirilmiştir.

Rodriguez-Rojas ve ark. (2017) sepiyolit bakteriyel hücrelerine girebileceği ve plazmid DNA'sında çift iplik kırıklarına yol açabileceğini bildirmişlerdir. Lopez-Pacheco ve ark. (2017) CD-1 farelerde bazı sitokinlerin mRNA ifadelerinde düşüşe yol açabileceğini bildirmişlerdir.

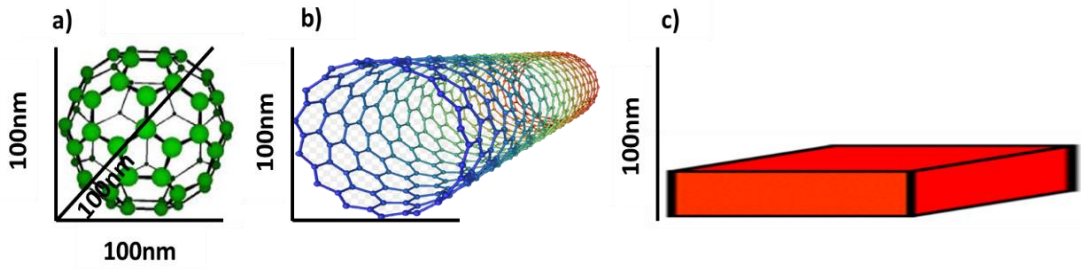
Sepiyolit farklı coğrafik bölgelerde, farklı tektonik hareketler sonucu oluştuğundan, her bölgenin kendine özgü sepiyolit yapısı mevcut olup, sepiyoliti oluşturan liflerin farklı şekil ve uzunluklarda olması, içerisinde farklı yapıları barındırması gibi nedenlerle sepiyolit ile yapılan çalışmalarda yukarıdaki literatür özetinde görülebileceği gibi standart sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle sepiyolit ile yapılacak çalışmalarda karakterizasyon çalışmaları ile çalışılan sepiyolit tüm özellikleri net bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Bunlardan birincisi sepiyolit hangi bölge ve coğrafyaya ait olduğu, ikincisi sepiyolit saflık oranı, bileşiminde yer alan mineraller ve bileşiklerin oranı, asbest içerip içermediği tespit edilmeli, üçüncüsü sepiyolit çeşidinin belirlenmesi ( $\alpha$ ,  $\beta$  formu), dördüncüsü çalışılacak maddenin ham sepiyolit etkisinin mi yoksa yapı olarak kendisini oluşturan nano fiber yapılı sepiyolit etkilerinin mi belirlenecek olması, beşincisi çalışılan ham sepiyolit veya nano sepiyolit liflerinin hücre içerisine girip girmediğinin tespit edilmesi, altıncı olarak da çalışılacak nanoyapılı sepiyolit fiberlerinin boyut oranlarının tam olarak tespit edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada nano sepiyolit fiberleri kullanılacağı için öncelikle nanoyapıların kendine has özellikleri irdelenerek, toksisite çalışmalarında kullanılan yöntemler ve toksisite çalışmalarında karşılaşılan sorunlar ele alınacaktır. Bir sonraki başlıkta üretilmesi planlanan nano yapıların özellikleri ve hücre içerisindeki etkileri üzerine değinilecektir.

## 2.6. Nanoteknoloji

Günümüzde toplumların gereksinim ve taleplerin artması ile birlikte, bu gereksinim ve ihtiyaçlara yönelik yön veren bilgi birikimi artmakta ve teknolojiler çeşitlenmektedir. Bu çeşitlenen teknolojiler içerisinde son yıllarda büyük artış gösteren nanoteknolojidir. Nanoteknoloji, nanoboyutta malzemeler üreterek ve bu malzemeleri kullanarak yeni alet ve aygıtlar üretmeyi amaçlamaktadır (Rasdtogi 2012). Nanomalzemeler, en az bir boyutunun 1-100 nm arasında olduğu (Borm ve ark. 2006) mikro ve üstü yapılardan ya da atom veya bileşiklerden sentezlenebilen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Thrall 2004). Nanomalzemeler, çok farklı şekillerden oluşan (kristal, iğne, yıldız, şerit, tüp, çubuk, kurdele, küre vs.) yapılara sahip olup (Buzea ve ark. 2007) genellikle nanopartiküller, nanofiberler, nanotüpler ve nanokompozitler adı altında gruplandırıldığı bildirilmiştir (Borm ve ark. 2006).

Nanomalzemeleri oluşturan yapılardan nanopartiküllerin üç boyutlu, nanofiberlerin ise en az iki boyutlu ve nanoplakaların en az bir boyutlu nanoölçekli yapılar olup (Şekil 2.7), bu nano yapılarından meydana gelen kompozitler, agregatlar, aglomeratlar, nanogözenekli sistemler ve nanoköpükler ise iç veya dış yapılarında nano ölçekli maddeler bulundurmakta olduğu bildirilmiştir (Krug ve Wick 2011).



**Şekil 2.7.** Nanoölçekli nanometaryeller a) Nanopartiküller üç boyutu b) Nanofiberlerin en az iki boyutu c) Nanoplakaların en az bir boyutu

Nano boyutlara sahip nanoyapılar, kendi mikroyapıları ile karşılaştırıldığında birim kütle başına çok daha geniş bir yüzey alanına ve çok daha fazla partikül sayısına sahip olduğu için (Buzea ve ark. 2007) benzersiz fizikokimyasal özellikler göstermekte olduğu bilinmektedir. Nanoyapıları avantajlı kılan özellikler aynı zamanda onları insan sağlığı ve çevre için riskli de kılmakta olduğu açıklanmıştır (Krug ve Wick 2011, Anonim 2012).



Bu nedenle insan yararına üretilen nanomalzemelerin üretilmeden önce detaylı toksikolojik değerlendirmelere ihtiyaç duyulması gerektiği önem arz etmektedir.

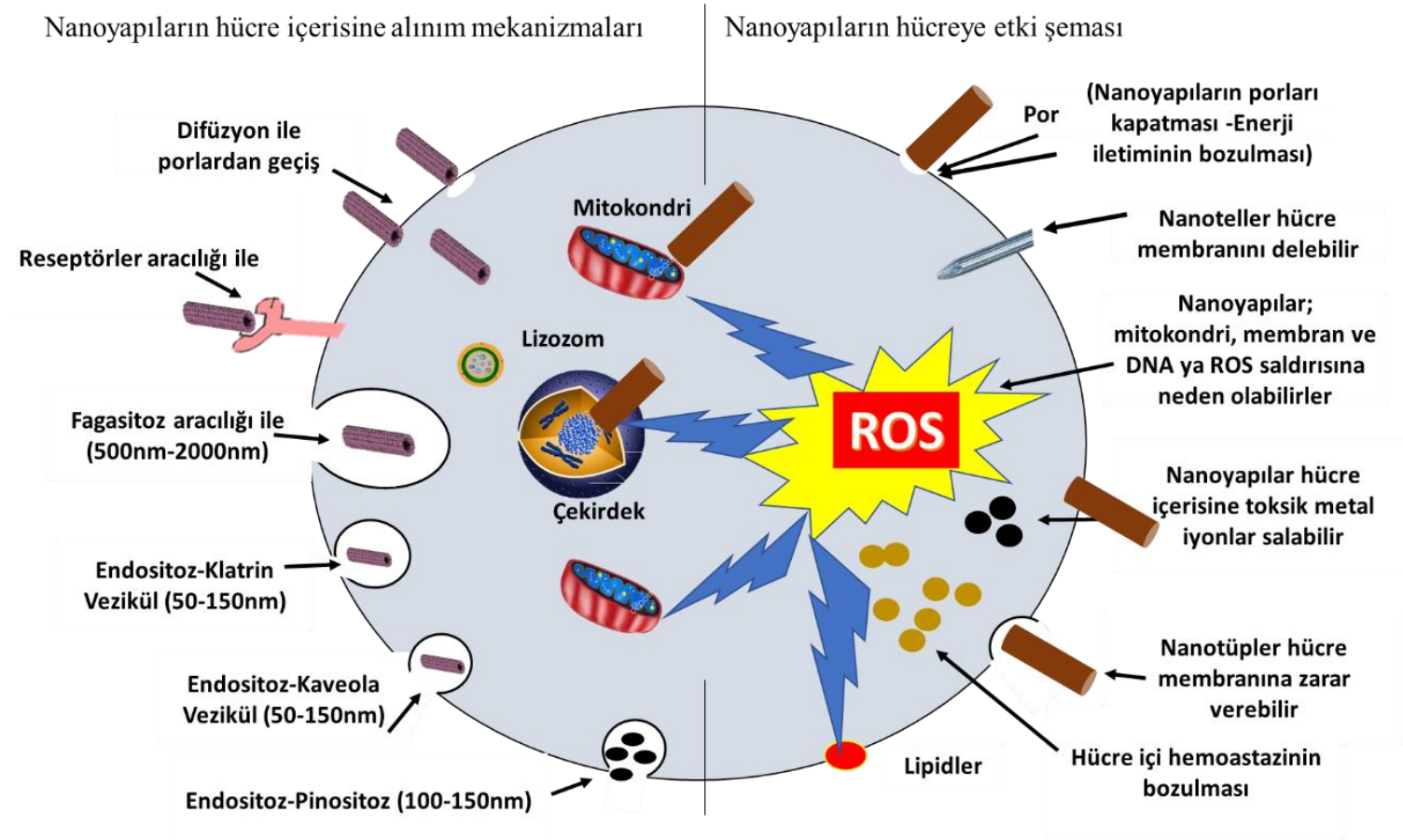
### **2.6.1. Nanotoksikoloji**

Nanopartiküllerin neden olduğu özel problemleri ortaya çıkarmak, bu alanda bilgi eksikliğini doldurmak (Donaldson ve ark. 2004) ve toksisite çalışmalarında kullanılan nanomateryallerin uygun şekilde karakterizasyonunu sağlamak için nanotoksikoloji alanı ihtiyaç duyulmuştur.

Nanopartiküller yüzey özellikleri ve kuantum etkileri nedeniyle aynı formdaki daha büyük malzemelerden önemli ölçüde farklılık göstermekte olduğu bildirilmiştir (Roduner 2006). Nanomateryallerin toksik özellikleri kimyasal kompozisyonu, miktarı, çözünürlüğü, şekli, nanopartiküllerin safsızlığı, yüzey alanı ve yüzey yükü gibi parametrelere bağlı olduğu açıklanmıştır (Çoşkun 2013).

Nanoteknoloji çalışmalarında kullanılan bu benzersiz özelliklere sahip nano materyallerin hücre içerisine nasıl girdiği, hücrede içerisindeki etkilerini ve bu etkileri hangi mekanizma ile yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalardan ilki nanopartiküllerin hücre içerisine alınım mekanizmaları Şekil 2.8 gösterilmiştir.

Nanoyapılar hücre içerisine iki farklı yoldan alınabildiği, birinci yolun; bazı nanoyapılar porlardan geçebilecek büyüklükte ise porlardan difüzyonla hücre içerisine geçebileceği (More 2006, Bhatt 2011, Karahalil 2013), ikinci yolun ise; endositozun farklı şekilleri ile gerçekleştiği açıklanmıştır. Endositozun ilk yolu, reseptörler aracılığıyla hücre zarından geçemeyecek büyüklükteki maddelerin endositoz yoluyla hücre içerisine alınmasıdır. Endositozda, reseptörler maddeyi tanıyarak çeşitli proteinler (klatrin, adaptin ve dinamin) ile birlikte vezikül (cep) oluşturarak ya da plazma zarının hücre içine doğru yapmış olduğu 50-100 nm'lik invajinasyonlar (kaveola) ile içeri alınmaktadır. Diğer bir yol fagositoz ile hücreye yaklaşık 500-2000 nm arasındaki partiküllerin yalancı ayaklar ile alınması olayı olduğu, son olay ise pinositoz ile sıvıların hücre içerisine alınması olduğu açıklanmıştır (Krug ve Wick 2011, Karahalil 2013).



Şekil.2.8. Nanoyapıların hücre içerisine alınım mekanizmaları ve hücreye etki şeması

Nanoyapıların doğrudan ve dolaylı olarak hücre ile etkileşime girebileceği ve birçok hücreye neden olabileceği bilinmektedir. Nanoyapıların doğrudan porların önünü tıkayabileceği, hücre zarını delebileceği ve zara zarar verebileceği, bu nedenle enerji iletiminin bozulabileceği bildirilmiştir (Mtijevic 2010). Ayrıca hücre içerisine giren nanoyapıların proteinler veya DNA gibi karşılaştırılabilir büyüklükteki biyolojik makromoleküllere bağlanarak hücre homeostazi için yan etkilere neden olabileceği açıklanmıştır (Krug ve Wick 2011). 40 nm'den küçük nanoyapıların ise hücre çekirdeğine girebileceğini (Mtijevic 2010) bu nedenle çekirdeğe ulaşan nanoyapıların doğrudan bölünme sırasında, iğ iplikleri veya DNA ile etkileşime girerek genetik materyalin hasar görmesine neden olabileceği açıklanmıştır (Singh ve ark. 2009). Nanometaryeller dolaylı olarak da hücre içerisine giren nanoyapıların bünyelerindeki metal iyonları salarak toksiteye neden olacağı (Song ve ark. 2012) nanoyapıların küçük boyutları nedeniyle daha geniş bir yüzey alanına sahip oldukları için reaktif oksijen türevleri (ROS) meydana getirebileceklerine ve hücre hasarına sebep olabilecekleri açıklanmıştır (Colvin 2003, Nel ve ark. 2006).

Dolaylı mekanizmalar ile hücre etkileşimi ise; Nanoyapılar, nötrofiller ve makrofajlar gibi aktifleştirilmiş fagositlerin etkinleşmesine neden olarak, bu inflamatuvar hücrelerden üretilen ROS salınmasına, mitokondri içinde elektron taşınmasını etkileyerek (sitokrom P450 enzimlerini ve NADPH-oksidadı uyararak) ROS üretimine neden olduğu bildirilmiştir (Risom 2005, Karlsson 2010, Fubini ve ark. 2010).

### **2.6.2. Nanoyapıların hücre içi ros oluşumundaki rolü**

Nanoyapıların yüzeyleri kendilerine özgü olup, yüksek yüzey alanları nedeniyle daha büyük yapılardan daha fazla serbest radikal oluşturur. Nanotoksikoloji çalışmalarında hücrede meydana gelen DNA hasarı ve hücrenin apoptoza sürüklenmesinin sebebinin nanoyapıların oluşturduğu oksidatif stres olarak açıklanmıştır (Stone ve ark. 2007, Park ve ark. 2008, Asharani ve ark. 2009, Ahamed ve ark. 2011). Nel ve ark. (2006) nanoyapıların küçük boyutları nedeni ile daha geniş yüzey alanına sahip oldukları için reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturabileceklerini ve bu oluşan ROS'ların hücre hasarına yol açabileceği bildirilmiştir.

Önceki çalışmalar, nanoyapıların hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA hasarına (DNA zincir kırıkları, çapraz bağlar ve baz/şeker katılım ürünlerinin oluşmasına, nükleik asitlerde hasar) neden olduğunu göstermiştir (Ahamed ve ark. 2008, Ahamed ve ark. 2010, Akhtar ve ark. 2012).

### **2.6.3. Nanoyapıların toksitesini etkileyen faktörler**

Nanotoksikoloji klasik toksikoloji çalışmalarına göre daha kapsamlı farklı parametreler ve karmaşık bir süreci içermektedir. Nanoyapıların partikül boyutu ve yüzey alanı, agregasyon ve aglomerizasyon, zeta potansiyeli, partikül şekli ve kristal yapısı, yüzey kimyası ve yüzey reaktivitesi önemli parametreleri oluşturmaktadır.

Nanoyapıların büyüklüğünün hücre üzerindeki önemli etkilerinden biri, partikül büyüklüğü azaldıkça hücre bariyerlerini kolay geçmesi ile birlikte daha yüksek etki göstermesidir (Shukla ve ark. 2005). Mesleki ve çevresel ortamlarda partikül konsantrasyonlarının küçük boyutlu ve yüksek bolluğu nedeniyle, nanopartiküllerin yüzey ağırlık oranının dikkate alınması gerekli olduğu açıklanmıştır (Nel ve ark. 2006). Ayrıca partikül boyutunun protein veya DNA gibi karşılaştırılabilir büyüklükteki biyolojik makromoleküllere bağlanabileceği için hücresel homeostazinin bozulabileceği bildirilmiştir (Cedervall ve ark. 2007, Lundqvist ve ark. 2008, Krug ve Wick 2011). Parçacık boyutu küçüldükçe yani çap küçüldükçe parçacıkların yüzeylerinde daha fazla çevre ile etkileşime giren atomlar bulunabileceği bildirilmiştir (Oberdörster ve ark. 2005)

Agregasyon ve aglomerizasyon; birçok tekli partikülün güçlü bağlar ile birleşmesi (metalik bağ veya kovalent bağ) agregat yapıları, zayıf bağlar ile birleşmesi (Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik güç ve/veya yüzey gerilimi) ise aglomerat (topak) yapıları oluşturduğu açıklamıştır (Jiang ve ark. 2009). Bu nedenle bu yapıların toksik etkilerinin tekli nanopartiküllerin toksik etkisinden çok farklı olarak ortaya çıkacağını bildirmişlerdir (Singh ve ark. 2009).

Zeta potansiyeli kısaca tanecikler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Hunter 1981). Zeta potansiyeli partikülün yüzey yüküne bağlı olup genellikle  $\pm 15$  mV'dan yüksek olan taneler dispersiyon (dağılma) özelliği,  $\pm 15$  mV'dan küçük değere sahip partiküllerin yüklü olanları aglomerasyon yani çökelme

özelliği gösterdikleri bildirilmiştir (Doğan 2001). Bu yük partiküllerin bir araya gelerek agregat oluşturmalarını engelleyen bir güç olarak görev aldığından dolayı nano çalışmalarında kullanılacak bir çözeltideki partiküllerin zeta potansiyelinin belirlenmesi büyük önem arz etmekte olduğu bilinmektedir.

Partiküllerin şekli (yıldız, şerit, tüp, çubuk, kurdele, küre, tanecik) hücre içerisine alınım ya da hedef moleküllerle etkileşimde farklı reaksiyonlara yol açabileceği (Obersorster ve ark. 2007), partiküllerin bileşimi aynı olsa bile farklı kristal formların toksitesinde farklı olabileceğini bildirilmiştir (Gurr ve ark. 2005).

Partikül yüzeylerinde depolanan enerji tekrar serbest bırakıldığında radikal oluşumuna veya hidrokarbonların bozulmasına neden olabileceği için (Krug ve Wick 2011) kendi boyutunda olan protein ve DNA'ların doğrudan yüzeylerine bağlanabilir (Cedervall ve ark. 2007, Lundqvist ve ark. 2008) ve proteinlerin inhibisyonuna ya da diğer protein modifikasyonlarına neden olabilir.

#### **2.6.4. Nanomateryal toksisitesi ve testlerin yetersizliği**

Nanomateryallerin toksisitesinin belirlenmesinde kullanılan metotların çoğu kimyasal toksikoloji için tasarlanmış ve standardize edilmiş metotlar olduğu bilinmekle beraber, nanomateryallerin birçok benzersiz fizikokimyasal özellikler (boyut, şekil, çözünürlük, topaklaşma, element saflığı, yüzey alanı gibi) gösterdiği ve bu özelliklerin de klasik toksisite testlerinde sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Karahalil 2013). Toksisite testlerinde genellikle kullanılan kolorimetrik ve floresan boyalar yaygın olarak kullanıldığı için, test maddeleri bu boyaaların optik özelliklerini değiştirebildiğinden, sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Doak ve ark. 2009, Karahalil 2013). Özellikle karbon bazlı nanopartiküller ya da karbon nanotüpler hücre canlılığın tayininde kullanılan formazan boyaalarla (3-(4, 5-Dimetiltiyazol2-il)-2, 5-difeniltetrazolim bromür (MTT), nötral kırmızısı, alamar mavisi, komasi mavisi) etkileşip, yanlış absorbanlar verdiği, gümüş nanopartiküllerin yanlış spektrum değişikliklerine neden olduğu, floresan boyaaların oksidatif tayininin de yaygın olarak kullanılan bir propla (2', 7'-diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) nanopartiküllerin etkileşerek yanlış yorumlara neden olduğu bildirilmiştir (Doak ve ark. 2009).

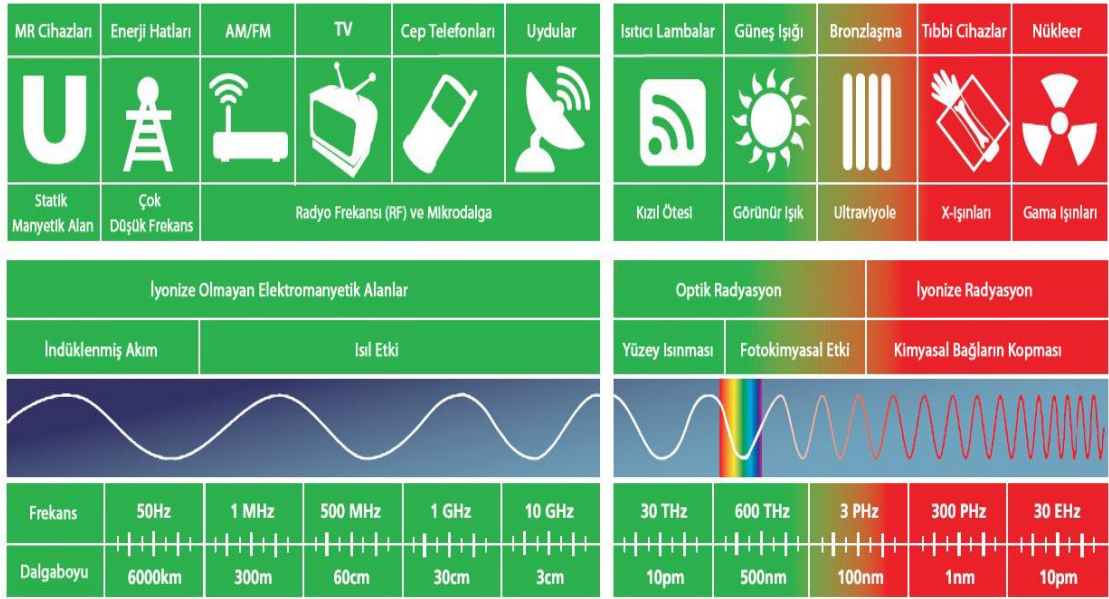
Ayrıca nanopartiküller kültür ortamında bulunan hücrelerin büyümesi ve üremesi için gerekli bileşikler ile birleşerek nanopartiküllerin çevresinde proteinden oluşan bir yapı oluşturduğu ve bu yapı nanomateryallerin etkisini maskeleyiği açıklanmıştır. Bu nedenle toksisiteden nanopartiküllerin etkisi değil oluşan bu protein kompleksi sorumlu olduğu bildirilmiştir (Lynch ve ark. 2007, Lynch ve Dawson 2008). Mikroçekirdek yönteminde de sitokalin B (hücrede sitokinezi durdurur) nanopartiküllerin endositoz ile hücre içine alınmasını engellediği bildirilmiştir (Fischer ve Chan 2007, Doak ve ark. 2009, Kazimirova ve ark. 2012).

Yukarıda aktarılan nanoyapıların kendine has özelliklere sahip olabildiği bu nedenle hücre toksikoloji çalışmalarının zorluklar getirdiği açıkça görülmektedir. Bu sebeple nanoyapıların karakterizasyon işlemleri ayrıntılı bir şekilde yapılmalı, toksik etkiler belirlenirken nanopartikül için en uygun yöntem belirlenip titiz bir şekilde çalışma yapılması gerektiği önem kazanmıştır.

## **2.7. Radyasyon**

Radyasyon, enerjinin uzayda dalgalar ya da tanecikler (foton) halinde yayılması olayı veya yüksek hızdaki partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisi olarak tanımlanmıştır. Radyasyon enerjisine göre iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak ikiye ayrılmıştır. Ancak radyasyonun dalga boyu küçüldükçe tehlike etkisinin arttığından, tehlike arz eden radyasyonun iyonlaştırıcı radyasyon olduğu açıklanmıştır (Kıymet 2013).

İyonize radyasyonlar, kütleli yapıya sahip partiküler radyasyon (alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ), elektron, proton ve nötronlar partikülleri) ve foton enerjili dalga karakterinde (X ve  $\gamma$  ışınları, yüksek enerjili) elektromanyetik radyasyon olmak üzere iki gruba ayrıldığı bildirilmiştir (Özalpan 2001, Algüneş 2002). İyonize olmayan ve iyonize olan radyasyon dalga boyları elektromanyetik spektrumda Şekil 2.9. da gösterilmiştir.

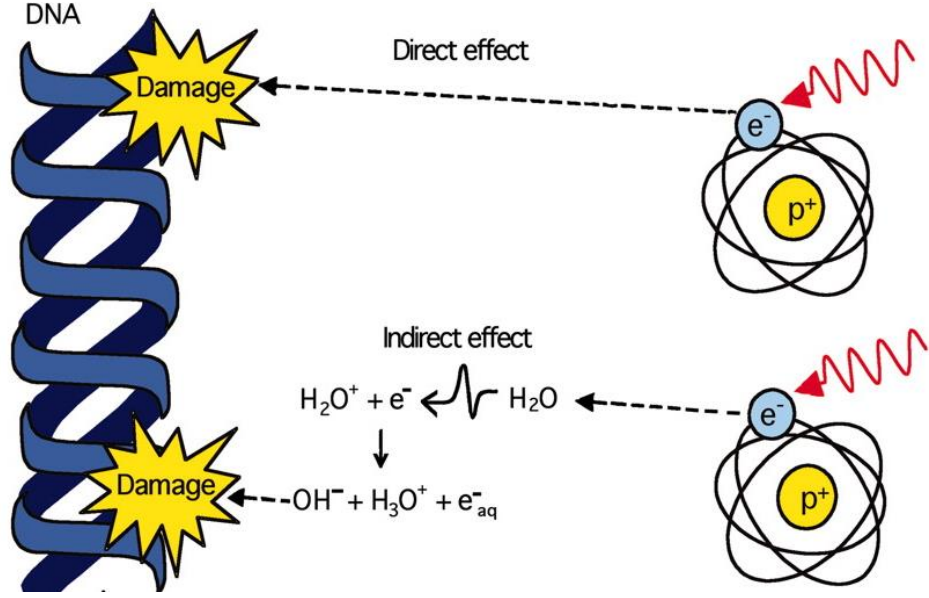


Şekil 2.9. Elektromanyetik spektrum (Anonim 2019c)

### 2.7.1. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri

İyonize radyasyonlar, bir atom ya da molekülden bir elektron ( $e^-$ ) kopararak iyonlaşmaya yol açtıkları bildirilmiştir (Algüneş 2002). Bu nedenle biyolojik dokular iyonize radyasyon ile etkileştiklerinde doku veya hücredeki yapılardan elektronlar uzaklaştırılır ise iyonizasyon meydana gelmektedir. İyonizasyon olayı biyolojik sistemlerde tüm moleküller için önemli bir hasar verici etmen olduğu bilinmektedir. İyonize radyasyonun biyolojik dokulardaki etkisi direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Şekil 2.10, Şekil 2.11) (Morgan ve Sowa 2005).

Direkt etkide radyasyonun hücredeki en kritik hedefi DNA olmakla birlikte (Sachs ve ark. 1992), RNA ya da özel bir enzimde ilk hedefler arasında olabilmektedir. DNA'nın iyonize radyasyonla uyarıldığında purin halkalarının açılması, fosfodiester bağlarının kırılması ve DNA'nın tek ya da çift sarmalı kırılması gibi olaylar gerçekleşebileceği açıklanmıştır (Friedberg 1995, Varanda ve Tavares 1998).

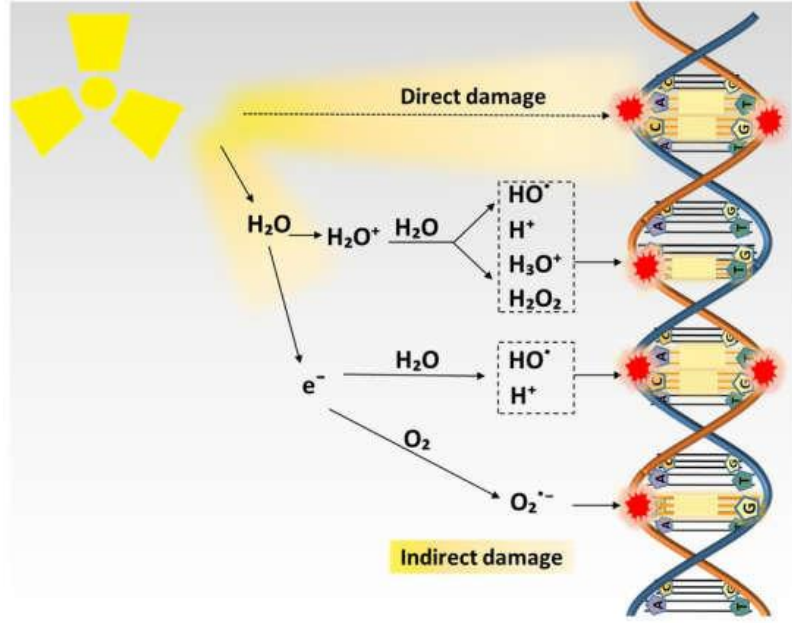


Şekil 2.10. İyonize radyasyonun direkt ve indirekt etkisi (Morgan ve Sowa 2005)

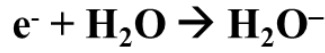
İyonize radyasyonun biyolojik yapının içerisinde bulunan su molekülleri veya ve diğer moleküller ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ürünlerin hücrede hasar oluşturması olayı indirekt etki olarak ifade edilmiştir (Algüneş 2002). İndirekt etkide iyonize radyasyonun etkisiyle fırlayan elektron biyolojik sistem içinde ilerlerken başka elektron yapılarına çarpışarak, zincirleme etki sonucu birçok olayın gerçekleşmesine neden olacağı için çok önemli bir olay olduğu bildirilmiştir (Toplan 2016)

Bu indirekt etkide radyasyon, özellikle su ile etkileşip serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Radyasyonun su ile etkileşiminde radyoliz olayları meydana gelmektedir. Radyoliz olayları çok kısa ömürlü ancak çok reaktif olan radikaller açığa çıkardığı bilinmektedir. Bu nedenle serbest radikaller kararlı yapılar olmadıklarından çevrelerindeki tüm kimyasal bağlara saldırıp kararlı hale geçmeye çalıştıkları açıklanmıştır (Dizdaroğlu 2012).





Şekil 2.11. Suyun hidrolizi (Wang ve ark. 2019)



Şekil 2.12. Suyun hidroliz aşamaları

Radyolizin ilk aşamasında radyasyon serbest su ile etkileşime girerek, bir serbest elektron ( $\text{e}^-$ ) ve bir iyonize su molekülü ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ) oluşturduğu, bu serbest elektron yüksek derecede reaktif olup, diğer iyonize olmamış su molekülü ile etkileşerek negatif yüklü ve yüksek derecede stabil olmayan  $\text{H}_2\text{O}^-$  molekülü oluşturduğu Şekil 2.12’de gösterilmiştir. Bu reaksiyonlar sonunda oluşan  $\text{H}_2\text{O}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}^-$  kararlı değildir ve her biri parçalanarak bir iyon ve bir serbest radikal oluşturduğu bildirilmiştir (Hall ve Giaccia 2012, Toplan 2016, Wang ve ark. 2019).  $\text{H}_2\text{O}^+$  molekülü bir serbest  $\text{H}^+$  ve  $\text{OH}^\bullet$  radikaline dönüştüğü, diğer  $\text{H}_2\text{O}^-$  molekülü ise derhal  $\text{OH}^-$  iyonu ve  $\text{H}^\bullet$  serbest radikaline ayrıldığı açıklanmış olup bu reaksiyonlar sonucunda  $\text{H}^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}^+$  ve  $\text{OH}^-$  olduğu açıklanmıştır (Hall ve Giaccia 2012,

Toplan 2016, Wang ve ark. 2019). Ayrıca suda çözülmüş halde bulunan oksijenin suyun hidrolizi ile açığa çıkan bir elektron etkileşmesi sonucu (Wang ve ark. 2019) yıkıcı etkisi olan birçok radikale (Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroperoksi radikalleri ( $HO_2^*$ ) ve hidroperoksi iyonları ( $HO_2^-$  vb.) dönüştüğü bildirilmiştir (Çetin ve ark. 2011). Bu nedenle ortamda çözülmüş oksijen varlığı yaşam süresi ve stabilitesi daha fazla olan serbest radikaller oluşturacak şekilde etkilediği açıklanmıştır (Kıraç ve Yüksel 2001, Toplan 2016).

Sonuçta radyasyonun doğrudan etkisi ve dolaylı etkisi ile hücredeki kritik hedefler; hücre zarındaki lipitler, proteinler, enzimler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) zarar görmekte olup ve fonksiyonları yitirebilmektedir. Radyasyonun hücre üzerindeki yıkıcı etkilerinin bazı maddeler ile birlikte kullanılması ile radyasyonun etkinliğini değiştirebileceği bilinmektedir. Bu kapsamda radyasyonun etkisini artırıcı yani duyarlaştırıcılar olarak bilinen maddeler radyosensitiv maddeler, radyasyona karşı koruyucu olarak kullanılan maddeler radyoprotektörler başlığı altında açıklanacaktır (Kıraç ve Yüksel 2001)

### **2.7.2. Radyosensitivite (Radyasyona duyarlılık)**

Farklı hücre, doku veya organ tipleri karşılaştırıldığında radyasyon hasarı için radyasyona son derece duyarlı iken diğerine göre dirençli olabileceği bildirilmiştir (Kıraç ve Yüksel 2001). Radyasyona duyarlılık, hücredeki moleküler oksijen seviyesi, hücrelerin çoğalma yeteneği ve farklılaşması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kıraç ve Yüksel, 2001).

Hücrelerdeki moleküler oksijen düzeyinin yüksek olması radyasyon etkinliğini artıran çok önemli bir etken olduğu yukarıda anlatılmıştır (Wang ve ark. 2019). Kanserli bir dokudaki hücrelerin çevre hücreler tarafından sıkıştırılması sonucu yeterli kan alamaması ile birlikte, bu kanserli doku merkezinde oksijen miktarları düşmekte olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kanserli dokular radyoterapi ile muamele sonucunda bu dokulardaki düşük oksijen nedeniyle serbest radikal üretimi yapılamayacağından radyoterapinin etkisinde azalmakta olduğu açıklanmıştır (Toplan 2016).

Ayrıca radyasyonun hücrede etkilediği en önemli moleküllerden biride DNA'dır. DNA hücrede kalıtım materyali olarak görev yapmakta ve hücre bölünmesinden sorumlu organeldir. DNA radyasyon ile hasara uğradığında kromozomal tamir mekanizmaları, hücreler mitoz ya da mayoz girmeden önce kromozomal hasarı tamir edemezlerse replikasyon başarısız olacaktır.

Sonuçta hücre ölümü ya da genetik olarak eksik nesillerle sonuçlanacaktır. Daha sık mitoz siklusuna giren hücrelerin radyasyona maruz kalmada en duyarlı hücreler olduğu (Kan hücreleri), tamir için daha az zamanları olacağı için radyasyona duyarlılık artacağı ve genetik mutasyonlar ve anormal hücre fonksiyonları tetiklenmesine sebep olacağı açıklanmıştır (Toplan 2016). Daha az sıklıkta mitotik aktivite gösteren hücrelerin (sinir, lens, kas, iskelet) daha az radyosensitivite gösterdikleri açıklanmıştır (Toplan 2016). Ancak oositler ve periferik lenfositler bölünmediği ve iyi farklılaşmış olduğu halde radyasyona son derece duyarlı olduğu, bunun nedenin ise bilinmediği bildirilmiştir (Kıraç ve Yüksel 2001, Toplan 2016).

Radyasyona karşı en duyarlı olan geç G2 fazındaki ve mitoz evresindeki hücreler olduğu, sentez (S) fazı ise hücre siklusunun radyasyona karşı en dirençli faz olarak kabul edilmiş olduğu bildirilmiştir (Hall 1988, Özalpan 2001, NRC 2006). S fazındaki direnç, DNA kırıklarının hızlı onarma kabiliyetinde olan sentez enzimlerinin varlığına ya da S fazından hemen önceki hücrelerde mutasyon sıklığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Hall 1988). Ayrıca yapılan çalışmalar hücrede doğal olarak bulunan ve canlıyı radyasyona karşı koruyucu etkisi olan sülfidril (SH) gruplarının değişik hücre fazlarında farklı miktarlarda bulunduğunu ortaya koyan çalışmalar olduğu bildirilmiştir (Carrano 1975, Hall 1988).

Radyasyon ışınlanması sırasında ortamda bulunan bazı maddelerin varlığı radyasyonun etkisini arttırıcı etki göstermesine radyoduyarlılaştırıcı veya radyosensitizerler olarak adlandırılır (Hall 1988, Pak 2001). En iyi radyosensitizer olarak oksijen olduğu bildirilmiştir (Pak, 2001). İdeal bir radyosensitizerin en önemli özelliğinin toksik olmaması ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerin radyasyona karşı duyarlılığını artırabilmesi olduğu ve 5-FU, mitomycin, cis-platin ve doxorubicin gibi birçok ilacın günümüzde ideal seviyede olmasa bu özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Pak 2001).

### **2.7.3. Radyoprotektörler**

Radyoprotektörler normal dokulara radyasyonunun verdiği zararlı etkileri azaltmak için kullanılan maddelere denilmektedir (Tabakçioğlu 2013). Radyasyonunun etkisi sonucu serbest radikallerin açığa çıktığı için hücreler radyasyona maruz bırakılmadan veya maruz bırakıldığı sırada verilmesinin etkili olduğu vurgulanmıştır (Varanda ve Tavares 1998).

Radyoprotektif etki mekanizmaları, serbest radikal ürünlerinin etkisizleştirilmesi, hedef moleküllere hidrojen atomu bağlanması ile kararlı bileşiklerin oluşturulması, karışık disülfid bileşiklerinin DNA molekülüne bağlanması ile birlikte geçici olarak replikasyonun durdurulmasına ve hücre bölünmesinin yavaşlatılması, dokularda hipoksi gelişiminin uyarılması şeklinde meydana gelmekte olduğu açıklanmıştır (Biaglow ve ark. 1983, Varanda ve Tavares 1998).

Radyoprotektif maddeler başlıca thiol bileşikleri, diğer sülfür bileşikleri, anestezi ilaçları, analjezikler ve trankilizanlar gibi farmakolojik ajanlar, WR-1065, WR-2721, vitamin C, E ve glutatyon gibi bileşikler olmakla birlikte (Biaglow ve ark. 1983, Varanda ve Tavares 1998) birçok farklı radyoprotektif madde olduğu bilinmektedir.

### **2.8. Biyolojik Testler**

Çağımızda teknolojinin gelişmesine paralel olarak, günlük yaşamımızda kullandığımız maddelerin ve malzemelerin sayısında ve çeşitliliğinde büyük artışlar meydana gelmiştir. Bu çeşitliliği oluşturan ve hayatımızın her alanında kullanmakta olduğumuz yüzbinlerce farklı çeşitte teknoloji ürünü materyallerin gerek makro düzeyde insan ve çevre sağlığı bakımından etkilerinin belirlenmesi gerekse mikro düzeyde hücre ve hücre altı yapılara etkilerinin ortaya konulabilmesi için maddelerin olası toksik etkileri, doz eşik değerleri, biouyumluluğu ve bu uyumluluk limitlerinin tespiti gibi verilerin ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında nano alfa sepiyolit liflerinin meydana getirebileceği sitotoksik etki XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue canlılık testleri kullanılarak belirlenecektir. Doz artışına bağlı olarak ortaya çıkabilecek sitotoksik etkinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak için komet testi ve ROS testi kullanılacaktır. Ayrıca Muse Annexin-V Testi

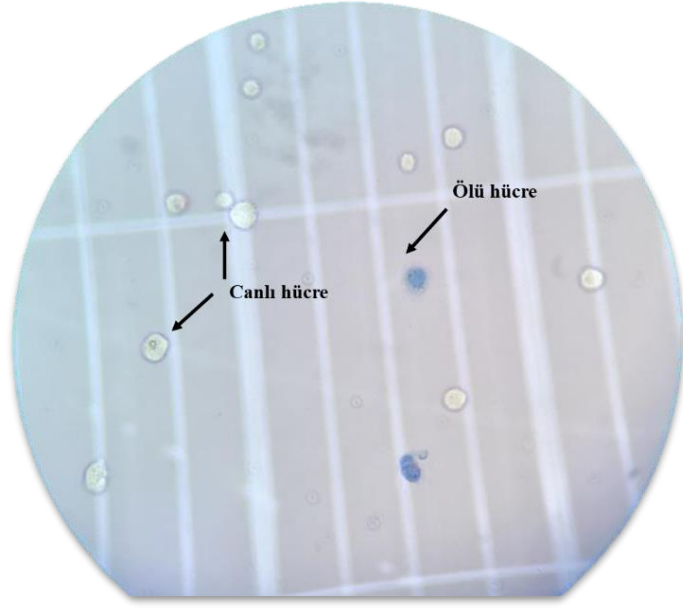
ve İkili boyama yöntemi (İkili Boyama, Akridin Orange-Etidyum Bromür) kullanılarak hücre ölüm mekanizması belirlenecektir.

### **2.8.1. XTT canlılık testi**

XTT yönteminde XTT kitinde bulunan sarı tetrazolium tuzları metabolik olarak aktif olan hücre mitokondrilerinde dehidrogenaz enzimi tarafından parçalanarak yoğun renkli kırmızı formazan kristallerini oluşturur. Mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimi hücre öldükten kısa bir süre sonra etkinliğini yitirdiği için kırmızı renkli formazan boyası sadece canlı hücrelerde oluşmaktadır. Bu nedenle üretilen kırmızı formazan boyasının miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Oluşan formazan kristallerinin yansıttığı floresan özellik sayesinde spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri ölçülerek canlılık oranları tespit edilebileceği açıklanmıştır (Weislow ve ark. 1989, Roehm ve ark. 1991)

### **2.8.2. Trypan blue canlılık testi**

Negatif yüklü olan trypan blue boyası hücre membranı zarar görmemiş canlı hücrelerin içerisine giremezken, hücre membranı zarar görmüş ölü hücrelerin içerisine girerek hücreyi maviye boyadığı bildirilmiştir (Anonim 2019d). Bu nedenle Şekil 2.13’de olduğu gibi ışık mikroskobu altında canlı ve ölü hücreler tespit edilip ölüm oranları belirlenebilmektedir. Ayrıca belli süreden daha uzun trypan boyası içinde kalan canlı hücrelerin de maviye boyandığı bildirilmiştir (Anonim 2019d).



Şekil 2.13. Trypan blue ile canlı ve ölü hücrelerin boyanması

### 2.8.3. Muse count viability testi

Muse Count Viability testinde tek bir reaktif içerisinde özel karışımlı floresan boyalar mevcut olup, bu boyalardan biri membranı geçerek hücrelerin çekirdeklerini boyarken, ikinci boya ise sadece hücre membranı tehlikeye girmiş, ölmüş veya ölmekte olan hücrelerin çekirdeklerini boyayabildiği bildirilmiş olup Şekil 2.14’de Muse™ count viability kit el kitapçığında bu şekiller gösterilmiştir (Anonim 2019e). Muse™ cell analyzer cihazında hücreler flow cell adı verilen bölümden geçerken lazer ışığı ile uyarılarak hücrelerden yansıyan ışık toplanarak canlılık ve ölüm oranları belirlenebildiği açıklanmıştır (Anonim 2019e).



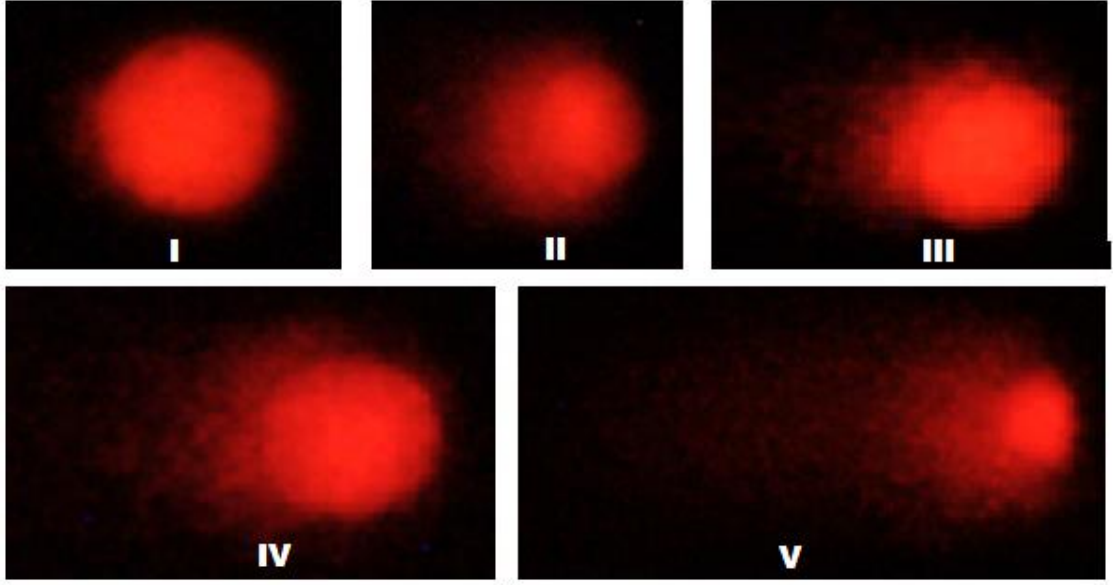
Şekil. 2.14. Muse Count Viability Testi ile canlı ve ölü çekirdeğin boyanması (Anonim 2019e)

#### **2.8.4. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi)**

Çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerin hücre DNA'sı üzerindeki DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metot olup, oksidatif stres, ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek zincir kırıklarını doğru, hassas, hızlı, ucuz ve az bir örnek hacmi kullanarak ölçen bir yöntem olup, tüm canlı hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010, Şekerçioğlu ve Şekerçioğlu 2011).

Komet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklığa göç etmeleri esasına dayanmakta olduğu açıklanmıştır (Pitarque ve ark. 1999, Çavaş ve Könen 2008). Daha önceleri tek hücrenin DNA'sının agaroz jel içerisinde elektroforetik alanda göç etmesi olayına tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis -SCGE) olarak isimlendirilirken, deney sonucunda elde edilen görüntülerin kuyruklu yıldız andırdığı için komet yöntemi olarak da adlandırılmıştır (Singh ve ark. 1988).

Bu yöntemle göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozta yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar kuyruk oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmakta olduğu açıklanmıştır (Östling ve ark. 1984, Singh ve ark. 1988, Martin ve ark. 1995). Hasarlanan hücre DNA'ları hasarın derecesine göre Şekil 2.15' de görüldüğü gibi beş kategoride değerlendirilmektedir.



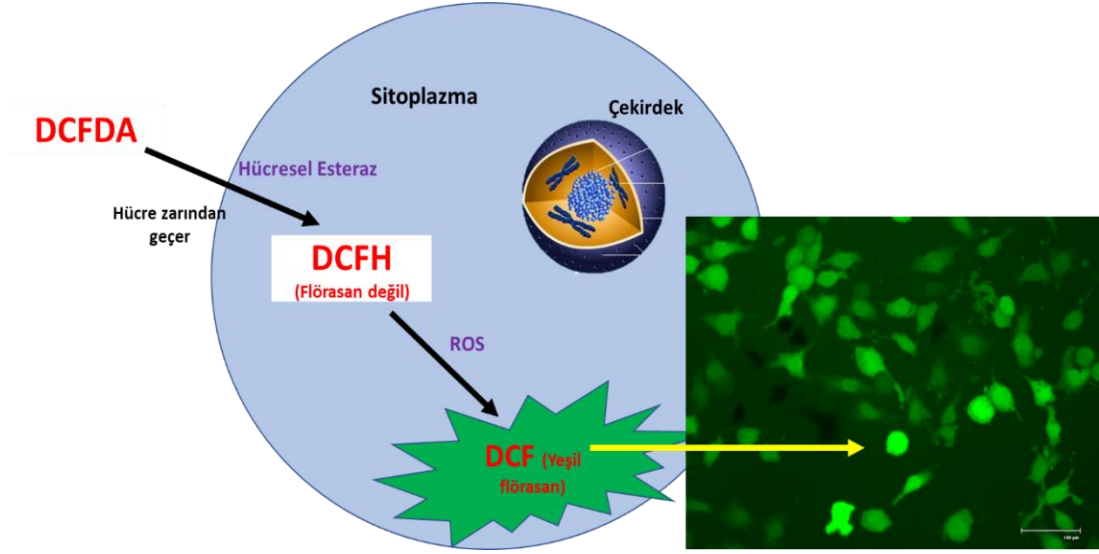
**Şekil 2.15.** Farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntülerinin komet yöntemi ile belirlenmesi, I- Hasarsız DNA II-Çok az hasarlanmış DNA III-Az hasarlanmış DNA IV-hasarlanmış DNA V- Tümüyle hasarlanmış DNA (Akca 2015)

#### **2.8.5. Reaktif oksijen türleri (ROS) testi**

Hücre içi ROS test kiti hidroksil, peroksil veya hücre içinde reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılan hücre tabanlı bir test olduğu bildirilmiştir (Anonim 2019f). Bu testte hücreye giren fluorojenik prob 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) kullanılmakta olduğu açıklanmıştır. Bu boya, DCFH-DA hücre içine difüze olur ve hücreler tarafından deasetillenerek floresan olmayan 2',7'-diklorodihidrofloreseine (DCFH) dönüştürüldüğü, bu yapı ise ROS tarafından oldukça floresan özellikteki 2',7'-diklorodihidrofloresein (DCF)'e hızlı bir şekilde oksitlendiği bildirilmiştir (Anonim 2019f, Kumbıçak 2013).

Sonuçta morfolojik olarak görüntülediğinde yeşil floresan yayan bir görüntü oluşturduğu (Şekil 2.16), floresan yoğunluğunun hücre sitoplazması içindeki ROS seviyesi ile orantılı olup, hücre ile etkileşime giren maddelerin oluşturduğu oksidatif stresin bu yöntem ile belirlenebildiği bildirilmiştir (Pogue ve ark. 2012, Anonim 2019f).





Şekil 2.16. ROS testinin mekanizması

### 2.8.6. Muse Annexin-V apoptoz testi

Apoptozis olarak adlandırılan programlı hücre ölüm yolağını takip eden hücrelerde bu ölüm şekline özgü bir takım karakteristik değişiklikler gözlenmekte olduğu bilinmektedir. Bu değişimler arasında, normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin membranın dış yüzüne transloke olması, spesifik hücresel proteinlerin degradasyonu veya kırılması, kromatin kondensasyonu ve apoptozisin geç evresinde membran bütünlüğünde bozulma olduğu açıklanmıştır (Rudin ve Thompson 1997, Ulukaya 2003, Ulukaya 2010). Fosfatidilserinin translokasyonu hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana geldiği ve yüksek afinitesi nedeniyle Annexin-V membran dışına transloke olmuş fosfatidilserine çok hızlı bir şekilde bağlandığı bildirilmiştir (Martin ve ark. 1995). Dış yüze transloke olan fosfatidilserinlere ile birleşen Annexin-V, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenirse görünür hale getirilebildiği ve böylece apoptotik hücrelerin tespit edilmesine imkân sunmakta olduğu açıklanmıştır (Gatti ve ark. 1998, Overbeeke 1998, Tasarik ve ark. 1998, Ulukaya 2010). 7-Aminoaktinomisin-D (7-AAD) aktinomisinden kökenlenmiş DNA'da seçici olarak GC bölgelerine bağlanan floresans özellikli bir molekül olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark. 1991). Hücre zarının geçirgenliği erken apoptotik hücrelerde geç apoptotik hücrelere göre daha düşük olduğu için, geç apoptotik hücrelerde DNA'ya bağlanmış 7-AAD miktarı daha yüksek olduğu

bildirilmiştir (Zembruski ve ark. 2012). Geç apoptotik ve ölü hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci madde olarak 7-ADD eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve 7-AAD (kırmızı floresan) ile aynı zamanda boyanan hücrelerde, normal hücreler: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-) ile boyanmazken erken apoptotik hücreler; Anneksin V (+) ile boyanıp ve 7- AAD (-) ile boyanmazlar, ancak geç apoptotik hücreler ve ölü hücrelerin Anneksin V (+) ve 7- AAD (+) ile her ikisinde boyanmaktadır. Bu durumda hücre içerisindeki boya karışımlarını okuyan lazer bir cihaz ile hücrelerin erken apoptoza mı yoksa geç apoptoza mı sürüklendiği tespit edilebildiği bildirilmiştir (Anonim 2019g).

