

**BAKIR-ÇİNKO ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İN  
VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ümit KUMBIÇAK**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKIR-ÇİNKO ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İN VİTRO  
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ümit KUMBIÇAK**

Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2013  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ ONAYI

Ümit KUMBIÇAK tarafından hazırlanan “Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

**Başkan:** Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye:** Prof. Dr. Ayla ÇELİK  
Mersin Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye:** Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye:** Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER  
Uludağ Ü. Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**

**Enstitü Müdürü**

**. .2013**

**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 yararlanılması 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.**

.../.../. 2013

**Ümit KUMBIÇAK**

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAKIR-ÇİNKO ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Ümit KUMBIÇAK**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Bu çalışmada Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin BEAS-2B insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerin belirlenmesi için XTT ve klonojenik test kullanılmıştır. Genotoksik etkiler ise mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX fokus testleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, apoptotik ve nekrotik etkiler ile ROS oluşumunun belirlenmesi için M30, M65 ve ROS testleri uygulanmıştır.

Deneylemlerden önce, kullanılan nanopartikül süspansiyonunun karakterizasyonu için zeta potansiyeli, DLS ve TEM analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. XTT ve Klonojenik testler için BEAS-2B hücreleri 24 saat süresince 0,1 ile 100  $\mu$ g/ml değişen dozlarda Cu-Zn alaşım nanopartiküllerine maruz bırakılmışlardır. Elde edilen IC50 değerine (4,66  $\mu$ g/ml) dayanarak genotoksisite testlerinde kullanılacak dozlar (0,1-3,2  $\mu$ g/ml) belirlenmiştir.

Çalışılan süspansiyonun karakterizasyonu sonucunda zeta potansiyeli -22 mV ve ortalama partikül büyüklüğü de 200 nm olarak belirlenmiştir. TEM analizlerinde ayrıca Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin sitoplazma içerisinde lokalize olduğu belirlenmiştir. Mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX fokus testlerinin sonucunda Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin kromozomal hasarlar yanında tek ve çift iplik DNA kırıklarına yol açtığı belirlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen M30:M65 oranları ise hücre ölümünün ağırlıklı olarak nekroz yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca, elde ettiğimiz bulgular gözlenen sitotoksik ve genotoksik etkilerden hücre içi ROS oluşumunun sorumlu olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanotoksikoloji, Bakır-Çinko alaşım nanopartikülleri, BEAS-2B hücreler, Sitotoksisite, Genotoksisite.

2013, x + 114 sayfa.

## ABSTRACT

PhD Thesis

### ASSESSMENT OF IN VITRO CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF COPPER-ZINC ALLOY NANOPARTICLES

**Ümit KUMBIÇAK**

Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr Tolga ÇAVAŞ

In the present study, cytotoxic and genotoxic effect of copper-zinc (Cu-Zn) alloy nanoparticles on BEAS-2B human epithelial cells were evaluated. XTT test and clonogenic assay were used to determine cytotoxic effects. Genotoxic effects were evaluated using micronucleus, comet and  $\gamma$ -H2AX foci assays. Furthermore, M30, M65 and ROS assays were applied to evaluate apoptotic and necrotic effects as well as intracellular reactive oxygen species formation, respectively.

Before the experiments, characterization of the nanoparticle suspension was carried out using zeta potential, DLS and TEM analyses. For XTT and clonogenic assays, BEAS-2B cells were exposed the different concentrations (0,1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) of Cu-Zn alloy nanoparticles. Based on the determined IC50 value (4,66  $\mu\text{g/ml}$ ), concentrations to be used in genotoxicity experiments (0,1-3,2  $\mu\text{g/ml}$ ) were determined.

Characterization of the studied suspension showed that the zeta potential was  $-22$  mV and the average size was 200 nm. TEM analyses further revealed the intracellular localization of Cu-Zn alloy nanoparticles in cell cytoplasm. Analysis of micronucleus, comet and  $\gamma$ -H2AX foci frequencies showed that exposure to Cu-Zn alloy nanoparticles induced chromosomal damage as well as single and double stranded DNA damage in BEAS-2B cells. Evaluation of M30:M65 ratios suggest that cell death was predominantly due to necrosis. Our results further indicated that increased intracellular ROS formation could be responsible from the observed cytotoxic and genotoxic effects.

**Keywords:** Nanotoxicology, Copper-Zinc alloy nanoparticles, BEAS-2B cells, Cytotoxicity, Genotoxicity.

**2013, x + 114 sayfa.**

## TEŞEKKÜR

Bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Doktora eğitimim süresince, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a

Deney aşamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Özgür VATAN'a, Arş. Gör. Dilek YILMAZ, Mümün COŞKUN ve Özgün TEKSOY'a,

Bütün bu zahmetli süreçte hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Zübeyde KUMBIÇAK ve varlığı ile motivasyonumu arttıran sevgili kızım Gülsena KUMBIÇAK'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, "U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı" tarafından KUAP (F-2012/61) nolu Bilimsel Araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

**Ümit KUMBIÇAK**  
.../.../2013

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller .....	4
2.1.1. Tanımı ve tarihçesi .....	4
2.1.2. Metal nanopartiküller .....	6
2.1.3. Metal alaşım nanopartiküller .....	7
2.2. Nanotoksikoloji .....	8
2.2.1. Nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri .....	9
2.2.2. Nanopartiküllerin hücre içi ROS oluşumundaki rolü .....	13
2.2.3. Apoptoz ve nekroz .....	16
2.3. Nanopartiküllerin Genotoksitesini Etkileyen Faktörler .....	19
2.3.1. Partikül boyutu ve yüzey alanı .....	20
2.3.2. Agregasyon ve aglomerizasyon .....	21
2.3.3. Zeta Potansiyeli .....	22
2.3.4. Partikül şekli ve kristal yapısı .....	23
2.3.5. Yüzey kimyası ve yüzey reaktivitesi .....	23
2.4. Toksikite Testleri .....	24
2.4.1. Sitotoksikite testleri .....	25
2.4.2. Genotoksikite testleri .....	27
2.4.3. M30 ve M65 testleri .....	35
2.4.4. Enzimatik Analizler .....	37
2.5. Metal ve Metal Alaşım Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri .....	39
3. MATERYAL ve METOT .....	43
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler ve Çözeltiler .....	43
3.2. Çözeltiler .....	45
3.3. Deney Planı .....	49
3.3.1. Bakır-çinko metal alaşım nanopartikül kolloidlerinin karakterizasyonu.....	49
3.3.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı .....	51
3.3.3. Bakır-çinko metal alaşım nanopartiküllerin hücre içine alımı .....	52
3.3.4. Kontrol ve doz grupları .....	52
3.3.5. Sitotoksikite testlerinin yapılması .....	54
3.3.6. Genotoksikite testlerinin yapılması .....	57
3.3.7. Nanopartikülün neden olduğu hücre ölüm yolağının M30 ve M65 testleri ile belirlenmesi .....	62
3.3.8. Olası etki