### **2.8.7. Apoptozun morfolojik olarak ikili boyama yöntemiyle görüntülenmesi**

Hoechst boyası, DAPI (4,6-diamidine-2'-phenylindole), propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür ve FITC (fluorescein isothiocyanate) gibi floresan boyaların kullanılması ile floresan mikroskop altında apoptoz ve nekrozlu hücreler tespit edilebilmekte olduğu bildirilmiştir (Güleş ve Eren 2008). Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür şekilde boyayabilmektedirler. Hem canlı hemde ölü hücreleri Hoechst, Akridin orange ve DAPI ile, geç apoptotik /sekonder nekrotik veya primer nekrotik olan tüm ölü hücreleri ise propidium iyodür ve etidyum bromür ile boyanabildiğini, böylelikle canlı ve ölü hücre ayırımına olanak tanınmasına fırsat sunduğu bildirilmiştir (Yılmaz 2005, Güleş ve Eren 2008, Doğan ve ark. 2013).

İkili boya yönteminde Hoechst veya Akridin orange boyası ile birlikte propidium iyodür veya etidyum bromür ile boyama gerçekleştirildiğinde hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir. Ancak ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hücrenin boyandığı renk ile nükleus morfolojisine bakılarak karar verilebildiği bildirilmiştir (Yılmaz 2005, Güleş ve Eren 2008). Örneğin canlı hücreler akridin orange ile boyandığında morfolojik olarak benzer yeşil renkler, apoptozun erken döneminde nükleuslarında kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyonu gösteren parlak yeşil renkli noktalanmalar içerirken, geç apoptotik dönemdeki hücreler de sarı-turuncu renkte, nekrotik hücreler ise etidyum bromür ile kırmızı renkte boyanabildiği bildirilmiştir (Avcı ve ark. 2013).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilen iş basamakları (alfa sepiyolitinin temin edilmesi, alfa sepiyolitinin mikron seviyesine düşürülmesi ve nano alfa sepiyolit üretimi, mikro ve nano alfa sepiyolitinin karakterizasyon çalışmaları, nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içine girişi ve lokalizasyonu, nano alfa sepiyolitinin in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi, nano alfa sepiyolitinin olası radyobiyojik etkilerinin belirlenmesi) ve yerleri aşağıdaki Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada gerçekleştirilen iş basamakları ve yerleri

Sıra No	Deney Aşamaları	Gerçekleştirilen Yerler
1	Alfa sepiyolit temin edilmesi	Akın Lületaşı, Eskişehir
2	Alfa sepiyolitinin mikron seviyesine düşürülmesi ve nano alfa sepiyolit üretimi	Anadolu Üniversitesi – Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Uludağ Üniversitesi- Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü- Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarı
3	Alfa sepiyolitinin karakterizasyon işlemleri (XRD, XRF, SEM, TEM, Zeta Potansiyeli)	Anadolu Üniversitesi – Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Osmangazi Üniversitesi (ARUM), Afyon Kocatepe Üniversitesi, Akredite Doğaltaş Analiz Laboratuvarı Kütahya Dumlupınar Üniversitesi İleri Teknoloji Merkezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı
4	Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içine girişi ve lokalizasyonu (TEM ve Konfokal Mikroskop Analizi)	Osmangazi Üniversitesi-Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM)
5	Nano alfa sepiyolitinin radyasyonsuz/radyasyonlu in vitro sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesi	Uludağ Üniversitesi- Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü- Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarı
6	Radyasyon deneyleri	Uludağ Üniversitesi-Tıp Fakültesi- Radyasyon Onkolojisi Bölümü

### 3.1. Alfa Sepiyolitinin Temin Edilmesi

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere gerekli olan lületaşı Akın Lületaşı işletmesinden temin edilmiştir. Temin edilen lületaşı Eskişehir ilindeki Türkmentokat ve Karatepe Köyü bölgesinde faaliyet gösteren ocak işletmecilerine ait olup, bu bölgedeki yumrulu ve tabakalı sepiyolit oluşumunun eski göl ortamlarının nadir örneklerinden olduğu belirtilmiştir (Ece ve Çoban 1994). Söz konusu bu bölge sulak alan, koruma bölgesi, doğal/tarihi sit alanı, askeri bölge, özel bölge, ormanlık alan, milli/tabiat parkları, mağaralar gibi bölgeler kapsamında olmadığı için örnek alımı için özel izin gerekmemektedir.

### 3.2. Alfa Sepiyolitinin Mikron Seviyesine Düşürülmesi ve Nano Alfa Sepiyolit Üretimi

Sepiyolit ilk çıkarıldığında etrafı çeşitli killerle kaplı olarak alınmıştır. Daha sonra ıslatılarak etrafında bulunan bu killerden arındırılmış ve daha sonra toz haline getirilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Alfa sepiyolitinin madenden ilk çıkarılmış, temizlenmiş ve toz hali

Alfa sepiyolitinin mikron seviyesine düşürülmesi işlemine alfa sepiyolit tozlarının tane boyutunun düşürülmesi için öncelikle Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında bulunan halkalı değirmen kullanılarak 1 dk boyunca öğütülerek boyutları mikron seviyesine indirilmiştir.

Nano alfa sepiyolit üretiminde; alfa sepiyolit nano liflerine ayrılabilmesi için geniş kapsamlı literatür taraması yapılmıştır. Ancak beta sepiyolit (sanayi sepiyoliti) ile ilgili çeşitli çalışmalara rastlanılmasına rağmen alfa sepiyolit nano liflerine ayrılmasını gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmalarda beta sepiyolit (sanayi sepiyoliti) bilyalı değirmende kuru ve yaş öğütme, iyonik sıvılar kullanılarak, solvotermal yöntem ile, asit ile muamele edinilmesi, mekanik dağıtma, Tris-HCl asit ile muamele ve kısa süreli sonikasyon işlemlerinden geçirilmişlerdir (Çizelge 3.2).

İlk basamakta alfa sepiyolit mikron seviyesine düşürüldükten sonra ikinci basamakta, nano alfa sepiyolit üretimi için farklı yöntemler kullanılmıştır. İkinci basamağın birinci aşamasında halkalı değirmende öğütülen tozların boyutları mikron seviyesine indirilmiştir. Alfa sepiyolit tozlarının boyutlarını küçültmek için atritör adı verilen cihazda 60 dk boyunca, alkol ve su ortamında alfa sepiyolit boyutunun mikron seviyesinin altına düşürülmesi hedeflenmiştir. İkinci aşamada, halkalı değirmende öğütülen sepiyolit tozları ZrO<sub>2</sub> bilyalı değirmende 1 ve 2 saatlik kuru öğütmeye tabi tutulmuştur. Üçüncü aşamada, 15g/500 ml saf su çözeltisi 4 dk blender (Braun marka blender, 700 watt) yardımı ile mekanik dağıtmaya tabi tutulmuştur. Mekanik dağıtma yönteminde çeşitli çözücüler (su, alkol, Tris-HCl) kullanılmıştır. İlk önce 4 dk sadece mekanik dağıtma yöntemi çözücü su ve alkol kullanılarak uygulanmıştır. Sonraki adımda 1 mg/ml sepiyolit mekanik dağıtma (1dk blender) ile birlikte 1 dk 10mM Tris-HCl asitte, 1 mg/ml sepiyolit mekanik dağıtma (2 dk blender) ile birlikte 15 dk 10mM Tris-HCl asitte bekletilmiştir. Dördüncü aşamada mekanik dağıtmaya yöntemine sıcaklık parametresi ve manyetik karıştırıcı eklenmiştir. Daha sonra 4 saat manyetik karıştırıcıda (100°, 1250 dk/devir) karıştırılmıştır. Beşinci aşamada 4 dk blender, 4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir) sonucu elde edilen 15g/500 ml'lik çözeltinin mikron ve mikron altı filtrelerden süzülme işlemine başlanılmıştır. 1 mikron çapında polipropilen torba filtre, şırınga ucu filtreleri (0,2-0,45-0,8 µm) ve 4-7 µm ve <2 µm olmak üzere ve iki farklı kâğıt filtrelerden filtrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Altıncı aşamada, 4 dk blender, 4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir) sonucu elde edilen 225 ml'lik çözeltiye 25 ml'lik HCl (% 0,2) asit çözeltisi eklenmiştir. Tekrar 2,5 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 devir/dk) karıştırılmıştır. Yedinci aşamada ise 250 ml'lik beherde 100 ml distile su içerisinde 2048 mg ve 4096 mg halkalı değirmende öğütülen sepiyolit tozları kullanılarak 1 saat sonikatörde (Ultrasonik Homojenizatör, Sonics VCX750, Amp.

(Genlik) %40, 750 watt) sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm bu öğütme işlemlerinde süre çalışmaları yapılarak elde edilecek en küçük tane boyutunun elde edilmesi sağlanmıştır. Bu aşamada optimum tane boyutu eldesi için uygun öğütme parametreleri karakterizasyon sonuçları ile harmanlanarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.2.** Nano alfa sepiyolitinin üretim aşamaları a) Halkalı değirmen b) Braun marka mekanik dağıtıcı c) Atritör değirmen d) Bilyalı değirmen e) Sonikatör f) Çeşitli filtrasyon gereçleri g) Manyetik karıştırıcı

**Çizelge 3.2.** Nano alfa sepiyolitün üretim aşamaları tablosu

Mikron Seviyesine İndirme İşlemleri	Nano Alfa Sepiyolit Liflerine Ayırma İşlemleri		
<b>Halkalı Değirmen</b> 1 dk öğütme	<b>Atritör Değirmen</b> *60 dk öğütme (su ve alkol)	<b>ZrO<sub>2</sub> Bilyalı Değirmen</b> *1 ve 2 saat kuru öğütme	<b>Mekanik Dağıtma</b> *15g/500 ml saf su ve alkol çözeltisi içerisinde 4 dk blender *1 mg/ml sepiyolit 10mM Tris-HCl asitte 2 dk blender, 15 dk bekletme
	<b>Mekanik Dağıtma+Manyetik Karıştırıcı</b> *4 dk blender (15g/500 ml saf su çözeltisi) *4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir)		<b>Mekanik Dağıtma+Manyetik Karıştırıcı+HCl asit çözeltisi</b> *4 dk blender (15g/500 ml saf su çözeltisi), *4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir) *HCl (%0,2) asit çözeltisi
	<b>Mekanik Dağıtma+Manyetik Karıştırıcı+ Çeşitli Filtrasyon İşlemleri</b> *4 dk blender (15g/500 ml saf su çözeltisi), *4 saat Manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir), *15gr/500 ml'lik çözeltinin mikron ve mikron altı filtrelerden süzülme işlemi (1 mikron çapında polipropilen torba filtre, şırınga ucu filtreleri (0,2-0,45-0,8µm) ve 4-7 µm ve <2 µm olmak üzere iki farklı kâğıt filtreler)		
	<b>Sonikasyon İşlemi</b> *100 ml distile su içerisinde 2048 mg ve 4096 mg alfa sepiyolit tozlarının 1 saat sonikasyonu		

### **3.3 Alfa Sepiyolit (Lületaşı) ve Nano Alfa Sepiyolit Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. X-ışınları difraktometresi (XRD)**

XRD’de X-ışınları kullanılarak hem alfa sepiyolit hem de nano alfa sepiyolit atomik ve moleküler yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır. Her bir kristalin X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırdığı ve bu kırınım profillerinin bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımladığı göz önünde bulundurularak, kendine özgü atomik dizilimi hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

#### **3.3.2. X-ışını floresans spektrometresi (XRF)**

X-ışınları floresans spektrometre (XRF) cihazı ile yarı kantitatif kimyasal kompozisyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde alfa sepiyolit içerisindeki bileşiklerin miktarı belirlenmiştir.

#### **3.3.3. Tane boyut ölçümü**

Halkalı, atritör ve bilyalı değirmende öğütme işlemleri esnasında tane boyut ölçümleri Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği bölümü laboratuvarlarında bulunan Malvern marka Mastersizer 2000 model tane boyut ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleme**

SEM cihazında odaklanmış bir elektron demeti ile numunelerin yüzeyi taranarak görüntü elde edilir. Bu çalışmada SEM cihazı (JEOL JSM 5600 marka SEM cihazı) kullanılarak öğütülen numunelerin morfolojisi, şekli ve boyut analizi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.5. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme**

Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM) çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. TEM cihazı (Hitachi HT7800 TEM marka geçirimli elektron mikroskobu) ile numunemizin yüzey ve ince yapılarının ayrıntılı olarak görüntülenmesi, yapı-fonksiyon ilişkilerinin yorumlanması ve morfolojisi hakkında bilgiler elde edilmiştir.



### **3.3.6. Zeta potansiyeli ölçümü**

Zeta potansiyeli tanecikler arasındaki itme veya çekme değerinin ölçüsünü ifade etmektedir. Partiküller yüzey yüklerine bağlı olarak bir araya gelip agregat oluşturabilirler. Bu nedenle genellikle +15 mV'dan yüksek ya da -15mV'dan küçük değere sahip partiküller stabil olarak kabul edilmektedirler. Bundan dolayı nanopartikül çalışmalarında kullanılacak bir çözeltideki partiküllerin zeta potansiyelinin belirlenmesi gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, numunelerimizin zeta potansiyeli 25 °C'de Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins.) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.4. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Hücre İçi Girişi ve Lokalizasyonu (TEM ve Konfokal Mikroskop Analizi)**

#### **3.4.1. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme**

A549 (ATCC® CRM-CCL-185™) insan akciğer kanseri ve BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™)™ insan akciğer sağlıklı hücrelerine nano alfa sepiyolitinin IC<sub>25</sub> değerleri ile muamelesi sonucunda, hücre içerisine girebildiğinin görüntülenmesi ve hücre içerisindeki yerleşim yerleri hakkında detaylı bilgi elde etmek için TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için her iki hücre hattı 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekim yapılmıştır. Flaslardaki (10 milyon hücre olacak şekilde hazırlanmalı) besiyeri aspire edilerek, üç kez PBS (pH:7,4) ile yıkanmıştır. Tripsin ile kaldırılan hücreler tüplere aktararak santrifüj edilmiştir. Tüp içerisinde dipte çökmüş hücrelerin üzerindeki besiyeri/tripsin karışımı aspire edilerek üzerine %15'lik glüteraldehit (Deneyden önce 3 ml glüteraldehit içerisine 20 ml'lik PBS eklenerek hazırlanan fiksatif, koyu renkli şişede muhafaza edilir) solüsyonundan 5ml eklenmiştir. Bir gece boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Bu işlemler bittikten sonra TEM için biyolojik örnek hazırlama işlemleri ardından TEM cihazında (Hitachi HT7800) görüntülenme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ancak TEM cihazındaki analizlerde özellikle hücreler tripsinle kaldırılmadan, yıkanma, glüteraldehitin verilmesi, bir gece bekletilmesi işlemi sonucunda flask yüzeyine yapışan hücrelerin kazıyarak TEM görüntülerinin çekilmesi işlemide yapılabilmektedir. Bu yöntemle yapılan deneylerde hücrenin şekli değişmediği için daha ayrıntılı görüntüler elde edilebilecektir.

### **3.4.2. Lazer taramalı konfokal mikroskop ile floresan görüntüleme**

Alfa sepiyolit örneklerinin floresan özelliği konfokal mikroskop cihazı kullanılarak (ZEISS LSM 800) belirlenmiştir. Nano alfa sepiyolit örneklerinin floresan özelliğinden yararlanılarak hücre içerisine girip girmediği, girdi ise hangi bölgelerde lokalizasyon sergilediğini göstermek için konfokal mikroskop cihazı kullanılmıştır (ZEISS LSM 800). Bu cihaz ile alfa sepiyolit örneklerinin hangi dalga boylarında hangi floresan özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun için 60 mm'lik petrilere ekim yapılmış olup 24 saat sonra BEAS-2B ve A549 hücre hatlarının IC<sub>25</sub> değerleri ile dozlanmıştır. Dozlamadan 24 saat sonra besiyeri aspire edilerek üç kez PBS ile yıkanmıştır. %10'luk formalin ile petrilere üzerine kaplayacak şekilde yayılarak 10 dk boyunca fikse edilmiştir. Petri üzerine yayılan hücrelere DAPI boyası damlatılarak 5 dk boyanmış olup üzeri lamel ile kapatılarak konfokal mikroskop cihazı kullanılarak (ZEISS LSM 800) görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. Kullanılacak Hücre Hatları ve Hücre Kültürü Şartları**

Nano alfa sepiyolit'in tüm in vitro deneylerinde; A549 (ATCC® CRM-CCL-185™) insan akciğer kanser ve BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik havalandırılmalı kapaklı flasklar içerisinde 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li, nemli ortama sahip panasonic markalı inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücre hatları için besiyeri 500 ml RPMI-1640 (LONZA 12-702F) medyum içerisine; 60 ml fetal bovine serum (FBS, SIGMA – ALDRICH F9665), 6 ml penisilin – streptomisin (THERMO SH40003.12), 6 ml sodyum piruvat (THERMO SH30239.01), 3 ml L-glutamin (SIGMA – ALDRICH G7513) eklenerek hazırlanmıştır. Deney setlerinin hazırlanması sırasında canlı hücre sayıları tyrpan blue çözeltisi kullanılarak roche marka cedex model hücre sayım cihazı ile belirlenmiştir.

### 3.6. Kontrol ve Doz Gruplarının Belirlenmesi

Ana stok çözeltisi hazırlamak için 4.096 g lületaşı 100 ml distile suda bir saat sonikasyon yapılmıştır. (4096 mg/100 ml'lik hazırlanan bir çözeltinin liflerinden tamamen ayrılması için gerçekleşen doygunluğa ulaştığı görülmüştür) Ana stok çözeltisinden 6 farklı (160 µg/ml, 320 µg/ml, 640 µg/ml, 1280 µg/ml, 2560 µg/ml, 5120 µg/ml) çözelti hazırlanmıştır. Her dozlama öncesi hazırlanan çözeltiler 5 dk sonikasyon yapılmıştır. Tüm deneyler 25 cm<sup>2</sup>'lik flask ve 3 ml besiyerine göre planlanmıştır. Bu çalışmada solvent kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 200 µM ile dozu ile muamele edilmiştir. Ayrıca radyasyon dozlarının in vitro hücreleri üzerindeki etkisi düşük olan 1Gy ve yüksek olan 2Gy radyasyon dozu kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Deney dozlama planları (BK: Büyüme kontrol, SK: Solvent kontrol, PK: Pozitif kontrol)

<b>Kullanılan testler</b>	<b>Nano Alfa Sepiyolit</b>	<b>Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulanması</b>
<b>TEM Mikroskop görüntüleme</b>	75cm'lik flask, Her hücre hattının kendi IC <sub>25</sub> değeri, 24 saat muamele	-
<b>Konfokal Mikroskop görüntüleme</b>	60mm'lik petri, Her hücre hattının kendi IC <sub>25</sub> değeri, 24 saat muamele	-
<b>XTT Testi, Muse Count Viability Testi, Trypan Blue Canlılık Testi</b>	25cm'lik flask, 96 kuyucuklu 3ml besiyeri, BK, SK (375µl), PK(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,15µl),160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 µg/ml	<b>* Sadece XTT Testi</b> 25cm'lik flask, 96 kuyucuklu 3ml besiyeri 1Gy; 1Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 1Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 1gy+IC <sub>25</sub> ;2Gy, 2Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 2Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 2Gy+IC <sub>25</sub>
<b>Komet Testi</b>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri BK, SK (375ul), PK(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); IC <sub>6,25</sub> ; IC <sub>12,5</sub> ; IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ; IC <sub>75</sub>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri 1Gy; 1Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 1Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 1Gy+IC <sub>25</sub> ;2Gy, 2Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 2Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 2Gy+IC <sub>25</sub>
<b>Hücre içi ROS Testi (Morfolojik Görüntüleme)</b>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri BK, SK (375ul), PK(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); IC <sub>6,25</sub> ; IC <sub>12,5</sub> ; IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ; IC <sub>75</sub>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri 1Gy; 1Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 1Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 1gy+IC <sub>25</sub> ;2Gy, 2Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 2Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 2Gy+IC <sub>25</sub>
<b>Annexin-V Apoptoz Testi ve Flörasan mikroskop morfolojik görüntüleme</b>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri BK, SK (375ul), PK(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); IC <sub>6,25</sub> ; IC <sub>12,5</sub> ; IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ; IC <sub>75</sub>	25cm'lik flask, 3ml besiyeri 1Gy; 1Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 1Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 1gy+IC <sub>25</sub> ;2Gy, 2Gy+IC <sub>6,25</sub> ; 2Gy+IC <sub>12,5</sub> ; 2Gy+IC <sub>25</sub>

### 3.7. Deneylerde Kullanılan İn Vitro Testler

#### 3.7.1. XTT canlılık testi

Çalışmada nano alfa sepiyolitinin antiproliferatif etkisi XTT cell proliferation kiti (Biological Industries, BI) kullanılarak belirlenmiştir. Ancak 96 kuyucuklu ve farklı kuyucuklular üzerinde yapılan deneylerde malzemenin özelliğinden kaynaklandığı düşünülen derinlik yüzey alanı değiştiğinde çok farklı sonuçlar elde edilmesi, özellikle yüksek dozlarda küçük kuyucuklular da temizlenme zorluğu gibi nedenlerden dolayı farklı sonuçlar elde edildiğinden tüm deneylerde 25 cm<sup>2</sup>'lik flask kullanılmıştır. Deney setlerini oluşturmak için hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. Her bir flask 25x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde gerçekleştirilen ekim işleminden sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda platelerdeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Taze besiyeri eklenmiş platelerdeki hücreler belirlenen 9 doz grubu (BK, SK (375µl), PK (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,15µl), 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 µg/ml) ile 24 saat süre boyunca maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler PBS ile yıkanmıştır. Flasklardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplere alınmıştır. Tüplere alınan hücreler iyice homojenize edilerek her bir doz grubu için 96 kuyucuklara 100'er mikrolitre tüplerden aktarılmış olup ve küçük aktivatör ile aktive edilmiş XTT ile muamele edilmiştir. 2 saat inkübasyon süresi sonrasında Biotek marka ELx800 model mikropłaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir.

Her bir konsantrasyon için (1- Amuamele grubu/Akontrol)x100 formül kullanılarak % hücre inhibisyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan absorbans değerlerinden çizilen grafik üzerinde seçilen doğrusal üç nokta kullanılarak oluşturulacak doğrunun fonksiyon denklemi kullanılarak IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri belirlenmiştir.

#### 3.7.2. Trypan blue canlılık testi

Trypan blue canlılık testinde deney setlerini oluşturmak için hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. Her bir flask 25x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde gerçekleştirilen ekim işleminden sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Taze besiyeri eklenmiş flasklarda hücreler belirlenen 9 doz grubu (BK, SK (375µl), PK (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,15µl), 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 µg/ml) ile 24

saat süre boyunca maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler PBS ile yıkanmıştır. Flasklardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplere alınmıştır. Cedex cihazında hücre sayımı yapılabilmesi için 50 µl hücre ile 50 µl trypan blue boyası (5mg/ml in Saline, 100 mL, Biological Industries, BI) aynı ependorfa koyularak süspansiyon edilmiştir. Bu karışımın 10 µl'si A ve B olacak şekilde 4'erden toplam 8 bölüme olan cedex lamına (Cedex® XS Analyzer) yayılmıştır. Okutulma bilgisayarda cedex okutma programı ile yapılmış olup, bu programda çıkan sonuca göre canlı hücre sayısı kullanılarak hesaplama yapılmıştır, bu hesaplama 1000 µl' deki hücre sayısını vermiştir. Bulunan değerlerden hücre canlılığı grafiği çizilmiştir. Grafik üzerinde R<sup>2</sup> değeri en iyi olan doğrusal üç nokta belirlenerek, fonksiyon denklemi yardımıyla IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri belirlenmiştir.

### **3.7.3. Muse count viability testi**

Muse count viability testinde deney setlerini oluşturmak için hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. Her bir flask 25x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde gerçekleştirilen ekim işleminden sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Taze besiyeri eklenmiş flasklardaki hücreler belirlenen 9 doz grubu (BK, SK (375µl), PK (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,15µl), 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 µg/ml) ile 24 saat süre boyunca maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler PBS ile yıkanmıştır. Flasklardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplere alınmıştır. 1x10<sup>5</sup>-1x10<sup>6</sup> hücre/ml aralığındaki hücre süspansiyonundan 50µl alınarak 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine aktarılarak üzerine 450µl Count & Viability Reagent kitinden (Luminex, Katalog no: MCH100102) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika ışık görmeyen ortamda bekletilerek Muse Cell Analyzer ile ölü ve canlı hücre tespiti yapılmıştır. Bulunan değerlerden hücre canlılığı grafiği çizilmiştir. Grafik üzerinde R<sup>2</sup> değeri en iyi olan doğrusal üç nokta belirlenerek, fonksiyon denklemi yardımıyla IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri belirlenmiştir.

#### 3.7.4. Komet testi

Hücredeki DNA hasarını ölçmek için komet testi kullanılmıştır. Deney setlerini oluşturmak için hücreler  $25 \times 10^4$  hücre/flask olacak şekilde  $25 \text{ cm}^2$  lik flasklara ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda PBS ile yıkanan ve taze besiyeri eklenen flasklarda her bir hücre hattı ayrı ayrı, nano alfa sepiyolitinin XTT, Trypan Blue ve Muse Count Viability Testleri sonucunda belirlenen ortalama IC değerleri ( $IC_{6,25}$ ;  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ;  $IC_{50}$ ;  $IC_{75}$ ) ile 24 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda her bir flasktan hazırlanacak hücre süspansiyonları düşük erime sıcaklıklı agaroz (LMA) ile karıştırılmıştır. Önceden agaroz ile kaplanmış lamlara yayılmış olup ve  $4^\circ\text{C}$ 'de 3 dakika bekletilerek LMA'nın polimerleşmesi sağlanmıştır. Agaroz katmanları içerisindeki hücreler bir gece lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris base, pH 10, 1% Triton X ve %10 DMSO) bekletilerek hücrelerin lizis olması sağlanmıştır. Süre sonunda lamlar karanlık ortamda,  $4^\circ\text{C}$ ' de alkali elektroforez tamponu (1 mM EDTA, 300 mM NaOH,  $\text{pH} \geq 13$ ) içinde 30 dakika bekletildikten sonra, 25V, 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrasında lamlar 5 dakika süre ile nötralizasyon tamponunda bekletilmiştir (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5). Kurutulan lamlar %70 lik etanol ile fikse edilmiştir. Fikse edilen lamlar etidyum bromür ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) ile boyanmış olup ve floresans mikroskop (Nikon eclipse i80 marka) ile her bir grup için 100'er adet komet görüntüsünün fotoğrafı çekilmiştir. Bu fotoğraflar, mikrosistem komet yazılımı kullanılarak Olive Tail Moment (OTM), Tail DNA (Kuyruk DNA%) ve Tail length (Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )) parametreleri değerlendirilmiştir.

#### 3.7.5. Hücre içi ros testi

Bu çalışmada nano- $\alpha$ -sepiyolitinin ros oluşumuna etkisi oksidatif stres üzerinden hücre ölümüne sebep olup olmadığı Cell Biolabs OxiSelect™ hücre içi ROS test kiti (Cell Biolabs, San Diego, CA, U.S.A) kullanılarak belirlenmiştir. Özellikle bu çalışmada kullanılan nano alfa sepiyolit yeşil floresan özellik gösterdiği konfokal mikroskop ile bulunmuştur. Bununla birlikte kullanılan DCF boyasının hücre içerisinde serbest radikal ile karşılaşınca yeşil floresan özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu iki floresan özellikteki yapı hücre içerisindeki ROS tespitini florometrik cihazlarda yanlış ölçülmesine neden olduğu ve test prosedürünün sıralaması ile yapılmasına imkân vermediği gözlenmiştir. Bu nedenle hücre içerisindeki ROS miktarı morfolojik olarak ölçülmüştür. Deney

setlerini oluşturmak için hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilmiştir. Her bir flask 25x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde gerçekleştirilen ekim işleminden sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hücreler nano alfa sepiyolitinin sitotoksikite testleri ile belirlen ortalama IC değerleri (IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub>) ile dozlanmıştır. Süre sonunda flaslardaki besiyeri madde karışımı uzaklaştırılmış olup, 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Her bir flaska üzerine örtecek miktarda hazırlanan DCFH-DA çözeltisinden (0,0024gr 2',7'-dichlorofluorescein öncelikle 10 ml sadece RPMI'da seyreltilir, seyreltilen çözeltiden 1ml alınarak tekrar 9 ml'lik sadece RPMI'da seyreltilir) eklenmiştir. Flaslardaki hücrelere eklenen DCFH-DA çözeltisi ile 2 saat süresince inkübasyona bırakılarak DCFH-DA'nın hücre içerisine girmesi sağlanmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanarak, %10'luk formalin ile flaslara üzerine kaplayacak şekilde yayılarak 10 dakika boyunca fikse edilmiştir. Ardından PBS ile yıkanarak invert floresans mikroskopunda (EVOS FL Hücre Görüntüleme Sistemi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi) morfolojik görüntüleme işlemi yapılmıştır. Belirli alandaki hücreler arasında ROS özelliği sergileyen ve sergilemeyen hücreler sayılarak ROS'lu hücre yüzdesi hesaplanmıştır.

### **3.7.6. Annexin-V testi ile apoptozun belirlenmesi**

Olası hücre ölüm mekanizmasının apoptotik yolak ile olup olmadığının belirlenebilmesi için Muse Annexin V & Dead Cell Kiti (Millipore, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır. Bu kit temelde, hücrelerdeki Annexin-V ve 7-AAD miktarlarının analizine dayanmaktadır. Deney setlerini oluşturmak için hücreler 25x10<sup>4</sup> hücre/flask olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup> lik flaslara ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir hücre hattı ayrı ayrı, nano alfa sepiyolitinin sitotoksikite testleri ile belirlen ortalama IC değerleri (IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub>) ile dozlanmıştır. Süre sonunda 3 kez PBS ile flaslara yıkanmıştır. Flaslardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplere alınmış olup 500 hücre/µl olacak şekilde ayarlanarak 100 µl Annexin V & Dead Cell Assay kiti, 100 µl hücre süspansiyonu karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika ışık görmeyen ortamda bekletilerek Muse Cell Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) kullanılarak yaşayan hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve ölü hücre yüzdeleri hesaplanmıştır.



### 3.7.7. Apoptozun morfolojik olarak görüntülenmesi (ikili boyama)

Annexin-V testi ile belirlenen verileri, ikili boyama metodu sonucunda morfolojik görüntülerden elde edilen veriler ile kıyaslamak amacıyla kullanılmıştır. Hücreler  $25 \times 10^4$  hücre/flask olacak şekilde  $25 \text{ cm}^2$  lik flasklara ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir hücre hattı ayrı ayrı, sitotoksosite testleri ile belirlenen ortalama nano alfa sepiyolit IC değerleri ( $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$ ) ile dozlanmıştır. Süre sonunda  $25 \text{ cm}^2$  lik flasklardaki hücreler PBS ile üç kez yıkanmıştır. Ardından %10'luk formalin ile flaskların üzerini kaplayacak şekilde yayılarak 10 dakika boyunca fikse edilmiştir. Ardından tekrar flaskların yüzeyini kaplayacak şekilde akrinin turuncusu ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) ve etidyum bromür ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) ile 20 dakika boyanarak invert floresans mikroskopunda (EVOS FL Hücre Görüntüleme Sistemi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi) morfolojik görüntüleme işlemi yapılmıştır.

### 3.7.8. Radyasyon deneyleri

Nano alfa sepiyolit ve radyasyon ile birlikte muamele edilmiş sağlıklı ve kanserli insan akciğer hücrelerinin tümünde olası radyobiolojik etkileri, XTT, Komet, ROS ve apoptoz testleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Nano alfa sepiyolit radyasyonla birlikte olası radyobiolojik etkilerini belirlemek için, flaskların içerisindeki hücrelerin ışınlama işlemi, 6-MV X-ışınları kullanılarak, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoterapi Merkezinde gerçekleştirilmiştir.  $25 \text{ cm}^2$  lik flasklarının filtreli kapakları iyice kapatılıp ağız kısımları kontaminasyonun önlenmesi amacıyla sıkıca parafilm ile sarılmıştır. Flasklar steril taşıma kabı içerisinde ışınlamaya götürülmüştür. Radyasyon uygulama dozları (1Gy – 2Gy) lineer hızlandırıcı (Siemens artiste) kullanılarak dakikada 3 cGy olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Verilen toplam doz, flaskların uygulama pozisyonundaki duruşlarının bilgisayarlı tomografik görüntülerine dayanarak, radyoterapi planlama sistemi (CMS-XiO) ile hesaplanmıştır. Radyasyon maruziyetinden 2 saat önce hücreler nano alfa sepiyolit sitotoksosite testleri ile belirlenen IC değerleri ( $IC_{6,25}$ ;  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ) ile muamele edilerek, 2 saat sonra 1Gy ve 2Gy radyasyon dozları ile muamele edilmiştir. Nano alfa sepiyolit ile birlikte iki radyasyon dozunun oluşturulduğu kombinasyon dozları 1Gy; 1Gy+ $IC_{6,25}$ ; 1Gy+ $IC_{12,5}$ ; 1Gy+ $IC_{25}$ ; 2Gy, 2Gy+ $IC_{6,25}$ ; 2Gy+ $IC_{12,5}$ ; 2Gy+ $IC_{25}$  olarak belirlenmiştir. Nano alfa sepiyolit uzaklaştırılmadan, 1Gy ve 2Gy olmak üzere iki farklı radyasyon dozuna maruz bırakılmış olan hücreler

radasyon maruziyeti sonrasında 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemlerden sonra sitotoksisite testleri olarak XTT testi, genotoksisite testleri olarak komet, oksidatif stres testi olan hücre içi ROS, apoptoz testlerinden Annexin-V testi ve ikili boyama yöntemi önceki aşamalarda açıklandığı şekilde 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub>; 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

Testlerinin istatistiksel analizleri SPSS 22 paket programıyla gerçekleştirilmiştir. XTT, Trypan Blue ve Muse Count Viability testlerinden elde edilen IC değerleri normal dağılıma uymadığı ve toplam veri sayısının 30 altında olması nedeniyle, IC değerlerinin kendi aralarındaki karşılaştırmalar parametrik olmayan Friedman testine göre belirlenmiştir. Ancak farklı IC değerleri ortalamaları arasındaki karşılaştırmalar parametrik olmayan Wilcoxon testi kullanılarak belirlenmiştir. ROS, Komet ve Apoptoz testlerinin sonuçları ise normal dağılıma uymadıkları için gruplar arasındaki karşılaştırmalar Wilcoxon testi kullanılarak belirlenmiştir. Bu karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyinin belirlenmesinde hem \* $p \leq 0,05$  hem de \*\* $p \leq 0,01$  değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Grafiklerin oluşturulmasında ise Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

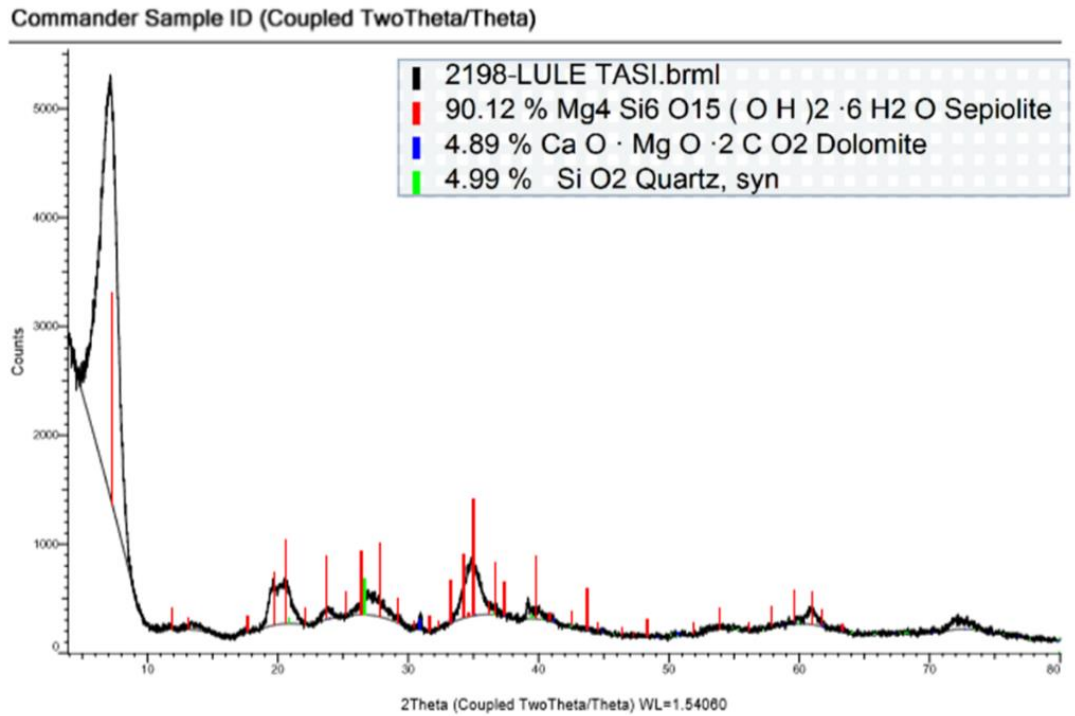
## 4. BULGULAR

### 4.1. Alfa Sepiyolitın XRD Analiz Bulguları

Çalışmada kullanılan alfa sepiyolit XRD analizine göre yüksek pik gösteren % 90 saflıkta sepiyolit olduğu görülmüştür. Diğer kısmında ise % 4,89 oranında dolomit, % 4,99 oranında SiO<sub>2</sub> içerdiği görülmüştür (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Özellikle alfa sepiyolit analizine göre içerikleri bakımından çok yüksek kalitede olduğu görülmüştür.

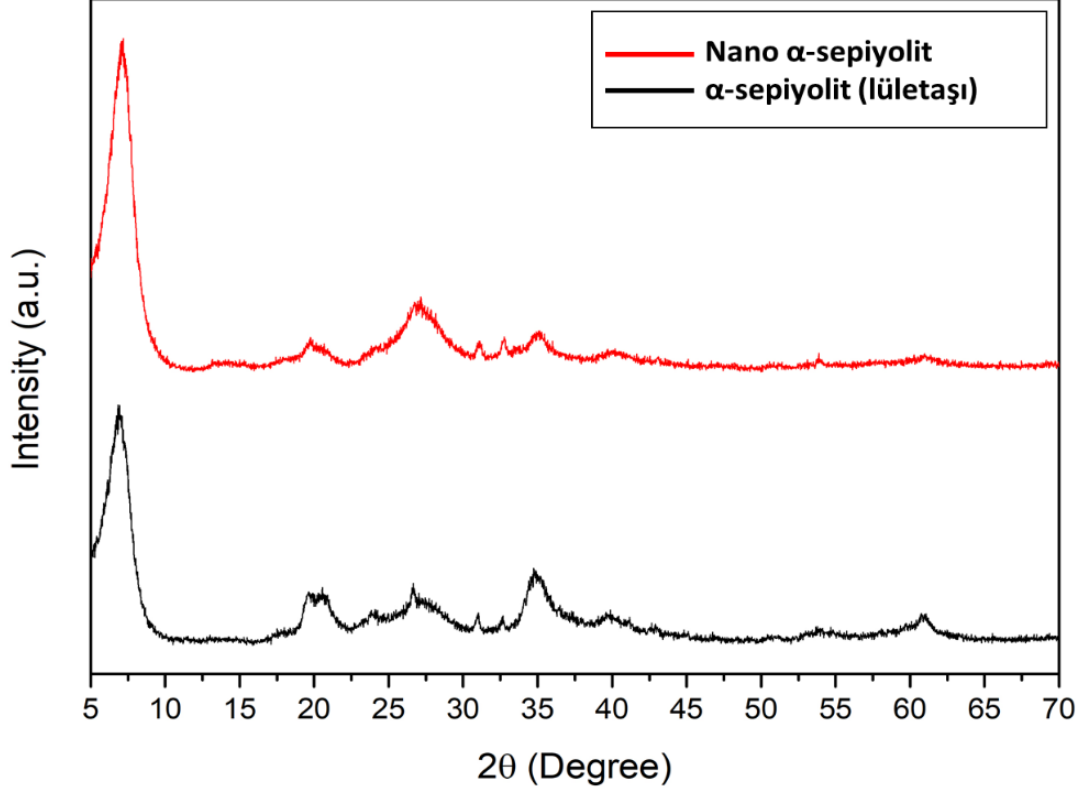
**Çizelge 4.1.** XRD ile alfa sepiyolitın içerik analizi

Sepiyolit	% 90,12	Mg <sub>4</sub> Si <sub>6</sub> O <sub>15</sub> (OH) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
Dolomit	% 4,89	CaO·MgO·2CO <sub>2</sub>
Kuvars	% 4,99	SiO <sub>2</sub>



**Şekil 4.1.** XRD ile alfa sepiyolitın içerik analizi

Ayrıca alfa sepiyolit sonike edilip nano liflerine ayrıldıktan sonraki XRD değişimleri incelenmiş olup, alfa sepiyolit ve nano alfa sepiyolit arasında önemli bir farklılık olmadığı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Nano alfa sepiyolit ve alfa sepiyolitinin XRD analizi

#### 4.2. Alfa Sepiyolitinin XRF Analiz Bulguları

Alfa sepiyolit maddesinin kimyasal analizi XRF çalışması ile saptanmıştır. Buradaki amaç alfa sepiyolitinin içerisinde yer alan kimyasal bileşimlerin neler olduğunu ortaya koymaktır. Bu çalışmada SiO<sub>2</sub> % 51,8, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> % 0.0994, CaO % 0.793, MgO % 25,9, Na<sub>2</sub>O % 0.394, K<sub>2</sub>O % 0.0356, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> % 0.475, NiO % 0.248, SiO<sub>3</sub> % 0.102 oranında bileşiklerden oluştuğu ve % 20,2’si ise kızdırma kaybından tespit edilemeyen maddeler olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2, EK 2). Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi SiO<sub>2</sub> % 51,8 ve MgO % 25,9 olduğu görülmektedir. Özellikle kaliteli sepiyolitte bu iki değer yüksek olması beklenmektedir.

**Çizelge 4.2.** Alfa sepiyolitın XRF ile kimyasal analizi

<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>%</b>	<b>51,8</b>
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,0994</b>
<b>CaO</b>	<b>%</b>	<b>0,746</b>
<b>MgO</b>	<b>%</b>	<b>25,9</b>
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	<b>%</b>	<b>0,394</b>
<b>K<sub>2</sub>O</b>	<b>%</b>	<b>0,0356</b>
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,475</b>
<b>NiO</b>	<b>%</b>	<b>0,248</b>
<b>SiO<sub>3</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,102</b>
<b>A.Z. (LOI)*</b>	<b>%</b>	<b>20,2</b>

\*A.Z. (LOI): Kızdırma kaybı)

### 4.3. Alfa Sepiyolitın Mikron Seviyeye Düşürülmesi ve Tanecik Boyutunun Ölçülmesi

Sepiyolit tozlarının tane boyutunun mikron seviyesine düşürülmesi için öncelikle halkalı değirmende alfa sepiyolit 1 dk boyunca öğütüldüğünde d(0,1) değeri 1,49 µm, d(0,5) değeri 5,02 µm, d(0,9) değeri 18,25 µm elde edilmiştir. Halkalı değirmende öğütülen tozlar 60 dk atritör değirmende öğütüldüğünde d(0,1) değeri 0,78 µm, d(0,5) değeri 3,32 µm, d(0,9) değeri 7,74 µm, ZrO<sub>2</sub> bilyeli değirmende 1 saat öğütüldüğünde (0,1) değeri 0,78 µm, d(0,5) değeri 1,95 µm, d(0,9) değeri 9,76 µm, 2 saat öğütüldüğünde (0,1) değeri 0,68 µm, d(0,5) değeri 1,55 µm, d(0,9) değeri 8,11 µm olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Çeşitli öğütme işlemleri ve tanecik boyut ölçümü

	<b>d(0,1)</b>	<b>d(0,5)</b>	<b>d(0,9)</b>
Halkalı değirmende 1dk öğütme	1,49 µm	5,02 µm	18,25 µm
Atritör değirmende 1 saat öğütme	0,96 µm	3,32 µm	7,74 µm
ZrO <sub>2</sub> bilyalı değirmende 1saat öğütülme	0,78 µm	1,95 µm	9,76 µm
ZrO <sub>2</sub> bilyalı değirmende 2saat öğütülme	0,68 µm	1,55 µm	8,11 µm

#### 4.4. Nano Alfa Sepiyolit Üretimi ile İlgili SEM Bulguları

Ham sepiyolit halkalı değirmende 1 dk öğütüldükten sonra, sepiyolit parçacıklarının mikron boyutunda büyük kütleler şeklinde (Şekil 4.3a-b), kuru olarak bilyalı değirmende (Şekil 4.3c) ve sıvı olarak atritör değirmende (Şekil 4.3ç) öğütüldüğünde ise küçük ve iri taş şeklinde mikro yapılar olduğu SEM görüntülerinde görülmektedir. Üç öğütme sonucunda nanoyapılı sepiyolit fiberlerin oluşmadığı gözlenmiştir.

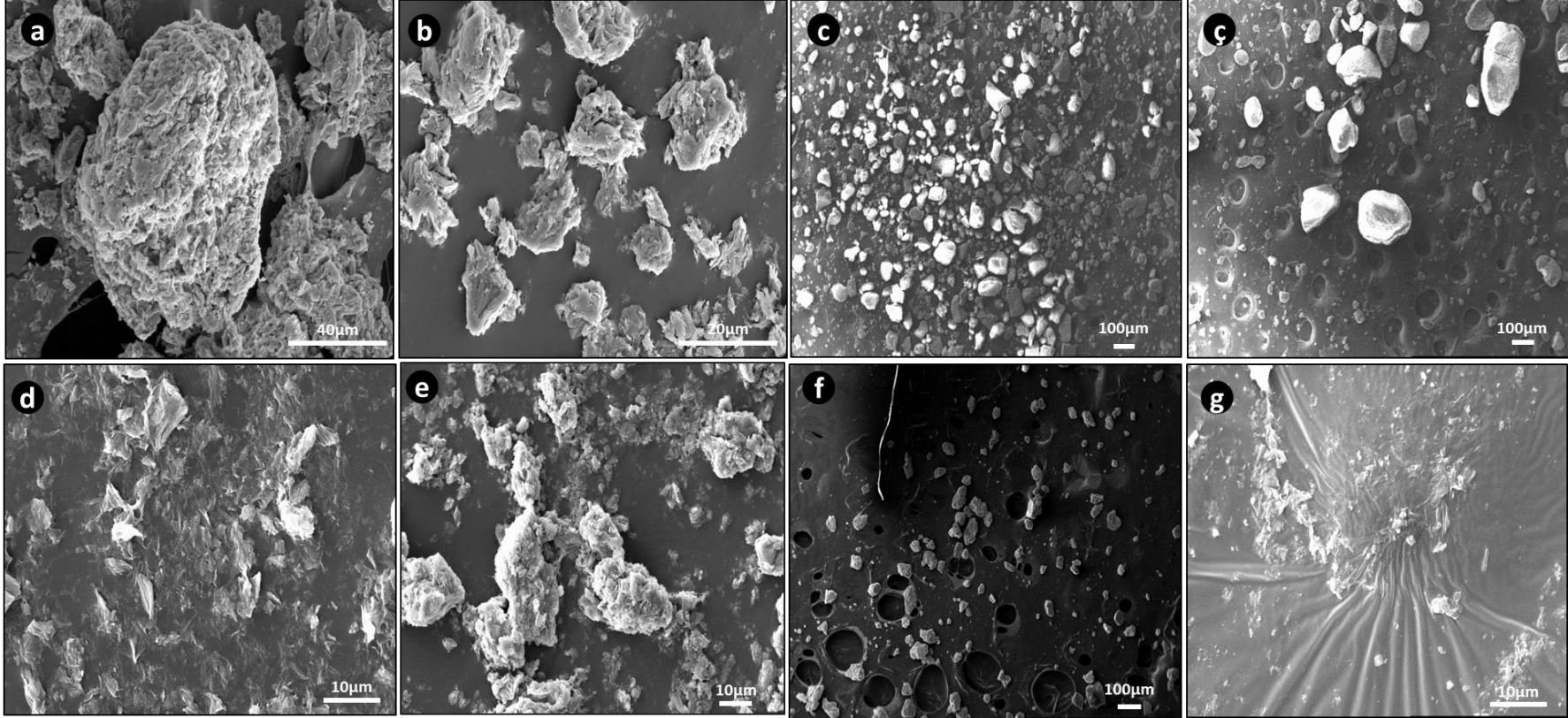
Halkalı değirmende öğütülen alfa sepiyolit 4 dk blender ile mekanik dağıtma, çözücü olarak su kullanıldığında liflerin görüldüğü, ama bu liflerin saman yığını şeklinde birbirlerine sıkıca bağlı oldukları görülmüştür (Şekil 4.3d). Çözücü etil alkol kullanılıp, 4 dk blender ile mekanik dağıtmaya tabi tutulduğunda sepiyolit fiberlerinin biraz açıldığı gözlenmiş olması ile birlikte tam serbest lifler oluşmadığı görülmüştür (Şekil 4.3e). 1 mg/ml alfa-sepiyolit 1 dk blender ile mekanik dağıtmaya ve 10mM Tris-HCl asitte 1 dk bekletildiğinde, aynı şekilde 2 dk blender ile mekanik dağıtma ile birlikte 15 dakika 10mM Tris-HCl asitte bekletildiğinde sepiyolit liflerinin serbestleşmediği görülmüştür (Şekil 4.3f-g).

15g/500ml saf su çözeltisi, 4 dk blender yardımı ile mekanik dağıtmaya tabi tutulup, 4 saat manyetik karıştırıcıda (100°, 1250 dk/devir) karıştırılarak, mekanik dağıtmaya sıcaklığın eklenmesi ile sepiyolit liflerinin gevşemeye başladığı görülmekle birlikte, tam olarak liflerin serbestleşmediği görülmüştür (Şekil 4.4a, 1000X büyütme, Şekil 4.4b. 50000X büyütme).

4 dk blender, 4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir) sonucu elde edilen 15g/500ml'lik çözeltinin mikron ve mikron altı filtrelerden süzülme işlemi sonucunda şırınga ucu ve polipropilen torba filtreden geçerken filtreleri tıkadığı gözlenmiş olup, filtrelerden geçen süzüntünün ise serbest lifler olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4c-d-e ve Şekil 4.4f-g). 25 ml'lik HCl (% 0,2) asit çözeltisi ile elde edilen SEM görüntüsünde görüldüğü gibi HCl asitin sepiyolitin yapısını bozduğu, bu yapıların kare yapılarına benzediği görülmüştür (Şekil 4.4h). Buraya kadarki tüm öğütme aşamalarında sepiyoliti oluşturan liflerin birbirinden ayrılmadığı Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de görülmüştür.

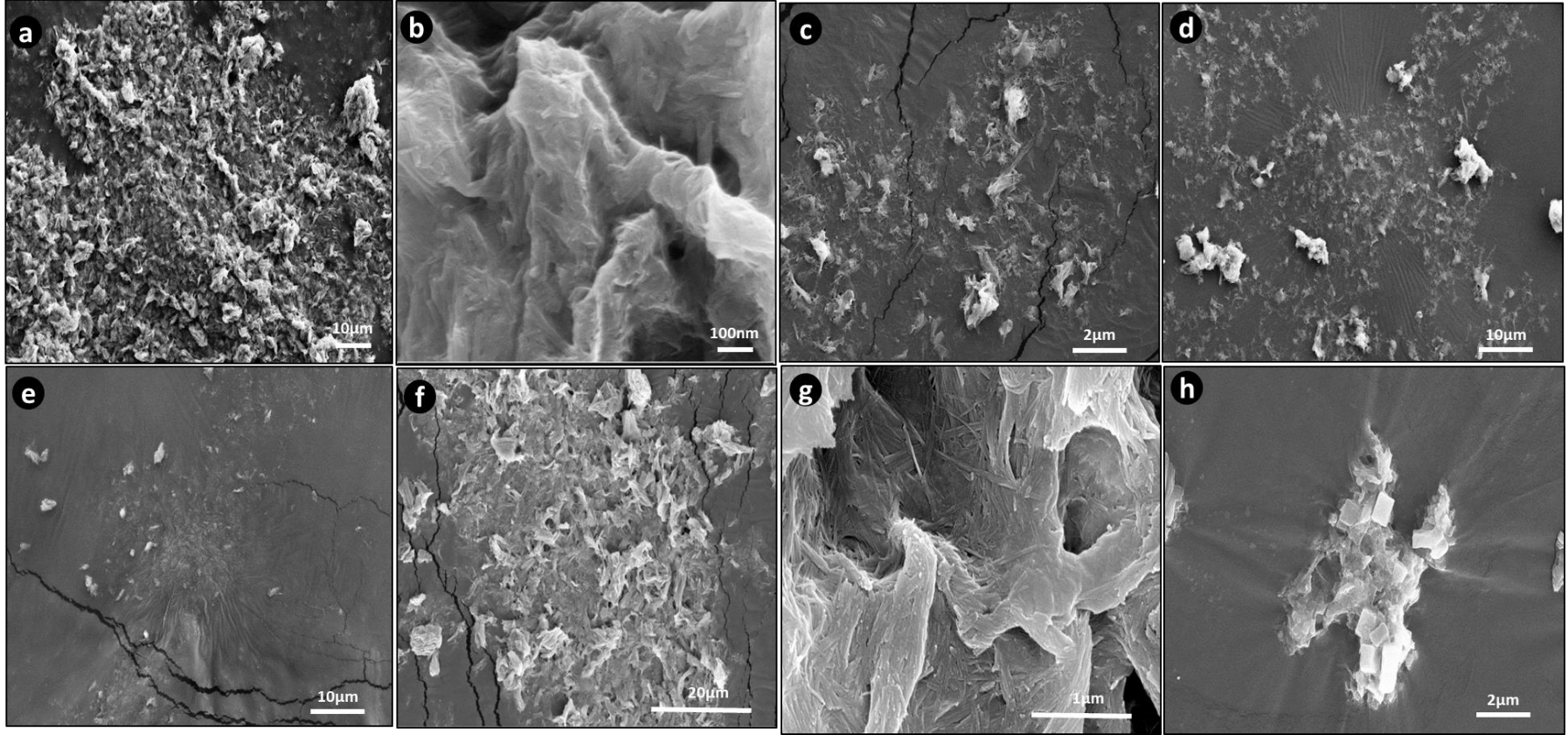
Alfa sepiyolit halkalı değirmende öğütüldüğünde Şekil 4.5’de görüldüğü gibi yaprakçık benzeri yapıların sıkı bir şekilde kenetlenerek bağlanması sonucunda mikron büyüklüğünde taş gibi yapılardan oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.5a). Bu yapılar mekanik dağıtıcı olarak sonikasyon kullanıldığında bu yapıların biraz açıldığı görülmüştür (Şekil 4.5b). Şekil 4.5c’de alfa sepiyolit fiberlerinin bir araya gelerek yoğun bir şekilde ot yığınlarının oluşturduğu karışık bir saman kümesini anımsattığı görülmüştür. Son aşamada ise halkalı değirmende öğütülen alfa sepiyolit tozları kullanılarak 1 saat sonikatörde sonikasyon işlemi sonucunda sepiyoliti oluşturan tüm liflerin birbirinden ayrılarak serbestleştiği SEM cihazında görülmüştür (Şekil 4.5e-f-g-h).

Ayrıca halkalı değirmende öğütülen alfa sepiyolit tozları kullanılarak 1 saat sonikatörde sonikasyon işlemi sonucunda sepiyoliti oluşturan tüm liflerin birbirinden ayrılarak serbestleştiği TEM cihazında Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Hem SEM hem de TEM cihazında nano alfa sepiyolit liflerinin birbirinden ayrıldığı ve görünen liflerin yapısında herhangi bir yapı bozulmasına rastlanılmadığı anlaşılmıştır.

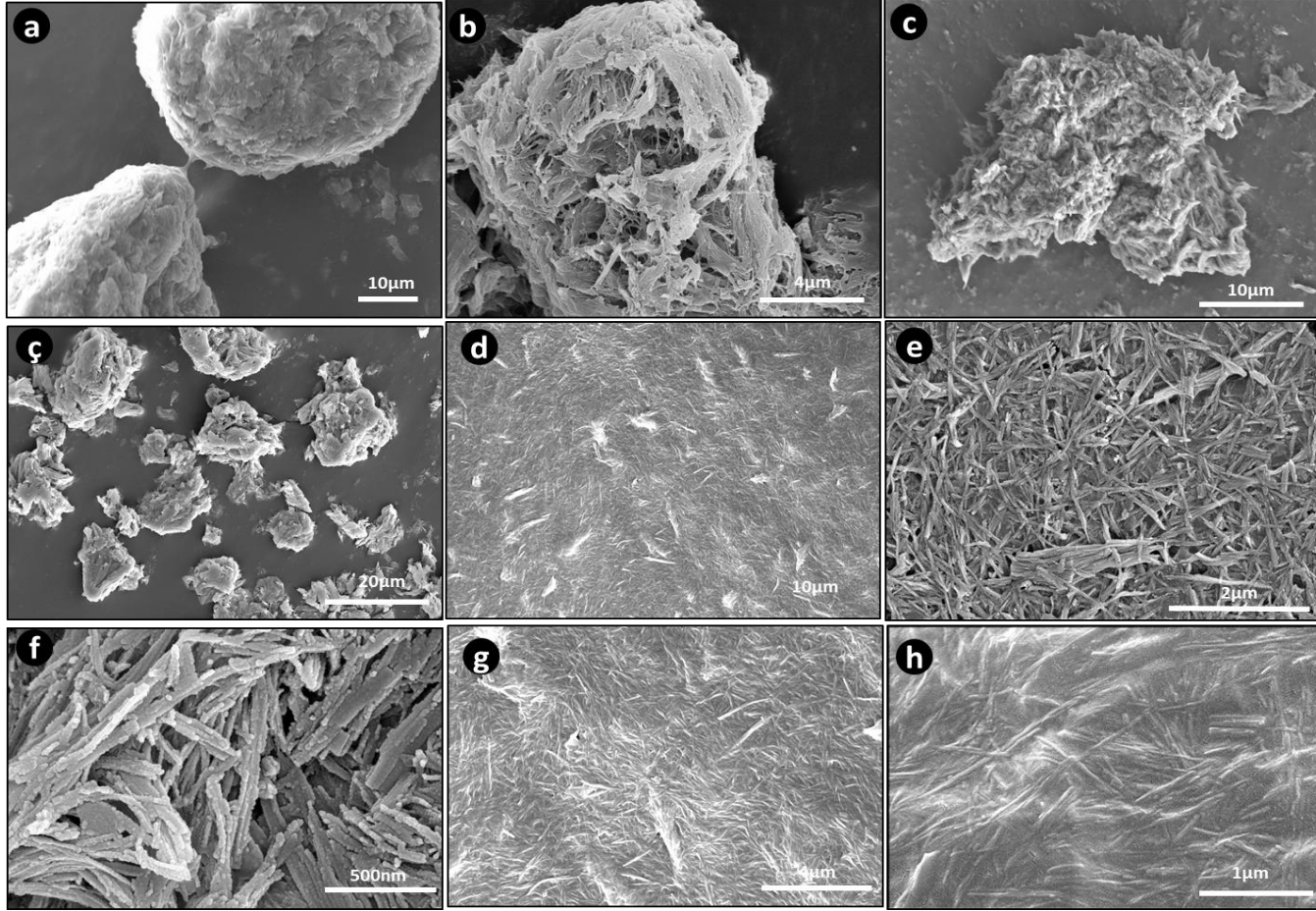


**Şekil 4.3.** Nano alfa sepiyolitin üretimi ile ilgili SEM görüntüleri a-b) Halkalı değirmende öğütme c) Bilyalı değirmende öğütme ç) Atritör değirmende öğütme d) 4 dk blender ile mekanik dağıtma, çözücü su e) 4 dk blender ile mekanik dağıtma, çözücü alkol f) 10mM Tris-HCl asitte bekletme ve 1dk blender g) 10mM Tris-HCl asitte 2 dk blender, 15 dk bekletme

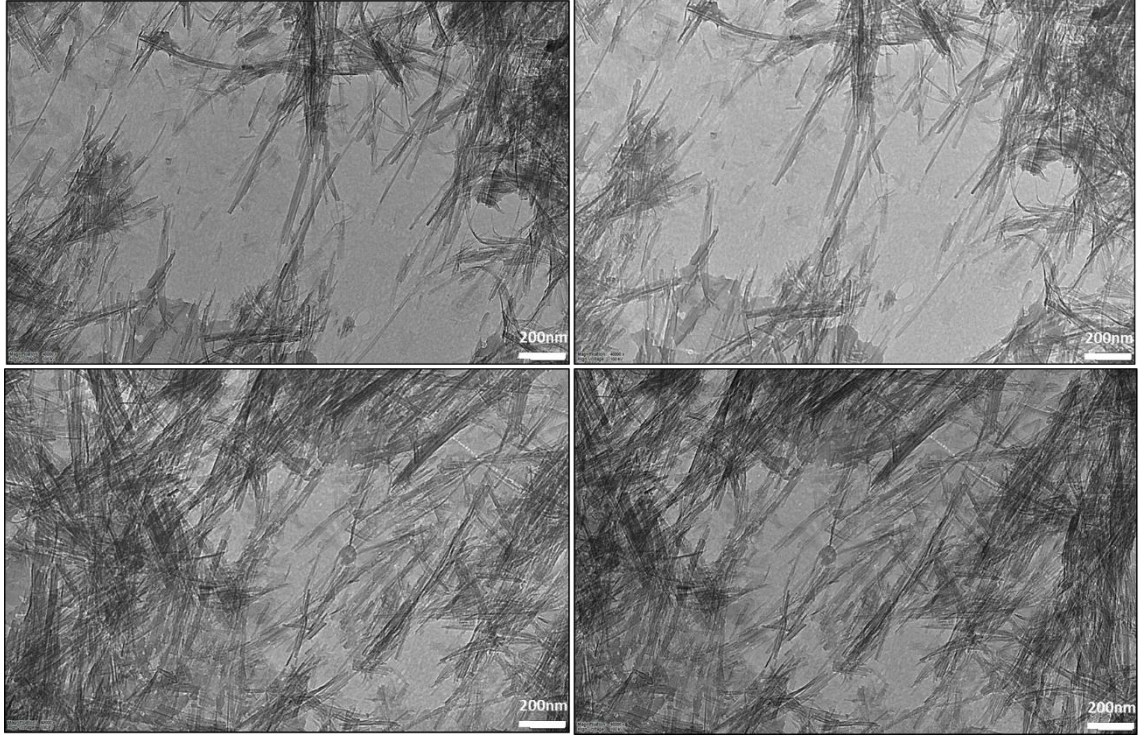




**Şekil 4.4.** Nano alfa sepiyolitinin üretimi ile ilgili SEM görüntüleri a) 4 dk blender, 4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir), 1000X, b) 4 dk blender, 4 saat manyetik karıştırıcı (100°, 1250 dk/devir), 5000X c) <2 mikron çapındaki kâğıt filtreden filtrasyon işlemi d) 0,8 mikron çapındaki şırınga filtreden filtrasyon işlemi e) 1 mikron çapında polipropilen torba filtre işlemi, 5000X f) 1 mikron çapında polipropilen torba filtre, 100000X g) HCl asit ile muamele işlemi



**Şekil 4.5.** Nano alfa sepiyolitinin üretimi ile ilgili SEM görüntüleri a-b-c-ç) Ham sepiyolitinin SEM görüntüsü (Halkalı değirmen ile öğütme) d-e-f-g-h) 1 saat sonikasyon sonucunda liflerin birbirinden ayrılmasını gösteren SEM görüntüleri



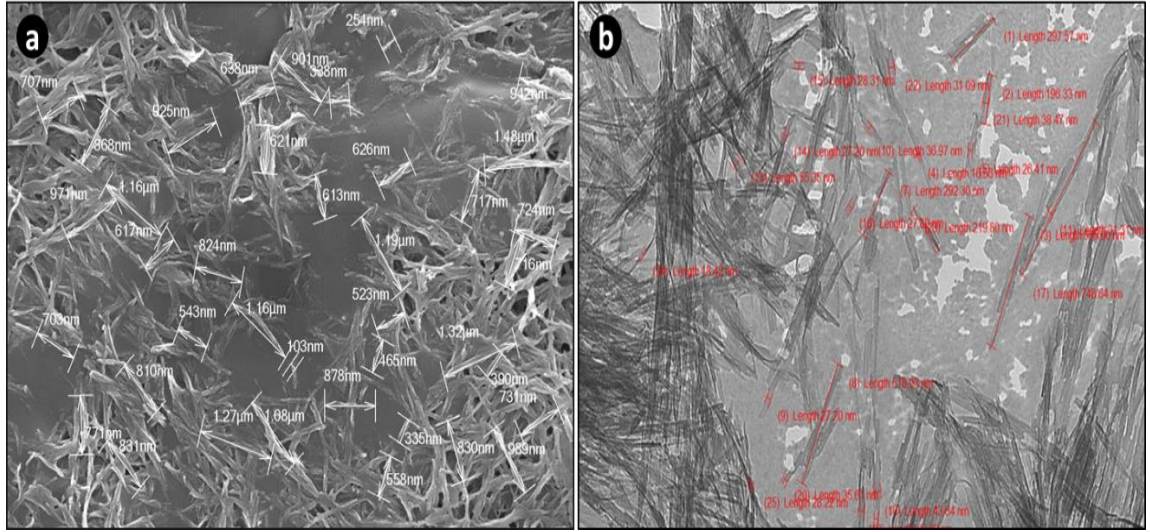
**Şekil 4.6.** Nano alfa sepiyolit'in TEM görüntüleri

#### **4.5. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Boyut Analizi Bulguları**

Nano alfa sepiyolit lif boyutlarını belirlemek için lif uzunlukları ve çapları SEM ve TEM cihazı kullanılarak görüntü analizi yapılmıştır (Şekil 4.7). SEM cihazı ile yapılan analizlerde lif uzunlukları  $569,6 \pm 278$  nm, çapları ise  $72 \pm 27,3$  nm olarak bulunmuştur. TEM cihazı ile yapılan analizlerde ise lif uzunlukları  $425,9 \pm 170,5$  nm, çapları ise  $35 \pm 11,8$  nm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Ayrıca lif uzunlukları ve çaplarını 10 kategoride sınıflandırdığımızda SEM ve TEM ile belirlenmiş lif uzunluklarının dağılımı Şekil 4.8'de, lif çapları dağılımı Şekil 4.9'da, gösterilmiştir. SEM cihazı ile analiz edilen nanofiberlerin çap dağılımları incelendiğinde % 85'inin 100 nm'nin altında olduğu, TEM cihazı ile analiz edilen nanofiberlerin çap dağılımları incelendiğinde ise %100'ün, 100 nm altında olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).

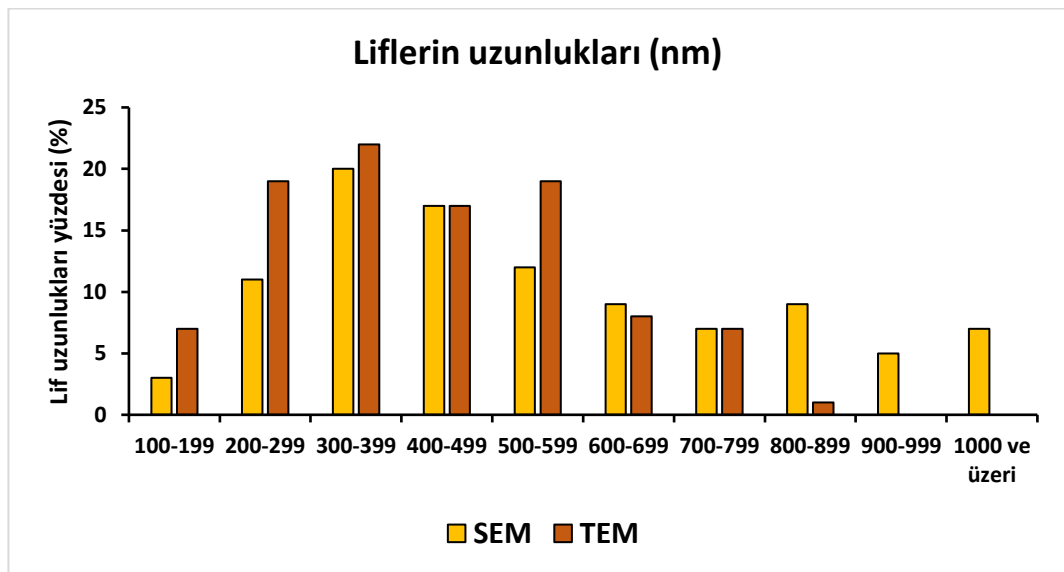




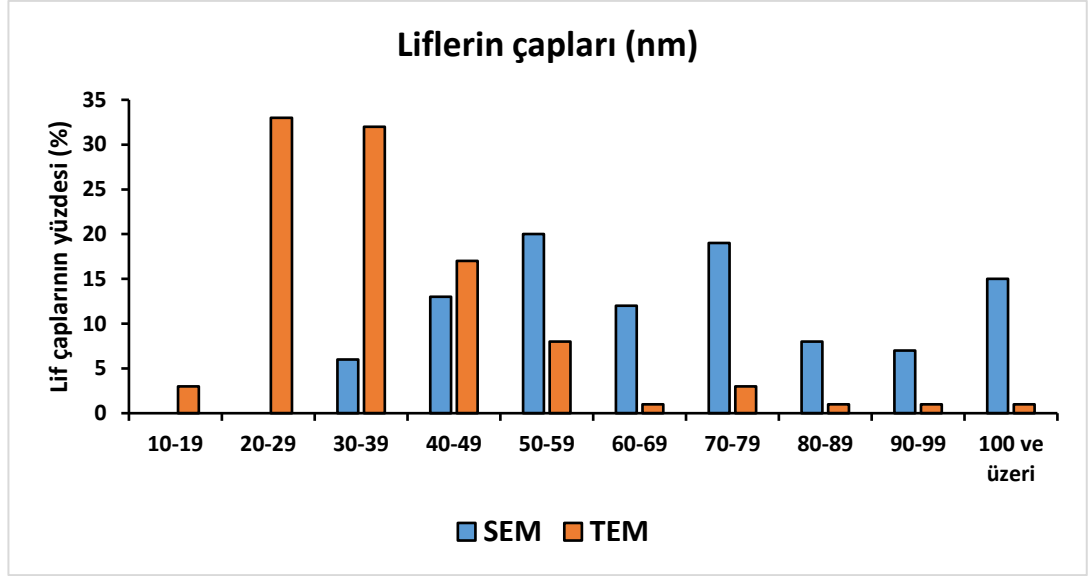
Şekil 4.7. Lif boyut analizi a) SEM cihazı b) TEM cihazı

Çizelge 4 4. SEM ve TEM cihazı ile lif boyut analizi (nm)

	Değerlendirilen Toplam lif	Minimum	Maksimum	Ortalama±Standart Sapma
<b>SEM Lif Uzunluk</b>	113	145,00	1480,00	569,6±278
<b>SEM Lif Çap</b>	97	32,00	172,00	72±27,3
<b>TEM Lif Uzunluk</b>	97	120,00	844,00	425,9±170,5
<b>TEM Lif Çap</b>	97	16,00	78,00	35±11,8



Şekil 4.8. SEM ve TEM cihazı ile belirlenmiş lif uzunluklarının yüzdelik dağılımı (%)



Şekil 4.9. SEM ve TEM cihazı ile belirlenmiş lif çaplarının yüzdelik dağılımı (%)

#### 4.6. Mikro ve Nano Alfa Sepiyolit Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

Nano alfa sepiyolit nanopartikül süspansiyonunun zeta potansiyeli değeri -15,4 mV olduğu, ham sepiyolit zeta potansiyel değeri -18,4 mV olduğu belirlenmiştir. Her iki maddenin de dağılma özellikleri +15 mV ve -15mV arasında bulunmadığı için dağılma özelliklerinin iyi kategoride olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.7. Nano $\alpha$ -Sepiyolit Liflerin Hücre İçine Girişi ve Lokalizasyonu Hakkında Bulgular

Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içine girip girmediklerini ve hücre içerisindeki lokalizasyonu hakkında veri elde etmek için TEM mikroskobu ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop kullanılmıştır.

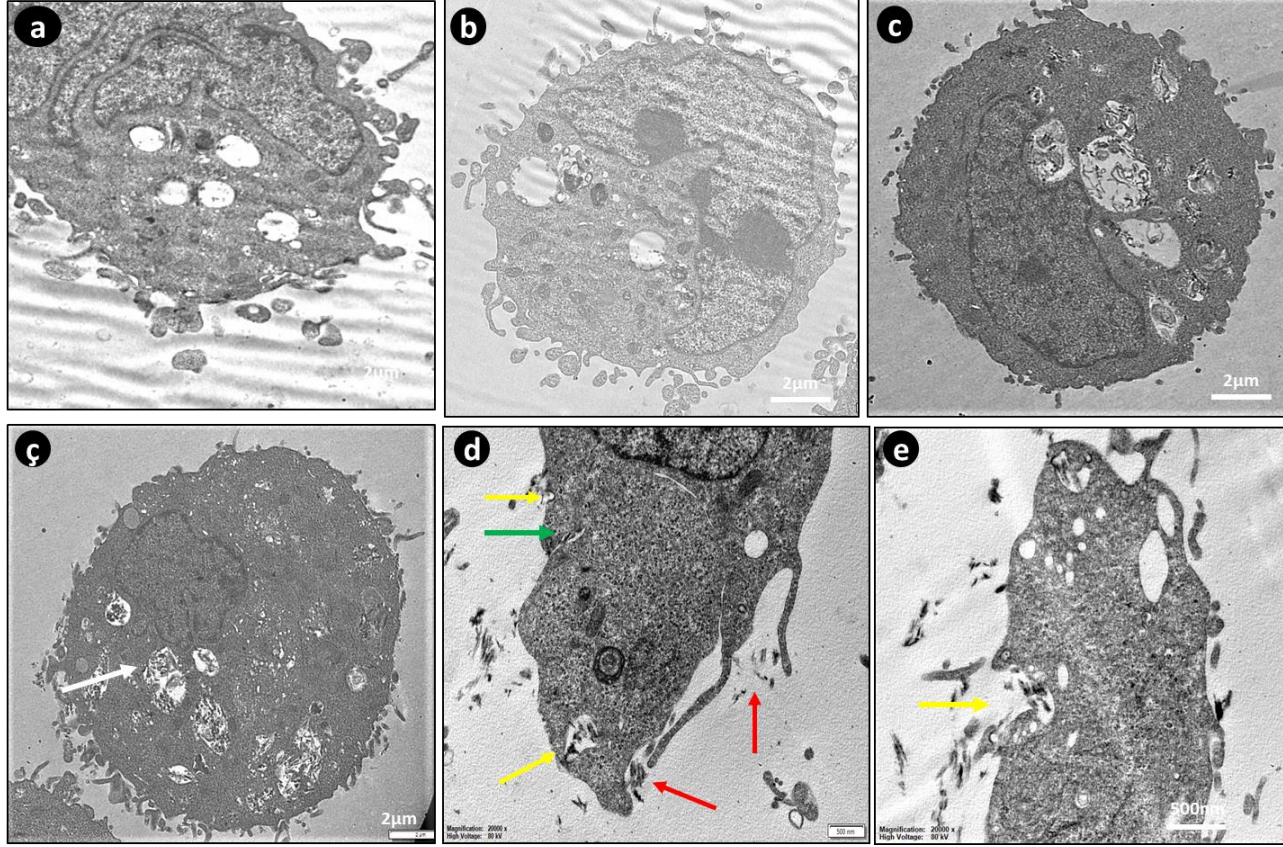
##### 4.7.1. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme bulguları

Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içine girip girmediklerini belirlemek için BEAS-2B hücre hattına IC<sub>25</sub>:1748  $\mu$ g/ml, A549 hücre hattı için IC<sub>25</sub>: 970  $\mu$ g/ml oranında nano alfa sepiyolit çözeltisi uygulanmış ve elektron mikroskobunda görüntüleri fotoğraflanmıştır. Şekil 4.10'da BEAS-2B hücre hattında çekilen elektron mikroskobu görüntüleri, Şekil 4.11'de ise A549 hücre hattında çekilen elektron görüntüleri gösterilmiştir.

Görüntüler incelendiğinde Şekil 4.10’da görüldüğü gibi a ve b şıklarında BEAS-2B hücre hatlarının kontrol grubu görüntüleri verilmiştir. Söz konusu bu görüntülerde birçok vezikülün boş olduğu görülmüştür. Ancak alfa sepiyolit lifleri ile dozlanmış c, ç, d ve e şıklarında ise bu vezikül içerisinde toplanmış alfa sepiyolit liflerinin görüntüleri görülmüştür.

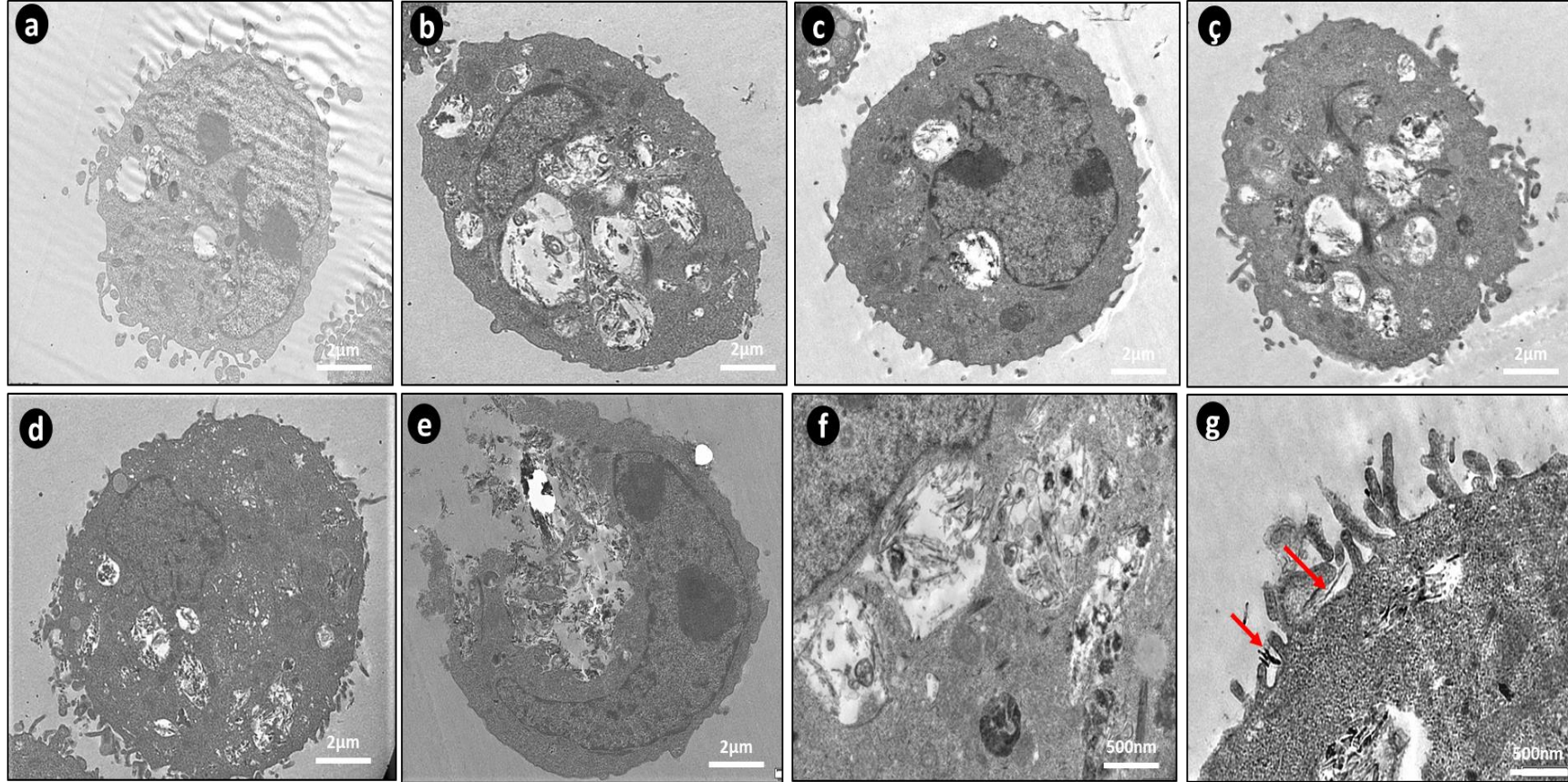
Şekil 4.11’de görüldüğü gibi a şıkında A549 hücre hattının kontrol grubu görüntüleri verilmiştir. Söz konusu bu görüntüde birçok vezikülün boş olduğu görülmüştür. Ancak nano alfa sepiyolit lifleri ile dozlanmış b, c, ç, d, e, f ve g şıklarında ise bu vezikül içerisinde toplanmış nano alfa sepiyolit liflerinin görüntüleri görülmüştür. Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine alınımının Şekil 4.10’de yeşil okla gösterdiği gibi liflerin direk hücre içerisine alındığı ve Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de sarı okların gösterdiği yapıdaki gibi içeriye doğru yapmış olduğu invajinasyonlar ile vezikül oluşturarak, kırmızı okların gösterdiği yapıda ise partiküllerin yalancı ayaklar oluşturarak fagositoz yoluyla alındığı görülmüştür. Sonuçta nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine alınım şeklinin vezikül oluşturarak endositoz yoluyla olduğu görülmüştür.

Ayrıca nano fiberlerin içerisinde biriktiği veziküllerin sitoplazmada sayıca arttığı (Şekil 4.11b), bu veziküllerin çekirdeğin membranına baskı yaptığı (Şekil 4.10c ve Şekil 4.11b ve c) görülmüştür.



**Şekil 4.10.** Nano alfa sepiyolit liflerinin BEAS-2B hücrelerine alınımı, a ve b) Kontrol, c, ç, d ve e) Hücre içerisine alınmış vezikül içerisindeki nanoliflerin görüntüsü, c) Çekirdeğe baskı yapan içi nanolifler ile dolu veziküller d ve e) Kırmızı ok nanoliflerin yalancı ayaklar ile fagositoz yoluyla alındığını gösteren şekil, sarı oklar içeri invajinasyon yaparak nanoliflerin vezikül oluşturularak alınması, Yeşil ok nanoliflerin zardan doğrudan geçişi göstermektedir





**Şekil 4.11.** Nano alfa sepiyolit liflerinin A549 hücrelerine alınımı, a) Kontrol, b, c, ç, d, e, f ve g) Hücre içerisine alınmış vezikül içerisindeki nanoliflerin görüntüsü, b ve c) Çekirdeğe baskı yapan içi nanolifler ile dolu veziküller g) Kırmızı ok nanoliflerin yalancı ayaklar ile fagositoz yoluyla alındığını gösteren şekil

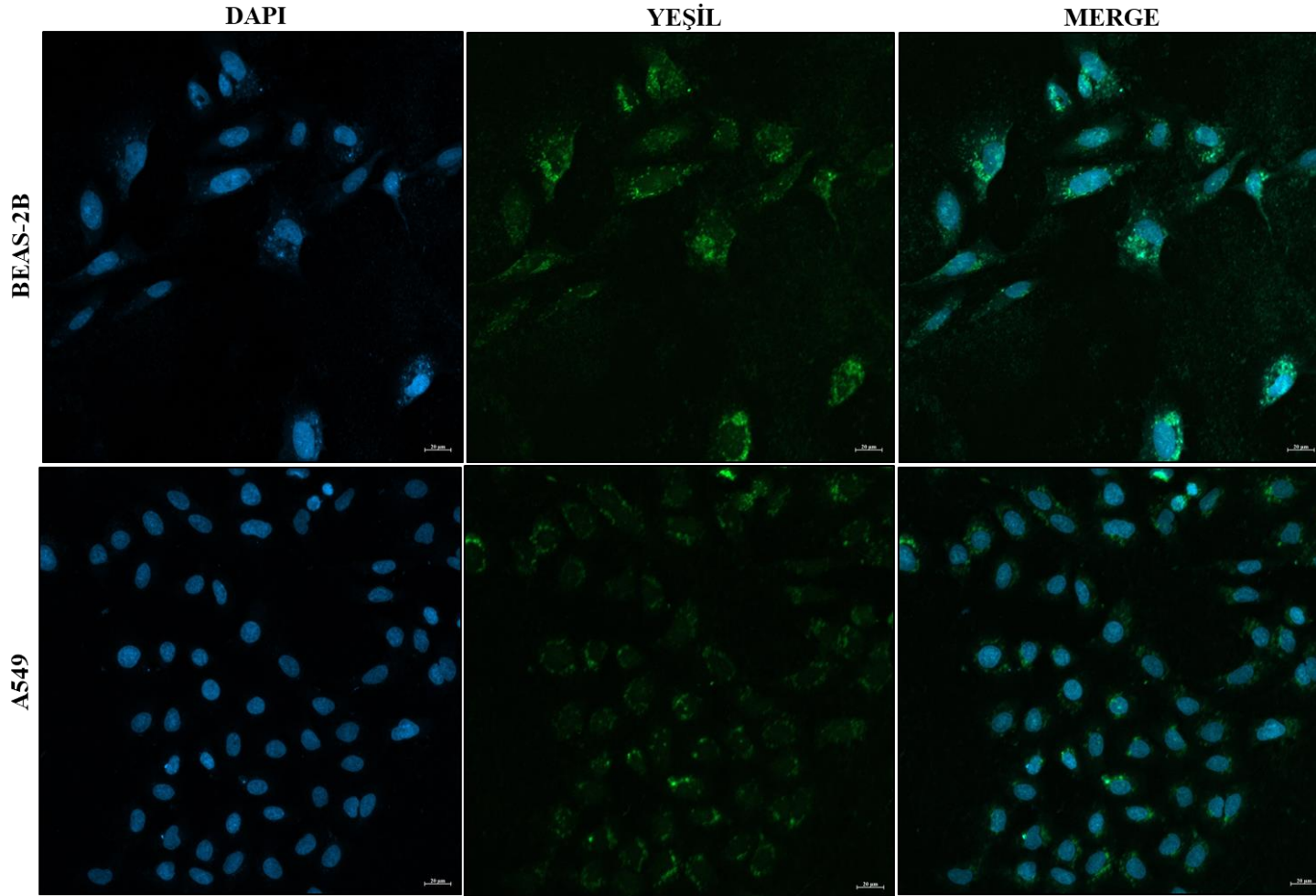


#### **4.7.2. Lazer taramalı konfokal mikroskop ile floresan görüntüleme bulguları**

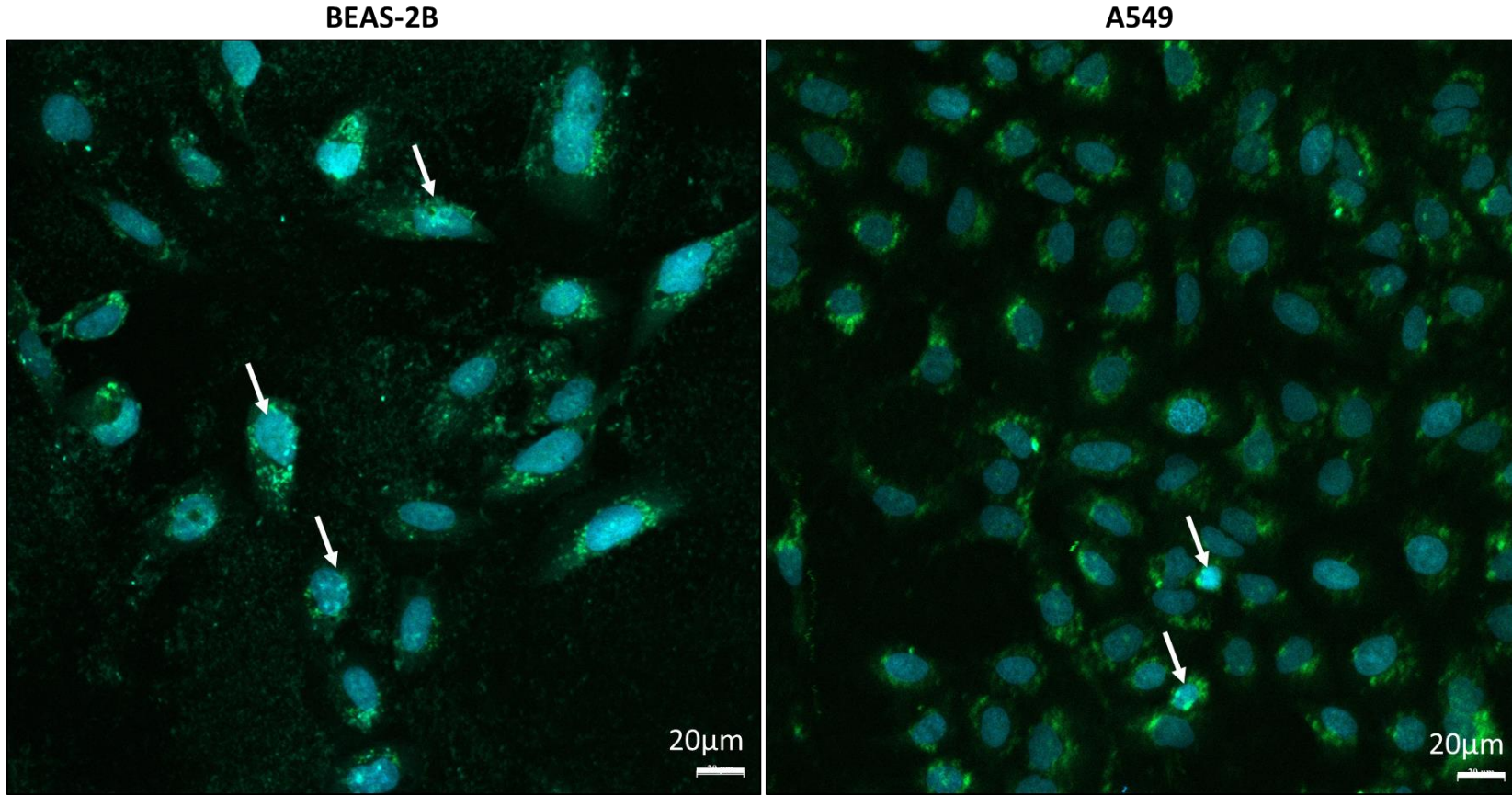
Nano alfa sepiyolit liflerinin floresan özelliği lazer taramalı konfokal mikroskop ile tespit edilmiştir. Sepiyolit liflerinin en iyi floresan özellik verdiği 506-538 nm aralığındaki yeşil renk olduğu bulunmuştur.

Ayrıca nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içi lokalizasyonu hakkında veri elde etmek için liflerin yeşil floresan özelliği kullanılarak hücre içerisindeki konumları Şekil 4.12’de gösterilmiştir. BEAS-2B hücre hattına IC<sub>25</sub>:1748 µg/ml, A549 hücre hattı için IC<sub>25</sub>: 970 µg/ml oranında nano alfa sepiyolit çözeltisi uygulanmış ve lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüleri fotoğraflanmıştır.

Her iki hücre hattının çekirdekleri DAPI boyası ile boyanarak mikroskop altında mavi floresan özellik göstermiş, aynı hücrelerin içerisine girmiş olan nano alfa sepiyolit liflerinin yeşil renkli floresan özelliği göstermiş olup, bu iki mavi ve yeşil floresan renkler birleştirilip fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 4.12’de mavi boyanan çekirdeğin etrafında sitoplazma içerisinde nano lifler yeşil renkli olarak görülmüştür. Yeşil floresan özellik sergileyen nano alfa sepiyolit liflerinin sitoplazmanın tüm bölümlerine yayıldığı görülmektedir. Şekil 4.13’de çekirdek içerisine giren nano alfa sepiyolit lifli hücreler beyaz ok ile gösterilmiştir.



**Şekil 4.12.** Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içi lokalizasyonunun lazer taramalı konfokal mikroskop ile tespiti



**Şekil 4.13.** Nano alfa sepiyolit liflerinin BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki hücre içi lokalizasyonu (beyaz oklar çekirdek içerisine giren lifleri göstermektedir)

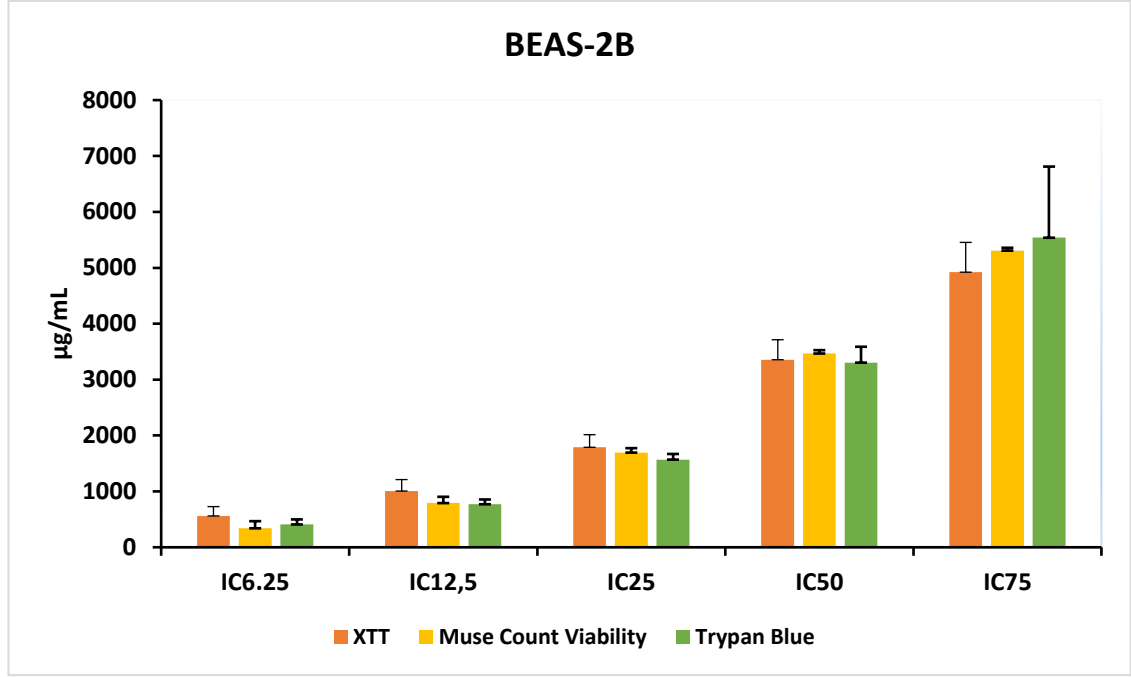
#### 4.8. Nano Alfa Sepiyolit Liflerinin Hayatta Kalış (% Canlılık) Oranına Etkisi

Çalışmada kullanılan nano alfa sepiyolit liflerinin inhibitör konsantrasyonları (IC; inhibitory concentration) belirlenmesi amacıyla, BEAS-2B ve A549 hücre hatları 160 µg/ml, 320 µg/ml, 640 µg/ml, 1280 µg/ml, 2560 µg/ml, 5120 µg/ml, konsantrasyonlarında nano alfa sepiyolit lifleri ile 24 saat süresince muamele edilerek XTT, Trypan Blue ve Muse Count Viability Testleri uygulanmış olup, elde edilen IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri ve her bir testin IC değerinin ortalaması alınmış olup Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Ayrıca BEAS-2B ve A549 hücrelerinin XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue canlılık testlerinin IC değerlerinin kendi aralarındaki anlamlılık düzeyinin Friedman testine göre belirlenmiştir. Ancak XTT, Muse ve Trypan Blue canlılık testlerinin BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ortalama değerleri anlamlılık düzeyi Wilcoxon testine ile karşılaştırılmıştır.

Nano alfa sepiyolit uygulanmasıyla BEAS-2B hücrelerinde elde edilen bulgular XTT testine göre IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 561,4±166,4; 1007±204,5; 1790±224,76; 3356,4±357; 4922,6±532 µg/ml bulunmuştur. Muse Count Viability testine göre IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 340,5±127; 792±111; 1695±78,6; 3356,4±357; 5307,5±50,5 µg/ml bulunmuştur. Trypan blue testine göre ise IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 409,2±90; 771,1±84,4; 1569,5±100; 3304±283,7; 5539±1272 µg/ml bulunmuştur.

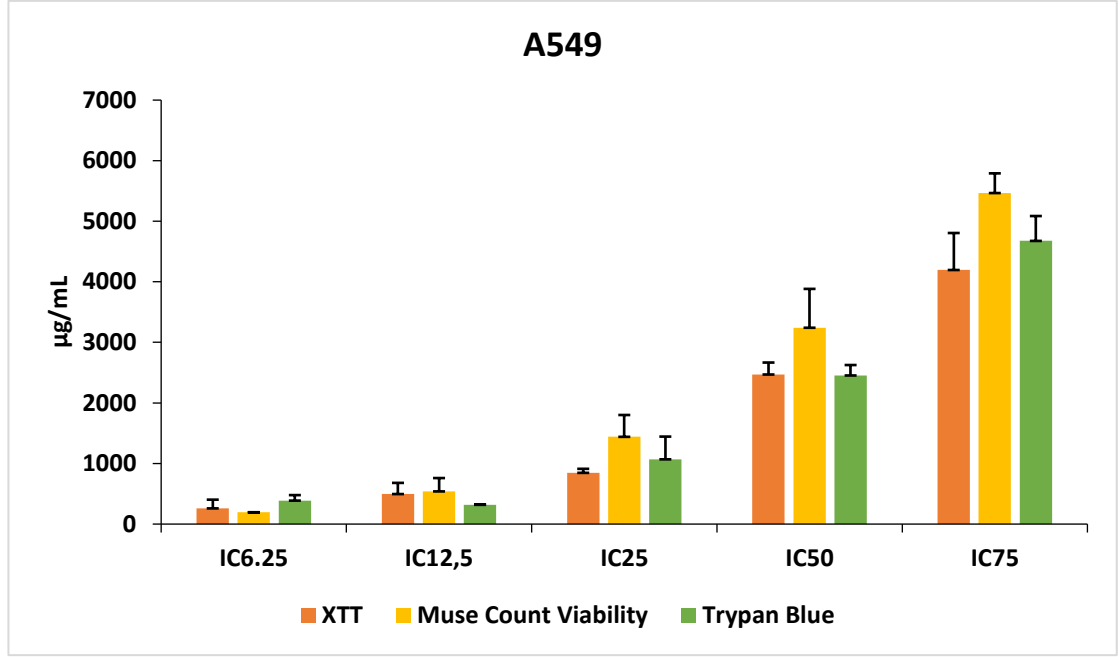
BEAS-2B hücrelerine nano alfa sepiyolit uygulanması sonucu farklı testler ile elde edilen IC değerleri Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Bu testlerin her bir IC değerleri friedman testi ile karşılaştırılmış olup, aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p>0,05).



**Şekil 4.14.** Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde farklı testler ile elde edilen IC değerleri, IC değerlerinin kendi aralarındaki anlamlılık düzeyinin friedman testine göre belirlenmesi (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ )

Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen A549 hücrelerinde elde edilen bulgular XTT testine göre IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 260±143; 497±183,5; 846±65,6; 2470±197; 4196±610 µg/ml bulunmuştur. Muse Count Viability testine göre IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 195,2±0; 539,9±219,6; 1440,5±360; 3241,8±641; 5465,8±324,4 µg/ml bulunmuştur. Trypan blue testine göre ise IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri sırasıyla 388±90; 319,5±0; 1070±374; 2454±172; 4676±410 µg/ml bulunmuştur.

A549 hücrelerine nano alfa sepiyolit uygulanması sonucu farklı testler ile elde edilen IC değerleri Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Bu testlerin her bir IC değerleri kendi aralarında Friedman testi ile karşılaştırılmış olup, aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).

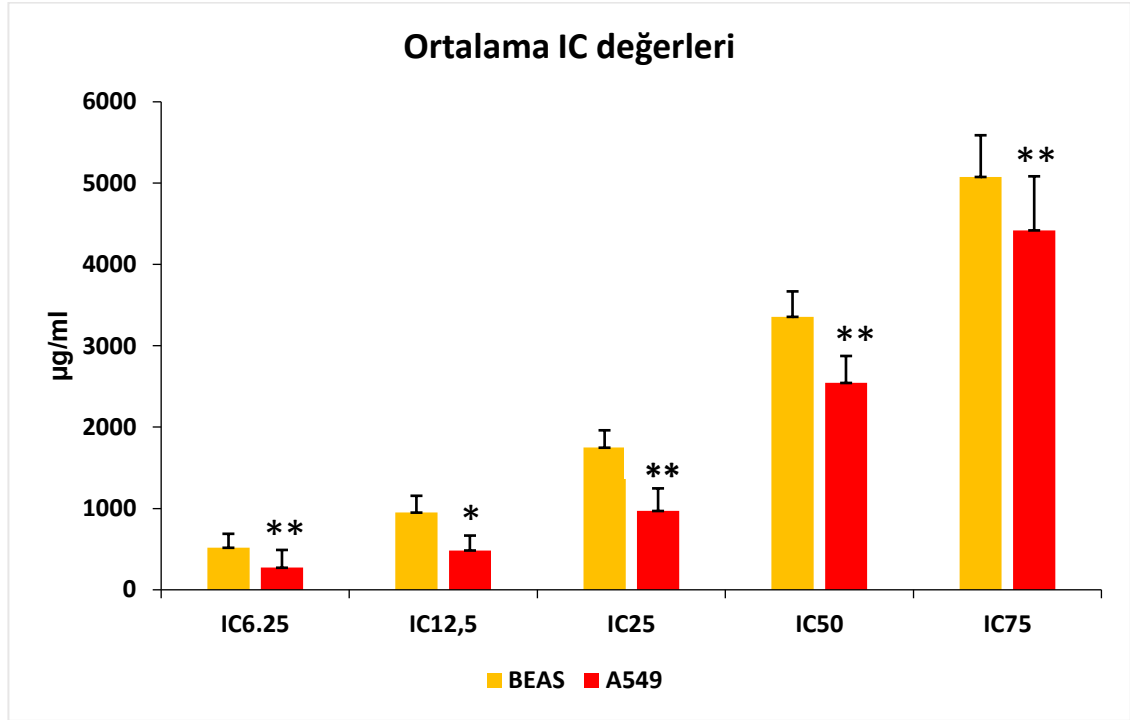


**Şekil 4.15.** Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen A549 hücrelerinde farklı testler ile elde edilen IC değerleri, IC değerlerinin kendi aralarındaki anlamlılık düzeyinin friedman testine göre belirlenmesi (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ )

Hem BEAS-2B hemde A549 hücrelerinde büyüme kontrol ile solvent kontrol arasındaki canlılık değerleri Wilcoxon testine göre kıyaslanmış olup, ikisi arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p > 0,05$ ). Bu nedenle sonraki deneylerimizde solvent kontrol kullanılmamıştır. Ancak pozitif kontrol olarak kullanılan hidrojen peroksitin canlılık düzeyleri ile büyüme kontrol arasındaki ilişki Wilcoxon testine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

Nano alfa sepiyolitinin uygulanmasıyla BEAS-2B ve A549 hücre hatlarından elde edilen XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue canlılık değerlerinin ortalama IC Değerleri bulunmuştur. Bu XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue testlerinin  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  ortalama değerleri BEAS-2B hücrelerinde sırasıyla  $517,5 \pm 171$ ;  $950 \pm 206$ ;  $1748 \pm 213$ ;  $3357 \pm 312$ ;  $5077 \pm 512$   $\mu\text{g/ml}$  bulunmuş, A549 hücre hattında ise sırasıyla  $272 \pm 218$ ;  $484 \pm 183$ ;  $970 \pm 277$ ;  $2544 \pm 331$ ;  $4420 \pm 664$   $\mu\text{g/ml}$  bulunmuştur.

Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen BEAS-2B ve A549 hücrelerinde yukarıdaki testler ile elde edilen ortalama IC değerleri Şekil 4.16’da gösterilmiş olup bu testlerden elde edilen her bir IC değerlerinin ortalama değerleri kendi aralarında Wilcoxon testi ile karşılaştırılmış olup, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). BEAS-2B hücrelerinden elde edilen ortalama IC değerlerinin A549 hücre hattına göre kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.16.** Nano alfa sepiyolit ile muamele edilen BEAS-2B ve A549 hücrelerinde üç test ile elde edilen ortalama IC değerleri, BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki ortalama IC değerlerinin birbirleri arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

**Çizelge 4.5.** Nano alfa sepiyolit lifleri ile muamele edilen BEAS-2B ve A549 hücrelerinde canlılık testleriyle elde edilen IC değerleri ve standart sapmaları

İnhibitör konsantrasyon (IC) değerleri	BEAS-2B			A549			BEAS	A549
	XTT	Muse Count Viability	Trypan Blue	XTT	Muse Count Viability	Trypan Blue	XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue Ort. IC Değerleri	
<b>IC<sub>6,25</sub></b>	561,4±166,4	340,5±127	409,2±90	260±143	195,2±0	388±90	517,5±171	272±218
<b>IC<sub>12,5</sub></b>	1007±204,5	792±111	771,1±84,4	497±183,5	539,9±219,6	319,5±0	950±206	484±183
<b>IC<sub>25</sub></b>	1790±224,76	1695±78,6	1569,5±100	846±65,6	1440,5±360	1070±374	1748±213	970±277
<b>IC<sub>50</sub></b>	3356,4±357	3467,6±59	3304±283,7	2470±197	3241,8±641	2454±172	3357±312	2544±331
<b>IC<sub>75</sub></b>	4922,6±532	5307,5±50,5	5539±1272	4196±610	5465,8±324,4	4676±410	5077±512	4420±664



#### 4.9. Nano Alfa Sepiyolitın ROS Oranına Etkisi

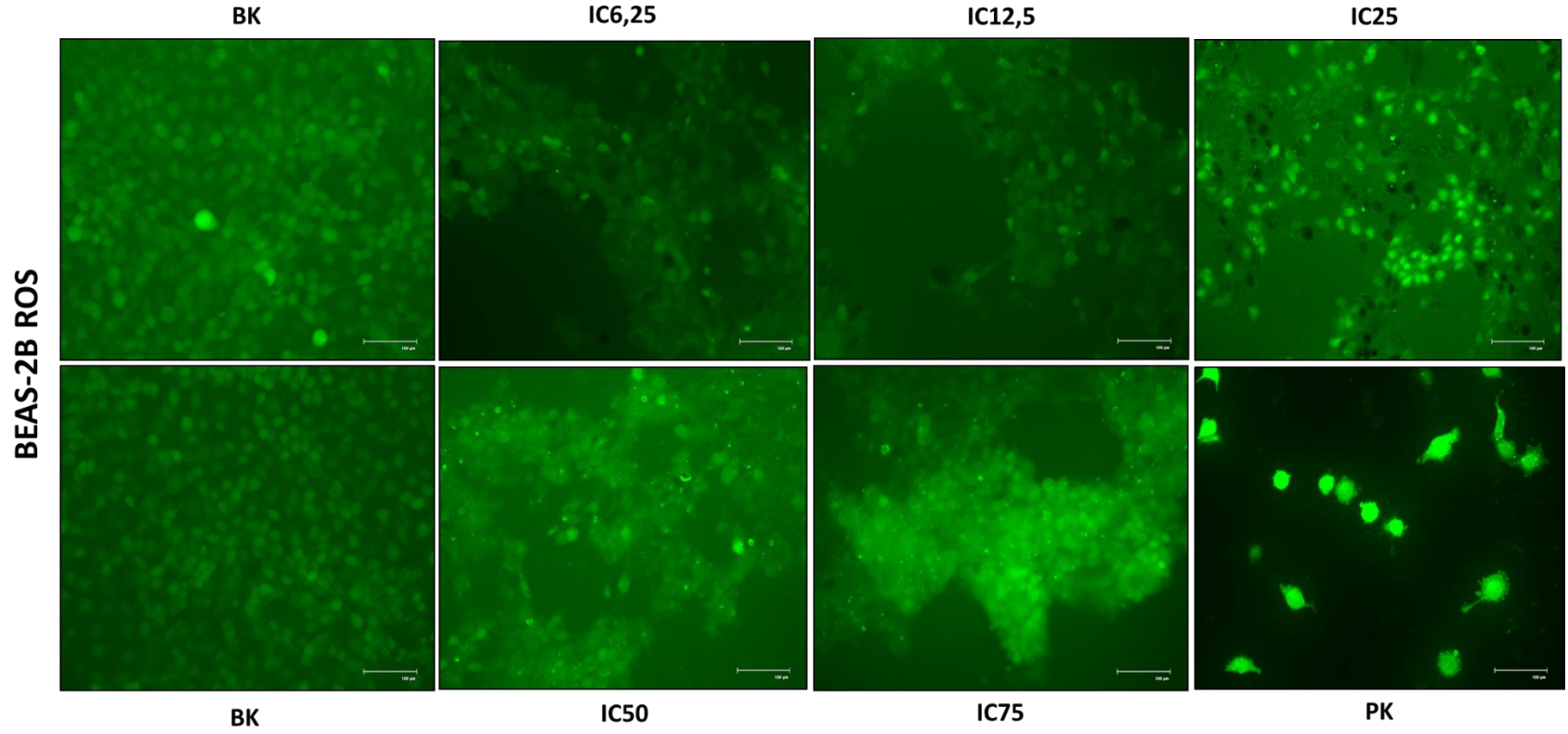
Nano alfa sepiyolitın IC<sub>6,25</sub> (517,5±171 µg/ml), IC<sub>12,5</sub> (950±206 µg/ml), IC<sub>25</sub> (1748±213 µg/ml), IC<sub>50</sub> (3357±312 µg/ml) ve IC<sub>75</sub> (5077±512 µg/ml) dozları ile BEAS-2B hücreleri 24 saat muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.17’de verilmiştir. Nano alfa sepiyolitın IC<sub>6,25</sub> (272±218 µg/ml), IC<sub>12,5</sub> (484±183 µg/ml), IC<sub>25</sub> (970±277 µg/ml), IC<sub>50</sub> (2544±331 µg/ml) ve IC<sub>75</sub> (4420±664 µg/ml) dozları ile A549 hücreleri 24 saat muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.18’de verilmiştir.

Her iki hücre hattından elde edilen görüntülerden belirlenen ROS değerlerinin yüzdesi (%) Çizelge 4.6’da verilmiştir. Ayrıca BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki kontrol grubu ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri arasındaki anlamlılık düzeyi wilcoxon testi ile karşılaştırılmıştır.

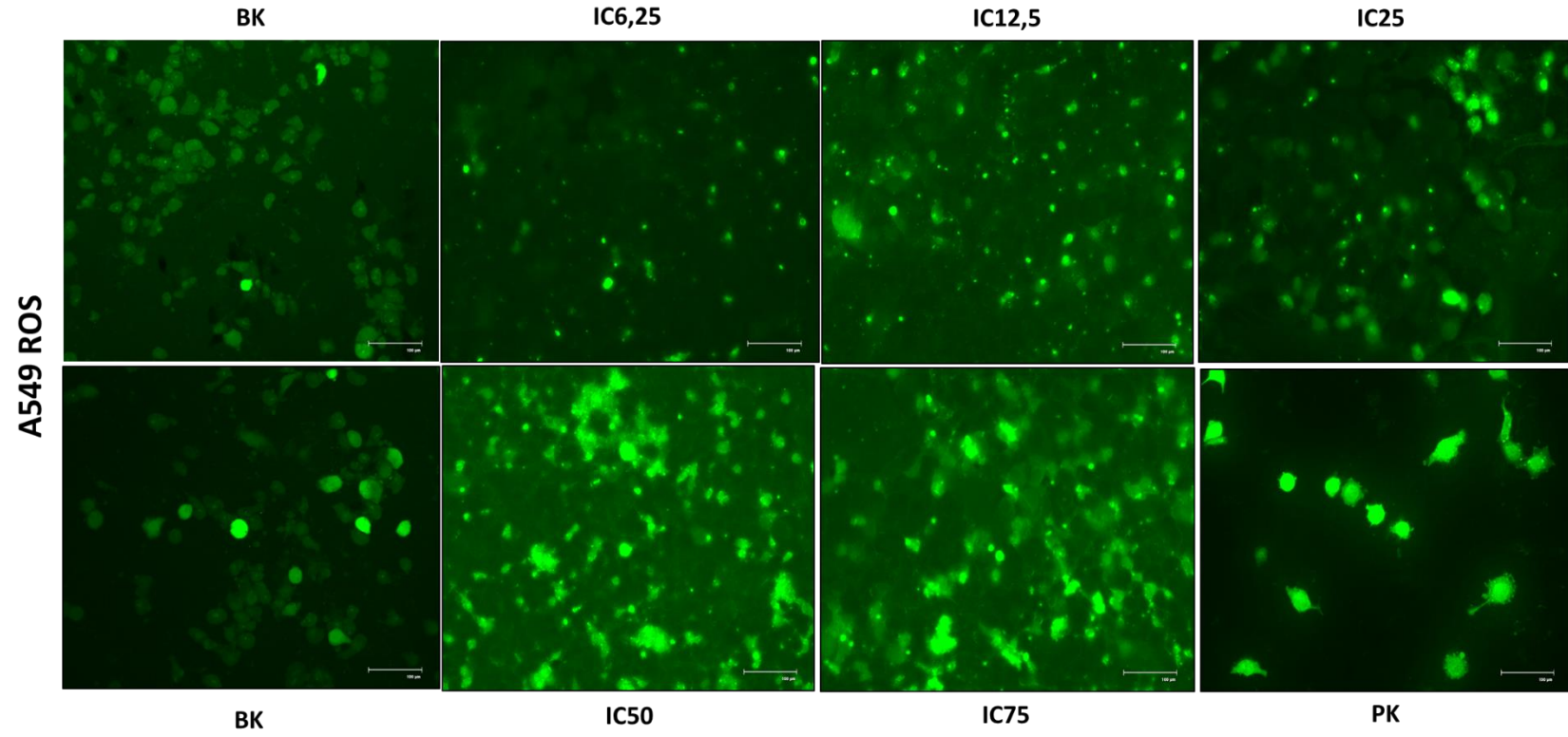
**Çizelge 4.6.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdelik (%) ROS değerleri ve standart sapmaları

Hücre hatları	Dozlar						
	BK	IC <sub>6,25</sub>	IC <sub>12,5</sub>	IC <sub>25</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>75</sub>	PK
BEAS-2B (%)	5,125±2,5	17±4,9	15±4,2	28±15,7	32±3,56	34,3±9	67,7±19
A549 (%)	15,5±8,5	20±8,6	24±9,9	54,3±13	83,8±11,3	70±15	79,4±15

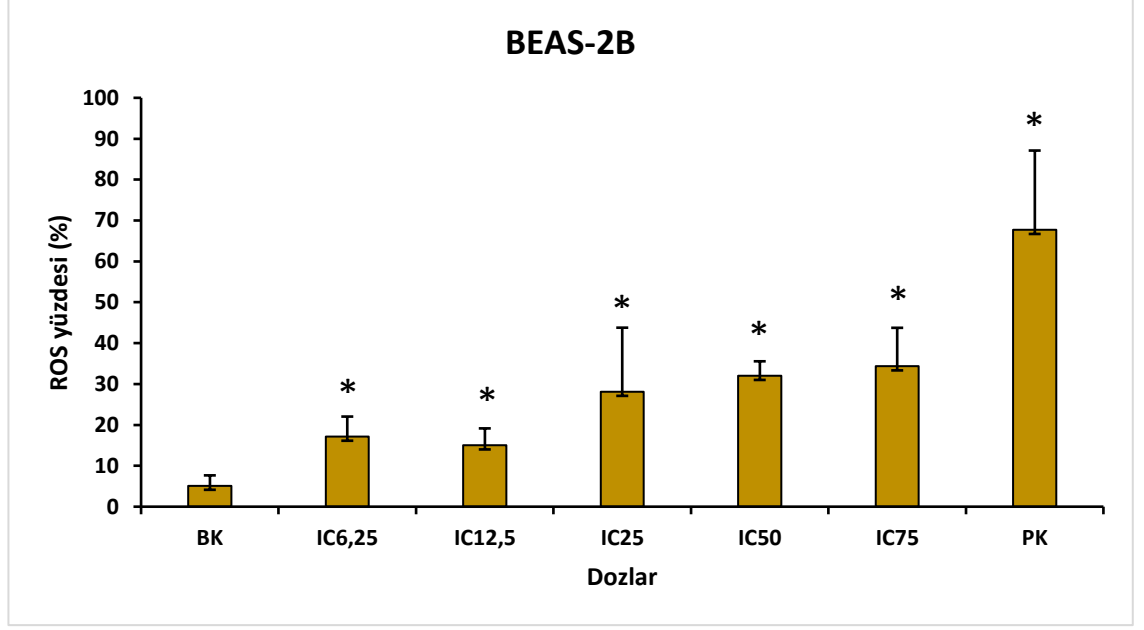
BEAS-2B hücrelerinde ortalama yüzdelik ROS, kontrol grubunda 5,125±2,5 ve pozitif kontrol grubunda 67,7±19 olarak belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama yüzdelik (%) ROS değerleri sırasıyla 17±4,9; 15±4,2; 28±15,7; 32±3,56; 34,3±9 bulunmuş olup Çizelge 4.6’da ve Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik (%) ortalama ROS değerleri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



**Şekil 4.17.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitin IC doz değerleri ile muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüleri

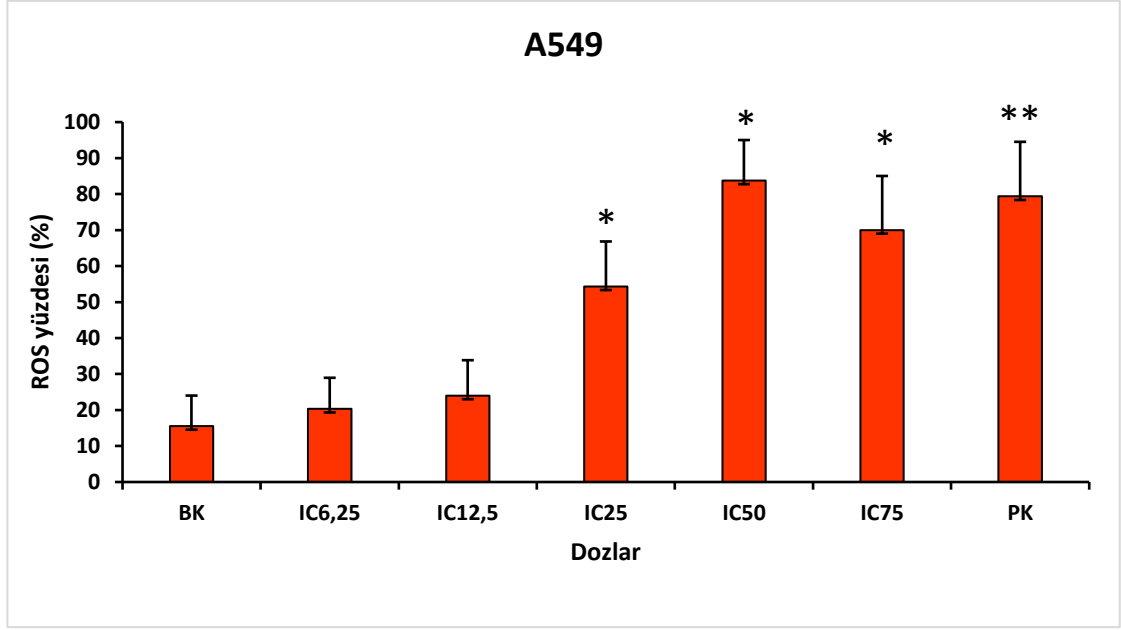


**Şekil 4.18.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamele edilmesi sonucu ROS testi ile elde edilen morfolojik görüntüleri



**Şekil 4.19.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdeler ROS değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde ise ortalama yüzdeler (%) ROS, kontrol grubunda  $15,5 \pm 8,5$  ve pozitif kontrol grubunda  $79,4 \pm 15$  olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitin IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama yüzdeler (%) ROS değerleri sırasıyla  $20 \pm 8,6$ ;  $24 \pm 9,9$ ;  $54,3 \pm 13$ ;  $83,8 \pm 11,3$ ;  $70 \pm 15$  bulunmuş olup Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdeler (%) ortalama ROS değerleri ile IC<sub>6,25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.20.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yüzdelik ROS değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### 4.10. Nano Alfa Sepiyolitın Komet Deneyi Sonuçları

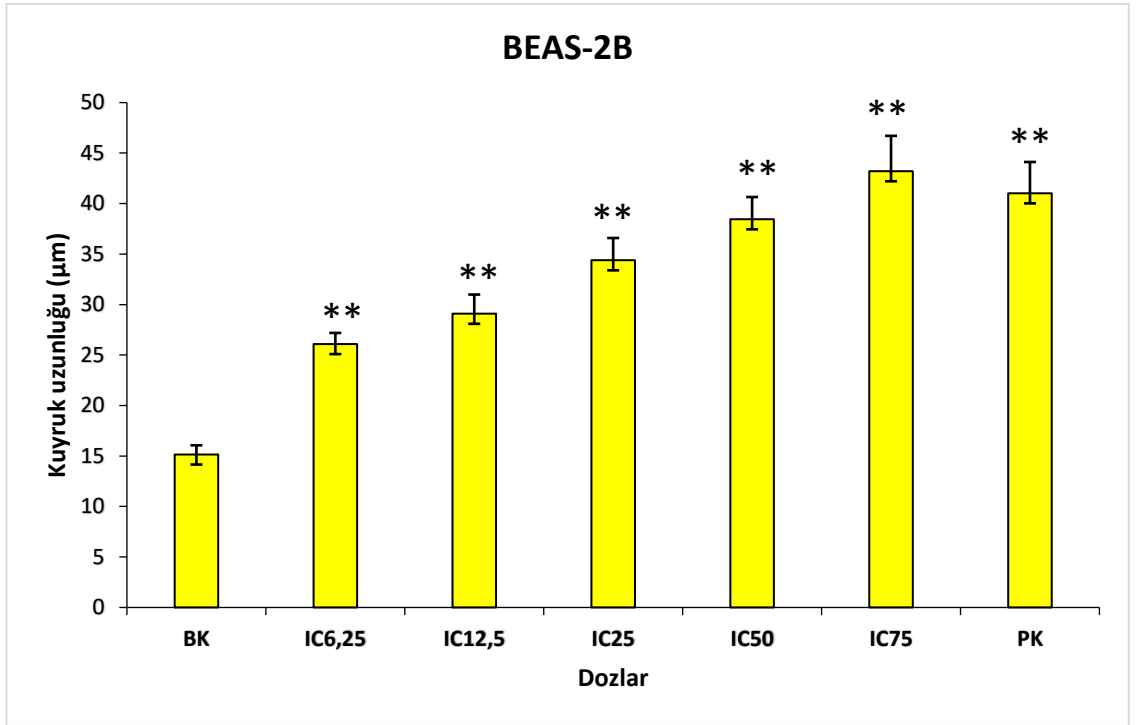
İn vitro komet testinde elde edilen bulgular içerisinde kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA (K.% DNA) ve olive kuyruk momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. Nano alfa sepiyolitın  $IC_{6,25}$  ( $517,5 \pm 171 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{12,5}$  ( $950 \pm 206 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{25}$  ( $1748 \pm 213 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{50}$  ( $3357 \pm 312 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{75}$  ( $5077 \pm 512 \mu\text{g/ml}$ ) ve PK dozları ile BEAS-2B hücreleri 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hataları (S.H) Çizelge 4.7’de verilmiştir. Nano alfa sepiyolitın  $IC_{6,25}$  ( $272 \pm 218 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{12,5}$  ( $484 \pm 183 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{25}$  ( $970 \pm 277 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{50}$  ( $2544 \pm 331 \mu\text{g/ml}$ ),  $IC_{75}$  ( $4420 \pm 664 \mu\text{g/ml}$ ) ve PK dozları ile A549 hücreleri 24 saat muamele edilmesi sonucu kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hataları (S.H) Çizelge 4.7’de verilmiştir. Ayrıca BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki kontrol grubu ile  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  değerleri arasındaki anlamlılık düzeyi wilcoxon testi ile karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.7.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hata (S.H) değerleri

Hücre hattı	BEAS-2B			A549		
	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S.H	Kuyruk %DNA miktarı $\pm$ S.H	Olive Kuyruk Momenti	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S.H	Kuyruk %DNA miktarı $\pm$ S.H	Olive Kuyruk Momenti
<b>BK</b>	15,2 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,2	20,3 $\pm$ 0,6	21 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 0,54
<b>IC<sub>6,25</sub></b>	26,1 $\pm$ 1,9	23,8 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 0,8	12,7 $\pm$ 0,4	12 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,11
<b>IC<sub>12,5</sub></b>	29,1 $\pm$ 2,2	22,3 $\pm$ 1,6	7,5 $\pm$ 0,9	28,4 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1,4	7,2 $\pm$ 0,8
<b>IC<sub>25</sub></b>	34,4 $\pm$ 2,2	26,5 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 0,8	33,7 $\pm$ 2,2	29,4 $\pm$ 1,8	9,4 $\pm$ 0,9
<b>IC<sub>50</sub></b>	38,45 $\pm$ 3,5	36 $\pm$ 2,9	14,4 $\pm$ 1,9	41,5 $\pm$ 1,6	40 $\pm$ 2,5	13,3 $\pm$ 0,9
<b>IC<sub>75</sub></b>	43 $\pm$ 3,1	35,4 $\pm$ 2,4	14,8 $\pm$ 1,5	40 $\pm$ 2	57,6 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1,2
<b>PK</b>	41 $\pm$ 2,6	45,5 $\pm$ 2,3	13,9 $\pm$ 1,2	55,5 $\pm$ 3,4	49,6 $\pm$ 2,5	22,7 $\pm$ 1,8

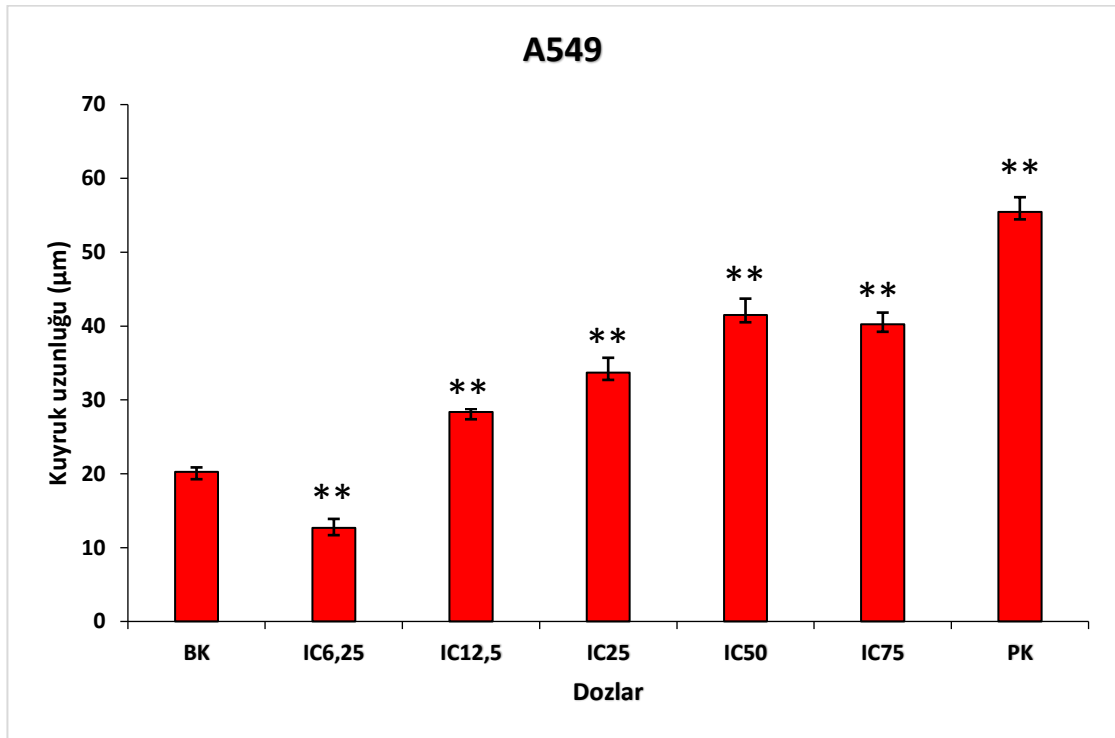
#### 4.10.1. Nano alfa sepiyolit'in kuyruk uzunluğu bulguları

BEAS-2B hücrelerinde kuyruk uzunluğu, kontrol grubunda  $15,2\pm0,9$   $\mu\text{m}$  ve pozitif kontrol grubunda  $41\pm2,6$   $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in  $\text{IC}_{6,25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $26,1\pm1,9$ ;  $29,1\pm2,2$ ;  $34,4\pm2,2$ ;  $38,45\pm3,5$ ;  $43\pm3,1$   $\mu\text{m}$  bulunmuş olup Çizelge 4.7'de ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün kuyruk uzunluğu değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistikî olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq0,01$ ).



Şekil 4.21. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p\leq0,05$ , \*\* $p\leq0,01$ )

A549 hücrelerinde kuyruk uzunluğu, kontrol grubunda  $20,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$  ve pozitif kontrol grubunda  $55,5 \pm 3,4 \mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in  $\text{IC}_{6,25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $12,7 \pm 0,4$ ;  $28,4 \pm 2$ ;  $33,7 \pm 2,2$ ;  $41,5 \pm 1,6$ ;  $40 \pm 2 \mu\text{m}$  bulunmuş olup, Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün ortalama komet kuyruk uzunluğu değeri ile  $\text{IC}_{6,25}$  dozundaki azalış istatistiki olarak anlamlı ( $p \leq 0,01$ ), diğer IC doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).

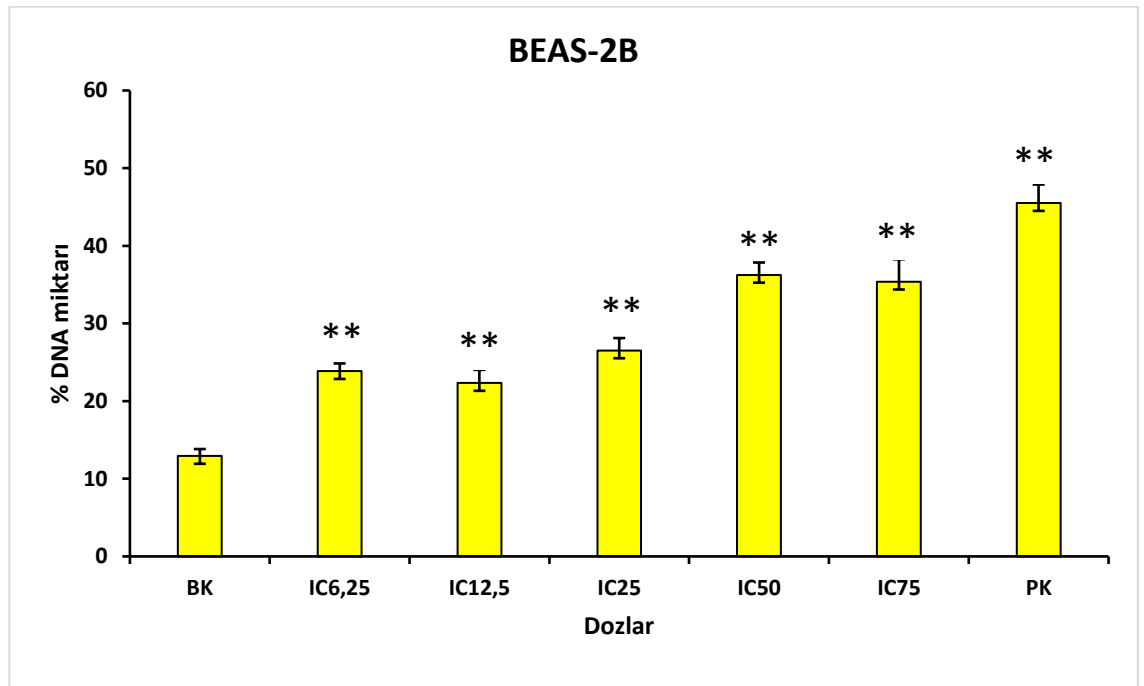


**Şekil 4.22.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )



#### 4.10.2. Nano alfa sepiyolitın kuyruk % DNA bulguları

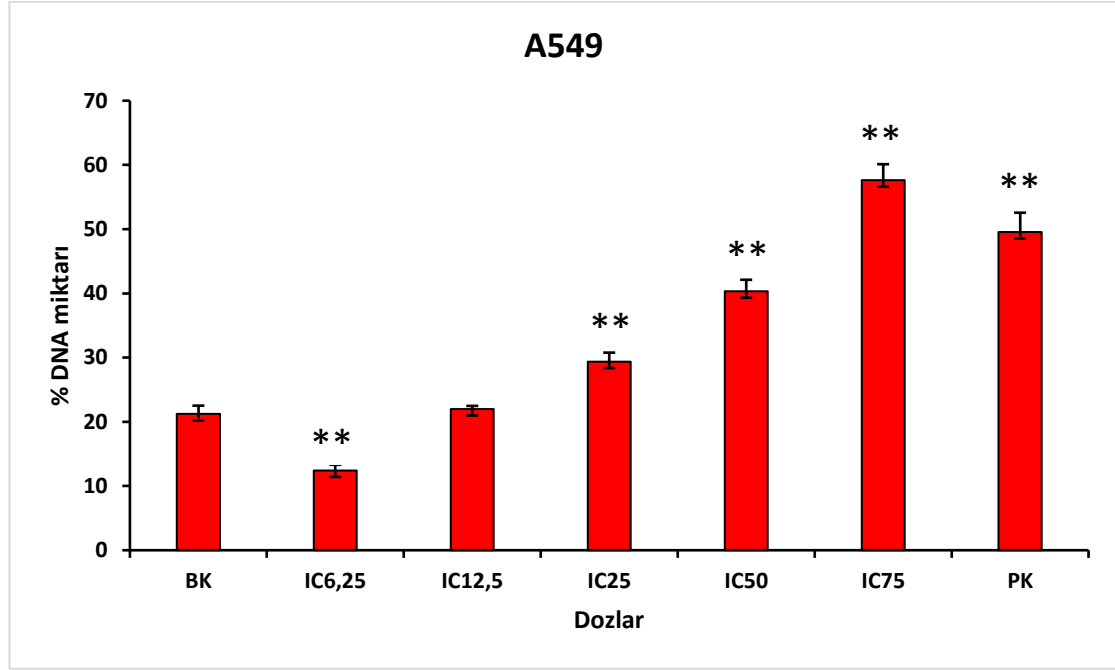
BEAS-2B hücrelerinde kuyruk % DNA miktarı, kontrol grubunda  $12,9 \pm 0,9$  ve pozitif kontrol grubunda  $45,5 \pm 2,3$  olarak belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitın  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri sırasıyla  $23,8 \pm 1,7$ ;  $22,3 \pm 1,6$ ;  $26,5 \pm 1,6$ ;  $36 \pm 2,9$ ;  $35,4 \pm 2,4$  bulunmuş olup, Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.23’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün kuyruk % DNA miktarı değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.23.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde kuyruk % DNA miktarı, kontrol grubunda  $21 \pm 1,3$  ve pozitif kontrol grubunda  $49,6 \pm 2,5$  olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitın  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama komet kuyruk % DNA miktarı değerleri sırasıyla  $12 \pm 0,5$ ;  $22 \pm 1,4$ ;  $29,4 \pm 1,8$ ;  $40 \pm 2,5$ ;  $57,6 \pm 3$  bulunmuş olup Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.24’de gösterilmiştir.

Büyüme kontrolün kuyruk % DNA miktarı değeri ile IC<sub>6,25</sub> dozundaki azalış anlamlı ( $p \leq 0,01$ ), IC<sub>12,5</sub> dozu arasındaki ilişki anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p > 0,05$ ). Diğer IC doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).

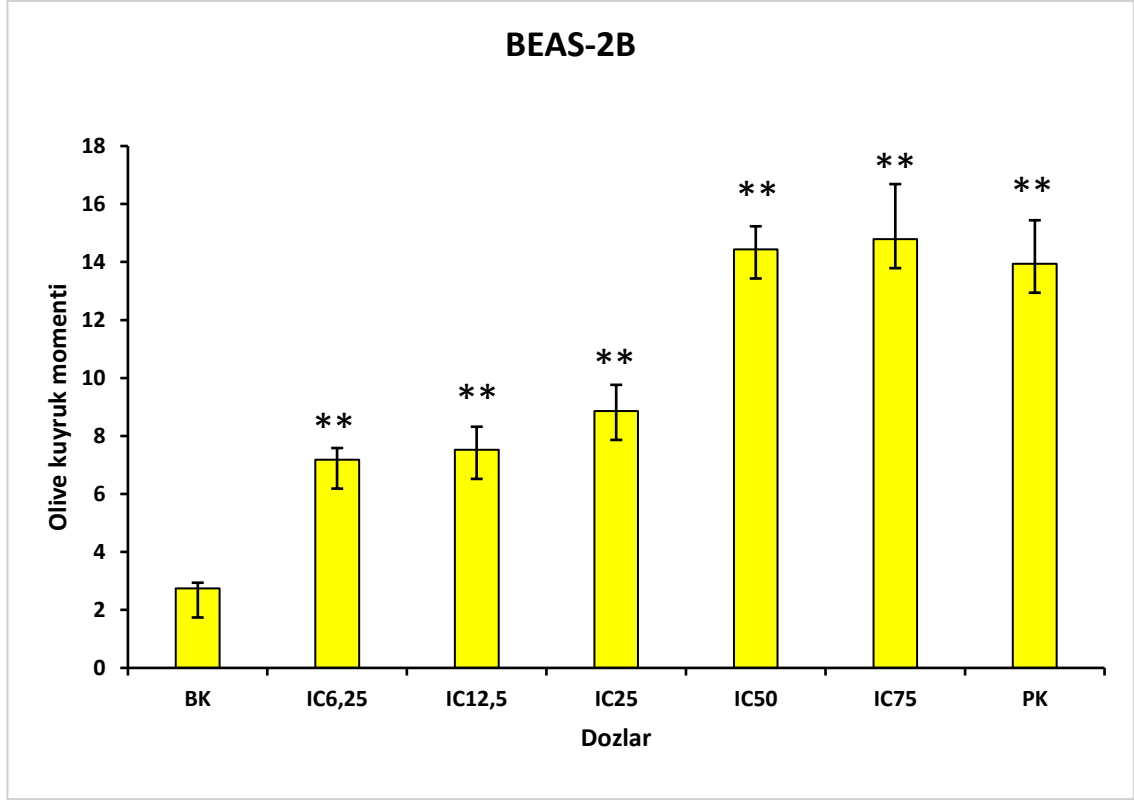


**Şekil 4.24.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### 4.10.3. Nano alfa sepiyolitinin olive kuyruk momenti bulguları

BEAS-2B hücrelerinde olive kuyruk momenti, kontrol grubunda  $2,7 \pm 0,2$  ve pozitif kontrol grubunda  $13,9 \pm 1,2$  olarak bulunmuştur. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla  $7,2 \pm 0,8$ ;  $7,5 \pm 0,9$ ;  $8,9 \pm 0,8$ ;  $14,4 \pm 1,9$ ;  $14,8 \pm 1,5$  bulunmuş olup Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.25’de gösterilmiştir.

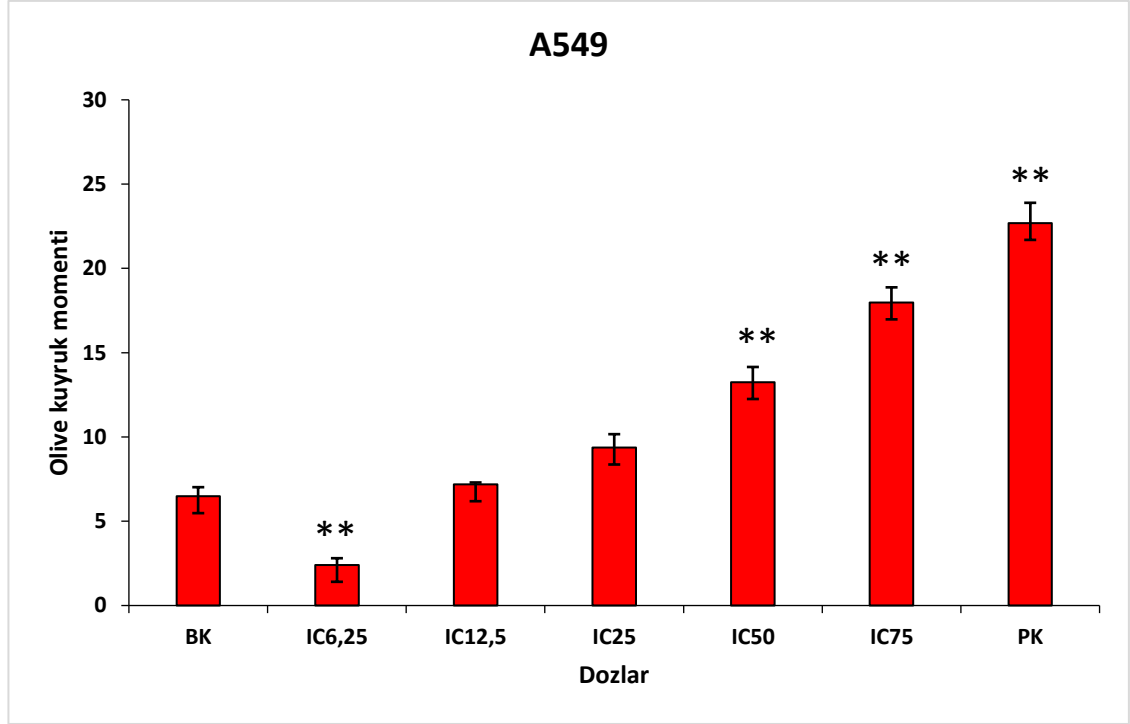
Büyüme kontrolün olive kuyruk momenti değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.25.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde komet olive kuyruk momenti, kontrol grubunda  $6,5 \pm 0,54$  ve pozitif kontrol grubunda  $22,7 \pm 1,8$  olarak bulunmuştur. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitin  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla  $2,4 \pm 0,11$ ;  $7,2 \pm 0,8$ ;  $9,4 \pm 0,9$ ;  $13,3 \pm 0,9$ ;  $18 \pm 1,2$  bulunmuş olup Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.26’da gösterilmiştir.

Büyüme kontrolün olive kuyruk momenti değeri ile  $IC_{6,25}$  doz değerleri arasındaki azalış anlamlı iken ( $p \leq 0,01$ ),  $IC_{12,5}$  ve  $IC_{25}$  dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p \leq 0,05$ ),  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).



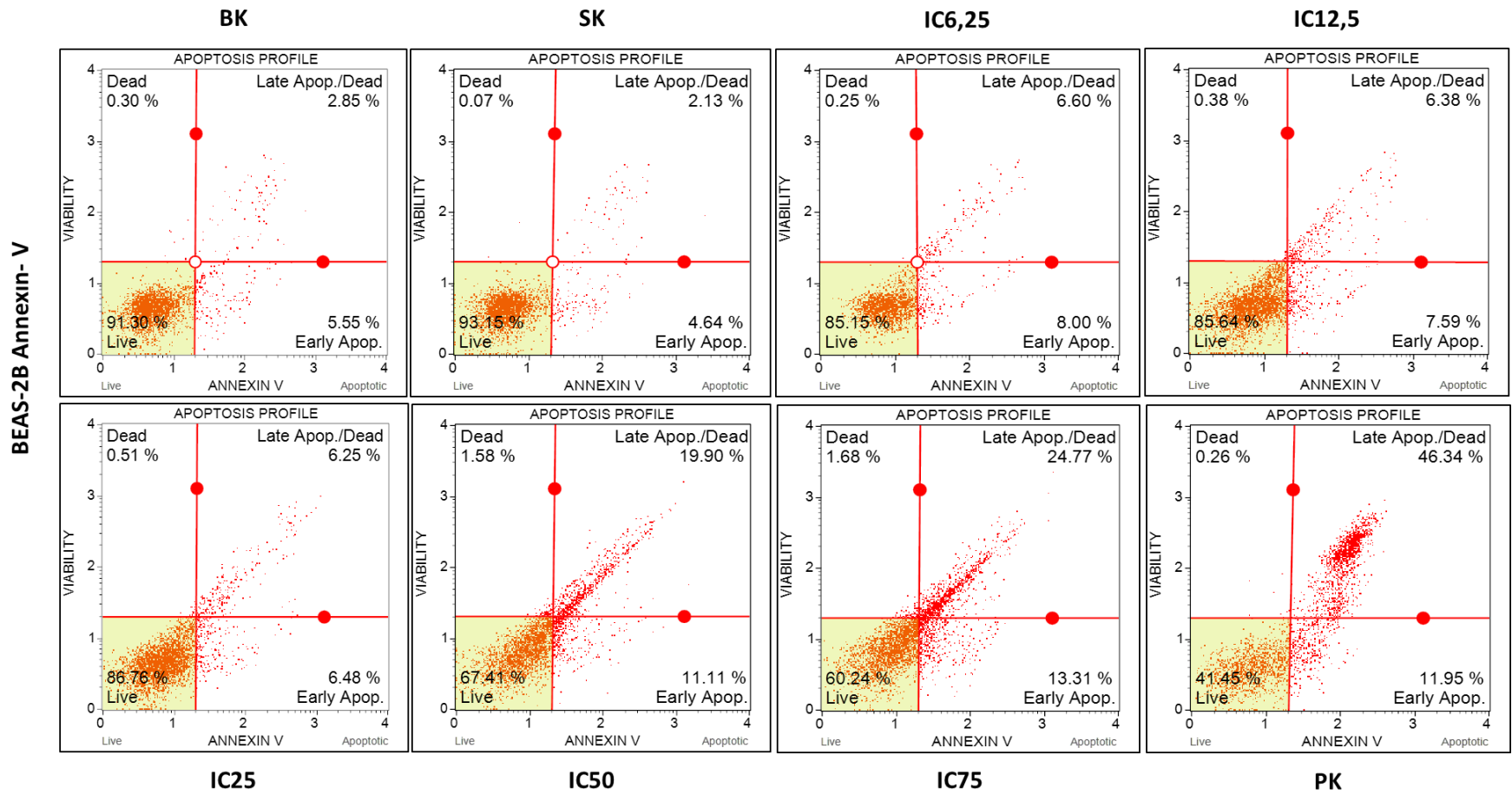
**Şekil 4.26.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momentı değerleri, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### 4.11. Nano Alfa Sepiyolitın Annexin-V Testi Apoptoz Bulguları

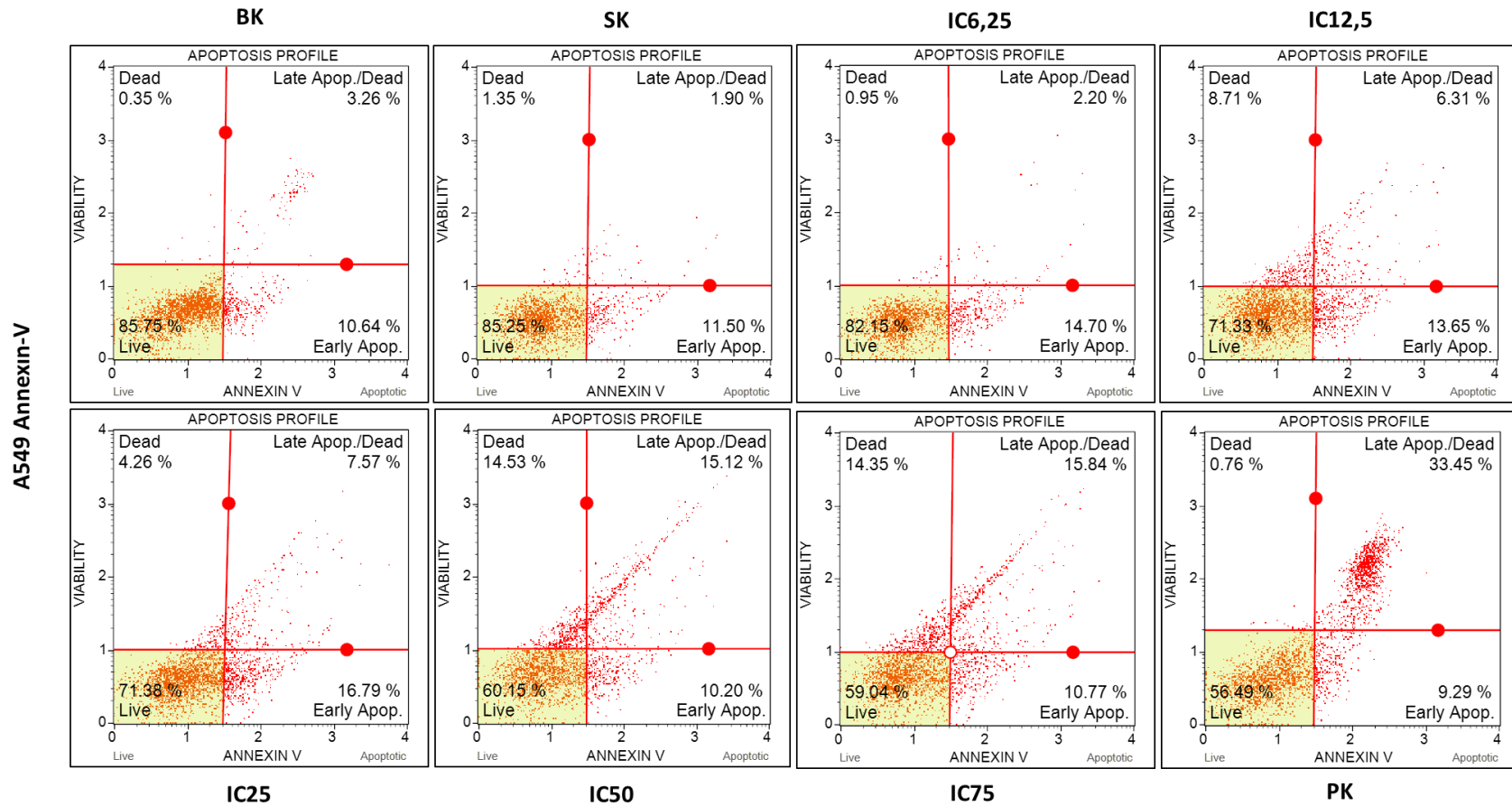
Nano alfa sepiyolitın IC<sub>6,25</sub> (517,5±171 µg/ml), IC<sub>12,5</sub> (950±206 µg/ml), IC<sub>25</sub> (1748±213 µg/ml), IC<sub>50</sub> (3357±312 µg/ml), IC<sub>75</sub> (5077±512 µg/ml) ve PK dozları ile BEAS-2B hücreleri, nano alfa sepiyolitın IC<sub>6,25</sub> (272±218 µg/ml), IC<sub>12,5</sub> (484±183 µg/ml), IC<sub>25</sub> (970±277 µg/ml), IC<sub>50</sub> (2544±331 µg/ml), IC<sub>75</sub> (4420±664 µg/ml) ve PK dozları ile A549 hücreleri 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları Çizelge 4.8’de verilmiştir. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde Annexin-V parametreleri, büyüme kontrol ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> doz değerlerinin karşılaştırılarak anlamlılık düzeyinin belirlenmesi wilcoxon testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Şekil 4.27’de BEAS-2B hücrelerinde, Şekil 4.28’de A549 hücrelerinde, nano alfa sepiyolitın 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen örnek grafikler gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri

Hücre hattı	BEAS-2B					A549					
	Dozlar	Canlı hücre±S.S	Erken Apoptotik Hücre±S.S	Geç Apoptotik Hücre±S.S	Toplam Apoptotik Hücre±S.S	Ölü Hücre±S.S	Canlı hücre±S.S	Erken Apoptotik Hücre±S.S	Geç Apoptotik Hücre±S.S	Toplam Apoptotik Hücre±S.S	Ölü Hücre±S.S
	<b>BK</b>	87,6±3,8	4,6±2,9	5,6±2,7	10,2±4	2,1±1,9	85,4±3,2	11,8±5,7	2,6±1,9	14±3,9	0,53±1,1
	<b>IC<sub>6,25</sub></b>	84±7	5,65±1,4	9,2±5,4	14,9±6	1,3±1,3	82,7±6,2	11,5±5,7	4±2,5	15,5±5,6	1,8±1,8
	<b>IC<sub>12,5</sub></b>	78,6±9,3	10,7±4,9	9,8±4,4	20,6±9,1	0,84±0,4	78±6,9	15±6,6	4,6±2,9	19,6±6,6	2,1±2,1
	<b>IC<sub>25</sub></b>	80,3±9,7	7,2±5,4	9,3±4,6	16,5±9,5	1,8±1,8	78,2±6,8	13,6±7,8	5,9±2,2	18,7±6,7	2,9±2,3
	<b>IC<sub>50</sub></b>	73±4,6	10,1±2,8	14,8±4,2	25±6,1	2,4±1,6	74,3±8,4	11,1±5,1	7,9±3,5	19±5,1	6,1±4,8
	<b>IC<sub>75</sub></b>	59,9±3,6	21±8,9	19,8±5,04	38,1±6	2±2,6	68,1±8,5	14,8±7,2	13,2±6,6	26,7±6,4	6±4,3
	<b>PK</b>	37,5±3,4	11,5±0,5	50,8±3,6	62,3±3,4	0,25±0,03	62,4±8,1	18,6±7,6	27±6,9	36,9±7,8	1,2±1,74



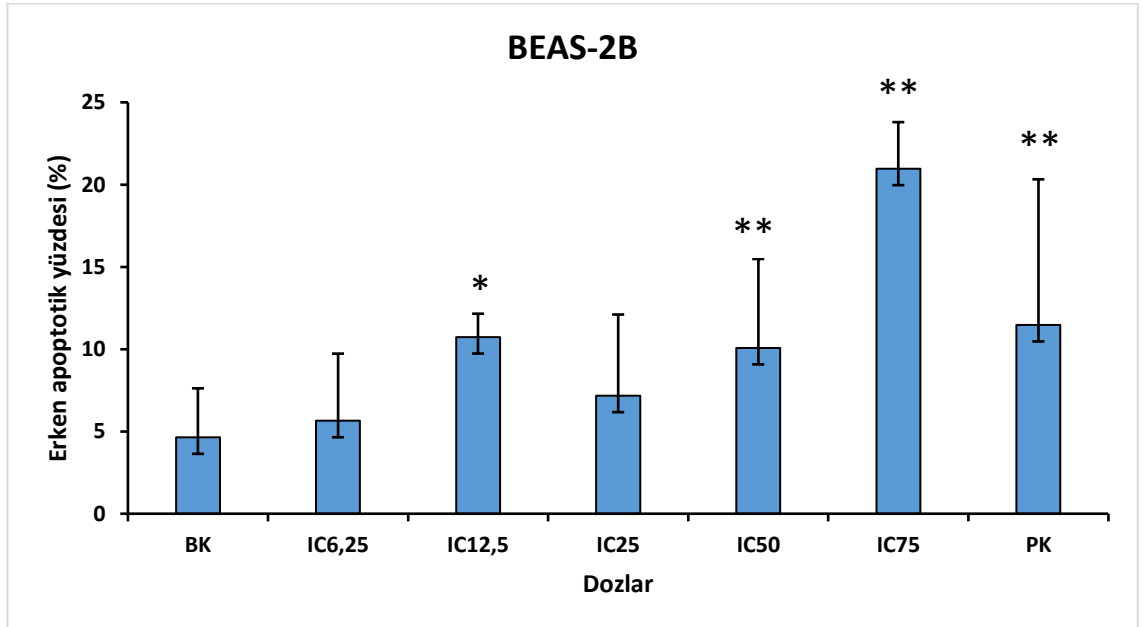
**Şekil 4.27.** BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolitin 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi



**Şekil 4.28.** A549 hücrelerinde nano alfa sepiyolitinin 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi

BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolit liflerinin IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon grupları muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri hesaplanmıştır. Bu parametrelerden yaşayan hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 87,6±3,8; 84±7; 78,6±9; 80,3±9,7; 73±4,6; 59,9±3,6; 37,5±3,4 bulunmuş olup Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken (p>0,05), IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,01).

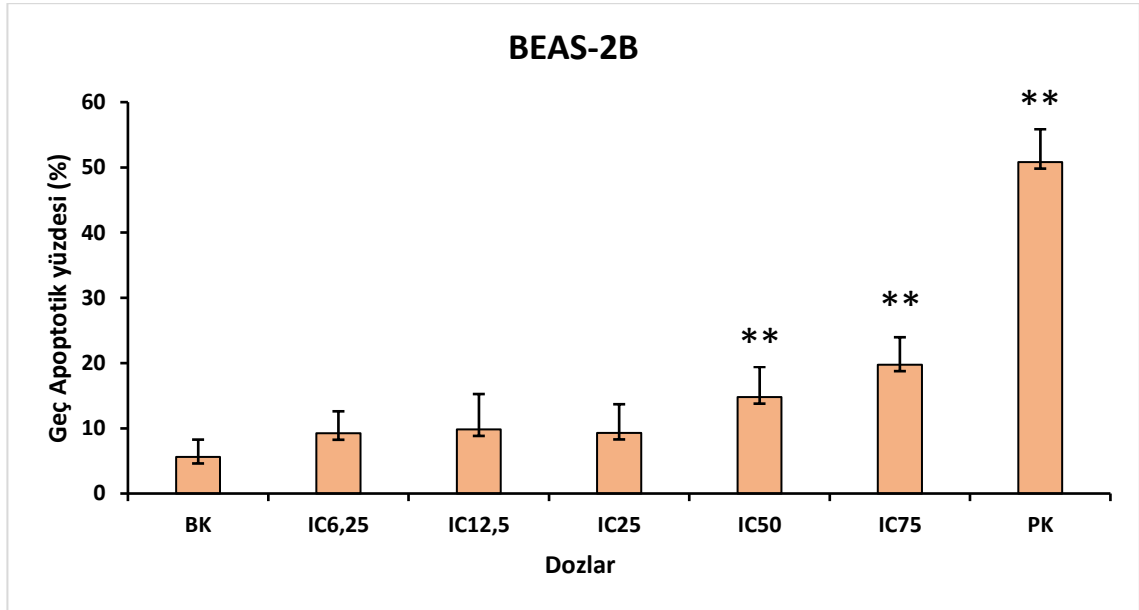
Diğer parametre ise erken apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 4,6±2,9; 5,65±1,4; 10,7±4,9; 7,2±5,4; 10,1±2,8; 21±8,9; 11,5±0,5 bulunmuş olup, Şekil 4.29’da gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub> ve IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken (p>0,05), IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



**Şekil 4.29.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\*p≤0,05, \*\*p≤0,01)

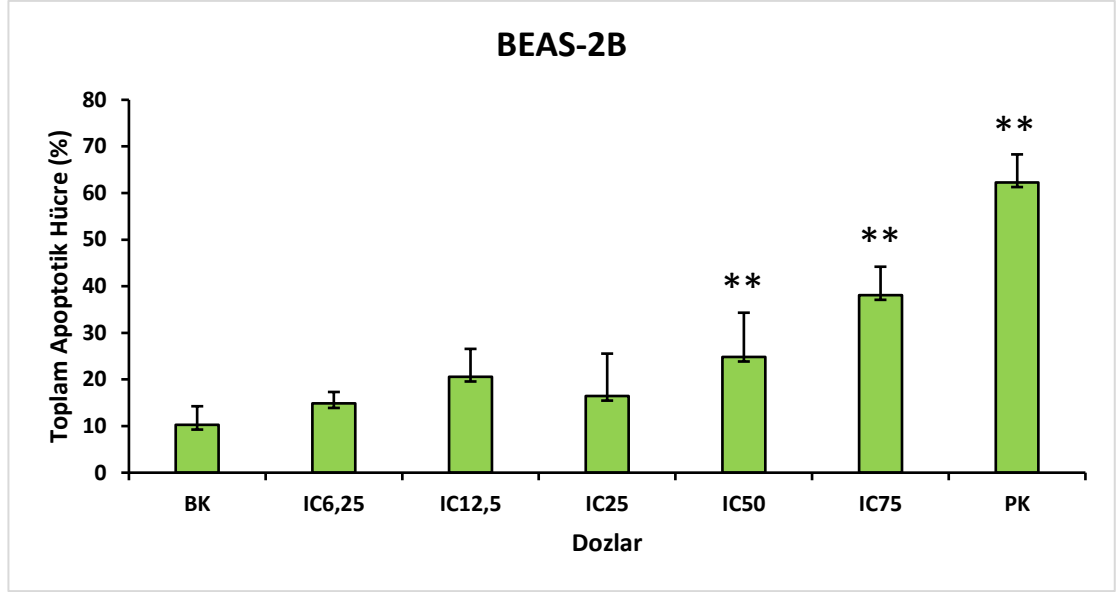


Geç apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 5,6±2,7; 9,2±5,4; 9,8±4,4; 9,3±4,6; 14,8±4,2; 19,8±5,04; 50,8±3,6 bulunmuş olup, Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub> ve IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken (p>0,05), IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,01).



**Şekil 4.30.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\*p≤0,05, \*\*p≤0,01)

Toplam apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 10,2±4; 14,9±6; 20,6±9,1; 16,5±9,5; 25±6,1; 38,1±6; 62,3±3,4 bulunmuş olup, Şekil 4.31'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken (p>0,05), IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,01).

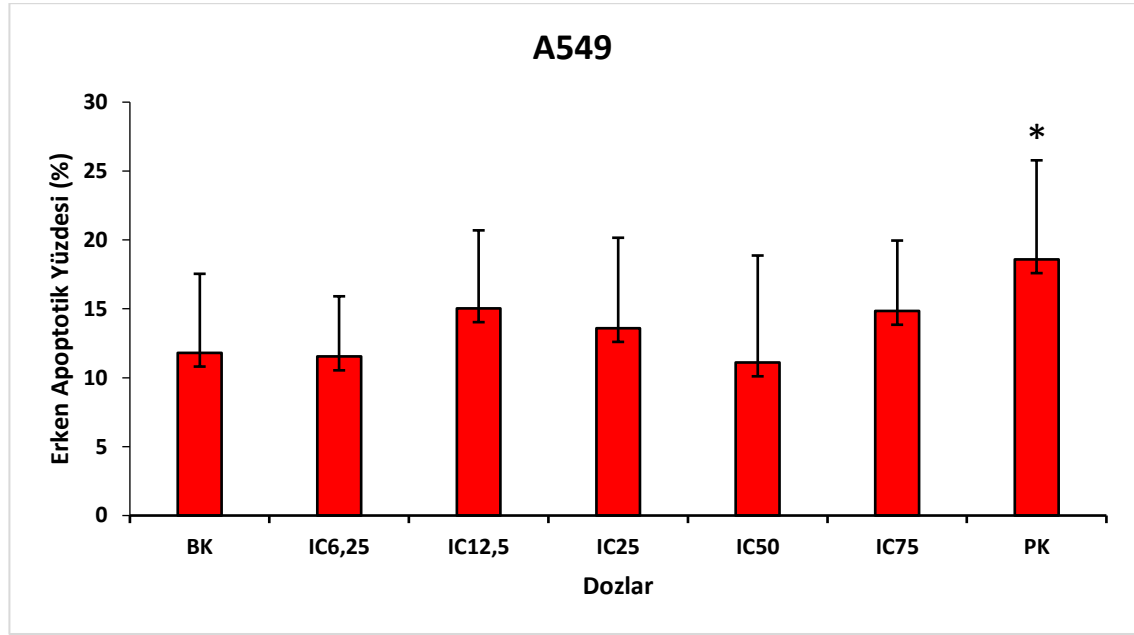


**Şekil 4.31.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Ölü hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 2,1±1,9; 1,3±1,3; 0,84±0,4; 1,8±1,8; 2,4±1,6; 2±2,6; 0,25±0,03 bulunmuş olup Çizelge 4.13’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).

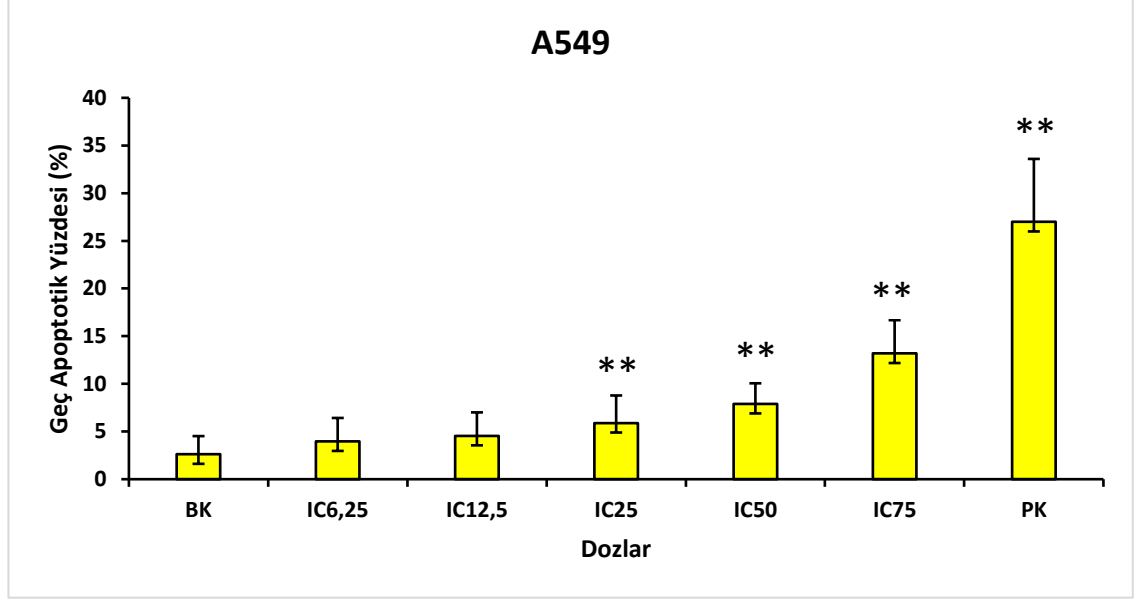
A549 hücre hattında nano alfa sepiyolit liflerinin IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon grupları muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri hesaplanmıştır. Bu parametrelerden yaşayan hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 85,4±3,2; 82,7±6,2; 78±6,9; 78,2±6,8; 74,3±8,4; 68,1±8,5; 62,4±8,1 bulunmuş olup, Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

Diğer parametre ise erken apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 11,8±5,7; 11,5±5,7; 15±6,6; 13,6±7,8; 11,1±5,1; 14,8±7,2; 18,6±7,6 bulunmuş olup, Şekil 4.32’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelerik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), PK doz değeri ile kıyaslandığında dozun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq0,05$ ).



**Şekil 4.32.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p\leq0,05$ , \*\* $p\leq0,01$ )

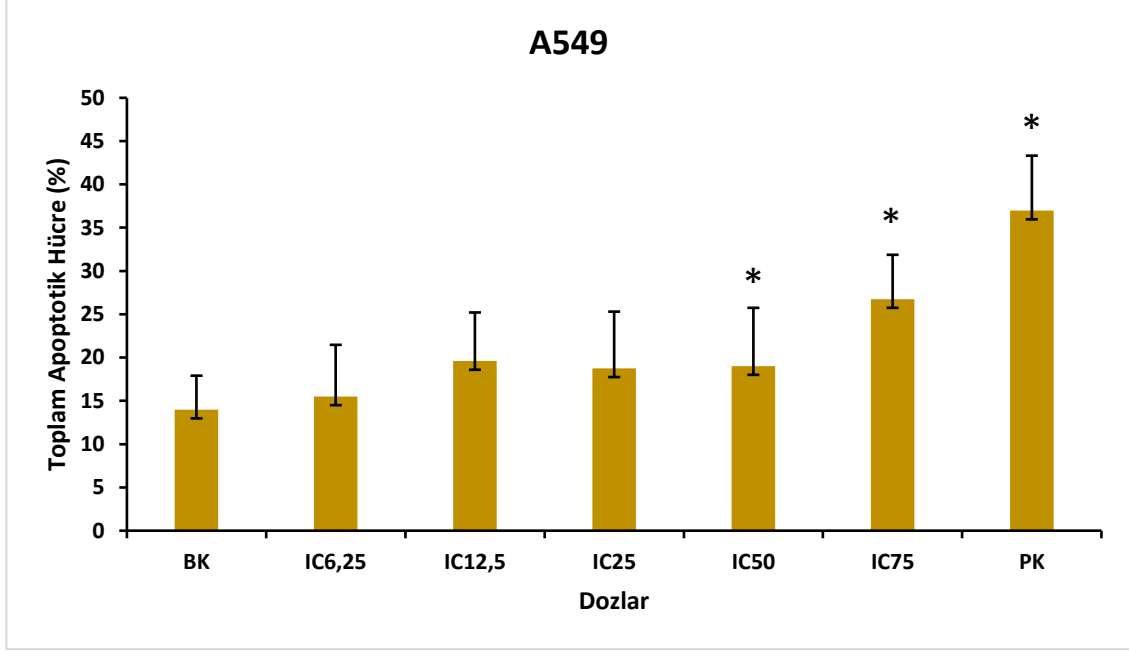
Geç apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 2,6±1,9; 4±2,5; 4,6±2,9; 5,9±2,2; 7,9±3,5; 13,2±6,6; 27±6,9 bulunmuş olup, Şekil 4.33’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelerik değerleri ile IC<sub>6,25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq0,01$ ).



**Şekil 4.33.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit'in IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Toplam apoptotik hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre  $14 \pm 3,9$ ;  $15,5 \pm 5,6$ ;  $19,6 \pm 6,6$ ;  $18,7 \pm 6,7$ ;  $19 \pm 5,1$ ;  $26,7 \pm 6,4$ ;  $36,9 \pm 7,8$  bulunmuş olup, Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub> ve IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

Ölü hücre yüzdesi BK, IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre  $0,53 \pm 1,1$ ;  $1,8 \pm 1,8$ ;  $2,1 \pm 2,1$ ;  $2,9 \pm 2,3$ ;  $6,1 \pm 4,8$ ;  $6 \pm 4,3$ ;  $1,2 \pm 1,74$  bulunmuş olup Çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile IC<sub>6,25</sub>, IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> ve PK arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



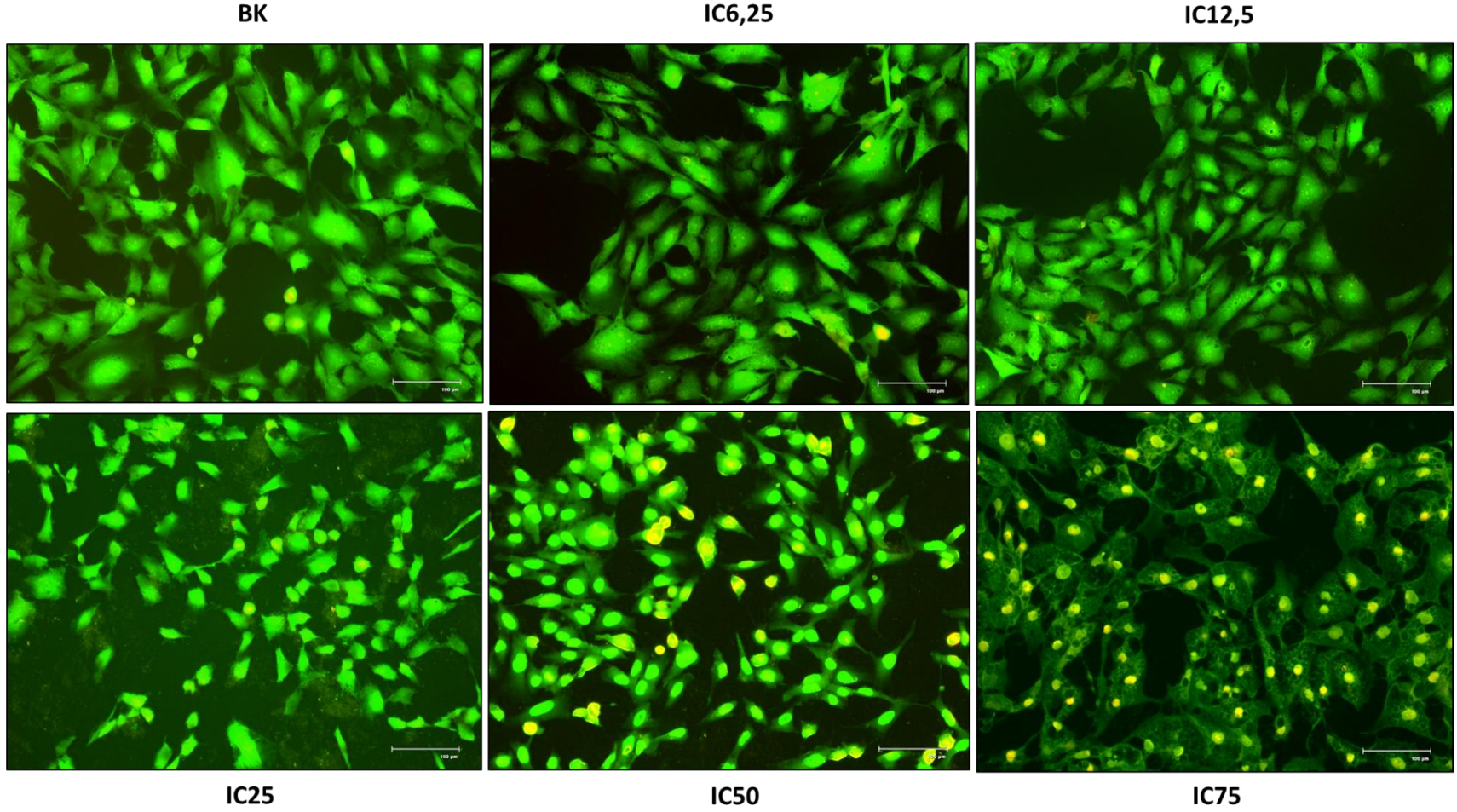
**Şekil 4.34.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolitinin IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile IC değerlerinin anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile belirlenmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### 4.12. Nano Alfa Sepiyolitinin Hücre Morfolojisinde Neden Olduğu Değişikliklerin İkili Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi

24 saat boyunca nano alfa sepiyolite maruz bırakılan BEAS-2B ve A549 hücrelerinde morfolojik değişimler ikili boyama yöntemi (akridin orange ve etidyum bromür) ile görüntülenmiştir. Şekil 4.35’de nano alfa sepiyolitinin BEAS-2B hücrelerinde meydana getirdiği morfolojik değişimler, Şekil 4.36’da A549 hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişimler gösterilmiştir.

BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolitinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin genel morfolojik yapısı incelendiğinde yeşil renklenmelerin yerini açık yeşil ve sarı renkli hücrelerin aldığı gözlenmiştir. A549 hücrelerinde ise nano alfa sepiyolitinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin genel morfolojik yapısı incelendiğinde yeşil renklenmelerin yerini daha çok sarı renkli hücrelerin aldığı gözlenmiştir. Açık yeşilli hücreler erken apoptoza işaret ederken sarı renkli hücreler ise geç apoptoza işaret etmektedir. Ayrıca her iki hücrede artan doz konsantrasyonu ile birlikte hücrelerin genel morfolojik yapısının bozulduğu gözlenmiştir.

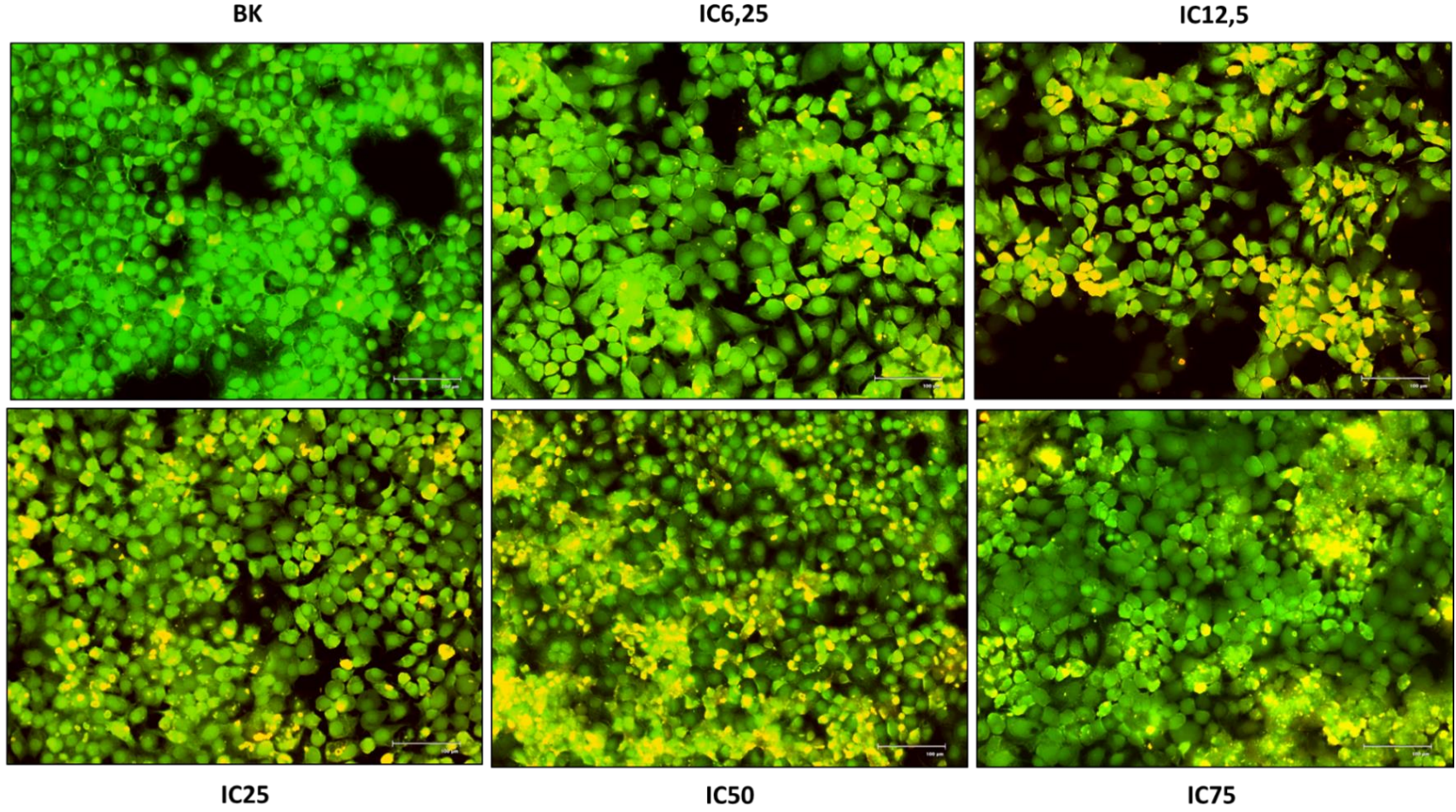
BEAS-2B (Sağlıklı Akciğer Hücresi)



Şekil 4.35. Nano alfa sepiyolitin BEAS-2B hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi



A549 (Kanserli Akciğer Hücresi)



Şekil 4.36. Nano alfa sepiyolit in A549 hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.

#### 4.13. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının Hayatta Kalış (% Canlılık) Oranına Etkisi

Çalışmada kullanılan nano alfa sepiyolit ve radyasyon birlikte kombine edildiğinde BEAS-2B hücreleri 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL), 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozları ile, A549 hücreleri ise 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL); 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozları ile 24 saat muamele edildiğinde XTT testi ile hayatta kalış (% canlılık) oranları belirlenmiştir. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde hayatta kalış oranları Çizelge 4.9’da gösterilmiştir. Ayrıca BEAS-2B ve A549 hücre hattının XTT canlılık testlerinden elde sonuçların anlamlılık düzeyleri wilcoxon testine göre belirlenmiştir.

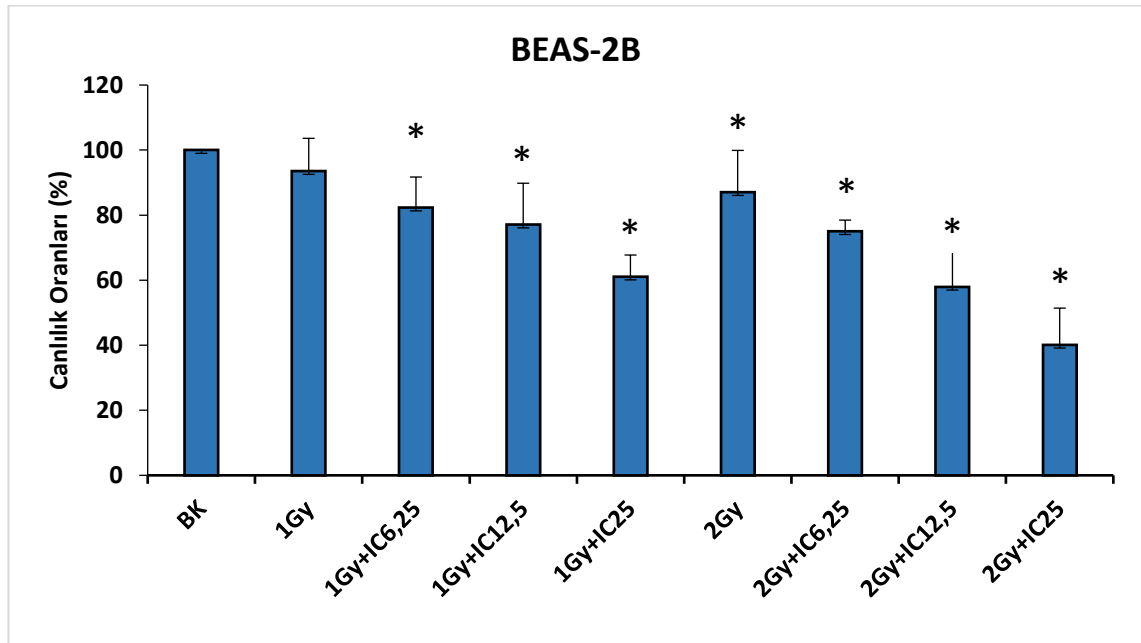
BEAS-2B hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranı, kontrol grubunda 100±00 ve pozitif kontrol grubunda 13,3±5,3 olarak belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerine nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen XTT canlılık yüzdeleri (%) sırasıyla 93,53±10; 82,3±9,4; 77±13; 61±6,6; 87,1±13; 75±3,4; 58±10,8; 40±11,3 bulunmuş olup Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün XTT canlılık yüzdeleri (%), 1Gy dozu ile karşılaştırıldığında neden olduğu azalış anlamlı değilken (p>0,05), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).

1Gy radyasyon dozunun canlılık yüzdeleri (%) ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+ IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı iken (p≤0,05), 2Gy radyasyon dozu ile kıyaslandığında düşüşün anlamlı olmadığı bulunmuştur (p>0,05). 2Gy radyasyon dozunun canlılık yüzdeleri (%) ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozu ile karşılaştırıldığında düşüş anlamlı değilken (p>0,05), 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



**Çizelge 4.9.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyonları grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT canlılık yüzdeleri ve standart sapma değerleri

	Dozlar					
	BK	1Gy	1Gy+IC <sub>6,25</sub>	1Gy+IC <sub>12,5</sub>	1Gy+IC <sub>25</sub>	PK
<b>BEAS-2B</b>	100±0	93,53±10	82,3±9,4	77±13	61±6,6	13,3±5,3
<b>A549</b>	100±0	92,2±14	71,8±16,8	63,5±19	61,8±23	3,2±2
	BK	2Gy	2Gy+IC <sub>6,25</sub>	2Gy+IC <sub>12,5</sub>	2Gy+IC <sub>25</sub>	PK
<b>BEAS-2B</b>	100±0	87,1±13	75±3,4	58±10,8	40±11,3	13,3±5,3
<b>A549</b>	100±0	72,3±16	68,7±13,3	53,5±20,8	42,3±17,4	3,2±2



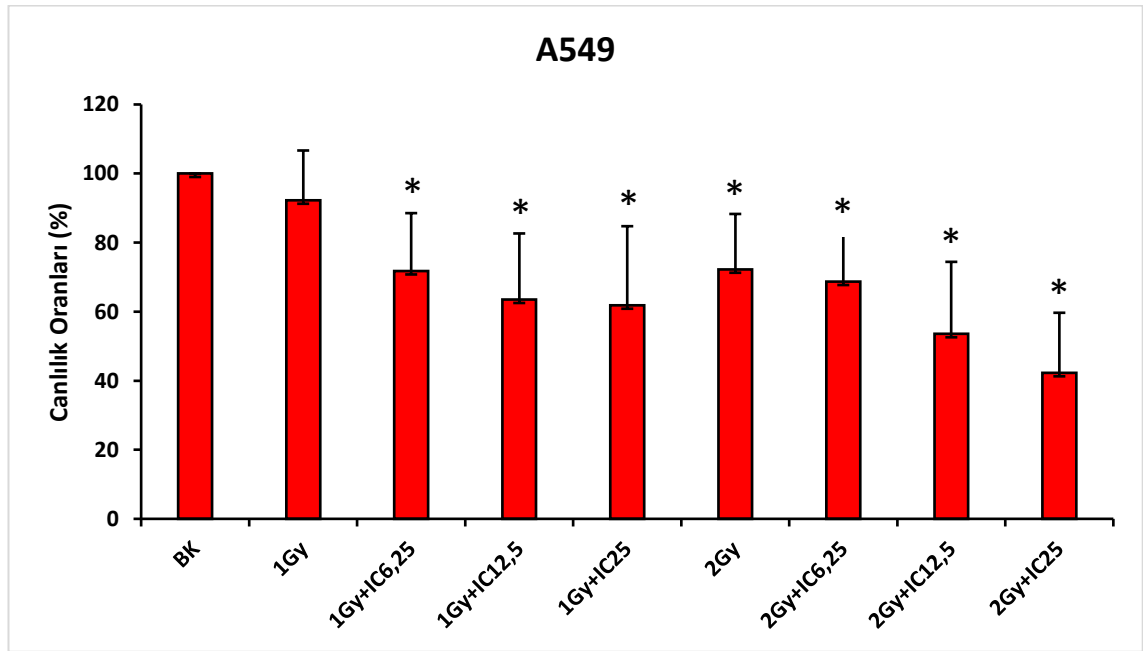
**Şekil 4.37.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT testi canlılık yüzdeleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\*p≤0,05, \*\*p≤0,01)

A549 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranı, kontrol grubunda 100±00 ve pozitif kontrol grubunda 3,2±2 olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerine nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen XTT canlılık

yüzdeleri (%) sırasıyla 92,2±14; 71,8±16,8; 63,5±19; 61,8±23; 72,3±16; 68,7±13,3; 53,5±20,8; 42,3±17,4 bulunmuş olup Şekil 4.38’de gösterilmiştir.

Büyüme kontrolün XTT canlılık yüzdeleri (%) 1Gy dozu ile karşılaştırıldığında neden olduğu azalış anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

1Gy radyasyon dozunun canlılık yüzdeleri (%) ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+ IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy radyasyon dozunun canlılık yüzdeleri (%) ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozu ile karşılaştırıldığında düşüş anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 2Gy+ IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.38.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen XTT testi canlılık yüzdeleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p\leq 0,05$ , \*\* $p\leq 0,01$ )

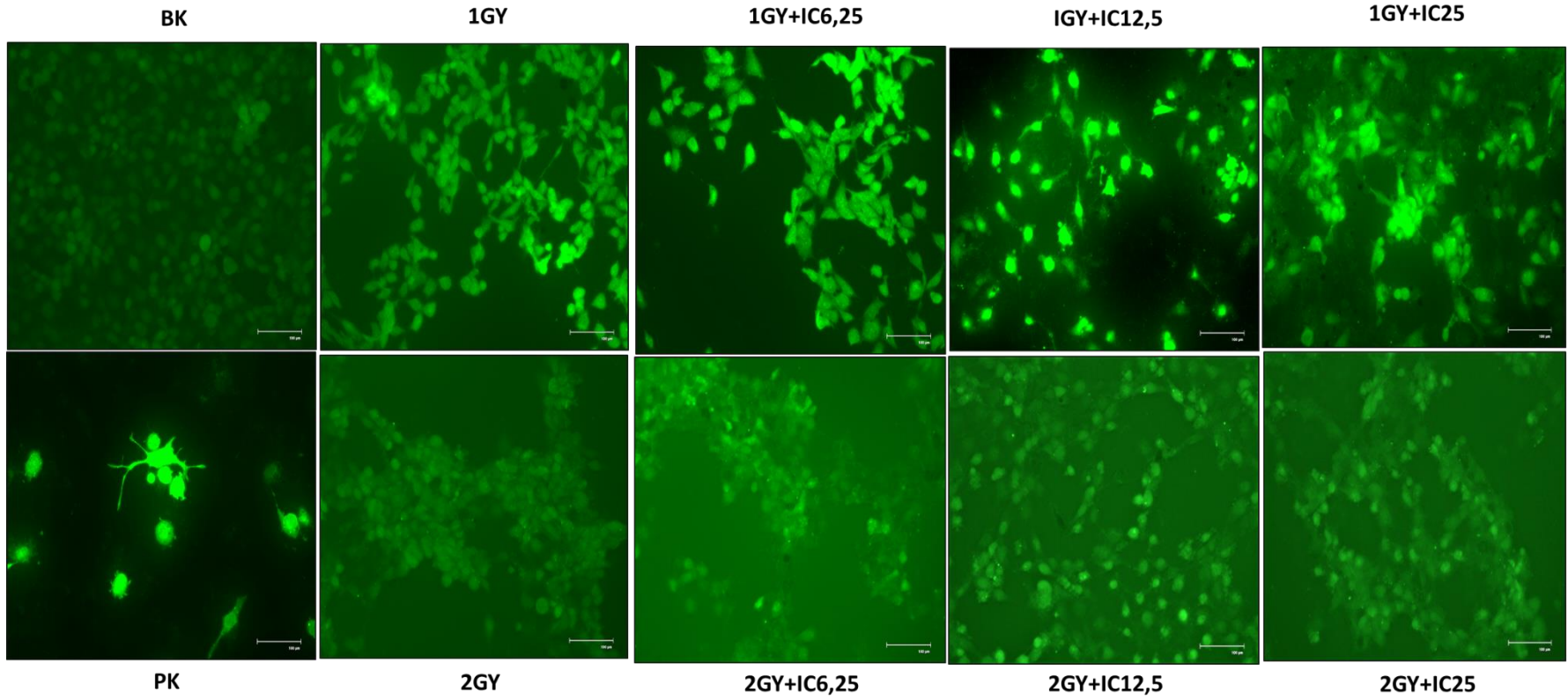
#### 4.14. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının ROS Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Nano alfa sepiyolit ve radyasyon birlikte kombine edildiğinde hücre içi ROS etkilerini tespit etmek için BEAS-2B hücreleri 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL), 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5 µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozları ile, A549 hücreleri ise 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL); 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 2gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozları ile 24 saat muamele edilmiştir. Her iki hücrenin ROS görüntülerinden ROS değerleri yüzdesi (%) hesaplanmış olup, Çizelge 4.10’da verilmiştir.

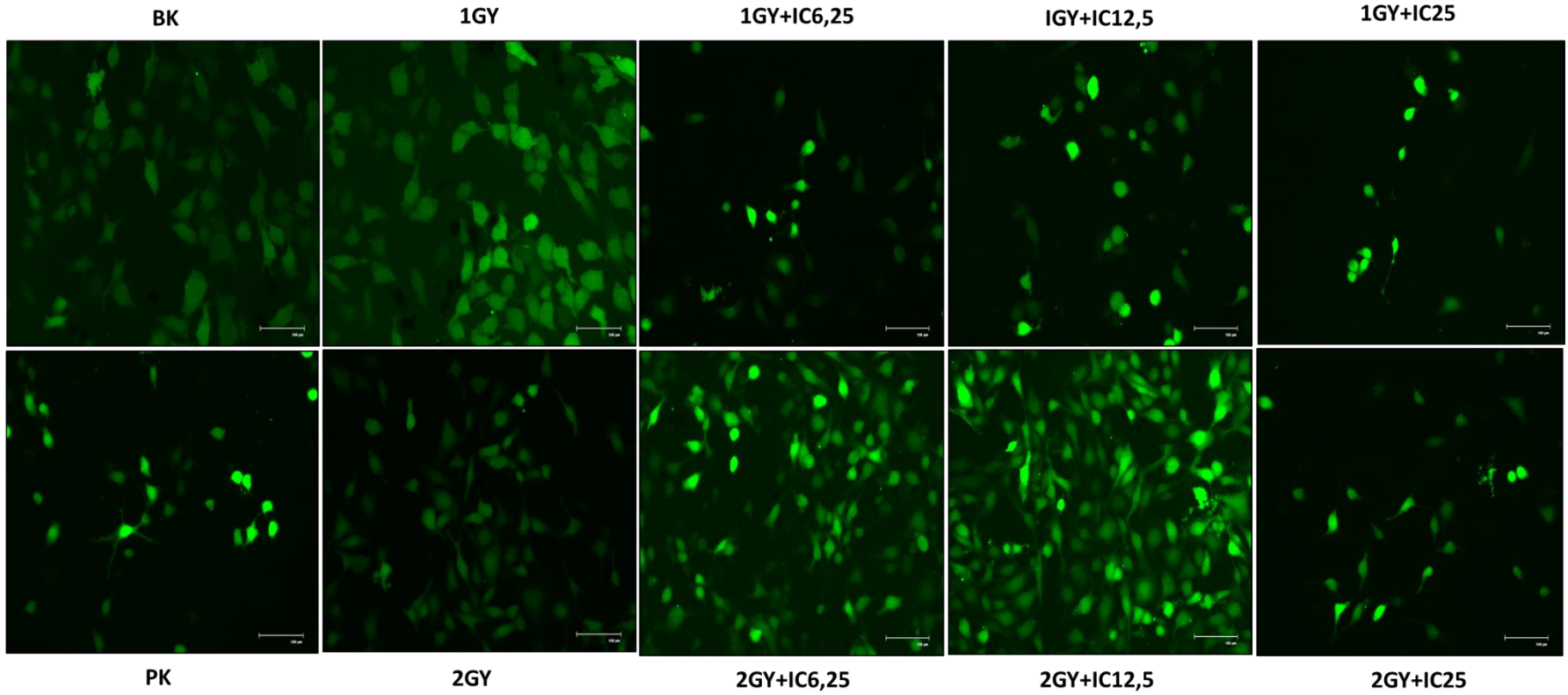
Ayrıca BEAS-2B hücrelerinden elde edilen görüntüler Şekil 4.39’de, A549 hücrelerinden elde edilen görüntüler Şekil 4.40’da verilmiştir. ROS değerlerinin istatistiksel analizi wilcoxon testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.10.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS değerleri yüzdesi ve standart sapma değerleri

	Dozlar					
	BK	1Gy	1Gy+IC <sub>6,25</sub>	1Gy+IC <sub>12,5</sub>	1Gy+IC <sub>25</sub>	PK
<b>BEAS-2B</b>	5,13±2,5	8,3±1,5	15±6,8	30,5±8,4	32,8±7,8	67,7±19,4
<b>A549</b>	15,5±8,5	11,7±7,1	20,2±10	33,8±8,3	41,9±16,8	79,4±15,2
	BK	2Gy	2Gy+IC <sub>6,25</sub>	2Gy+IC <sub>12,5</sub>	2Gy+IC <sub>25</sub>	PK
<b>BEAS-2B</b>	5,13±2,5	17±5,1	15,9±3,7	29±13	35±9,52	67,7±19,4
<b>A549</b>	15,5±8,5	27±8,6	35,4±9,9	42,5±6,4	66±15,4	79,4±15,2

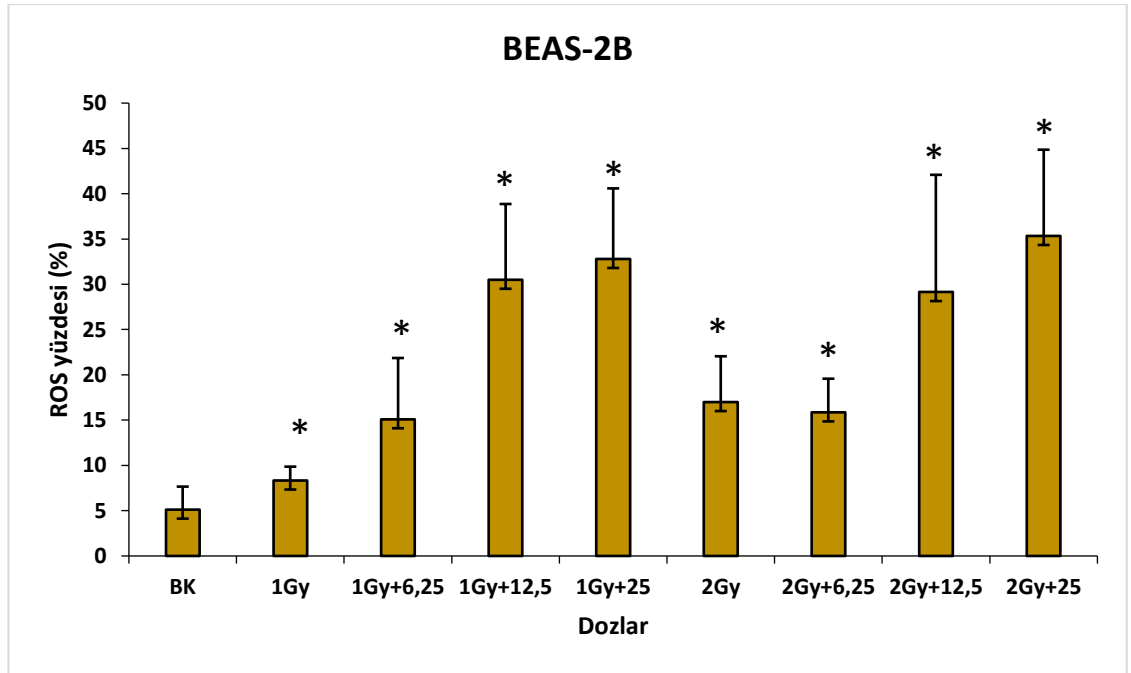


**Şekil 4.39.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerlerinin morfolojik görüntüsü



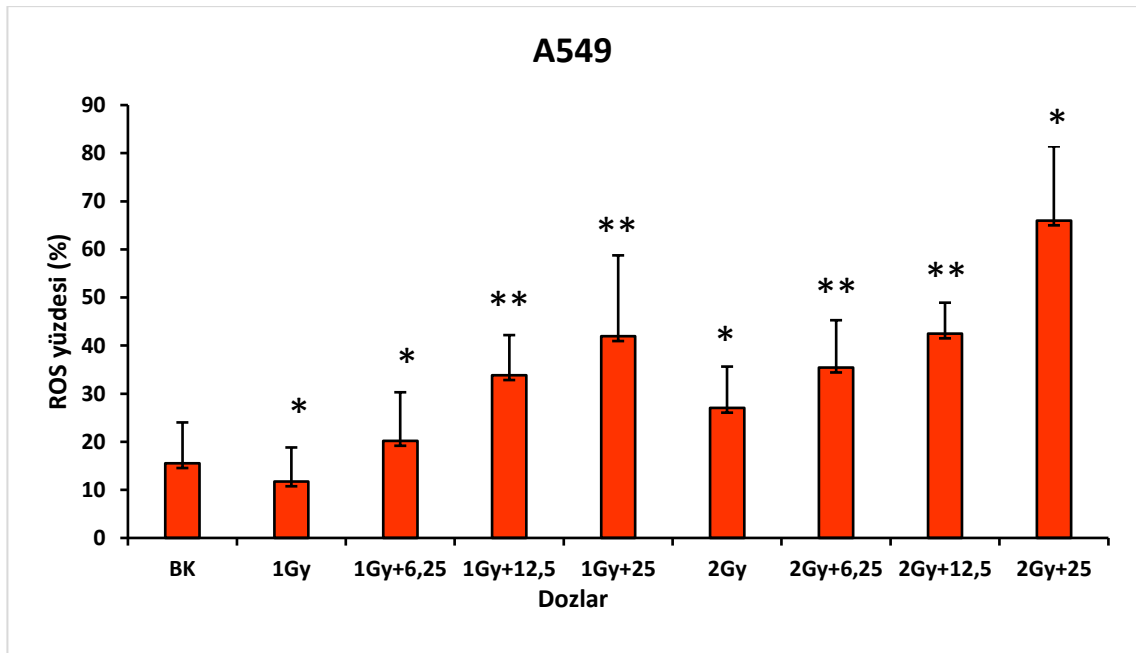
**Şekil 4.40.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerlerinin morfolojik görüntüsü

BEAS-2B hücrelerinde ortalama yüzdelerik ROS, kontrol grubunda  $5,125 \pm 2,5$  ve pozitif kontrol grubunda  $67,7 \pm 19$  olarak belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama yüzdelerik (%) ROS değerleri sırasıyla  $8,3 \pm 1,5$ ;  $15 \pm 6,8$ ;  $30,5 \pm 8,4$ ;  $32,8 \pm 7,8$ ;  $17 \pm 5,1$ ;  $15,9 \pm 3,7$ ;  $29 \pm 13$ ;  $35 \pm 9,52$  bulunmuş olup, Şekil 4.41’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelerik (%) ortalama ROS değerleri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 1Gy radyasyon dozunun yüzdelerik (%) ortalama ROS değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy radyasyon dozunun yüzdelerik (%) ortalama ROS değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+ IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.41.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS testi yüzdeleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde ortalama yüzdelik ROS, kontrol grubunda  $15,5 \pm 8,5$  ve pozitif kontrol grubunda  $79,4 \pm 15,2$  olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama yüzdelik (%) ROS değerleri sırasıyla  $11,7 \pm 7,1$ ;  $20,2 \pm 10$ ;  $33,8 \pm 8,3$ ;  $41,9 \pm 16,8$ ;  $27 \pm 8,6$ ;  $35,4 \pm 9,9$ ;  $42,5 \pm 6,4$ ;  $66 \pm 15,4$  bulunmuş olup, Şekil 4.42’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik (%) ortalama ROS değerleri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış veya azalış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 1Gy radyasyon dozunun yüzdelik (%) ortalama ROS değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> değeri ile kıyaslandığında dozun neden olduğu azalış ve 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy radyasyon dozunun yüzdelik (%) ortalama ROS değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.42.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen ROS testi yüzdeleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### **4.15. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Birlikte Uygulamalarının Komet Deneyi Sonuçları**

Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte etkilerini tespit etmek için BEAS-2B hücreleri 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL), 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozları ile, A549 hücreleri ise 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL); 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu in vitro komet testinde elde edilen bulgular içerisinde kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk % DNA (K.% DNA) miktarı ve olive kuyruk momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiş olup Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Komet değerlerinin istatistiksel analizi wilcoxon testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

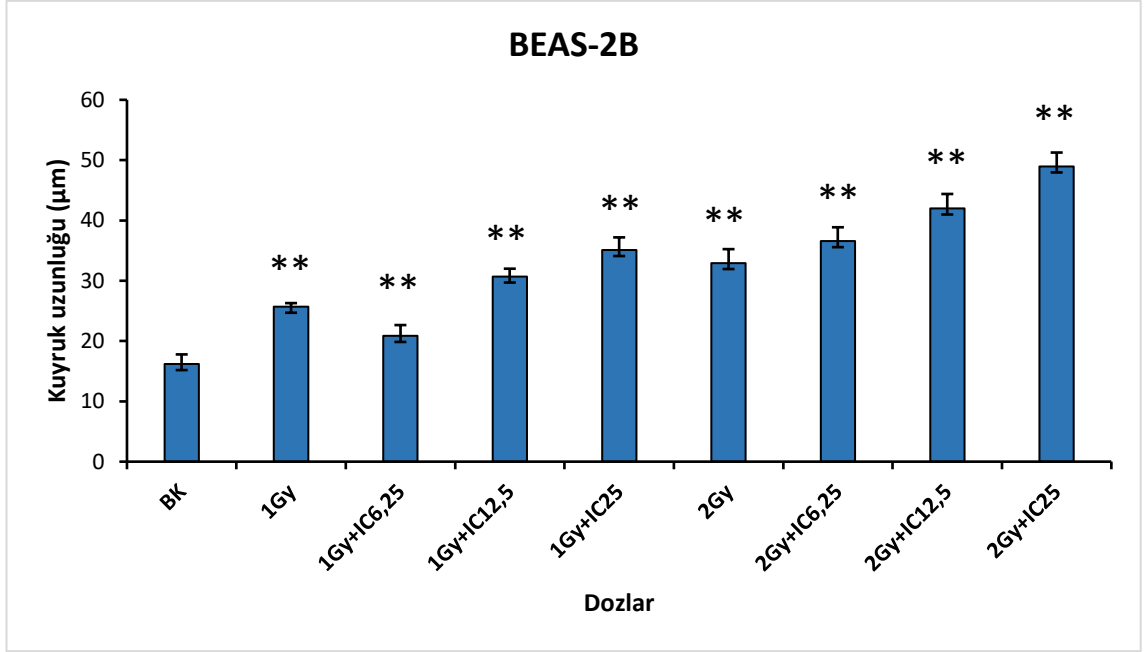
#### **4.16.1. Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte uygulamalarının kuyruk uzunluğu bulguları**

BEAS-2B hücrelerinde kuyruk uzunluğu, kontrol grubunda 16,2±1,6 µm, ve pozitif kontrol grubunda 43,6±3,2 µm olarak bulunmuştur. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla 25,7±1,8; 20,8±1,3; 30,7±2,1; 35,1±2,3; 33±2,3, 36,6±2,4, 42±2,3, 49±2,2 µm bulunmuş olup, Şekil 4.43’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün ortalama komet kuyruk uzunluğu değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05). 1Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk uzunluğu değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken (p>0,05), 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05). 2Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk uzunluğu değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken (p>0,05), 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



**Çizelge 4.11.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti ortalamaları ve standart hataları (S.H)

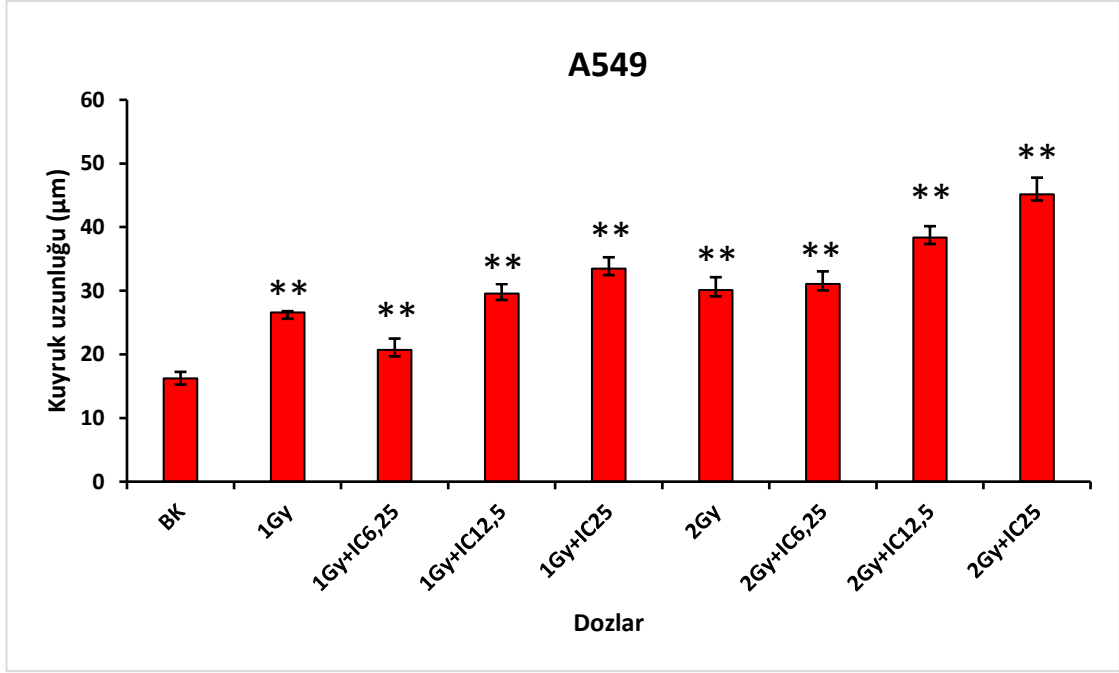
Hücre hattı	BEAS-2B			A549		
Dozlar	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S.H	Kuyruk % DNA miktarı $\pm$ S.H	Olive kuyruk Momenti $\pm$ S.H	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S.H	Kuyruk % DNA miktarı $\pm$ S.H	Olive kuyruk momenti $\pm$ S.H
<b>BK</b>	16,2 $\pm$ 1,6	16,8 $\pm$ 0,6	4,9 $\pm$ 0,8	16 $\pm$ 1	18,1 $\pm$ 1,2	3,94 $\pm$ 0,4
<b>1GY</b>	25,7 $\pm$ 1,8	22,5 $\pm$ 1,2	6,3 $\pm$ 0,6	26,6 $\pm$ 1,8	25 $\pm$ 1,7	7,3 $\pm$ 0,8
<b>1GY+IC<sub>6,25</sub></b>	20,8 $\pm$ 1,3	19,8 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,3	20,7 $\pm$ 1,5	22,3 $\pm$ 2	5,7 $\pm$ 0,8
<b>1GY+IC<sub>12,5</sub></b>	30,7 $\pm$ 2,1	26,8 $\pm$ 2	8,6 $\pm$ 0,9	29,5 $\pm$ 1,8	23,5 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 0,7
<b>1GY+IC<sub>25</sub></b>	35,1 $\pm$ 2,3	31 $\pm$ 2,1	11 $\pm$ 1,1	33,5 $\pm$ 2	28,2 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 0,7
<b>2GY</b>	33 $\pm$ 2,3	30,4 $\pm$ 2,3	10,3 $\pm$ 1,2	30 $\pm$ 2	28,8 $\pm$ 2,3	9,4 $\pm$ 1,1
<b>2GY+IC<sub>6,25</sub></b>	36,6 $\pm$ 2,4	30,8 $\pm$ 2,3	11,2 $\pm$ 1,1	31 $\pm$ 1,8	29,5 $\pm$ 1,8	9,1 $\pm$ 0,8
<b>2GY+IC<sub>12,5</sub></b>	42 $\pm$ 2,3	36,6 $\pm$ 2,2	13,3 $\pm$ 1,1	38 $\pm$ 2,6	35,1 $\pm$ 2,6	12,3 $\pm$ 1,2
<b>2GY+ IC<sub>25</sub></b>	49 $\pm$ 2,2	36,7 $\pm$ 2,2	15,2 $\pm$ 1,2	45 $\pm$ 2,7	34 $\pm$ 2	13,8 $\pm$ 1,1
<b>PK</b>	43,6 $\pm$ 3,2	36,9 $\pm$ 2,6	14,7 $\pm$ 1,5	58,3 $\pm$ 2,6	57,8 $\pm$ 2,3	22,2 $\pm$ 1,2



**Şekil 4.43.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde kuyruk uzunluğu, kontrol grubunda  $16 \pm 1 \mu\text{m}$ , ve pozitif kontrol grubunda  $58,3 \pm 2,6 \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $26,6 \pm 1,8$ ;  $20,7 \pm 1,5$ ;  $29,5 \pm 1,8$ ;  $33,5 \pm 2$ ;  $30 \pm 2$ ,  $31 \pm 1,8$ ,  $38 \pm 2,6$ ,  $45 \pm 2,7 \mu\text{m}$  bulunmuş olup Şekil 4.44'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün kuyruk uzunluğu değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).

1Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk uzunluğu değerleri ile 2Gy radyasyon dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk uzunluğu değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+ IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



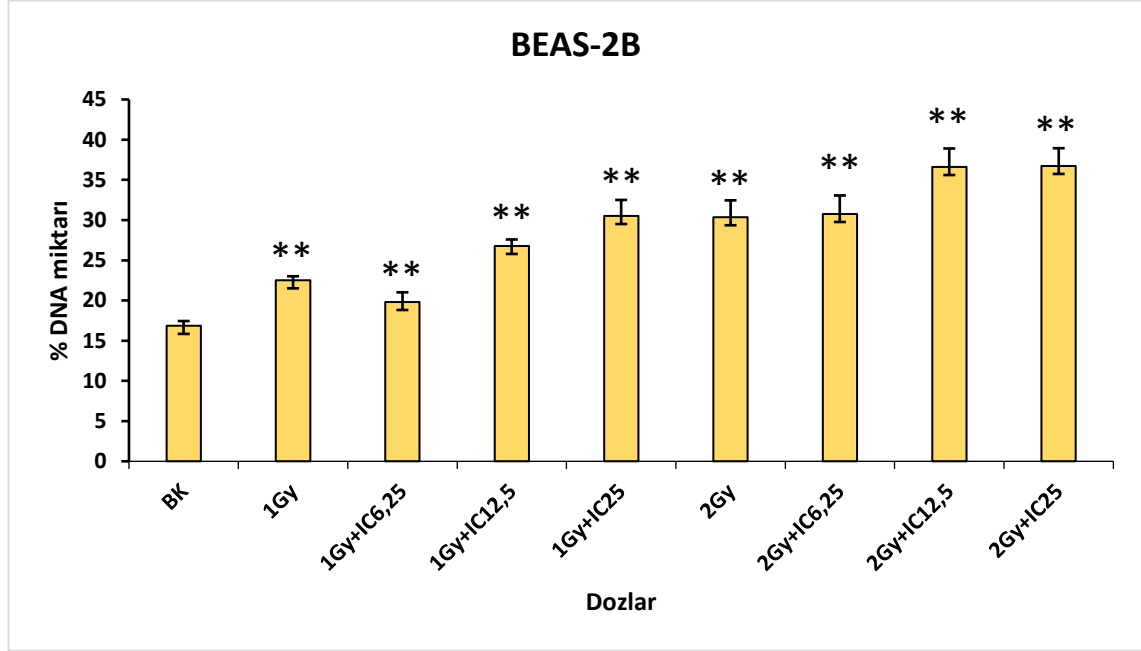
**Şekil 4.44.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

#### 4.16.2. Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte uygulamalarının kuyruk % DNA miktarları bulguları

BEAS-2B hücrelerinde kuyruk % DNA miktarı, kontrol grubunda  $16,8 \pm 0,6$  ve pozitif kontrol grubunda  $36,9 \pm 2,6$  olarak bulunmuştur. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri sırasıyla  $22,5 \pm 1,2$ ;  $19,8 \pm 0,8$ ;  $26,8 \pm 2$ ;  $31 \pm 2,1$ ;  $30,4 \pm 2,3$ ;  $30,8 \pm 2,3$ ;  $36,6 \pm 2,2$ ;  $36,72,2$  bulunmuş olup, Şekil 4.45’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün kuyruk % DNA miktarı ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).

1Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk uzunluğu değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> ve 1Gy+IC<sub>12,5</sub> dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). 2Gy radyasyon dozunun ortalama komet kuyruk

uzunluğu değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

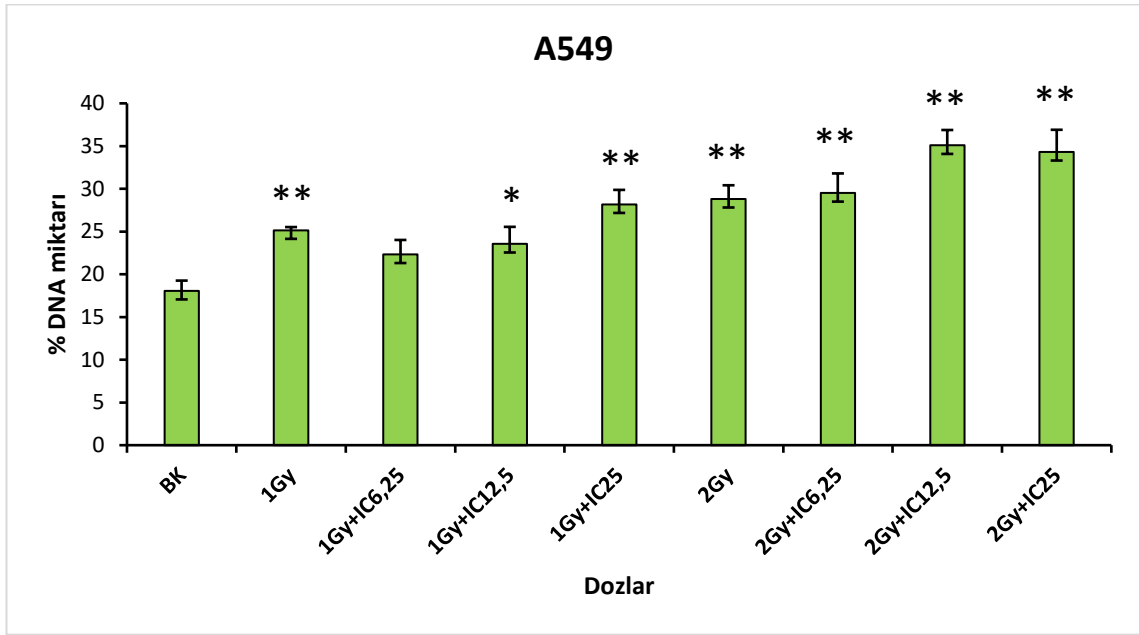


**Şekil 4.45.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p\leq 0,05$ , \*\* $p\leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde kuyruk % DNA miktarı, kontrol grubunda  $18,1\pm 1,2$ , ve pozitif kontrol grubunda  $57,8\pm 2,3$  olarak bulunmuştur. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri sırasıyla  $25\pm 1,7$ ;  $22,3\pm 2$ ;  $23,5\pm 1,7$ ;  $28,2\pm 1,6$ ;  $28,8\pm 2,3$ ,  $29,5\pm 1,8$ ,  $35,1\pm 2,6$ ;  $34\pm 2$  bulunmuş olup, Şekil 4.46'de gösterilmiştir.

Büyüme kontrolün kuyruk % DNA miktarı değeri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu azalış anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), diğer IC doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

1Gy radyasyon dozunun kuyruk % DNA miktarı değerleri ile 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy radyasyon dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub> ile kıyaslandığında dozun neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy radyasyon dozunun kuyruk % DNA miktarı değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).



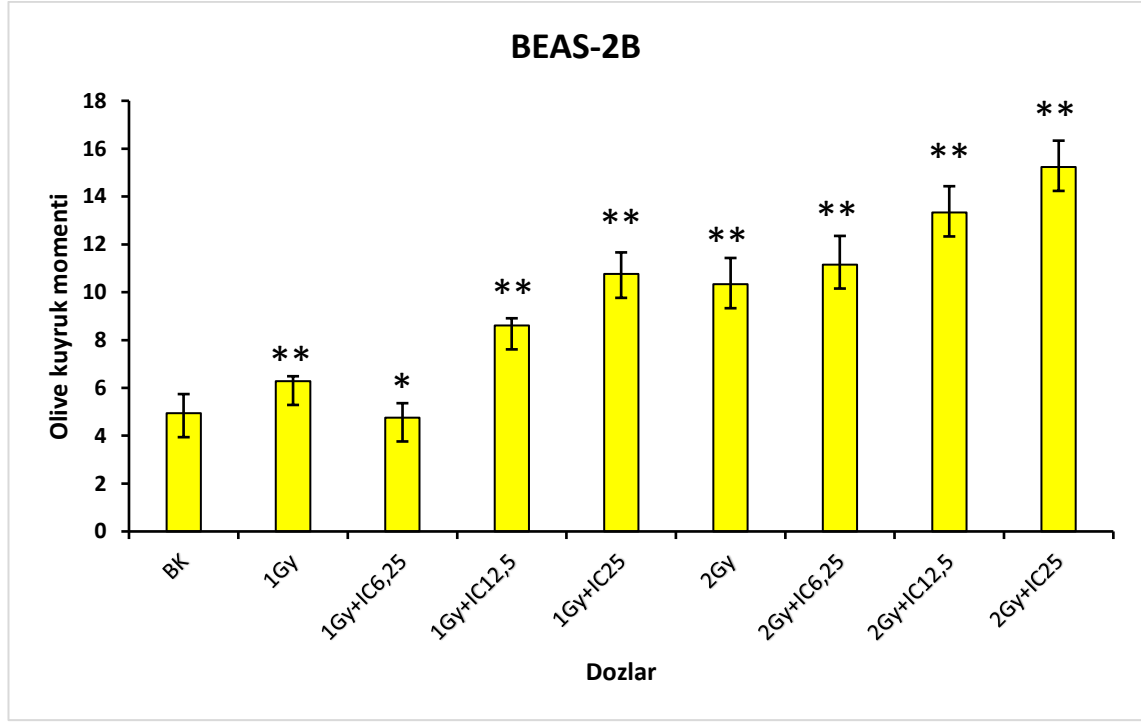
**Şekil 4.46.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA miktarı değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p\leq 0,05$ , \*\* $p\leq 0,01$ )

#### 4.16.3. Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte uygulamalarının olive kuyruk momenti bulguları

BEAS-2B hücrelerinde olive kuyruk momenti miktarı, kontrol grubunda  $4,9\pm 0,8$  ve pozitif kontrol grubunda  $14,7\pm 1,5$  olarak bulunmuştur. BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla  $6,3\pm 0,6$ ;  $4,8\pm 0,3$ ;  $8,6\pm 0,9$ ;  $11\pm 1,1$ ;  $10,3\pm 1,2$ ;  $11,2\pm 1,1$ ;  $13,3\pm 1,1$ ;  $15,2\pm 1,2$  bulunmuş olup, Şekil 4.47’de gösterilmiştir.

Büyüme kontrolün olive kuyruk momenti değeri ile IC doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş veya artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

1Gy radyasyon dozunun olive kuyruk momenti değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> ve 1Gy+IC<sub>12,5</sub> dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). 2Gy radyasyon dozunun olive kuyruk momenti değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

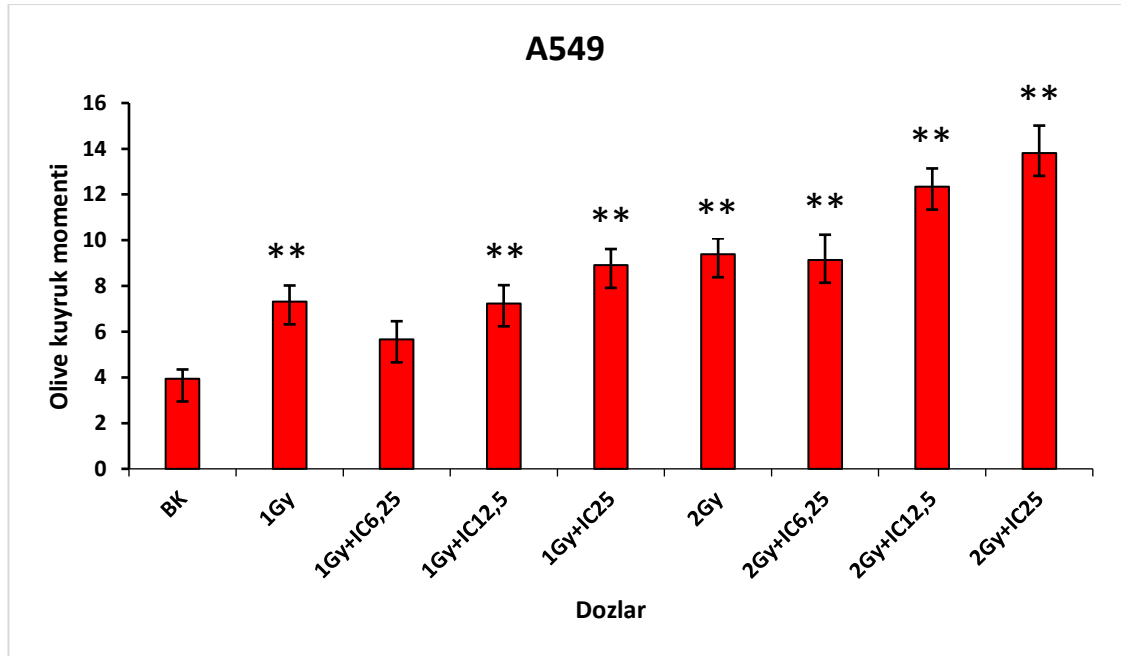


**Şekil 4.47.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

A549 hücrelerinde olive kuyruk momenti, kontrol grubunda  $3,94 \pm 0,4$  ve pozitif kontrol grubunda  $22,2 \pm 1,2$  olarak bulunmuştur. A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla  $7,3 \pm 0,8$ ;  $5,7 \pm 0,8$ ;  $7,2 \pm 0,7$ ;  $8,9 \pm 0,7$ ;  $9,4 \pm 1,1$ ;  $9,1 \pm 0,8$ ;  $12,3 \pm 1,2$ ;

13,8±1,1 bulunmuş olup Şekil 4.48’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün ortalama olive kuyruk momenti değeri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> dozun neden olduğu azalış anlamlı değilken (p>0,05), diğer IC doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,01).

1Gy radyasyon dozunun olive kuyruk momenti değerleri ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> dozun neden olduğu azalış anlamlı (p≤0,05), 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy radyasyon dozları arasındaki ilişki anlamlı değildir (p>0,05). 2Gy radyasyon dozunun olive kuyruk momenti değerleri ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub> dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değilken (p>0,05), 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



**Şekil 4.48.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen olive kuyruk momenti değerleri, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\*p≤0,05, \*\*p≤0,01)

#### 4.17. Nano Alfa Sepiyolit ve Radyasyonun Annexin-V Apoptoz Bulguları

Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte etkilerini tespit etmek için BEAS-2B hücreleri 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL), 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozları ile, A549 hücreleri ise 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL); 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapmaları (S.S) Çizelge 4.12’de verilmiştir.

BEAS-2B hücrelerinde büyüme kontrolün 1Gy,1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması, 1Gy dozunun 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy ve PK dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması, 2Gy dozunun 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması wilcoxon testi ile gerçekleştirilmiştir.

A549 hücrelerinde büyüme kontrolün 1Gy,1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması, 1Gy dozunun 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy ve PK dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması, 2Gy dozunun 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK dozları ile anlamlılık düzeylerinin karşılaştırılması wilcoxon testi ile gerçekleştirilmiştir.

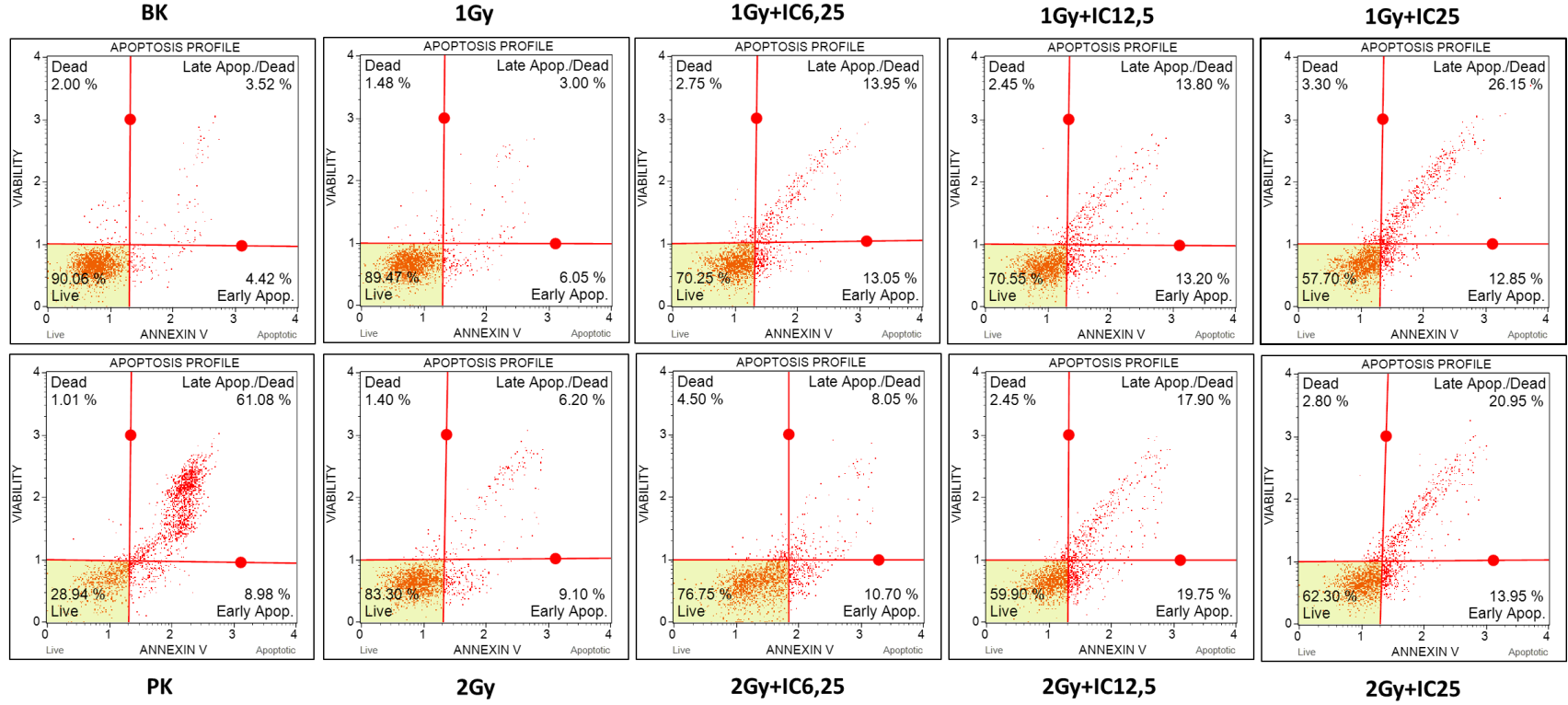
Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyon dozlarının 24 saatteki apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen örnek grafikler BEAS-2B için Şekil 4.49’da, A549 için Şekil 4.50’de gösterilmiştir.



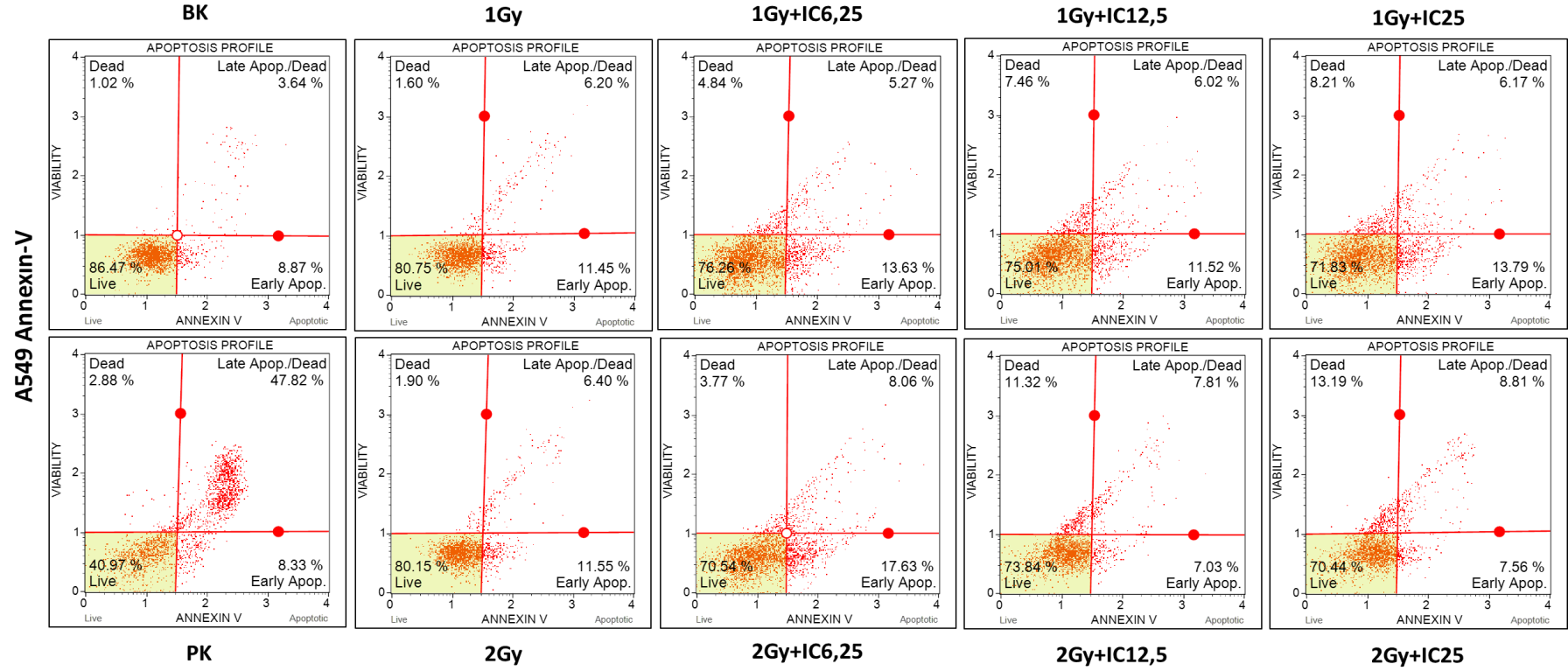
**Çizelge 4.12.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri

	BEAS-2B					A549				
	Canlı hücre±S.S	Erken Apoptotik Hücre±S.S	Geç Apoptotik Hücre±S.S	Toplam Apoptotik Hücre±S.S	Ölü Hücre±S.S	Canlı hücre±S.S	Erken Apoptotik Hücre±S.S	Geç Apoptotik Hücre±S.S	Toplam Apoptotik Hücre±S.S	Ölü Hücre±S.S
<b>BK</b>	88,7±2,46	3,1±1,3	3,4±0,6	6,8±1,6	3,5±3,7	85,4±3,5	10,4±2,6	2,9±1,3	13,7±3,2	0,8±0,7
<b>1GY</b>	84,8±7,8	7,3±1,9	3,2±1,3	10,5±1,7	4,7±6,7	80,6±2,9	13,6±4,7	3,7±2,3	17,7±3,7	2±2,2
<b>1GY+IC<sub>6,25</sub></b>	73±4,75	9,3±2,5	12,6±3,8	21,9±4,2	4,9±2,3	77,6±4	10,2±3,2	5,6±2,4	16,1±1,9	6,6±4,5
<b>1GY+IC<sub>12,5</sub></b>	68,4±1,74	10,6±1,8	14,3±0,5	24,9±1,4	6,7±2,7	72,6±5,96	13,3±4,1	6,6±2,5	19,7±6,9	7,3±2,8
<b>1GY+IC<sub>25</sub></b>	58,8±3,89	9,9±2,6	21,6±5,2	30,2±6,1	10,9±4,8	70,5±11,3	17,3±6,8	6,7±1,5	23±7,2	6,2±5
<b>2GY</b>	83,1±3,36	9,3±3,2	6±0,5	15,3±3,66	1,6±0,35	80,9±5,2	13,4±8,4	3,5±1,9	17,4±6,5	2,2±2,5
<b>2GY+IC<sub>6,25</sub></b>	71,3±3,4	11,8±1,9	11,9±2,5	23,7±3,9	5±2,5	75,2±4,9	15,8±3,8	5,9±2	21,7±4,8	3,3±2,7
<b>2GY+IC<sub>12,5</sub></b>	64,1±4,72	12,2±4,7	15,4±3,4	27,6±6,9	8,3±3,9	72,5±6,8	11,9±1,7	8,4±8,9	20,4±6,3	7,2±3,9
<b>2GY+ IC<sub>25</sub></b>	59,1±2,5	9,3±2,9	21,3±0,4	31,1±3	9,2±4,7	68,9±1,5	14,6±2,9	8,4±0,4	24,3±2,6	6,7±3,4
<b>PK</b>	41,6±2,2	5,7±4,3	49,6±17,4	57,1±20,8	1,3±0,9	62,9±9,3	23,5±1,9	21,8±18,2	35,9±9,6	1,7±1,2

BEAS-2B Annexin-V



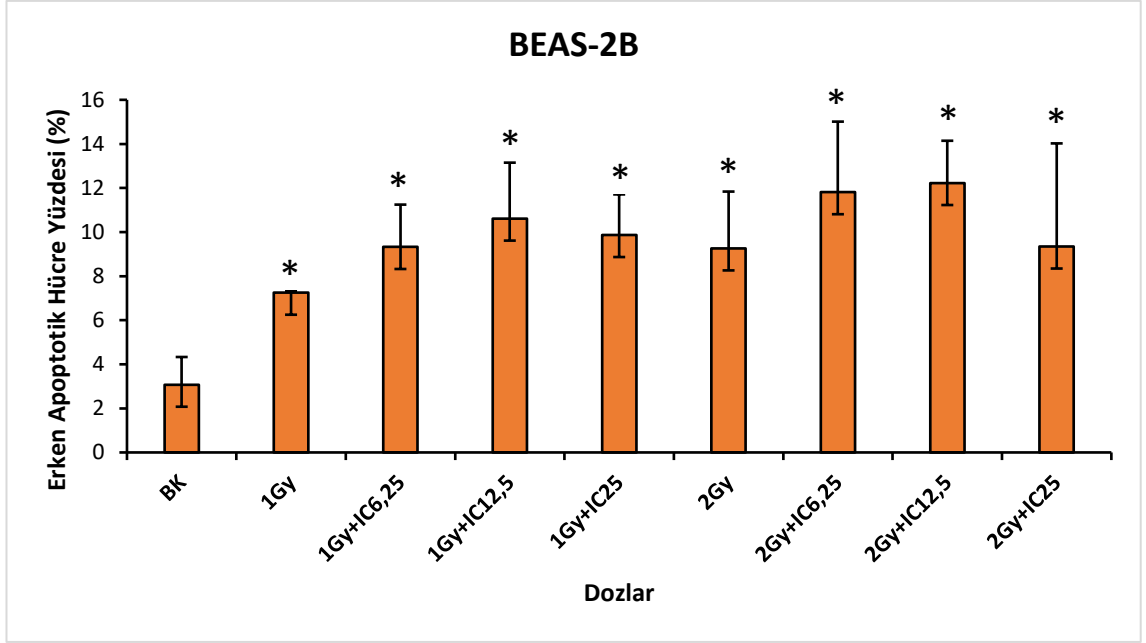
Şekil 4.49. BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi



**Şekil 4.50.** A549 hücrelerinde nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi

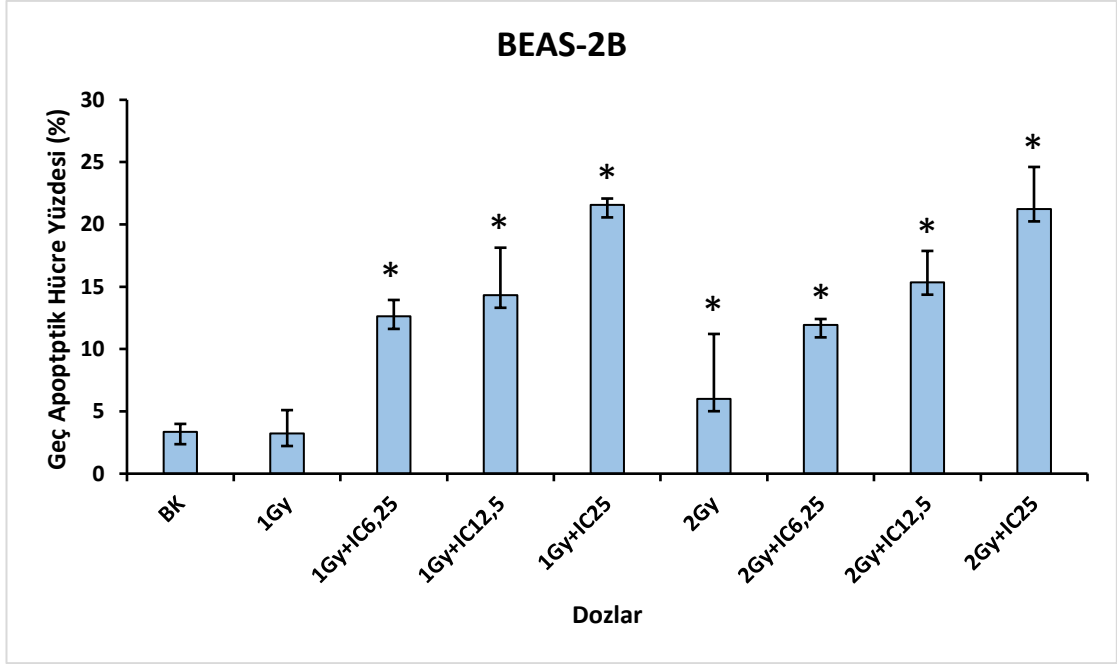
Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte etkilerini tespit etmek için BEAS-2B hücreleri 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> konsantrasyon grupları muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri hesaplanmıştır. Bu parametrelerden yaşayan hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 88,7±2,46; 84,8±7,8; 73±4,75; 68,4±1,74; 83,1±3,36; 71,3±3,4; 64,1±4,72; 59,1±2,5; 41,6±2,2 bulunmuştur. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 1Gy ile 2Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

Diğer parametre ise erken apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 3,1±1,3; 7,3±1,9; 9,3±2,5; 10,6±1,8; 9,9±2,6; 9,3±3,2; 11,8±1,9; 12,2±4,7; 9,3±2,9; 5,7±4,3 bulunmuş olup, Şekil 4.51'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile PK arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 1Gy ile PK arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



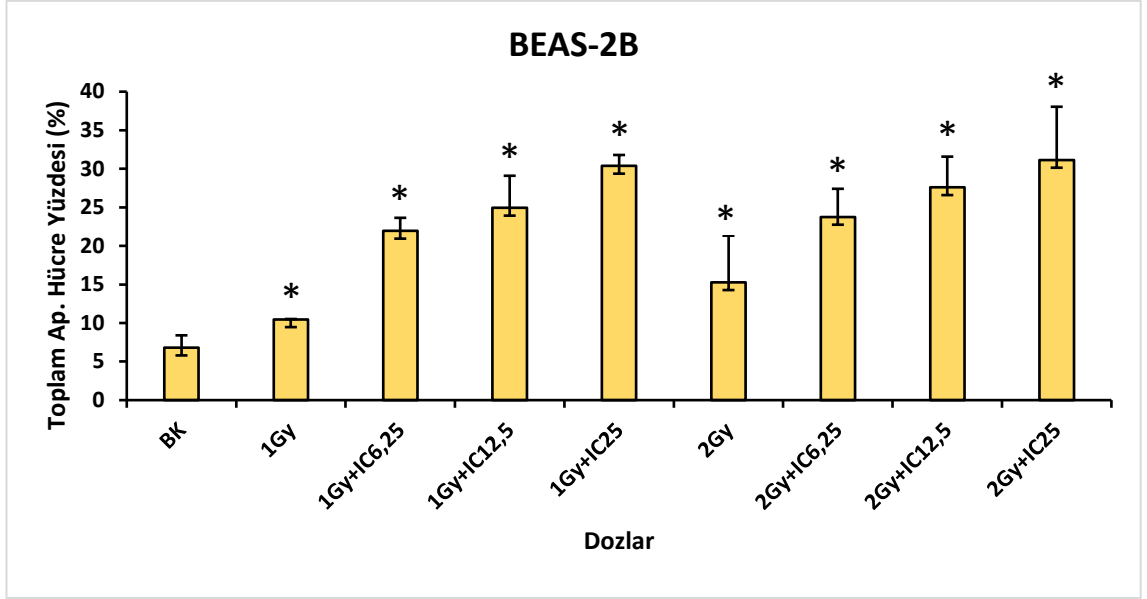
**Şekil 4.51.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Geç apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 3,4±0,6; 3,2±1,3; 12,6±3,8; 14,3±0,5; 21,6±5,2; 6±0,5; 11,9±2,5; 15,4±3,4; 21,3±0,4 ve 49,6±17,4 bulunmuş olup, Şekil 4.52’de gösterilmiştir. Büyüme kontrol ile 1Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.52.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Toplam apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 6,8±1,6; 10,5±1,7; 21,9±4,2; 24,9±1,4; 30,2±6,1; 15,3±3,66; 23,7±3,9; 27,6±6,9; 31,1±3 ve 57,1±20,8 bulunmuş olup, Şekil 4.53’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.53.** BEAS-2B hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Ölü hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 3,5±3,7; 4,7±6,7; 4,9±2,3; 6,7±2,7; 10,9±4,8; 1,6±0,35; 5±2,5; 8,3±3,9; 9,2±4,7 ve 1,3±0,9 bulunmuştur. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy ve PK doz değerleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). 2Gy ile PK doz değeri arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

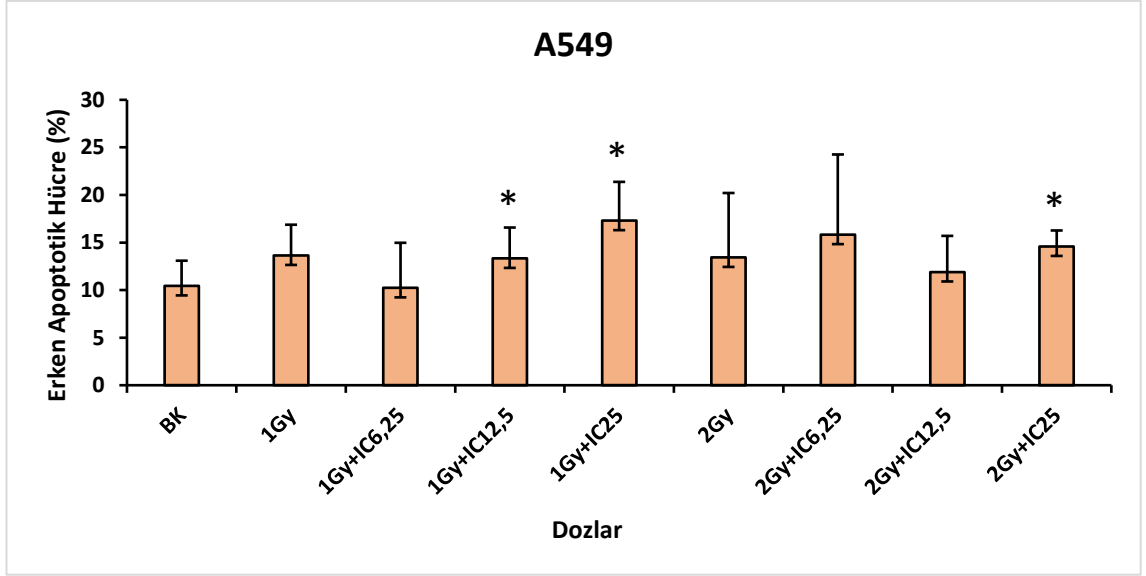
Nano alfa sepiyolit ve radyasyonun birlikte etkilerini tespit etmek için A549 hücreleri 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> konsantrasyon grupları muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri hesaplanmıştır. Bu parametrelerden yaşayan hücre yüzdesi BK, 1Gy,1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 85,4±3,5; 80,6±2,9; 77,6±4; 72,6±5,96; 70,5±11,3; 80,9±5,2; 75,2±4,9; 72,5±6,8; 62,9±9,3 bulunmuştur. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy ve 2Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub> ve 2Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

Diğer parametre ise erken apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy,1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 3,1±1,3; 7,3±1,9; 9,3±2,5; 10,6±1,8; 9,9±2,6; 9,3±3,2; 11,8±1,9; 12,2±4,7; 9,3±2,9; 5,7±4,3 bulunmuş olup, Şekil 4.54'de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy,1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub> dozları arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ).

1Gy ile 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub> ile kıyaslandığında dozların neden olduğu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

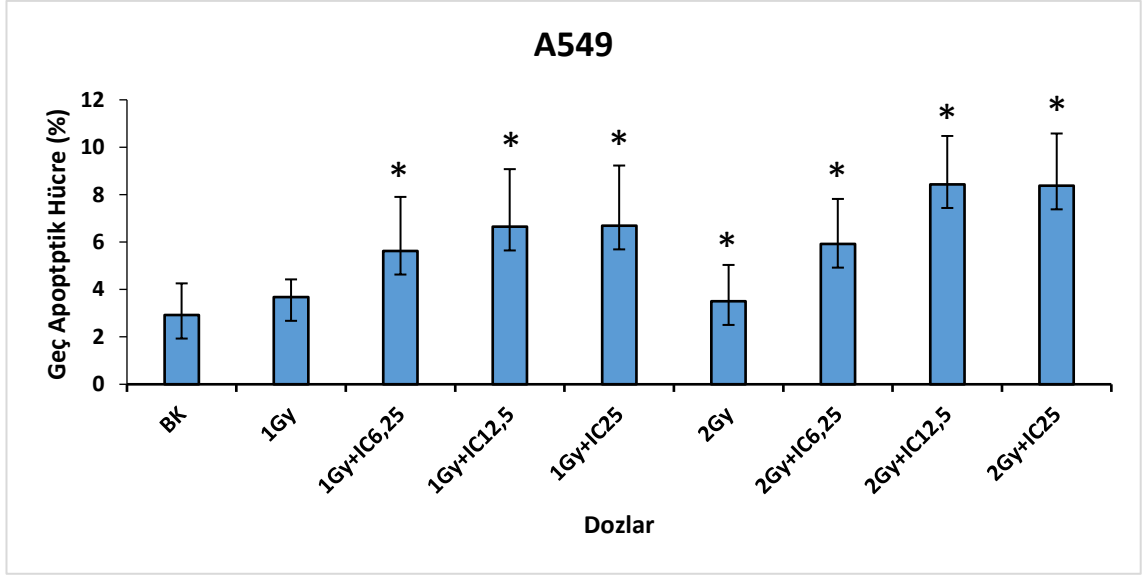




**Şekil 4.54.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen erken apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Geç apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre  $2,9 \pm 1,3$ ;  $3,7 \pm 2,3$ ;  $5,6 \pm 2,4$ ;  $6,6 \pm 2,5$ ;  $6,7 \pm 1,5$ ;  $3,5 \pm 1,9$ ;  $5,9 \pm 2$ ;  $8,4 \pm 8,9$ ;  $8,4 \pm 0,4$ ;  $21,8 \pm 18,2$  bulunmuş olup, Şekil 4.55’de gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub>, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub> ve 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

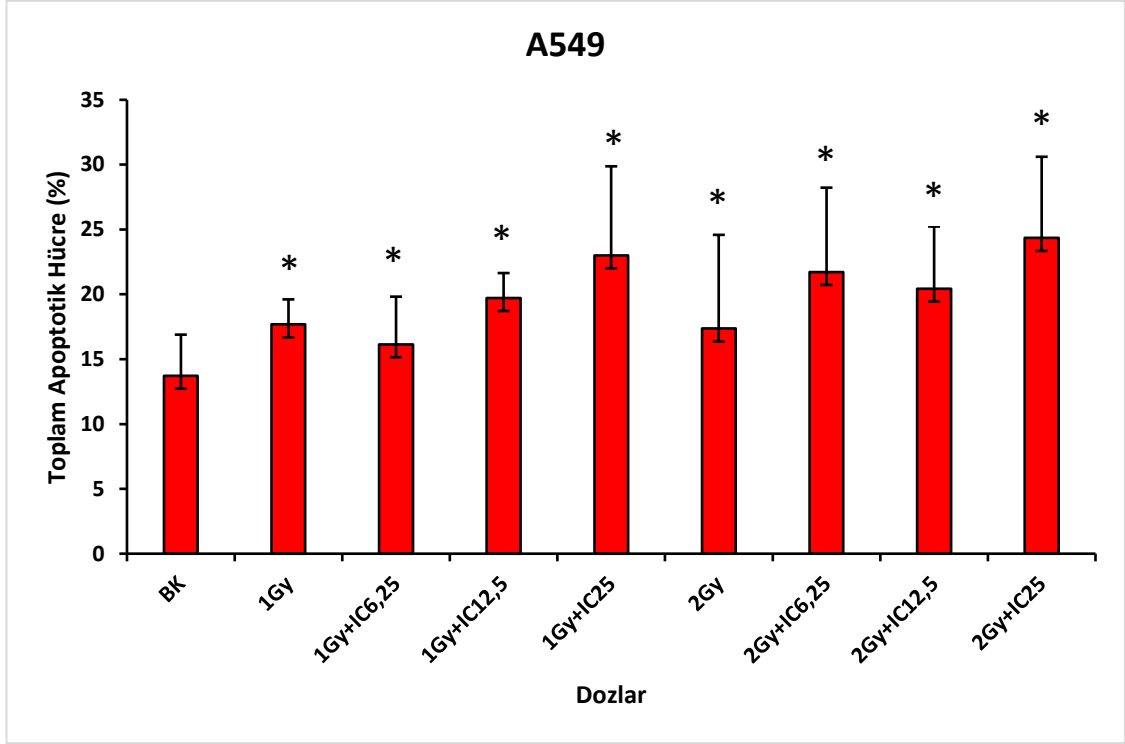
1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.55.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen geç apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Toplam apoptotik hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre 13,7±3,2; 17,7±3,7; 16,1±1,9; 19,7±6,9; 23±7,2; 17,4±6,5; 21,7±4,8; 20,4±6,3; 24,3±2,6 ve 35,9±9,6 bulunmuş olup, Şekil 4.56'da gösterilmiştir. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy doz değerleri ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.56.** A549 hücrelerinin nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu elde edilen toplam apoptotik hücre yüzdesi, büyüme kontrol ile çeşitli konsantrasyon grupları arasındaki anlamlılık düzeyinin wilcoxon testi ile karşılaştırılması (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

Ölü hücre yüzdesi BK, 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> ve PK konsantrasyonlarda verilen sıraya göre  $0,8 \pm 0,7$ ;  $2 \pm 2,2$ ;  $6,6 \pm 4,5$ ;  $7,3 \pm 2,8$ ;  $6,2 \pm 5$ ;  $3,3 \pm 2,7$ ;  $7,2 \pm 3,9$ ;  $6,7 \pm 3,4$ ;  $9,2 \pm 4,7$  ve  $1,7 \pm 1,2$  bulunmuştur. Büyüme kontrolün yüzdelik değerleri ile 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub> arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

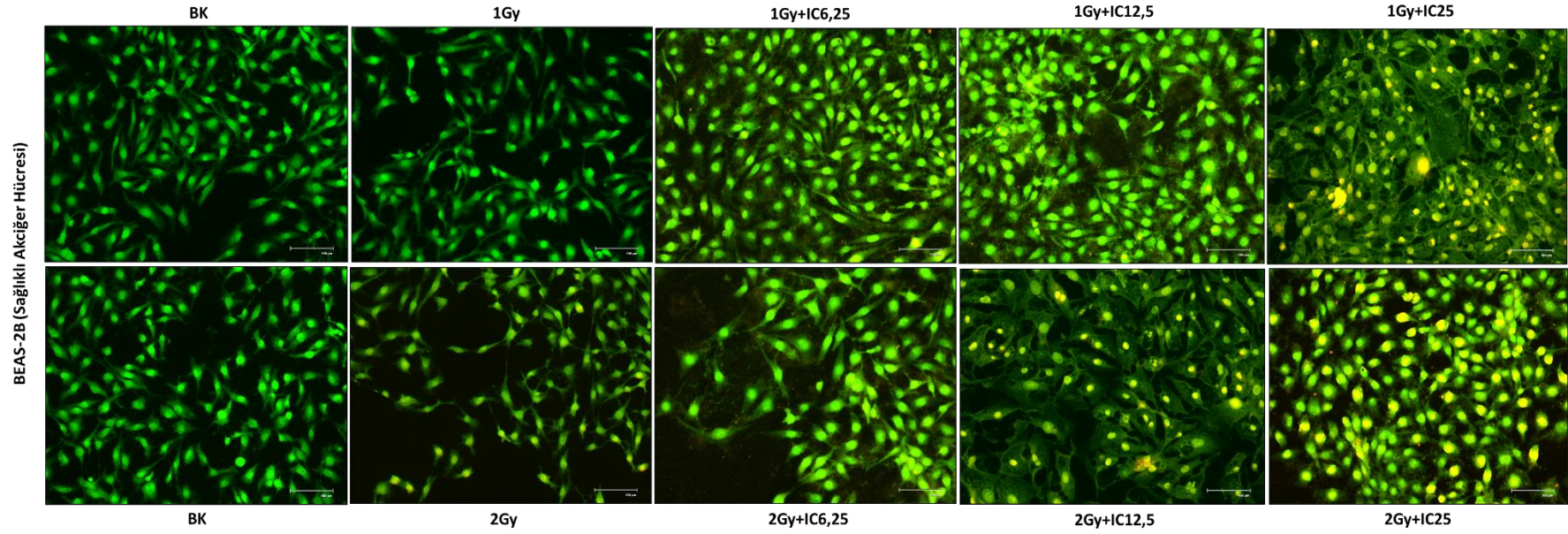
1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>, 1Gy+IC<sub>12,5</sub>, 1G+IC<sub>25</sub>, 2Gy ve PK doz değerleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ), 2Gy ile PK doz değeri arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), 2Gy+IC<sub>6,25</sub>, 2Gy+IC<sub>12,5</sub>, 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile kıyaslandığında dozların neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.11. Nano Alfa Sepiyolit ile Birlikte Radyasyonun Hücre Morfolojisindeki Neden Olduğu Değişikliklerin Görüntülenmesi**

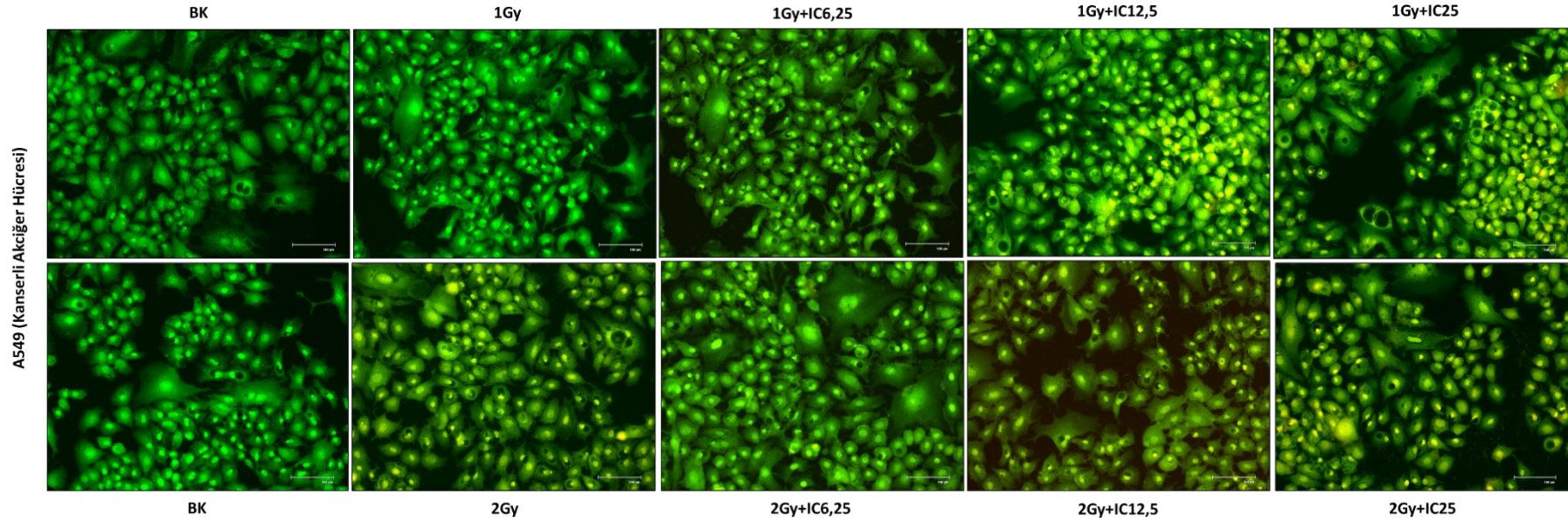
24 saat boyunca nano alfa sepiyolit ve radyasyonun çeşitli konsantrasyon gruplarına maruz bırakılan BEAS-2B ve A549 hücrelerinde morfolojik değişimler ikili boyama yöntemi (akridin orange ve etidyum bromür) ile belirlenmiştir. İkili boyama yöntemi sonucunda BEAS-2B hücrelerinde elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.57’de gösterilmiştir. A549 hücrelerinde ise ikili boyama yöntemi elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.58’de gösterilmiştir.

BEAS-2B hücrelerinde kontrol grubunda bulunan hücrelerin renklerinin yeşil olduğu görülmektedir. Ancak nano alfa sepiyolit ve radyasyonun artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin genel morfolojik yapısı incelendiğinde yeşil renklenmelerin yerini açık yeşil ve sarı renkli hücrelerin aldığı gözlenmiştir.

A549 hücrelerinde ise kontrol grubunda bulunan hücrelerin renklerinin yeşil olduğu görülmektedir. Ancak nano alfa sepiyolit ve radyasyonun artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin genel morfolojik yapısı incelendiğinde yeşil renklenmelerin yerini açık yeşil ve sarı renkli hücrelerin aldığı gözlenmiştir. A549 hücrelerinin renk görüntüleri ile BEAS-2B hücrelerinin görüntüleri arasında paralellik olduğu gözlenmiştir. Açık yeşilli hücreler erken apoptoza işaret ederken sarı renkli hücreler ise geç apoptozu işaret etmektedir. Ayrıca her iki hücrede artan doz konsantrasyonu ile birlikte hücrelerin genel morfolojik yapısının bozulduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.57.** Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun BEAS-2B hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.



**Şekil 4.58.** Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun A549 hücrelerindeki morfolojik değişimlerinin ikili boyama yöntemi ile görüntülenmesi.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sepiyolitın doğada bulunan iki formundan biri olan alfa sepiyolit, halk arasında bilinen adıyla lületaşı, çoğunlukla süs eşyası ve dekoratif oyma yapımında kullanılmaktadır. Ülkemizde bol miktarda alfa sepiyolit olmasına rağmen bu maddeye gereken bilimsel önem verilmemiştir. Son yıllarda sepiyolit kil minerallerinin başta nano biyomedikal çalışmalar olmak üzere birçok alanda kullanım potansiyeline sahip olduğunun gösterilmeye başlanması ile birlikte, bu maddeye olan bilimsel ilgi artmıştır.

Sepiyolit sahip olduğu kristal yapı ve dokusal özellikleri ile eşsiz özellikler sergilemektedir (Singer 1984, Galan 1996). Bu özelliklerinden dolayı ilaçların yavaş salınımında (Andronescu ve ark. 2006), eczacılıkta ilaçların bozulmasının önlenmesinde, ağır metallerin absorpsiyonunda (Slamova ve ark. 2011), ilaç sektöründe dolgu malzemesi (Yılmaz 2007), boyalarda, ilaçlarda, farmasötiklerde kalınlaştırıcı ve çökme önleyici olarak kullanılması (Alvarez 1984, Clarke 1989) ve nanokompozitlerin geliştirilmesi için katkı maddeleri (Xie ve ark. 2007) olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.

Bunlar ile birlikte sepiyolitın içerisinde yer aldığı nanokiller, kanser tedavisinde ilaçlar ile kombinasyon halinde (Zarkoviç ve ark. 2001), kanser sonrası tedavide adjuvan olarak (Paveli'c ve ark. 2001), kemik dokusu mühendisliğinde (Ambre ve ark. 2013), nano boyutlu immünosensörler üretiminde (Feng ve ark. 2013), diş yapıştırıcılarında (Solhi ve ark. 2012), yara örtülerinde, ilaç taşıyıcı nano araçlarda (Wicklein ve ark. 2010, Wicklein ve ark. 2011) kullanılmaktadır. Bu killerin nano yapılarının fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca doğal bir nano yapı olmasından dolayı son yıllarda artan ilgi bu killerin nano yapıları üzerine yoğunlaşmıştır.

Doğal olarak sepiyolitın içerisinde bulunan nano liflerin eşsiz özellikleri nedeniyle gelecekte birçok kullanım alanına aday nano malzemeler olacağı gözüyle bakılmaktadır. Ancak sepiyolit mineralinin genellikle mikro ve mikro yapılarından elde edilen nanoyapıları ile ilgili biyoyumluluk çalışmaları yetersizdir. Bu konuyla ilgili IARC, in vitro ve in vivo sepiyolit çalışmaların az sayıda olduğunu, bu çalışmalar ile yapılan değerlendirmede lif uzunluğunun ve kristal yapısının toksitede etkili

olduğunu raporlamıştır (Anonim 1997). EFSA tarafından yapılan değerlendirmede ise sepiyolitın parenteral yollardan (soluma, intrapleural ve intraperitoneal) potansiyel olarak kanserojen olduğuna dair sınırlı kanıtlar var olduğunu ve aynı uygulama yolunu kullanmayan bir dizi çalışmada kanserojen etki, test edilen sepiyolit numunelerinin jeolojik kökenine göre değişmiş olduğunu raporlamıştır (Anonim 2013). Bu nedenle sepiyolitın potansiyel karsinogenik, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin daha kapsamlı olarak araştırılmasını zorunlu hale gelmiş olduğu bildirilmiştir (Anonim 2013, Stockmann-Juvala ve ark. 2014). Özellikle ham sepiyolit ile yapılan biyoyumluluk testleri yeterli görünmezken, nano ölçekteki sepiyolitın olası etkileri hakkındaki veriler son derece sınırlı olmakla birlikte nano alfa sepiyolit ile yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca hem ham sepiyolit hemde nano sepiyolit ile ilgili yapılan çalışmalarda sepiyolitın karakterini ortaya koyacak karakterizasyon işlemlerinin tam yapılmadığı veya eksik yapıldığı görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan alfa sepiyolit ile ilgili köken, bileşim, saflık oranı, ağır metal bulundurma bulundurmaması ilk aşamada göz önünde bulundurulacak kriterler olmuştur. İkinci aşamada mikro sepiyolitten nano lif üretiminin gerçekleştirilmesi, elde edilen alfa sepiyolit liflerinin karakterize edilmesi, bu liflerin kullanılan hücre hatlarının içerisine girip girmediğinin tespit edilmesi işlemleri olmuştur. Üçüncü aşamada üretilen nano alfa sepiyolitın biyolojik uyumluluklarının test edilmesi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise radyasyon ile birlikte nano alfa sepiyolitın radyobiyolojik etkileri araştırılmış olup tüm bu başlıklar aşağıda tartışılmıştır.

Çalışmada kullanılan alfa sepiyolit Alpu ilçesinin Türkmentokat ve Karatepe köyleri arasındaki Sarısu bölgesinden temin edilmiş olup, bu lületaşı yatakları sahasının en önemli ve en kaliteli hakiki lületaşlarının çıkarıldığı bölge olduğu bildirilmiştir (Ece ve Çoban, 1994). Yapılan XRD çalışması sonucunda ise alfa sepiyolit mineralinin % 90 saflıkta sepiyolit minerali olduğu görülmüştür (bkz. Çizelge 4.1). Ayrıca bu mineralin bileşiklerin içerisinde ağır metaller içermediği tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.2). Sabah (1999) ve Can (2008) yüksek kaliteli sepiyolitın yüksek oranlarda SiO<sub>2</sub> ve MgO içerirken, düşük oranlarda ise CaO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bileşiklerini içerdiğini bildirmişlerdir.



Deneyde kullanılan alfa sepiyolit % 51,8 SiO<sub>2</sub>, % 25,9 MgO bileşiklerini yüksek miktarda içerirken, düşük miktarda % 0,746 CaO, % 0,0994 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve % 0,475 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bileşiklerini içerdiği görülmüştür (bkz. Çizelge 4.2). Bu nedenle deneyde kullanılan alfa sepiyolit yüksek kalite ve saflıkta bir sepiyolit formu olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada kullanılan alfa sepiyolit yüksek kalitede ve saflıkta olduğu belirlendikten sonraki aşamada alfa sepiyolit nano liflerine ayrılması işlemine geçilmiştir. Sepiyolit doğada kendini oluşturan liflerin bir araya gelmesiyle kalıp şeklinde büyük kütleler halinde bulunmakta olduğu bilinmektedir. Bu sepiyolit kütlelerinin en küçük yapısının nano yapıda birbirine sıkıca bağlanmış sayısız lif demetlerinden oluşmuş olduğu bildirilmiştir (Sabah 1999, Can 2008, Avunduk 2011) Ancak sepiyolit fiber yapılı demetlerin yüzeyindeki silanol grupları arasındaki Van der Waals kuvveti ve hidrojen bağları ile birbirine çok güçlü bir şekilde tutunduğu için (Can 2008), fiberlerin birbirlerinden ayrılması kolay olmamaktadır. Bu nedenle sepiyoliti oluşturan liflerin birbirinden ayrılması için birçok yöntem denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerden solvotermal ile yüksek basınç altında liflerin ayrılması kimyasal yolla gerçekleştirilmiştir (Zhang ve ark. 2005, Darvishi ve Morsali 2010). Diğer bir çalışmada mekanik dağıtıcı ile sepiyolit liflerinin dispersiyonu gerçekleştirilmiş olup çeşitli boylarda nano lifler elde edilmiştir (Can ve Çelik 2010). Ayrıca düşük sürelerde sonikasyon işlemi ile liflerin serbestleşme işlemi (Toledo-Magana ve ark. 2015), %37'lik HCl asit çözeltisinin çeşitli pH'ları ile (Hassan ve ark 2015) ve 10mM Tris-HCl asit çözeltisinde sonike edilmesi veya vorteks karıştırıcı (Castro-Smirnov ve ark 2016) kullanılarak sepiyolitten nano lifler elde edilmeye çalışılmıştır. Tüm bu çalışmalarda bazı tabakalı sanayi sepiyoliti ( $\beta$ -sepiyolit) tipleri suda dağılma özellikleri (Sabah ve Çelik, 1999) gösterdiği için liflerine ayrılması kolay olduğu görünmüş olmasına rağmen, tüm sepiyolit çeşitlerinde bu uygulamaların gerçekleştirilmesi zor olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.3, Şekil 4.4) Özellikle alfa sepiyolit türlerinin yataklanmalarının farklılık göstermesi ve oluşumlarının farklı olması (Brauner ve Preisinger 1956, İrkeç 1991) nedeniyle kendine ait fiziksel ve kimyasal özellikler gösterebilmekte olup, su içerisinde dağılma özelliği göstermediği bildirilmiştir (Sabah 1998).

Nano lif üretimi yöntem çalışmalarında şimdiye kadar alfa sepiyolit nano liflerine ayrıldığını gösteren bir çalışma ile karşılaşmamıştır. Bu nedenle bu çalışmamızda alfa sepiyolit nanoliflerine ayrılması için yukarıda bahsedilen çeşitli çalışmalar denenmiştir. Tüm bu çalışmalar sonucunda farklı oluşum şekillerine sahip alfa sepiyolit serbest liflerine ayrılması için atritör değirmende kuru ve yaş öğütme, ZrO<sub>2</sub> bilyalı değirmende öğütme, blender yardımı ile mekanik öğütme, 10mM Tris-HCl asitte mekanik öğütme, manyetik karıştırıcı, çeşitli filtrasyon işlemleri ve çok az sürede sonike edilmesi ile alfa sepiyolit liflerine ayrılmayacağı görülmüştür (bkz. Şekil 4.3, Şekil 4.4). Bu işlemlerde çok az alfa sepiyolit serbestleştiği görülmüş olmasına rağmen tüm alfa sepiyolit liflerinin demetler halinde birbirine tutunduğu görülmüştür.

Can (2008) tarafından sepiyolit fiberlerinin ancak mekanik yöntemlerle disperse edilmesi ile iyi sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir ve nanoyapıların topaklaşmasını önlemek için sonike edildiği, daha küçük nano yapılar elde etmek için sonike cihazları kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmamızda suda ses dalgaları ile birlikte güçlü bir dağıtıcı olan sonikatör cihazının kullanılması ideal bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde alfa sepiyolit liflerinin tamamen birbirinden ayrılması için yüksek sürelerde ve bazı çözelti konsantrasyonlarında sonike edilmesi ile serbestleşmiş liflerin elde edilebildiği görülmüştür (bkz. Şekil 4.5). Nano alfa sepiyolit elde edilmesi için 5,12 mg/ml suda hazırlanan alfa sepiyolit solüsyonunun doygunluk noktasına ulaştığı görülmüştür. Bu süspansiyon üzerinde alfa sepiyolit liflerinin elde edilmesinin zor olduğu anlaşılmakta olup, ideal solüsyonun 5,12 mg/ml altındaki çözeltilerde 1 saat sonikasyon yapılması ile serbestleşmiş liflerin elde edilebileceği görülmüştür (bkz. Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Elde edilen nano alfa sepiyolit lif boyutları SEM cihazı ile yapılan analizlerde lif uzunlukları  $569,6 \pm 278$  nm, çapı  $72 \pm 27,3$  nm olarak, TEM cihazı ile yapılan analizlerde ise lif uzunlukları  $425,9 \pm 170,5$  nm, çapı  $35 \pm 11,8$  nm olarak bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.4). Bu çalışmada elde edilen liflerin çapının 100 nm'nin altında olduğu, bu nedenle Borm ve ark. (2006) tarafından belirtildiği gibi en az bir boyutunun 1-100 nm arasında olan yapılarından olduğu için nano alfa sepiyolit nanomalzemeler sınıfına girdiği görülmüştür.

Üretilen nano alfa sepiyolit nanopartiküllerin aglomera oluşturabilme değerleri önemli olduğu için zeta potansiyeli ölçülmüştür. Nano alfa sepiyolit süspansiyonunun zeta potansiyeli değeri -15,4 mV olduğu, ham sepiyolit zeta potansiyel değeri -18,4 mV olduğu belirlenmiştir.  $\pm 15$  mV'dan yüksek olan taneler dispersiyon (dağılma) özelliği gösterdiği bildirilmiştir (Doğan 2001). Bu nedenle hem mikro hem de nano alfa sepiyolit dağılma özellikleri +15 mV ve -15mV arasında bulunmadığı için dağılma özelliklerinin iyi kategoride olduğu sonucuna varılmıştır

Nano alfa sepiyolit liflerinin üretimi gerçekleştirildikten sonraki aşamada hücre içerisine girip girmediği tespit edilmiştir. Nitekim hücre içerisine girebilen nanopartiküllerin hücre içindeki sitoplazma proteinleri, organeller ve DNA'ya bağlanması ile birlikte bu yapıların hücre içerisindeki görevlerini bloke edebileceği bildirilmiştir (Buzea 2007). Bu nedenle nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine girişi ve hücre içerisindeki lokalizasyonu toksisitesi açısından önemlilik arz etmektedir.

Özellikle sepiyolit makropinositoz yoluyla memeli (V79 hamster) hücrelerine spontan bir şekilde girebileceği, hatta hücre çekirdeğine kadar gidebileceği gösterilmiştir (Castro-Smirnov ve ark 2017). Toledo-Magana ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sepiyolit nano killerinin esas olarak büyük vakuoller içerisinde agregatlar olarak bulunduğunu ve bazı durumlarda vakuoller membranının yırtılmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda sepiyolit nanokillerinin daha fazla toplanması, kültürler üzerinde sepiyolit nanokillerinin daha yüksek sitotoksik etkisiyle açıklanmıştır (Toledo-Magana ve ark. 2015). Söz konusu bu çalışmada nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine girebildiği BEAS-2B ve A549 hücrelerinin TEM görüntüleri incelendiğinde görülmüştür. Bu görüntülerde nano alfa sepiyolit liflerinin sitoplazma içerisinde birçok vezikül içerisinde toplanmış olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.11). Krug ve Wick (2011) nanoyapıların hücre homeostazi için yan etkiler oluşturduklarını belirtmiş olup, bu çalışmada sitoplazmada artan sayıda vezikül içindeki nano sepiyolit liflerinin bulunması hücre homeostazi için olumsuz sonuçlar doğurabileceği görülmektedir (bkz. Şekil 4.11e ve f).

Bu görüntüler incelendiğinde olası nano alfa sepiyolit hücre içi alınım mekanizmaları ortaya çıkmıştır. Nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine alınmasında, birinci olarak liflerin direkt hücre içerisine alınabileceği (bkz. Şekil 4.10d), ikinci olarak hücre zarının içeri doğru yapmış olduğu invajinasyonlar ile vezikül oluşturarak alınabileceği (bkz. Şekil 4.10d ve e), partiküllerin yalancı ayaklar oluşturarak fagositoz yoluyla alınabileceği görülmüştür (bkz. Şekil 4.11g). Sonuçta nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içerisine alınımları şekli vezikül oluşturarak endositoz olayı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ortaya çıkan görüntülerdeki bulgular, hem sepiyolit liflerinin alınımları ve hemde hücre içerisindeki yerleşim durumları ile Toledo-Magana ve ark. (2015) ve Castro-Smirnov ve ark (2017) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

TEM cihazında çekilen görüntülerde nano fiberlerin içerisinde biriktiği veziküllerin sitoplazmada sayıca arttığı (bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.11), bu veziküllerin çekirdeğin membranına baskı yaptığı (bkz. Şekil 4.10c, Şekil 4.11b) görülmüştür. Ancak çekirdek içerisinde sepiyolit nanolifleri ile ilgili görüntü elde edilememiştir. Castro-Smirnov ve ark. (2016) sepiyolit doğal bir floresan özelliğe sahip olduğunu ve hücre içerisinde bu maddenin floresan özelliğinden yararlanılarak hücredeki konumunun tespit edilebileceğini bildirmiştir. Nano alfa sepiyolit liflerinin floresan özelliği ile Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile hücre içerisindeki yerleşim lokalizasyonları tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.12). Hem BEAS-2B hem de A549 hücrelerinde yeşil floresan özellik sergileyen nano alfa sepiyolit liflerin sitoplazmanın çeşitli yerlerine yerleştiği görülmüştür (bkz. Şekil 4.12). Ayrıca sitoplazmada görülen nano alfa sepiyolit liflerinin çekirdek içerisine girdiği Lazer Konfokal Mikroskop ile görüntülenmiştir (bkz. Şekil 4.13).

Hücre içerisine girebilen nano alfa sepiyolit liflerinin BEAS-2B sağlıklı hücre ve A549 kanser hücrelerindeki sitotoksitesisi XTT, Trypan Blue ve Muse Count Viability Testleri olmak üzere üç farklı yolla ölçülmüştür. Bu testlerden XTT yönteminde mitokondri canlılığına, Muse Count Viability testinde çekirdek canlılığına ve Trypan Blue yönteminde ise hücre canlılığına bakılarak sitotoksitesite belirlenmiştir. Her iki hücre hattında üç test yöntemiyle belirlenen canlılık oranlarının doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ( $p \leq 0.05$ , bkz. Çizelge 4.5).

XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue Ort. IC<sub>6,25</sub>; IC<sub>12,5</sub>; IC<sub>25</sub>; IC<sub>50</sub>; IC<sub>75</sub> değerleri BEAS-2B hücrelerinde sırası ile 517,5±171; 950±206; 1748±213; 3357±312; 5077±512 µg/ml bulunmuştur. XTT, Muse Count Viability ve Trypan Blue Ort. IC<sub>6,25</sub>; IC<sub>12,5</sub>; IC<sub>25</sub>; IC<sub>50</sub>; IC<sub>75</sub> değerleri A549 hücrelerinde sırası ile 272±218; 484±183; 970±277; 2544±331; 4420±664 µg/ml bulunmuştur.

BEAS-2B hücrelerinde üç test yöntemiyle belirlenen ortalama IC değerleri ile A549 hücre hattında belirlenen ortalama IC değerleri ile kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (p≤0.05, bkz. Çizelge 4.5, Şekil 4.16). Bu nedenle aynı doz grupları ile muamele edilen A549 ortalama IC değerleri, BEAS-2B hücrelerinde belirlenen IC<sub>6,25</sub> değerinin % 52,6'sına; IC<sub>12,5</sub> değerinin % 51'ine; IC<sub>25</sub> değerinin % 55,6'sına; IC<sub>50</sub> değerinin % 75,8'ine; IC<sub>75</sub> değerinin % 87,1'ine denk gelmekte olduğu görülmüştür (bkz. Çizelge 4.5). Bu nedenle aynı doz grupları ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerine göre A549 ortalama IC değerleri düşük olup, sağlıklı hücrelere göre kanserli hücrelerde seçici bir özellik sergilediği görülmüştür. BEAS-2B hücrelerinde ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki göstermesi nedeni ile nano alfa sepiyolitin biyoyoumlu bir malzeme olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada hem BEAS-2B hemde A549 hücrelerinde elde edilen doz artışına bağlı olarak canlılık oranı azalması görülmekle birlikte nano alfa sepiyolitin ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Yapılan bu çalışma J. Cervini Silva ve ark. (2015b) ve Toledo-Magana ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekte olup ancak yüksek dozlarda canlılık üzerinde inhibisyona neden olduğu görülmektedir. Söz konusu J. Cervini Silva ve ark. (2015b) tarafından yapılan çalışmalarda U251 (glioblastoma, beyin tümörü), SKLU-1 (akciğer adenokarsinoma), K512 (kronik miyeloid lösemi), HCT-15 (İnsan kolon adenokarsinomu) ve MCF-7 (İnsan insan beyaz meme adenokarsinomu) hücrelerine karşı yüksek dozlarda sepiyolite maruz bırakıldığında inhibisyonun arttığını, Toledo-Magana ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ise amipli dizanteri (*Entamoeba histolytica*), RAW 264,7 fare kan makrofajları ve insan periferik kan makrofajlarında uygulanan dozların yüksek olmasına rağmen inhibisyonun düşük olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak nano alfa sepiyolitinin neden olduğu sitotoksik etkinin altındaki sebepler incelenmiştir. Öncelikle sepiyolit yüzeyinin benzersiz özellikleri (geniş spesifik yüzey alanı, negatif elektrik yükü ve fibröz morfoloji) ile farklı biyoaktif türler ile etkileşime girebileceğini bazı çalışmalar ortaya çıkarmıştır (Castro-Smirnov ve ark. 2016). Sepiyolitinin etkileşime girdiği maddelerin polisakkaritler (Alcântara ve ark. 2014), lipitler (Wicklein ve ark. 2010), proteinler (Fernandes ve ark. 2011, Alcântara ve ark. 2012) ve virüs parçacıkları (Ruiz-Hitzky ve ark. 2009) olduğu belirtilmiştir. Ayrıca J. Cervini Silva ve ark. (2015a) tarafından deneylerde sepiyolitinin lipid peroksidasyonunu inhibe edebildiği ortaya konmuştur. Bu gerçekleşen çalışmalarda olduğu gibi nano alfa sepiyolitinin hücre zarındaki lipidler ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonuna neden olmuş olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin hücre içine girebilme ve hücre içindeki sitoplazma proteinleri, organeller ve DNA'ya bağlanması ile birlikte bu yapıların hücre içerisindeki görevlerini bloke ettiği bildirilmiştir (Buzea 2007). Bu nedenle TEM görüntüleri incelendiğinde sitoplazmanın çeşitli bölgelerine nano liflerin dağıldığı hatta çekirdeğin içerisine girebildiği konfokal mikroskop ile çekilen görüntülerde görünmektedir (bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.13). Bu nedenle nano alfa sepiyolitinin çeşitli makromoleküllere bağlanma özellikleri ile bağlanarak hücre içerisindeki görevlerini inhibe etmiş olabileceği düşünülmektedir.

Toledo-Magana ve ark. 2015 tarafından gerçekleştirilen çalışmada sepiyolit nano killerinin esas olarak büyük vakumlar içerisinde agregatlar olarak bulunduğunu ve bazı durumlarda vakuol membranının yırtılmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda sepiyolit nanokillerinin daha fazla toplanması, kültürler üzerinde sepiyolit nanokillerinin daha yüksek sitotoksik etkisiyle açıklanmıştır (Toledo-Magana ve ark. 2015).

Bu çalışmada nano alfa sepiyolit liflerinin hücre içine girebildiğinin BEAS-2B ve A549 hücrelerinin TEM görüntüleri incelendiğinde sitoplazma içerisinde birçok vezikül içerisinde toplanmış alfa sepiyolit liflerinin görüntüleri görülmüştür. Krug ve Wick (2011) nanoyapıların hücre homeostazi için yan etkiler oluşturduklarını belirtmiş olup, bu çalışmada sitoplazmada artan sayıda vezikül içindeki nano alfa sepiyolit liflerinin bulunması hücre homeostazi için olumsuz sonuçlar doğurabileceği görülmekte olup (bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12), bu çalışmada ise nano alfa sepiyolit dozlarının artışına paralel olarak veziküllerin artması, vezikül içindeki liflerin

artması sonucunda veziküllerin patlaması ile birlikte sitotoksik etkinin artmış olabileceği değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak nano alfa sepiyolit A549 hücrelerinde anti-kanser aktivitesine sahip olmamakla birlikte, kanserli ve sağlıklı hücreler arasında seçici özellik sergilediği ve Toledo-Magana ve ark. (2015)'ın belirttiği gibi biyouyumlu bir madde olarak değerlendirilmektedir.

Nano alfa sepiyolit BEAS-2B ve A549 hücrelerinde doz artışına paralel olarak sitotoksikite artışına neden olabilecek çeşitli değerlendirmeler yukarıda yapılmış olup, ancak nano alfa sepiyolit etkisiyle meydana gelen inhibisyonun mekanizmasını aydınlatmak için ROS, Komet, Annexin-V testi ve İkili boyama yöntemi yapılmıştır.

Nano alfa sepiyolit hücre kültüründe neden olduğu hücre içi ROS miktarı BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında DCFA-DA elisa testi ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu deneyde hücre içi ROS miktarı absorbans değeri florometrik plaka okuyucuda okunmuş olup, absorbans değerleri arasında mantıklı veriler elde edilememiştir. Bu çalışmada mantıklı veriler elde edilmemesi, nano alfa sepiyolit doğal olarak yeşil floresan (506-538nm) özelliği ile yanlış okumalara sebep olduğu düşünülmektedir. Nitekim Doak ve ark. (2009) tarafından nanopartiküllerin floresan boya oksidatif tayininin de yaygın olarak kullanılan bir proba (2',7'-diklorofloresin-diasetat, DCFH-DA) nanopartiküllerin etkileşerek yanlış yorumlara neden olabileceği bildirilmiştir. Sepiyolit yüzeyinin geniş spesifik yüzey alanı, negatif elektrik yükü ve fibröz morfoloji gibi benzersiz özellikleri nedeni (Alvarez 1984, Clarke 1989, Galan 1996, Sabah 1999) ile DCFA-DA ile etkileşime girebileceği ayrıca bu nanoliflerin yeşil floresan özelliği (Castro-Smirnov ve ark. 2016) ile DCFA-DA'nın yeşil floresan özelliği birleşeceğinden okunan absorbans değerlerinin farklı sonuçlar doğurduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada nano alfa sepiyolit ROS etkisi hücre içi ROS testi ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Her bir hücre hattına kendi IC<sub>6,25</sub>; IC<sub>12,5</sub>; IC<sub>25</sub>; IC<sub>50</sub>; IC<sub>75</sub> dozları ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Muamele sonucunda elde edilen ROS değerleri ile büyüme kontrol ile kıyaslandığında her hücredeki ROS seviyesi dozların artışına paralel olarak anlamlı şekilde artmıştır (p≤0.05, bkz. Çizelge 4.6).

Bu çalışmada artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak nano alfa sepiyolitinin her iki hücre hattında neden olduğu hücre içi ROS artışının nedenleri inceleyecek olursak, mikron boyutundaki sepiyolit kütlesinin sonikasyon sonucunda çok geniş yüzeylere sahip nano alfa sepiyolit liflerinin büyük yapılardan daha fazla serbest radikal oluşturmuş olabilmeleridir. Nitekim Nel ve ark (2006) nanoyapıların küçük boyutları nedeni ile daha geniş yüzey alanına sahip oldukları için reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabildiklerine ve hücre hasarına sebep olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca birçok *in vitro* çalışmada, nanopartiküle maruz bırakılan hücrelerde ROS seviyesinde önemli artışların olduğunu, hücrede meydana gelen DNA hasarı ve hücrenin apoptoza sürüklenmesinin sebebini nanoyapıların oluşturduğu oksidatif stres olarak açıklanmıştır (Stone ve ark. 2007, Park ve ark. 2008, Asharani ve ark. 2009, Ahamed ve ark. 2011).

Söz konusu bu çalışmada doz artışına bağlı olarak hücrelerde meydana gelen hücre içi ROS artışı ile sitotoksik etkinin uyumlu olduğu görülmüştür. Nano alfa sepiyolitinin hücreler üzerindeki ROS artışının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin ROS artışıyla meydana geldiği çıkarımı yapılabilmektedir.

Nano alfa sepiyolitinin neden olduğu DNA hasarı BEAS-2B ve A549 hücrelerinde komet testi ile belirlenmiştir. Her bir hücre hattına nano alfa sepiyolitinin kendi  $IC_{6,25}$ ;  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ;  $IC_{50}$ ;  $IC_{75}$  dozları ile 24 saat muamelesi sonrasında komet testi gerçekleştirilmiştir. Komet testi sonuçları kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiştir.

BEAS-2B hücre hattında nano alfa sepiyolitinin  $IC_{6,25}$ ;  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ;  $IC_{50}$ ;  $IC_{75}$  dozları ile muamelesi sonucunda elde edilen sonuçlar büyüme kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti parametreleri anlamlı bir artış gözlenmiştir. ( $p \leq 0.01$ , bkz. Çizelge 4.7). A549 hücre hattında nano alfa sepiyolitinin  $IC_{6,25}$  ile muamelesi sonucunda elde edilen sonuç büyüme kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti parametreleri anlamlı bir azalış gözlenmiştir. ( $p \leq 0.01$ , bkz. Çizelge 4.7). Ancak nano alfa sepiyolitinin  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ;  $IC_{50}$ ;  $IC_{75}$  dozları ile muamelesi sonucunda elde edilen sonuçlar büyüme kontrol ile kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti parametrelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. ( $p \leq 0.01$ , bkz. Çizelge 4.7).



Bu çalışmada artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak nano alfa sepiyolit her iki hücrede neden olduğu DNA hasar artışının nedenlerini incelenecektir. Castro-Smirnov ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sepiyolit nanofiberlerinin taşıdıkları silanol grupları nedeniyle DNA'ya direkt olarak bağlanabilecekleri gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise hücre içerisine giren nanopartiküller hücresel proteinlerle veya mitoz bölünme süresinde doğrudan DNA ile etkileşerek hasara neden olabileceği bildirilmiştir (Buzea 2007, Sing ve ark. 2009). ROS artışının hücrede dolaylı olarak hücrede DNA hasarına neden olabileceği açıklanmıştır (Stone ve ark. 2007, Park ve ark. 2008, Asharani ve ark. 2009, Ahamed ve ark. 2011). Söz konusu bu çalışmada uygulanan nano alfa sepiyolit liflerinin hücre çekirdeğine girebildiği çekilen konfokal mikroskop ile görüntülenmiş olup (bkz. Şekil 4.12, Şekil 4.13), DNA ile yukarıda bahsedildiği gibi bağlanacağından dolayı (Castro-Smirnov ve ark. 2016) DNA molekülünün işlevini yitirmesine neden olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca nano alfa sepiyolit liflerinin hücrelerde ROS artışına neden olduğu Çizelge 4.6'de gösterilmiş olup, bu nedenle hücre içi ROS miktarı artışının hücredeki DNA hasarının nedeni olabileceği değerlendirilmektedir.

Ancak sadece A549 hücrelerindeki IC<sub>6,25</sub> dozunun DNA hasarının büyüme kontrolden anlamlı şekilde düşük olması A549 hücrelerindeki IC<sub>6,25</sub> dozunun neden olduğu düşük ROS seviyesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuçta her iki hücre hattında da meydana gelen DNA hasarının iki nedenle meydana gelebileceği görülmüştür. Birincisi nano alfa sepiyolit liflerinin doğrudan DNA'ya bağlanarak DNA'nın işlevini yerine getirememesine, ikincisi ise nano alfa sepiyolit liflerinin neden olduğu hücre içi ROS artışı nedeniyle dolaylı olarak DNA'ya zarar vermesi olduğu düşünülmektedir.

Buraya kadarki çalışmalarda nano alfa sepiyolit doz artışına bağlı olarak hücreleri inhibisyona sürükleyen mekanizmalardan bahsedilmiştir. Bu bölümde ise nano alfa sepiyolit ile muamele edilen hücrelerdeki ölüm mekanizmasından bahsedilecektir. Şimdiye kadar sepiyolit nano killeri ile yapılan çalışmalar son derece yetersiz olup, hücre ölüm mekanizması ile ilgili bilgiler yok denecek kadar azdır. Bir araştırmada Toledo-Magana ve ark. (2015) tarafından sepiyolit nanokillerinin ölüm mekanizmasının çalışılan makrofaj tipine göre değiştiği belirtilmiştir. RAW 264.7 ve fare kemik iliği makrofafları (MMDM) kültürlerinin esas ölüm mekanizmasının

nekroz olduğu, insan periferel kan makrofajları ile amip kültürlerinin ölüm mekanizmasının apoptoz olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise nano alfa sepiyolit BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında neden olduğu hücre ölüm mekanizmasını belirlemek için Annexin-V testi uygulanmış olup, ikili boyama yöntemiyle elde edilen görüntüler ile kıyaslanmıştır. Her bir hücre hattına nano alfa sepiyolit  $IC_{6,25}$ ;  $IC_{12,5}$ ;  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  dozları ile 24 saat muamelesi sonrasında Annexin-V testi gerçekleştirilmiştir.

BEAS-2B hücrelerinde nano alfa sepiyolit liflerinin çeşitli IC konsantrasyon grupları muamelesi sonucu sitotoksik etkinin artması ile birlikte Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre sayısının azaldığı görülmektedir (bkz. Çizelge 4.8). Buradaki doz artışına bağlı olarak toplam apoptotik hücre ölümüne bakıldığında büyüme kontrol ile  $IC_{6,25}$  arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ),  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu toplam apoptotik hücre ölümü anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). BEAS-2B hücrelerinde  $IC_{12,5}$  dozu erken apoptotik hücre ölümüne ve  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  dozları ise hem erken hemde geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.29, Şekil 4.30).

A549 hücrelerinde ise nano alfa sepiyolit liflerinin çeşitli IC konsantrasyon grupları muamelesi sonucu sitotoksik etkinin artması ile birlikte Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre sayısının azaldığı görülmektedir (bkz. Çizelge 4.8). Buradaki doz artışına bağlı olarak toplam apoptotik hücre ölümüne bakıldığında büyüme kontrol ile  $IC_{6,25}$ ,  $IC_{12,5}$  ve  $IC_{25}$  arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ ),  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu toplam apoptotik hücre ölümü anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ ). A549 hücrelerinde IC dozlarının erken apoptotik hücre ölümüne neden olmadığı ve  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  dozlarının ise geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.32, Şekil 4.33).

BEAS-2B hücrelerinde ölüm şeklinin daha çok dozların yükselmesi ile birlikte orantılı olarak hem erken apoptotik hücre ölümüne hem de geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.29, Şekil 4.30). Ancak A549 hücrelerinde ölüm şeklinin geç apoptotik hücre ölümü olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.32, Şekil 4.33).

Annexın-V testinin verilerinin teyit edilmesi için, ikili boyama yöntemi ile morfolojik görüntüleme yapılmış olup, bulunan sonuçların birbirini doğrular nitelikte olduğu görülmüştür. Nano alfa sepiyolit ile muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinde erken apoptoz belirteci olan açık yeşil renklenmeler ve geç apoptoz belirteci olan sarı renkli hücrelerin doz artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür. A549 hücrelerin ikili boyama yöntemi ile elde edilen morfolojik görüntülerinde, hücrelerin daha çok geç apoptoz belirtisi olarak sarı renkli hücreler görülmüştür (bkz. Şekil 4.35, Şekil 4.36).

Bu aşamaya kadar nano alfa sepiyolit her iki hücredeki tek başına etkisinden ve altında yatan mekanizmalardan bahsedilmiştir, bundan sonraki aşamada ise nano alfa sepiyolit ve radyasyonunun her iki hücre üzerindeki etkileri ve bu etkilerin altında yatan mekanizmalar değerlendirilecektir.

Günümüzde radyoterapi, kanser tedavilerinde tek başına kullanılabilen ve cerrahi ve kemoterapi kombinasyonları ile birlikte de kullanılan bir tedavi yöntemi olduğu açıklanmıştır (Perez ve Brady 1998). Radyoterapi ile amaç yüksek dozdaki radyasyon ile kanser hücreleri hedef alınıp, kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturularak hücrelerin öldürülmesi veya kanserli hücrelerin çoğalmalarını engellemektir. Kanser hücreleri normal hücrelere göre bölünme yeteneği oldukça hızlıdır. Bu çok hızlı bölünüp çoğalan kanser hücreleri kendilerini tamir etme olanakları normal hücrelere göre düşük olmasından dolayı radyoterapi ile uygulanan radyasyonun kanser hücreleri üzerindeki etkisi normal hücrelere göre daha etkili olduğu bilinmektedir.

Ancak radyoterapinin olumlu etkilerine rağmen aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı radyoterapinin etkileri sınırlıdır. Hücrelerdeki moleküler oksijen düzeyinin yüksek olması radyasyon etkinliğini artıran çok önemli bir etken olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark. 2019). Kanserli dokular radyoterapi ile muamele sonucunda bu dokulardaki düşük oksijen nedeniyle serbest radikal üretimi daha az olacağından radyoterapinin etkisinin daha düşük olacağı bildirilmiştir (Toplan 2016). Radyasyonun diğer bir yan etkisi yüksek düzeydeki yüksek radyasyon dozunun tümörü çevreleyen sağlıklı doku üzerinde de toksiteye neden olmasıdır. Ayrıca radyasyona dirençli olan tümör hücreleri nedeniyle tümörleri yok etmek için radyoterapinin bazı hücrelerde başarısız olduğu bildirilmiştir (Kıraç ve Yüksel 2001, Hainfeld ve ark. 2008).

Bu kapsamda radyasyonun oluşturduğu hasardan çevre dokularını korumak için koruyucu radyoprotektif maddelerin kullanılması (Kalpana ve ark. 2009) ya da radyasyona dirençli hücrelerin yok edilmesi için toksik özellik göstermeyen ancak radyasyon ile birlikte verildiğinde radyasyona duyarlılığı artıran maddelerin kullanılmasının önemli olduğu bildirilmiştir (Pak 2001). Bu kullanılacak maddelerin radyasyon etkinliğini artırarak kanserli hücreli yok edebilecek, ayrıca kullanılan yüksek doz radyasyon yerine daha düşük dozla kanserli hücrelerin ölümüne neden olup, çevre dokuların az zarar görmesini sağlayan maddeler kullanılması gerekli olduğu birçok çalışmada açıklanmıştır.

Radyoterapi çalışmalarında radyasyon ile birlikte altından oluşan çok çeşitli nanoyapıların kanser tedavisinde ve teşhisinde yoğun bir şekilde kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Boisselier ve Astruc 2009, Muthu ve Singh 2009). Altın nano parçacıklarının radyasyonla birlikte kullanılması, bu maddenin biyouyumlu olması ve radyasyonu yüksek derecede absorblama özelliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hainfeld ve ark. 2008). Altın nanopartiküllerinin radyasyonun hücre üzerindeki duyarlılığını mükemmel bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (Hainfeld ve ark. 2008).

Özellikle bu çalışmamızda nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyon kullanmamızın asıl sebebi olmamakla birlikte, TR 2016 01282B numaralı patentte Akca ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen deneylerde mikron boyutundaki alfa sepiyolit ile oluşturulan bir zırh materyalinin 662 keV'lik gama ışınlarına karşı soğurma katsayısı  $0,75 (\mu, \text{cm}^{-1})$  bulunmuştur. Aynı deneyde altının soğurma katsayısı  $1,98 (\mu, \text{cm}^{-1})$ , kurşunun  $1,20 (\mu, \text{cm}^{-1})$  ve alüminyumun ise  $0,20 (\mu, \text{cm}^{-1})$  olarak bulunmuştur. Alfa sepiyolitinin soğurma katsayısının kurşuna yakın olması ve altın ile kıyaslanabilir bir sayıda olması nedeniyle hücre kültürü çalışmasında nano alfa sepiyolitinin radyasyonla birlikte kullanılabilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır.

Bu nedenlerle çalışmamızda nano alfa sepiyolitinin radyasyonla birlikte hem sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) hem de kanserli akciğer hücrelerinde (A549) radyobiyolojik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada nano alfa sepiyolit ile gerçekleştirilen sitotoksikite deneylerinde BEAS-2B ve A549 hücre hatlarından elde edilen XTT ortalama IC değerleri dikkate alınarak düşük sitotoksikite gösteren BEAS-2B hücrelerinde  $IC_{6,25}(517,5 \mu\text{g/mL})$ ;  $IC_{12,5}(950 \mu\text{g/mL})$ ;  $IC_{25}(1748 \mu\text{g/mL})$ ; A549

hücrelerinde ise sırasıyla IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); IC<sub>25</sub>(970µg/mL) değerleri radyasyonla birlikte muamele edilmiştir.

Tabakçioğlu (2013) tarafından lenfosit kültürlerine 2Gy yüksek radyasyon dozu uygulandığı bildirilmiştir. Ayrıca Çoşkun (2013) tarafından yürütülen çalışmalarda A549 kanserli akciğer hücrelerinde büyüme kontrole göre 1Gy dozunun canlılığının % 80'e, 2Gy'de ise canlılığın % 65'e kadar düşmüş olduğu gözlenmiştir. Büyüme kontrol ile 1Gy radyasyon dozu arasındaki farklılığın anlamsız olduğu, ancak 2Gy radyasyon dozu arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu nedeniyle bu çalışmada radyasyon dozu olarak hücreler üzerindeki etkisi düşük olan 1Gy ve etkisi yüksek 2Gy radyasyon dozları kullanılmıştır.

Söz konusu nano alfa sepiyolit maddesinin ilk defa radyasyonla birlikte kombine edilerek uygulanması bu deneyde gerçekleştirilmiştir. Bu deney çalışmasında her iki hücre hattında nano alfa sepiyolit etkisinin çok yüksek dozlarda az sitotoksik etki göstermesi önemlilik arz ettiği düşünülmektedir. Bu sitotoksik etkinin sağlıklı hücelere göre kanserli hücrelerde 2 kat doz uygulaması (bkz. Çizelge 4.5) ile gerçekleşiyor olması diğer önemli bir husus olduğu düşünülmektedir.

Varanda ve Tavares (1998) hücreler radyasyona maruz bırakılmadan veya bırakıldığı zaman radyasyon dozunun verilmesinin uygun olacağını belirtmiştir. Bu sebeple bu çalışmada radyasyon dozu verilmeden 2 saat önce dozlama gerçekleştirilmiş olup, nano alfa sepiyolit ve radyasyonun BEAS-2B ve A549 hücre hatlarındaki sitotoksitesisi 24 saat boyunca muamele edilerek XTT yöntemiyle ölçülmüştür.

BEAS-2B hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranı 1Gy ve 2Gy radyasyon dozunda sırasıyla 93,53±10 ve 87,1±13 elde edilmiştir. Kontrol grubu ile 1Gy radyasyon dozu arasındaki ilişki anlamlı değilken (p>0,05, bkz. Çizelge 4.9), 2Gy arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (p≤0,05, bkz. Çizelge 4.9). BEAS-2B hücrelerinde 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozlarından sırasıyla 93,53±10; 82,3±9,4; 77±13; 61±6,6 canlılık oranları, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5 µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(1748µg/mL) dozlarından sırasıyla 87,1±13; 75±3,4; 58±10,8; 40±11,3 canlılık elde edilmiştir. 1Gy radyasyonun neden olduğu inhibisyona göre radyasyon ve nano alfa sepiyolit birlikte uygulandığında 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub>

dozlarının neden olduğu inhibisyon ile canlılık yüzdelerindeki azalış karşılaştırılırsa, sırasıyla % 12, % 17,7; % 34,8, 2Gy radyasyonun neden olduğu inhibisyona göre 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozlarının neden olduğu inhibisyon ile canlılık yüzdelerindeki azalış karşılaştırılırsa, sırasıyla % 13,9; % 33,4; % 54,1 canlılıktaki azalış elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.37)

A549 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranı 1Gy ve 2Gy radyasyon dozunda sırasıyla 92,2±14; ve 72,3±16 elde edilmiştir. Kontrol grubu ile 1Gy radyasyon dozu arasındaki ilişki anlamlı değilken ( $p>0,05$ , bkz. Çizelge 4.9), 2Gy arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p\leq 0,05$ , bkz. Çizelge 4.15). A549 hücrelerinde 1Gy, 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 1Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozlarından sırasıyla 92,2±14; 71,8±16,8; 63,5±19; 61,8±23 canlılık oranları, 2Gy, 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(272µg/mL); 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL); 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozlarından sırasıyla 72,3±16; 68,7±13,3; 53,5±20,8; 42,3±17,4 canlılık elde edilmiştir. 1Gy radyasyonun neden olduğu inhibisyona göre radyasyon ve nano alfa sepiyolit in birlikte uygulandığında 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> dozlarının neden olduğu inhibisyon ile canlılık yüzdelerindeki azalış karşılaştırılırsa, sırasıyla % 22,1, % 31,2; % 33, 2Gy radyasyonun neden olduğu inhibisyona göre 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozlarının neden olduğu inhibisyon ile canlılık yüzdelerindeki azalış karşılaştırılırsa, sırasıyla % 5; % 26; % 41,5 canlılıkta azalış elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.38).

Bu çalışmada BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmayan 1Gy ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> dozları karşılaştırıldığında elde edilen canlılık oranlarının radyasyon dozlarının etkisini artırarak sitotoksitesini artırmış olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.37, Şekil 4.38). Ancak özellikle BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde anlamlı bir etkiye neden olan 2Gy ile 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları karşılaştırıldığında elde edilen canlılık oranlarının radyasyon dozlarının etkisini artırarak sitotoksitesinin önemli derecede artırmış olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.37, Şekil 4.38).

Bu sonuçlar incelendiğinde her iki hücre hattında da kullanılan nano alfa sepiyolit in radyasyon duyarlılığını artırmış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada bulunan 1Gy ile 2Gy radyasyon dozları ile elde edilen canlılık sonuçlarının Çoşkun (2013) tarafından belirlenen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Ayrıca BEAS-2B hücrelerine uygulanan 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL) dozu ile A549 hücrelerindeki 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL) uygulanan doz miktarları benzer olduğu görülmektedir. Bu nedenle BEAS-2B hücrelerindeki 1Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL) dozunun canlılık oranının 82,3±9,4 olduğu, benzer doz olan A549 hücrelerindeki 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(484±183µg/mL) dozunun ise 63,5±19 canlılık elde edildiği, benzer dozlarda elde edilen canlılık oranlarının BEAS-2B sağlıklı hücrelerine göre A549 kanserli hücrelerinde % 22,8 daha fazla düşük olduğu tespit edilmiştir.

BEAS-2B hücrelerine uygulanan 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL) ile A549 hücrelerindeki 1Gy+ IC<sub>25</sub>(970±277µg/mL) uygulanan doz miktarları benzer olduğu görülmektedir. Bu nedenle BEAS-2B hücrelerindeki 1Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL) dozunun canlılık oranının 77±13 olduğu, benzer doz olan A549 hücrelerindeki 1Gy+ IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozunun ise 61,8±23 canlılık elde edildiği, benzer dozlarda elde edilen canlılık oranlarının BEAS-2B sağlıklı hücrelerine göre A549 kanserli hücrelerinde % 19,7 daha fazla düşük olduğu tespit edilmiştir.

Söz konusu bu çalışmada özellikle kontrol grupları ile arasındaki ilişki anlamlı olan 2Gy dozunun hem BEAS-2B hemde A549 hücrelerindeki etkiyi kıyaslanmanın önemli olduğu düşünülmektedir. 2Gy radyasyon dozuna maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde canlılık oranı 87,1±13 iken, A549 hücrelerinde bu oran 72,3±16 olarak bulunmuştur. 2Gy radyasyon dozunun kanserli hücrelerde daha seçici olduğu görülmüştür (bkz. Şekil 4.37, Şekil 4.38).

Ayrıca BEAS-2B hücrelerine uygulanan 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL) ile A549 hücrelerindeki 2Gy+ IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL) uygulanan doz miktarları benzer olduğu görülmektedir. Bu nedenle BEAS-2B hücrelerindeki 2Gy+IC<sub>6,25</sub>(517,5µg/mL) dozunun canlılık oranının 75±3,4 olduğu, benzer doz olan A549 hücrelerindeki 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(484µg/mL) dozunun ise 53,5±20,8 canlılık elde edildiği, benzer dozlarda elde edilen canlılık oranlarının BEAS-2B sağlıklı hücrelerine göre A549 kanserli hücrelerinde % 28,6 daha fazla düşük olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca BEAS-2B hücrelerine uygulanan 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL) ile A549 hücrelerindeki 2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) uygulanan doz miktarları benzer olduğu görülmektedir. Bu nedenle BEAS-2B hücrelerindeki 2Gy+IC<sub>12,5</sub>(950µg/mL) dozunun canlılık oranının 58±10,8 olduğu, benzer doz olan A549 hücrelerindeki

2Gy+IC<sub>25</sub>(970µg/mL) dozunun ise 42,3±17,4 canlılık elde edildiği, benzer dozlarda elde edilen canlılık oranlarının BEAS-2B sağlıklı hücrelerine göre A549 kanserli hücrelerinde % 27,1 daha fazla düşük olduğu tespit edilmiştir. Yukarıdaki sonuçlar incelendiğinde yüksek dozlarda dahi düşük toksik etki göstermesinin yanında, nano alfa sepiyolit radyasyon duyarlılığını sağlık hücrelere göre kanserli hücrelerde seçici olarak arttırdığı bulunmuştur.

Yukarıda nano alfa sepiyolit ve radyasyonun her iki hücre hattındaki etkisi bulunmuş olup, hücreler üzerinde meydana gelen bu etkinin nasıl olduğu aşağıda tartışılmıştır. Hücreler üzerinde uygulanan radyasyonun direkt olarak hücre DNA'ları üzerinde hasar oluşturduğu (Sachs ve ark. 1992, Friedberg 1995, Varanda ve Tavares 1998), dolaylı olarak ta bulunduğu ortamdaki su molekülü ve diğer ortam molekülleri ile etkileşmeye girerek ROS üretiminin arttırmasına (Algüneş, 2002) neden olduğu bilinmektedir.

Radyasyon ile birlikte uygulanan nano alfa sepiyolit ise yapısında zayıf elektron taşıyan oksijen atomlarının bulundurması, zayıf hidrojen bağların bulundurması ve Si-OH (Silanol) grupları bulundurması nedeniyle başka maddeler ile etkileşime girebileceği bildirilmiştir (Serratos 1979, İrkeç 1992, Jones ve Galan 1998). Bu nedenle hücre içerisine giren nano alfa sepiyolit liflerinin bu özellikleri ile birçok biyomolekülün etkisini bloke edebileceği düşünülmektedir. Bunlara ilaveten nano alfa sepiyolit ile yapılan komet deney sonuçlarında DNA hasarını arttırdığını (bkz. Çizelge 4.7), ROS deneyi sonucunda ise hücre içi ROS miktarını artırması (bkz. Çizelge 4.6) nano alfa sepiyolit radyasyon ile birlikte hücrede artan kümülatif hasara neden olabileceği ve daha çok hücreyi ölüme sürükleyerek radyasyonun duyarlılığını artırıcı etki yaptığı düşünülmektedir.

Ayrıca nanopartiküllerin hücre zarından geçerek, hücrelerde birikebileceği (Niidome 2004, Anshup, 2005), hücrede artan nanopartikül konsantrasyonun radyasyon duyarlılığının ön şartı olarak gösterildiği (Chithrani 2006, Chithrani 2009, Chithrani ve ark. 2010) için bu çalışmada Şekil 4.13'de gösterilen konfokal mikroskopta çekilen görüntülerde sitoplazmada biriken nano alfa sepiyolit liflerinin radyasyon duyarlılığı üzerinde önemli etki yaptığı düşünülmektedir.



Nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun BEAS-2B ve A549 hücrelerinde doz artışına paralel olarak 1Gy ve 2Gy radyasyon dozuna göre sitotoksisite artışına neden olabilecek çeşitli değerlendirmeler yukarıda yapılmış olup, ancak nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun etkisiyle meydana gelen inhibisyon mekanizmasını aydınlatmak için ROS, Komet, Annexın-V testi ve İkili boyama yöntemi yapılmıştır.

Nano alfa sepiyolit ve radyasyon kombine uygulamalarında ROS ve Komet testlerinde elde ettiğimiz bulgular sitotoksisite sonucunda elde edilen verileri desteklediği görülmektedir. ROS testinde, hem BEAS-2B hemde A549 hücreleri üzerine sadece 1Gy ve 2Gy radyasyon dozu ile nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları arasındaki azalış anlamlı bulunmuş olup ( $p \leq 0,05$ , bkz. Şekil 4.41, Şekil 4.42), sadece radyasyon verilen dozlara göre nano alfa sepiyolit ile birlikte muamele edilen radyasyon dozlarında hücre içi ROS miktarları önemli derecede arttığı görülmüştür.

Bir diğer deneyde ise BEAS-2B ve A549 hücrelerinde DNA hasarının tespiti komet testi ile gerçekleştirilmiştir. Komet testi parametreleri olan kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti sadece 1Gy ve 2Gy radyasyon dozları ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları arasındaki artış anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ , bkz. Çizelge 4.11). Sadece radyasyon verilen dozlara göre nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyon verilen dozların hücredeki DNA hasarını önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir.

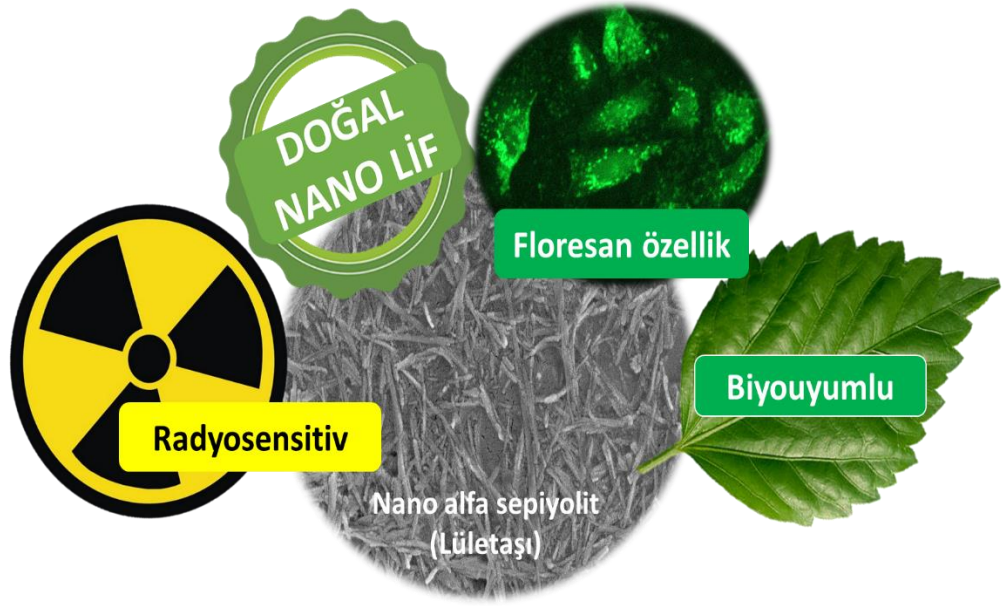
Tüm bu çalışmalar sonucunda nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun neden olduğu hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak için BEAS-2B ve A549 hücrelerinde Annexın-V testi gerçekleştirilmiş olup, bu yöntemi desteklemek için ikili boyama yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ise nano alfa sepiyolitinin neden olduğu hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak için BEAS-2B ve A549 hücre hatlarına Annexın-V testi uygulanmış olup, ikili boyama yöntemiyle elde edilen görüntüler ile kıyaslanmıştır. Her bir hücre hattına nano alfa sepiyolit ile birlikte radyasyonun 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları ile 24 saat muamelesi sonrasında Annexın-V testi gerçekleştirilmiştir.

Radyasyonla birlikte nano alfa sepiyolitinin çeşitli IC konsantrasyon grupları ile BEAS-2B hücrelerinin muamelesi sonucu sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.37, Şekil 4.38). Sitotoksitenin artması ile Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre sayısının benzer şekilde azaldığı görülmektedir (bkz. Çizelge 4.12). Buradaki doz artışına bağlı olarak toplam apoptotik hücre ölümüne bakıldığında büyüme kontrol ile 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu toplam apoptotik hücre ölümü anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ , bkz. Çizelge 4.12). BEAS-2B hücrelerinde tüm IC doz değerlerinin (1Gy hariç) hem erken apoptotik hücre ölümüne ve hemde geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.51, Şekil 4.52). Buradaki 1Gy ve 2Gy radyasyon dozu ile 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> dozları arasındaki doz artışına bağlı olarak hem erken apoptotik hücre ölümüne ve hemde geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.50, Şekil 4.51, Şekil 4.54, Şekil 4.55).

A549 hücrelerinde ise radyasyonla birlikte nano alfa sepiyolitinin çeşitli IC konsantrasyon grupları ile muamelesi sonucu sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.37, Şekil 4.38). Sitotoksitenin artması ile Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre sayısının benzer şekilde azaldığı görülmektedir (bkz. Çizelge 4.12). Buradaki doz artışına bağlı olarak toplam apoptotik hücre ölümüne bakıldığında büyüme kontrol ile 1Gy; 1Gy+IC<sub>6,25</sub>; 1Gy+IC<sub>12,5</sub>; 1Gy+IC<sub>25</sub> ve 2Gy; 2Gy+IC<sub>6,25</sub>; 2Gy+IC<sub>12,5</sub>; 2Gy+IC<sub>25</sub> doz değerleri kıyaslandığında dozların neden olduğu toplam apoptotik hücre ölümü anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

A549 hücrelerinde erken apoptotik hücre ölümünde ziyade geç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.54, Şekil 4.55). Annexin-V testinin verilerinin teyit edilmesi için, ikili boyama yöntemi ile morfolojik görüntüleme yapılmış olup, bulunan sonuçların birbirini doğrular nitelikte olduğu görülmüştür. (bkz. Şekil 4.57, Şekil 4.58).



**Şekil 5.1.** Nano alfa sepiyolit özellikleri

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda; ülkemizin unutulmaya yüz tutmuş ve çok dar anlamda kullanım alanına sahip yer altı kaynağı olan alfa sepiyolitten (lületaşı) geniş spesifik yüzey alanı, negatif elektrik yükü ve fibröz morfoloji gibi mükemmel özelliklere sahip nanoteknoloji çalışmalarında kullanılacak doğal nano lifler üretilmiştir (Şekil 5.1). Bu üretilen doğal nano liflerin yüksek dozlarda dahi düşük sitotoksik etki göstermesi nedeniyle biyoyumlu bir madde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu maddenin anti-kanser etkisi olmamakla birlikte sağlıklı hücrelere göre kanserli hücrelerde seçici bir özellik gösterdiği bulunmuştur. Nano alfa sepiyolit ve radyasyon birlikte kullanıldığında özellikle kanserli hücrelerde radyasyon duyarlılığını önemli derecede artırdığı görülmüştür. Bu nedenle nano alfa sepiyolit radyosensitiviteyi artırıcı önemli bir madde olduğu bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Siddiqui, M.A., Ahmad, J., Musarrat, J., AlKhedhairi, A.A. AlSalhi, M.S., Alrokayan, S.A. 2011.** Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*, 283: 101-108.
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S., Schlager, J., Hong, Y. 2008.** DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 233: 404–410.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B., Alhadlaq, H.A., 2010.** Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396: 578-583.
- Akca, Ç. 2015.** Eşek (*Equus Asinus* L. 1758) sütünün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin kanserli ve sağlıklı insan akciğer hücre hatları üzerine karşılaştırmalı olarak araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Akca, Ç., Çavaş, T., Çinkılıç, N., Gürler, O., Ayas, E., Vatan, Ö., Tarım, Ü., Huriyet, H. 2016.** Radyasyona karşı hafif, ekonomik zırh: Alfa-sepiyolit (lületaş). Türk Patent Enstitüsü, Patent Başvuru No:2016/01282.
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, A.M., Ahmad, J., Alrokayan, S.A. 2012.** Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 845–857.
- Akinci, O. 1998.** Geology and layered meerschaum formations in 124-C1 section of Eskişehir map. *General Directorate of Mineral Research and Exploration*, 215-224.
- Alcântara, A.C.S., Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. 2012.** Zein–Fibrous clays biohybrid materials. *Eur. J. Inorg. Chem.* 30: 5216-5224.
- Alcântara, A.C.S., Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. 2014.** Polysaccharide–fibrous clay bionanocomposites. *Appl. Clay Sci.*, 96: 2-8.
- Algan, E. 2015.** Eskişehir’de lületaş. *Anadolu Üniversitesi Sanat ve Tasarım Dergisi*, 8: 1-31.
- Algüneş, Ç. 2002.** Radyasyon Biyofiziği. Trakya Üniversitesi Yayınları, Edirne, No:51, 135 s.
- Alvarez, A. 1984.** Sepiolite: properties and uses, In: A. Singer and E. Galan, eds. Palygorskite-Sepiolite. Occurrences, Genesis and Uses, *Developments in Sedimentology*, Elsevier, 37: 253-287.
- Ambre, A. H. Katti, D. R. Katti, K. S. 2013.** Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymerscaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research A.*, 9: 2644-2660.

**Andrady, A.L. 2008.** Science and technology of polymer nanofibers. Wiley Press, New Jersey, 403 pp.

**Andronescu, E., Grigore, F., Tardei, C., Stefan, E. 2006.** Natural zeolites with medical applications-preliminary preparation and characterization. *Revista Medico: Chirurgicalaa Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi's*, 110: 236-241.

**Angur, G.E. 2016.** Çimento esaslı yapıştırıcı harçlarda sepiyolit katkılı malzeme geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Maden Mühendisliği Anabilim Dalı, Kütahya.

**Anonim, 1996.** List of MAK and BAT Values, 1996. report no:32, **Deutsche Forschungsgemeinschaft**, Weinheim.

**Anonim, 1997.** Sepiolite, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Summary of Data Reported and Evaluation, IARC (International Agency for Research on Cancer), Lyon, Fransa.

**Anonim, 2001a.** A Laboratory Manual for X-Ray Powder Diffraction (Sepiolite and palygorskite). U. S. Geological Survey (Amerika Jeolojik Araştırma Birimi) Open-File Report 01-041. U.S.A.

**Anonim, 2001b.** Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu Endüstriyel Hammaddeler Alt Komisyonu Genel Endüstri Mineralleri-II (Mika-Zeolit-Lületaşı) Çalışma Grubu Raporu. DPT, Ankara.

**Anonim, 2006.** Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation; BEIR VII Phase 2. Washington, DC., The National Academics Press. National Research Council. Washington, U.S.A.

**Anonim, 2012.** Ex-ternal Review Draft Nanotechnology white paper, Nanotechnology: Safety paradigms. J. Toxicol. Environ. Health Sci. 4: 1-12, U. S. Environmental Protection Agency (U. S EPA), Washington.

**Anonim, 2013.** Scientific Opinion on the safety and efficacy of a preparation of bentonite and sepiolite (To fin® Dry) as feed additive for all species. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). EFSA (European Food Safety Authority), Parma, Italy.

**Anonim, 2019a.** Pipo evi, <http://pipoevi.com/kisaca-luletasi-minerali-ve-luletasi-pipolar>, Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019b.** <http://www.dolsanmadencilik.com/home/content/urunler/sepiyolit>, Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019c.** Elektromanyetik spektrum. <http://www.electrosense.com.tr/sss/Iyonlastirici-radyasyon>-Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019d.** Trypan blue boyasının kullanımı. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15250061?SID=srch-srp-15250061#/15250061?SID=srch-srp-15250061>-Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019e.** Muse™ Count Viability Kit El Kitapçığı. [http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/4600-3373MAN%20\[B\]%20MCH100102%20&%20MCH600103%20MUSE%20COUNT%20&%20VIABILITY%20KIT%20USER'S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/4600-3373MAN%20[B]%20MCH100102%20&%20MCH600103%20MUSE%20COUNT%20&%20VIABILITY%20KIT%20USER'S%20GUIDE.pdf)-Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019f.** OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence). <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-342-ROS-assay-kit.pdf>-Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019g.** Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. [http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf)-Erişim tarihi:10.10.2019.

**Anonim, 2019h.** Sepiyolit. MTA.[http://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/sepiyolit-\(Erişim Tarihi:20.11.2019\)](http://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/sepiyolit-(Erişim%20Tarihi:20.11.2019)).

**Anshup, A., Venkataraman, J.S., Subramaniam, C., Kumar, R.R., Priya, S., Kumar, T.R.S., Onkumar, R.V., A. John, R.V., Pradeep, T. 2005.** Growth of gold nanoparticles in human cells. *Langmuir*, 21: 11562–11567.

**Avcı, Ç.B., Süslüer, Y.S., Şığva, D.Ö., Söğütü, F., Dünder, M., Gündüz, C. 2013.** Rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi, *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine*, 52(1): 7-14.

**Avérous, L., Pollet, E. 2012.** Environmental silicate nano-biocomposites. Springer, London, 447 pp.

**Avunduk E. 2011.** Mekanize tünel kazılarında adezyon problemi, Madencilikte Özel Konular – 1 İTÜ Maden Mühendisliği Bölümü Ders Notları, İstanbul.

**Aydın, S. 2010.** Arsenat (III) ve arsenit (v) iyonlarının modifiye edilmiş beydellit, zeolit ve sepiyolit mineralleri ile giderimi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Gebze, Kocaeli.

**Balcı, S., 1995.** Sepiyolitın ısı bozulması ve asit ön aktivasyonunun gözenek yapısı üzerine etkileri, Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, 21-22 Nisan 1995, İzmir, Türkiye.

**Balkan, R., 2006.** Bentonit, kaolin ve sepiyolitın bazı organik molekülleri absorplamasının infrared incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Eskişehir.

**Baykara, T., Günay, V., Kara, M., Günay, E., Sevinçtav, S., Çeşmeci, R., Mısırlı, Z. 1995.** Eskişehir (Sivrihisar) sepiyolitlerinin karakterizasyonu. İleri Seramikler Projesi, Sepiyolitlerin Değerlendirilmesi Alt Projesi Teknik Raporu, TÜBİTAK-MAM, İstanbul.

**Benli, B., Yalm, C. 2017.** The influence of silver and copper ions on the antibacterial activity and local electrical properties of single sepiolite fiber: A conductive atomic force microscopy (C-AFM) study. *Applied Clay Science*, 146: 449-456.

**Bhatt, I., Tripathi, B.N. 2011.** Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*, 82:308-317.

**Biaglow, J.E., Varnes, M.E., Clark, E.P., Epp, E.R., 1983.** The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. *Radiat Research*, 95: 437-455.

**Borm, P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E. 2006.** The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.*, 2(11): 1-35.

**Brauner, K., Preisinger, A. 1956.** Struktur und entstehung des sepioliths, *Tschermaks Mineralogische und Petrographische Mitteilungen*, 6: 120-140.

**Brigatti, M.F., Galan, E., Theng, B.K.G., 2006.** Structures and Mineralogy of Clay Minerals. In: Handbook of Clay Science, Editor(s): Bergaya F., Theng BKG, Lagaly G (ed), Elsevier, Amsterdam, pp. 19-86.

**Buie, B.F., 1983.** Meerschäum. In: Lefond, S.1., ed., Industrial Minerals and Rocks (Nonmetallcs Other Than Fuels), *Society of Mining Engineers*, 5: 909-913.

**Buzea, C., Blandino, I.P., Robbie, K. 2007.** Nanomaterials and nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2(4): 17-71.

**Çakıroğlu, B. 2015.** Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin poliakrilik asit esaslı nanofiber membran üzerine kovalent immobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.

**Campbell, K. T., Craig, D. Q. M., McNally, T. 2010.** Ibuprofenloaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) layered silicate nanocomposites prepared by hot melt extrusion, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21 (8): 2307-2316.

**Can, G. 1992.** Dünya'da ve Türkiye'de sepiyolitik kil. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*, 41: 166-170.

**Can, M.F. 2008.** Sepiyolit/Epoksi Nanokompozit üretimi ve karakterizasyonu, *Doktora Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Maden Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.

**Can, M.F., Çelik, M.S. 2010.** Nano-fiber yapılı sepiyolit in hazırlanması ve atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile boyut tayini, *İstanbul Teknik Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 9(3): 99-109.

**Carrano, A.V. 1975.** Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage. *Radiation Research*, 63: 403-421.

**Castro-Smirnov, F. A., Piétrement, O., Aranda, P., Bertran, J. R., Ayache, J., Cam, E. L., Ruiz-Hitzky, E., Lopez, S. B. 2016.** Physical interactions between DNA and sepiolite nanofibers, and potential application for DNA transfer into mammalian cells. *Scientific Report*, 6: 36341.

**Castro-Smirnov, F. A., Ayache, J., Bertrand, J.R., Dardillac, E., Le Cam E., Piétrement, O., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E., Lopez, B. S. 2017.** Cellular uptake pathways of sepiolite nanofibers and DNA transfection improvement. *Science Report*, 7(1): 5586.

**Çavaş, T., Könen, S. 2008.** In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90: 154-159.

**Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S. 2007.** Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *PNAS*, 104: 2050-2055.

**Çelik, M. ve Karakaya, N. 1998.** Sistematik Mineraloji, Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 434 s.

**Cervini-Silva, J., Ramírez-Apan, Teresa M., Kaufhold, S., Palacios E., Gomez-Vidales, V., Ufer, K., Angel, P., Montoya, A. 2017.** Cell growth underpinned by sepiolite. *Applied Clay Science*, 137: 77–82.

**Cervini-Silvaa, J., Nieto-Camachod, A., Ramírez-Apand, T. M., Gómez-Vidalese, V. 2015a.** Oxidative stress inhibition and oxidant activity by fibrous clays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133: 32-35.

**Cervini-Silvaa, J., Nieto-Camachod, A., Ramírez-Apand, T. M., Gómez-Vidalese, V., Palacios E., Montoyaf A., De Jesús R. E. 2015b.** Anti-inflammatory, anti-bacterial, and cytotoxic activity of fibrous clays. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 129: 1-6.

**Çetin, E., Çetin N. ve Küçük, O. 2011.** Toklularda karayolu ile taşımının oksidan antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2): 103-109.

**Çetişli, H. 1985.** Asetik asit ile n-bütanolün Eskişehir sepiyoliti üzerine esterleşmesi, *A.Ü. Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 2(1): 109-117.



- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C. 2006.** Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano. Lett.* 6: 662-668.
- Chithrani, B.D., Jelveh, S., Jalali, F., Van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P., Jaffray, D. A. 2010.** Gold Nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat. Res.* 173: 719-728.
- Chithrani, B.D., Stewart, J., Allen, C., Jaffray, D. A. 2009.** Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 5: 118-127.
- Çmar, M., Çelik, M.S. 2006.** Yüksek viskoziteli endüstriyel uygulamalarda sepiyolit in öğütme mekanizması. *İTÜ Mühendislik Dergisi*, 5(2): 68-78.
- Clarke, G.M. 1989.** Sepiolite: the Spanish mineral. *Ind. Clays*, 85.
- Colvin, V. L. 2003.** The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.*, 21(10): 1166-1170.
- Coşkun, M. 2013.** Fulleren nanopartiküllerinin radyasyona maruz bırakılan a549 insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerinin mikronükleus ve gh2ax test yöntemleri kullanılarak araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Dandy, A. J., Nadiye-Tabbiruka, M. S., 1975.** The effect of Heating in vacuo on the microporosity of sepiolite. *Clays and Clay Minerals*, 23: 428-430.
- Darvishi, Z. ve Morsali, A. 2010.** Synthesis and characterization of nano-sepiolite by solvothermal method. *Applied Surface Science*, 256: 3607-3611.
- Daşdemir, M. 2006.** Electrospinning of thermoplastic polyurethane (TPU) for producing nanofibers. *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Gaziantep.
- Demir, E., 2008.** Isıl işlemin bir bentonitin kation değiştirme kapasitesi, adsorpsiyonu, gözenekliliği, yüzey alanı ve yüzey asitliği gibi bazı fizikokimyasal özelliklerine etkisi, *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Denizeau, F., Marion, M., Chevalier, G., Cote, M.G. 1985.** Absence of genotoxic effects of nonasbestos mineral fibers. *Cell Biol. Toxicol.*, 1: 23-32.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010.** Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” yöntemi ile DNA hasar analizi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(2): 77- 89.
- Dizdaroğlu, M., 2012.** Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease, *Cancer Lett*, 327(1-2): 26-47.

**Doak, S.H, Griffiths, S.M, Manshian, B., Singh, N., Williams, P.M., Brown, A.P., Jenkins, G.J. 2009.** Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, 24: 285-293.

**Doğan, İ., Yar, A.T., Ergin, V., Menevşe, S., Menevşe, A., Ekmekçi, A. 2013.** L929 fibroblast hücre hattında topoizomeraz inhibisyonunun DNA onarımı ve apoptozis üzerine etkisi, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem)*, 38(2): 229–237.

**Doğan, M. 2001.** Sulu ortamda perlitin yüzey yükünün ve adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi. *Doktora tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

**Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., Borm, P.J.A. 2004.** Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.*, 61: 727-728.

**Ece, Ö.I, Çoban, F., 1994.** Geology, occurrence, and genesis of Eskişehir sepiolite, Turkey. *Clay and Clay Minerals*, 42: 81-92.

**Emül, E. 2016.** Elektrosipin tekniği ile nhap/jelatin/antikanserojen içeren nanofibril üretimi, karakterizasyonu ve hücre uyumunun araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.

**Erdem, A., Çubukçu, H. E., Congur, G., Karadeniz, H., Canavar, E. 2012.** Sensitive sepiolite-carbon nanotubes based disposable electrodes for direct detection of DNA and anticancer drug-DNA interactions. *Analyst*, 137(17): 4001-4004.

**Fahey, J.J., Axelrod, J.M., 1948.** Loughlinite, a new hydrous sodium magnesium silicate. *Am. Mineral.*, 33: 195.

**Feng, R., Zhang, Y., Li H. 2013.** Ultrasensitive electrochemical immunosensor for zeranol detection based on signal amplification strategy of nanoporous gold films and nanomontmorillonite as labels. *Analytica Chimica Acta*, 758: 72-79.

**Fernandes, F. M., Manjubala, I., Ruiz-Hitzky, E. 2011.** Gelatin renaturation and the interfacial role of fillers in bionanocomposites. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13: 4901-4910.

**Fischer, H.C., Chan, W.C., 2007.** Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*, 18: 565–571.

**Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. 1995.** DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, 453 s.

**Fubini, B., Ghiazza, M. Fenoglio, I. 2010.** Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*, 4: 347-363.

- Fukuda, K., Koshi, K., Kohyama, N., Myojo, T. 1988.** Biological effects of asbestos and its substitutes- fibrogenicity and carcinogenicity in mice and rats. *Environ. Res. Japan*, 93: 118.
- Galan, E., 1996.** Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays, *Clay Minerals*, 31: 443-453.
- Galan, E., Singer, A. 2011.** Developments in palygorskite-sepiolite research a new outlook on these nanomaterials. In *Developments in Clay Science 3*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Garcia-Romero, E. Suarez, M., 2013.** Sepiolite–palygorskite: Textural study and genetic considerations, *Applied Clay Science*, 86: 129-144.
- Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall’asta, V., Gazzola, G.C. 1998.** Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 46: 895-900.
- Governa, M., Valentino, M., Visona, L., Monaco, F., Amati, M., Scancarello, G., Scansetti, G. 1995.** In Vitro biological effects of clay minerals advised as substitutes for asbetos. *Cell Biol.Toxicol*, 11: 237-249.
- Gregg, S.J., Sing, K.S.W. 1982.** Adsorption surface area and porosity (2nd ed.). Academic Press, London, 303 pp.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008.** Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 73-78.
- Gurr, J.R., Wang, A. S.S., Chen, C.H., Jan, K.Y. 2005.** Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicol.*, 213: 66-73.
- Ha, J. U., Xanthos, M. 2011.** Drug release characteristics from nanoclay hybrids and their dispersions in organic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 414(1-2): 321– 331.
- Hall, E.J. 1988.** Radiobiology for the radiologist. 3 th ed. New York, 10-209.
- Hall, E.J., Giaccia, A.J. 2012.** Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia, PA, USA, 556 pp.
- Hansen, K., Mossman, B.T. 1987.** Generation of superoxide (O<sup>-</sup>) from alveolar macrophages exposed to asbestiform and nonfibrous particles. *Cancer Res.*, 47: 1681-1686.
- Hassan, M., A.S., Afify, Tulliani, J.M. 2016.** Synthesis of ZnO nanoparticles onto sepiolite needles and determination of their sensitivity toward humidity, NO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, *Journal of Materials Science & Technology*, 32: 573-582.

**Hatiboğlu, B. 2006.** Mechanical properties of individual polymeric micro and nano fibers using atomic force microscopy (AFM). *M.Sc. Thesis*, North Carolina State University Graduate School of Natural, Textile Engineering, Raleigh, North Carolina.

**Hunter, R. J., Preedy, V.R. 2011.** Nanomedicine in health and disease. Published by science publishers, an imprint of Edenbridge Ltd., İngiltere, 444 pp.

**Hunter, R.J. 1981.** Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications. Academic Press, London, 385 pp.

**İrkeç, A.T. 1992.** Kıbrısık (Bolu) sepiyolit oluşumlarının mineralojik-kimyasal özellikleri ve kökenine yaklaşım, *Yüksek Lisans tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Jeoloji Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

**İrkeç, T. 1991.** Bolu-Kıbrısık sepiyolitinin mineralojik ve kimyasal özellikleri ve Eskişehir-Sivrihisar sedimanter sepiyoliti ile karşılaştırılması. Ulusal Kil Sempozyumu, Eskişehir.

**İrkeç, T. 1995.** Endüstriyel hammaddeler tanım, perspektif ve Türkiye açısından önemi. MTA Doğal Kaynaklar ve Ekonomi Bülteni, Ankara.

**İrkeç, T. 1995.** Regresyondaki Türkiye madencilik sektörü için yeni bir umut: Sepiyolit. VII. Ulusal Kil Sempozyumu, Ankara.

**İrkeç, T. 1996.** Lületaş, tabakalı sepiyolit, atapulgit (paligorskit), DPT VII. Beş Yıllık Kalkınma Planı Özel İhtisas Komisyonu, Diğer Endüstri Mineralleri Çalışma Grubu Raporu, Ankara.

**Jiang, J.K., Oberdörster, G., Biswas, P. 2009.** Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal Nanopart Res*, 11: 77-89.

**Jones, B. F. ve Galan, E. 1988.** Sepiolite and palygorskite, in hydrous phyllosilicates, reviews in mineralogy. Editor(s): Bailey, S.W., Mineralogical Soc. America, Michigan, pp: 631-667.

**Karahalil, B. 2013.** Gıda endüstrisinde nanoteknolojinin kullanılması ve güvenlik sorunu. *Gazi Üniversitesi Gıda Dergisi*, 38(1): 39-46.

**Karlsson, H.L. 2010.** The comet assay in nanotoxicology research. *Anal Bioanal Chem.*, 398: 651-666.

**Kazimirova, A., Magdolenova, Z., Barancokova, M., Staruchova, M., Volkovova, K., Dusinska, M. 2012.** Genotoxicity testing of PLGA-PEO nanoparticles in TK6 cells by the comet assay and the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.*, 748: 42-47.

**Kıraç, F.S., Yüksel, D. 2001.** Radyasyon Biyolojisi. Gültürk Ofset Tanıtım Baskı, 162 s.

**Kıymet, T. 2013.** Mirisetin'in insan lenfosit DNA'sı üzerindeki radyoprotektif etkisinin incelenmesi. *Doktora Tezi*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

**Korkmaz Ş. 1987.** Doğal ve preslenmiş lületaşının bazı fiziksel özelliklerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mimarlık Mühendislik Fakültesi, Eskişehir.

**Koshi, K., Kohyama, N., Myojo, T., Fukuda, K. 1991.** Cell toxicity, hemolytic action and clastogenic activity of asbestos and its substitutes, *Industrial Health*, 29: 37-56.

**Kozanoğlu, G.S. 2006.** Elektrospinleme tekniğiyle nanofiber üretim teknolojisi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.

**Krug, H.F., Wick, P. 2011.** Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50: 1260-1278.

**Lemic, J., Tomasevic-Canovic, M., Djuricic, M., Stanic, T. 2005.** Surface modification of sepiolite with quaternary amines. *Journal of Colloid Interface Science* 292 (1): 11-19.

**Liu, P., Liu, W.M., Xue., Q.J. 2004.** In situ chemical oxidative graft polymerization of aniline from silica nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 87: 109–113.

**Lopez-Galindo, A., Sanchez Navas, A. 1989.** Morphological, cristallographical and geochemical criteria of the differentiation between sepiolites of sedimentary and hydrothermal origin. *Bol. Soc. Esp. Miner.*, 12:375-384.

**López-Pacheco, C. P., Antonio, N.C., Zarate-Reyes, L., García-Romero, E., Suárez, M., Kaufhold, S., García Zepeda, E., Cervini-Silva, J. 2017.** Sepiolite and palygorskite-underpinned regulation of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines as determined by a murine inflammation model. *Applied Clay Science*, 137(1): 43-49.

**Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K. A. 2008.** Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *PNAS.*, 105: 14265-14270.

**Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., CabaleiroLago, C., Dawson, K.A. 2007.** The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci*, 134-135: 167-174.

**Lynch, I., Dawson, K.A. 2008.** Protein-nanoparticle interactions. *NanoToday*, 3: 40-47.

- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., Van Schie, R.C.A.A., La Face, D.M, Green. D.R. 1995.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and abl. *J. Exp. Med.* 182: 1545-1556.
- Moore, M.N. 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int*, 32: 967–976.
- Morgan, W.F, Sowa, M.B. 2005.** Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *PNAS*, 102(40): 14127-14128.
- Mtijeivic, E. 2010.** Fine particles in medicine and pharmacy. Potsdam, Newyork, USA.
- Murray, H.H. 2000.** Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite A general overview mineral applications. *Applied Clay Science*, 17: 207-221.
- Murray, H.H. 1986.** Clays. In: Gerhartz, W., Yamamoto, YS., Campbell, F.T., Pfefferkorn, R. Rounsaville, J.F., eds, Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 7, 5th Ed., Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, pp. 109-136.
- Muthu, M.S., Singh, S. 2009.** Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine*, 4: 105-18.
- Nagy, B. S. and Bradley, W. F. 1955.** The structural scheme of sepiolite. *America Mineralogist*, 40: 885-892.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006.** Toxic potential of materials at the nano level. *Science.*, 311: 622-627.
- Niidome, T., Nakashima, K., Takahashi, H., Niidome, Y. 2004.** Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chem. Commun.*, 7(17): 1978–1979.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. 2005.** Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, 113: 823-839.
- Oberdorster, G., Stone, V., Donaldson, K. 2007.** Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology*, 1: 2-25.
- Oktay, B. 2015.** Elektrospin Tekniği ile Hazırlanan Biyopolimer Nanoliflerin Yüzey Modifikasyonları ve Uygulamaları. *Doktora Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Östling, O., Johanson, K.J. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res. Commun*, 123 (11): 291-298.

**Overbeeke R, Steffens-Nakken, H., Vermes., I, Reutelingsperger, C., Hanen, C. 1998.** Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115.

**Özalpan, A. 2001.** Temel Radyobiyojoloji. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 353 s.

**Pak, Y. 2001.** Radyasyon onkolojisi ve radyoterapi kavramları, Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Yıllığı, Cilt:1, Sayı:2.

**Park., S, Lee, Y.K., Jung, M., Kim, K.H., Chung, N., Ahn, E.K., Lim, Y., Lee, K.H. 2008.** Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol.*, 19(1): 59-65.

**Pavelić, K., Hadžija, M., Bedrica, L. 2001.** Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 78: 708-720.

**Pietrement, O., Castro-Smirnov, F.A., Le Cam, E., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E., Lopez, B.S. 2018.** Sepiolite as a new nanocarrier for DNA transfer into mammalian cells: proof of concept, issues and perspectives. *Chemical Record*, 18: 849-857.

**Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., Marcos, R. 1999.** Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res.*, 441(1): 115-27.

**Pogue, A.I., Jones, B. M., Bhattacharjee, S., Percy, M. E., Zhao, Y., Lukiw, W. J. 2012.** Metal-Sulfate induced generation of ROS in human brain cells: detection using an isomeric mixture of 5- and 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Carboxy-DCFDA) as a cell permeant tracer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 9615-9626.

**Pott, F., Roller, M., Rippe, RM., Germann, P.G., Bellmann, B. 1991.** Tumours by the intraperitoneal and intrapleural routes and their significance for the classification of mineral fibres. Editor(s): Brown, RC., Hoskins, IA. & Johnson, N.F., Mechanisms in Fibre Carcinogenesis, New York, Plenum Press, pp: 547-565.

**Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Lim, T.C., Ma, Z. 2005.** An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 381 pp.

**Rasdtogi, I.D. 2012.** Nanotechnology: Safety paradigms. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* 4: 1-12.

**Risom, L., Moller, P., Loft, S. 2005.** Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*, 592: 119-37.

**Rödelsperger, K., Brückel, 8., Manke, J., Voitowitz, H.J., Pott, F. 1987.** Potential health risks from the use of fibrous mineral absorption granulates. *Br. J. ind. Med.*, 44: 337-343.

- Rodriguez-Rojas, A., Radek, R., Rodriguez-Beltran, J., Blazquez, J., Rolff, J. 2017.** Clay-induced DNA double-strand breaks underlay genetic diversity, antibiotic resistance and molecular basis of asbestosis. *Scientific Reports*, 8: 8504.
- Roduner, E. 2006.** Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.*, 35: 583-592.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. 1991.** An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Meth.* 142: 257-265.
- Rudin, C.M., Thompson, C.B. 1997.** Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med.*, 48: 267-281.
- Ruiz-Hitzky, E., Darder, M., Aranda, P., del Burgo, M. Á. M., del Real, G. 2009.** Bionanocomposites as new carriers for influenza vaccines. *Adv. Mater.* 21: 4167–4171.
- Ruiz-Hitzky, E., Fripiat, J.J. 1976.** Organomineral derivatives obtained by reacting organochlorosilanes with the surface of silicates in organic solvents. *Clays & Clay Minerals*, 25: 25-3.
- Russell, A. 1991.** Specialty clays: market niches taken by unique properties. *Ind. Miner.*, 285: 49-61.
- Sabah, E. ve Çelik M.S. 1999.** Sepiyolit: özellikleri ve kullanım alanları. 3. Endüstriyel Ham maddeler Sempozyumu, İzmir.
- Sabah, E., 1998.** Çeşitli amin türleri kullanılarak sepiyolitın adsorpsiyon mekanizmasının açıklanması. *Doktora Tezi*, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Sabah, E., Turan, M., Celik, M. S. 2002.** Adsorption mechanism of cationic surfactants onto acid- and heat-activated sepiolites, *Water Research*, 36, 3957-3964.
- Sachs, R.K., Chen, P.L., Hahnfeldt, P.J., Hlatky, L.R. 1992.** DNA damage caused by ionizing radiation. *Math. Biosci.*, 112: 271-303.
- Santaren, J. 1993.** Sepiolite: a mineral thickener and rheology additive, *Modern Paint and Coatings*, 98-72.
- Sarıkaya, Y., Biçer, C., Biçer, N. 1985.** Asit aktivasyonu ile killerin fizikokimyasal özelliklerinin değişimi. II.Ulusal Kil Sempozyumu, Ankara.
- Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z. 2011.** Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 68(4): 241-252.
- Şenol, F., Tayyar, E., Doğan, G. 2005.** Nanofiberler ve uygulama alanları. *Maraton*, 3: 20-25.



- Serna, C. J., Vanscoyoc, G. E. 1978.** Infrared study of sepiolite and palygorskite surfaces, Proceedings of the Int. Clay Conference, Elsevier, Amsterdam, pp: 197-206.
- Serratos, J.M. 1979.** Surface properties of fibrous clay minerals (palygorskite and sepiolite). Proc. Intern. 6th Clay Conf., Oxford, 1978.). M.M. Mortland & V.C. Farmer, (Eds.) (99-109), Elsevier, Amsterdam.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., Sastry, M. 2005.** Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21: 10644–10654.
- Silva, J.C., Camacho, A.N., Vidales, V.G. 2015a.** Oxidative stress inhibition and oxidant activity by fibrous clays. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 133(1): 32-5.
- Silva, J.C., Camacho A.N., Vidales V.G., Kaufhold, S., Benny K.G., 2015b.** Theng The anti- inflammatory activity of natural allophane. *Applied Clay Science*, 105 (106): 48– 51.
- Singer, A. ve Galan, E. 1984.** Palygorskite-Sepiolite: Occurences, genesis and uses. Elsevier, 352 s.
- Singh, N., Mansian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J. 2009.** Nanogenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3894-3914.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175(1): 184-91.
- Slamova, R., Trckova, M., Vondruskova, H., Zraly, Z., Pavlík, I., 2011.** Clay minerals in animal nutrition. *Applied Clay Minerals*, 51: 395-398.
- Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D. Eaton, J.W., Tang L. 2010.** Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent, *Particle and Fibre Toxicology*, 7: 22.
- Solhi, L. Atai, M. Nodehi, A. Imani, M. Ghaemi, A. Khosravi, K. 2012.** Poly(acrylic acid) grafted montmorillonite as novel fillers for dental adhesives: synthesis, characterization and properties of the adhesive. *Dental Materials*, 28(4): 369-377.
- Song, M.F., Li, Y.S., Kasai, H., Kawai, K., 2012.** Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *J Clin Biochem Nutr.* 50: 211-216.
- Stockmann-Juvala, H. 2014.** Risk management in the construction industry-derivation of occupational exposure limit values for nanomaterials. Nano Tox. Conference, April 23-26, Turkey.

**Stone, V., Johnston, H., Clift, M.J. 2007.** Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 6: 331-340.

**Suárez, García-Romero, M.E. 2012.** Variability of the surface properties of sepiolite. *Applied Clay Science*, 67: 72-82.

**Süpüren, G., Kanat, Z.E., Çay, A., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I. 2007.** Nano Lifler (Bölüm 2). *Tekstil ve Konfeksiyon Dergisi*, 2: 83-89.

**Tabakçıoğlu, K. 2013.** Mirisetin'in insan lenfosit DNA'sı üzerindeki radyoprotektif etkisinin incelenmesi, *Doktora Tezi*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

**Tang, O., Wang, F., Tang, M., Liang, J., Ren, C. 2012.** Study on pore distribution and formation rule of sepiolite mineral nanomaterials. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials*, Volume 2012, Article ID 382603, 6 pages doi:10.1155/2012/382603.

**Taşlıgil, N., Şahin, G. 2011.** Doğal ve Kültürel Özellikleriyle Lületaşı. *The Journal of International Social Research*, 4 (16).

**Tekin, G. 2004.** Perlit ve Sepiyolit'in amonyum hepta molibdat ile modifikasyonu ve elektrokinetik özellikleri, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6: 2.

**Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C., 1998.** Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 4: 757.

**Thrall, J.H., 2004.** Nanotechnology and medicine. *Radiology*, 230: 315-8.

**Toledo-Magana, Y. Flores-Santos, L., De Oca G. M., González-Montiel A., Laclette, J.-P., Carrero, J. C. 2015.** Effect of clinoptilolite and sepiolite nanoclays on human and parasitic highly phagocytic cells, *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 12.

**Toplan, Ş.S. 2016.** İyonize radyasyonun biyolojik etkileri, Biyofizik ders kitabı, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

**Toprakezer, F. 2009.** Nanokompozit sentezinde kullanılacak na-bentonit kilinin saflaştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Adana.

**Tunçdilek, N. (1955).** Lületaşı, *Türk Coğrafya Dergisi*, 12:13-14.

**Türkyılmaz, A. 2005.** Sepiyolit'in elektrokinetik özellikleri ve bakır adsorpsiyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

- Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis Ders Notları. Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>, (Erişim tarihi: 20.10.2019).
- Ulukaya, E. 2010.** Hücre siklusu ve apoptozis: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>. (Erişim tarihi: 20.10.2019).
- Ürersoy, T. 1989.** Beyaz Altın festivali, Beyaz Altın Kongresi Notları, Eskişehir Valili Yayınları, 67, Eskişehir.
- Varanda, E.A., Tavares, D.C. 1998.** Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J. Venom. Anim. Toxins*, 4: 5-21.
- Vicente Rodriguez, M.A., Lopez Gonzalez, J.D., Banares Munoz, M.A. 1994.** Acid activation of a spanish sepiolite, physicochemical karakterizatio, free silica content and surface area of the solids obtained, *Clay Minerals*, 29:361-367.
- Wagner, L.C., Griffiths, D.M., Munday, D.E. 1987.** Experimental studies with palygorskite dusts. *Br. J. ind. Med.*, 44: 749-763.
- Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., De Ridder, M. 2019.** Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)*, 11(1): 112.
- Weaver, C.E., Pollard, L. 1973.** The Chemistry of Clay Minerals, Elsevier, Amsterdam.
- Weislow, O.S., Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. 1989.** New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81: 577-586.
- Wicklein, B., Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. 2011.** Phospholipid–Sepiolite Biomimetic Interfaces for the Immobilization of Enzymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 3: 4339-4348.
- Wicklein, B., Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. 2010.** Bio-organoclays based on phospholipids as immobilization hosts for biological species. *Langmuir*, 26: 5217–5225.
- Xie, S., Zhang, S., Wang, F., Yang, Egu’ela, M.R.S., Lefebvre, J.M. 2007.** Preparation, structure and Thermo mechanical properties of nylon-6 nanocomposites with lamella-type and fiber-typesepiolite. *Composites Science and Technology*, 67: 2334–2341.
- Yariv, S., Cross, H., Michaelian, K. H. 2002.** Structure and surface acidity of clay minerals. In *Organo-clay complexes and interactions*, New York Basel: Marcel Dekker, Inc., pp: 1-38.
- Yeniyol, M. 1992.** Yenidoğan (Sivrihisar) sepiyolit yatağının jeolojisi, mineralojisi ve oluşumu, *MTA Dergisi*, 114: 71-84.

**Yeniyol, M., Öztunalı, Ö. 1985.** Yunak sepiyolitinin mineraloji ve oluşumu. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. II.Ulusal Kil Sempozyumu Bildiriler, Ankara.

**Yılmaz, İ. 2005.** Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikozektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

**Yılmaz, Y. 2007.** Eskişehir yöresi sepiyolitinin termal özelliklerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

**Yılmaz, Z. 2011.** Elektrospınleme yöntemiyle elde edilen poliüretan nanofiberler üzerinde sistem parametrelerinin analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

**Yurdakoç, M.K., Güzel, F., Tez, Z. 1989.** KDK ve belirleme yöntemleri. IV. Ulusal Kil Sempozyumu, Sivas.

**Zarkovic, N., Zarkovic, K., Kraljetic, M. 2003.** Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite. *Anticancer Research*, 23: 1589-1595.

**Zembruski, N.C.L., Stache, V., Haefeli, E.W., Johanna, Weiss, J. 2012.** 7-Aminoactinomycin-D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 429: 79-81.

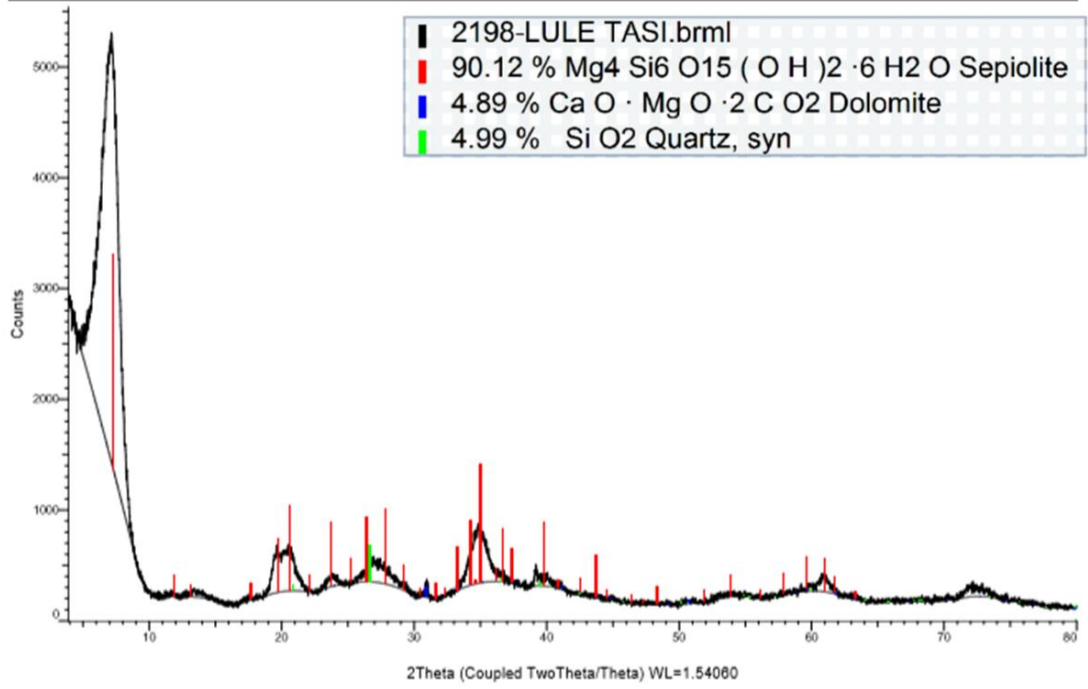
**Zhang, Y.C., Wu, X., Hu, X.Y., Guo, R. 2005.** Low-temperature synthesis of nanocrystalline ZnO by thermal decomposition of a green single-source inorganic precursor in air. *Journal of Crystal Growth*, 250–254.

## **EKLER**

- EK 1** Alfa Sepiyolit'in XRD Analizi (Afyon Kocatepe Üniversitesi)  
**EK 2** Alfa Sepiyolit'in XRF Analizi (Afyon Kocatepe Üniversitesi)  
**EK 3** Beta Sepiyolit'in Bir Çeşidi Olan Alüminyumlu Sepiyolit

## EK 1 Alfa Sepiyolitin XRD Analizi (Afyon Kocatepe Üniversitesi)

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)



## EK 2 Alfa Sepiyolitin XRF Analizi (Afyon Kocatepe Üniversitesi)

### Test / Analiz Raporu

Test / Analysis Report

Bilgi İçindir

Sayfa 2/2

Page 2/2

Numune Adı: Lületaş

Sample Name

ANALİZ Analysis	SONUÇLAR Results	TEST / ANALİZ METODU Test / Analysis Method
*XRF Yöntemiyle Kimyasal Analiz (Chemical Analysis by XRF)		TS EN 15309
	SiO <sub>2</sub> %	51,8000
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	0,0994
	CaO %	0,7930
	MgO %	25,9000
	Na <sub>2</sub> O %	0,3940
	K <sub>2</sub> O %	0,0356
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	0,4750
	NiO %	0,2480
	SO <sub>3</sub> %	0,1020
	A.Z. (LOI) %	20,2000

Bu raporda (\*) şeklinde işaretlenmiş test / analiz sonuçları TÜRKAK tarafından akreditedir.  
In this report (\*) marked test / analysis results accredited by Turkish Accreditation Agency (TÜRKAK)

Laboratuvar Şefi  
Chief of Laboratory

Gediz EMEK

Çevre Şartları / Environmental Conditions

Sıcaklık / Temperature, °C : 22,2  
Rutubet / Moisture, % : 55,0

Sonuçlar, sadece deneyi yapılan numuneye aittir.  
The results belong to the tested sample only.

### EK 3 Beta Sepiyolitin Bir Çeşidi Olan Alüminyumlu Sepiyolit, Dolsan Kimya

2018- 9- 4 05:40

SQX Calculation Result							
Sample : BEYAZ SEPIYOLIT				Date analyzed : 2018- 8-10 02:15			
Application : GENEL PROGRAM Model : Bulk				Balance :			
Flux: Li2B4O7		Ratio: 10.0000		Matching library:		File : BEYAZ SEPIYOLIT	
No.	Component	Result	Unit	Det.limit	El.line	Intensity	w/o normal
1	Na2O	0.4367	mass%	0.12038	Na-KA	0.0566	0.4484
2	MgO	0.2322	mass%	0.09254	Mg-KA	0.0917	0.2384
3	Al2O3	36.8034	mass%	0.22579	Al-KA	61.2843	37.7831
4	SiO2	49.7425	mass%	0.08511	Si-KA	78.3957	51.0665
5	P2O5	0.0800	mass%	0.01044	P -KA	0.3740	0.0822
6	SO3	2.4604	mass%	0.01998	S -KA	8.2188	2.5258
7	K2O	0.0824	mass%	0.01090	K -KA	0.8458	0.0846
8	CaO	0.1589	mass%	0.01515	Ca-KA	1.3550	0.1631
9	TiO2	1.5571	mass%	0.03739	Ti-KA	5.6470	1.5985
10	Cr2O3	0.0541	mass%	0.01799	Cr-KA	0.5701	0.0555
11	Fe2O3	0.8923	mass%	0.01204	Fe-KA	22.7274	0.9160
12	A.Z.	7.5000	mass%				7.5000



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Çetin AKCA
Doğum Tarihi	01.02.1985
Yabancı Dil	İngilizce
Medeni Durumu	Evli
İletişim (e -posta)	<a href="mailto:cakca16@gmail.com">cakca16@gmail.com</a>
Öğrenim Durumu	
2015- 2020	<b>Doktora</b> Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı
2012- 2015	<b>Yüksek Lisans</b> Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı
2003-2008	<b>Lisans</b> Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü
1999-2003	<b>Lise</b> Göl Anadolu Öğretmen Lisesi
Çalıştığı Kurum	Uçucu Sağlık Araştırma ve Eğitim Merkezi Başkanlığı

### Yayınları

### Patentler ve Makaleler

**Akca C., Vatan O., Yılmaz D., Huriyet H., Cinkilic N., Cavas T. 2019.** In vitro cytotoxic and genotoxic effects of donkey milk on lung cancer and normal cells lines. *Czech J. Food Sci.*, 37: 00–00

**Akca, Ç., Çavaş, T., Tarım, Ü.A., Ayas, E., Çinkılıç, N., Gürler, O., Vatan, Ö., Huriyet, H. Gergin, B., Arıkan, H.S. 2016.** Radyasyona Karşı Hafif, Ekonomik Zırh: Alfa-Sepiyolit (Lületaş). Patent No: TR 2016 01282 B, Tescil tarihi: 2019-03-21, Erişim adresi: Türk Patent Enstitüsü.

**Akca, Ç., Çavaş, T., Çinkılıç, N., Gürbüz, O., Huriyet, H., Yılmaz, D., Pehlivan, E., Turan, H., Vatan, Ö. 2015.** Akciğer Kanseri Tedavisinde Doğal Bir Madde: Kolofan. Patent No: TR 2015 03361 B, Tescil tarihi: 2017-01-23, Erişim adresi: Türk Patent Enstitüsü.

**Akca, Ç., Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Huriyet, H., Mert, E. Deliacı, İ., Karaaslan, R., Yılmaz, A.E. 2015.** Kanser tedavisinde doğal bir kokteyl: Eşek sütü. Patent No: TR 2015 11195 B, Tescil tarihi: 2017-11-21, Erişim adresi: Türk Patent Enstitüsü.

### **Poster Sunumları**

**Akca, Ç., Çavaş, T., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Çinkılıç, N. Huriyet, H. 2015.** In Vitro Cytotoxic and Genotoxic Effects of Colophony on Cancerous (A549) and Healthy (BEAS-2B) Lung Cell Lines. Molecular Medicine Tri-Conference, 15-20 February 2015, Poster presentation.

**Akca, Ç., Çavaş, T., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Çinkılıç, N. 2014.** Eşek (*Equus asinus* L. 1758) Sütünün Sitotoksik Etkisinin Kansersiz ve Sağlıklı İnsan Akciğer Hücre Hatları Üzerine Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması. IV. Bilgilendirme ve AR-GE günleri, 11-13 Kasım 2014, Bursa, En iyi Poster ödülü.

### **Kurslar**

**Deney Hayvanı Kullanım Kursu. 2018.** Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK). 12-23 Kasım 2018. BURSA.

**Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells Course. 2015.** Cambridge Healthtech Institute, 15-20 February 2015, Moscone North Convention Center, San Francisco, CA, USA.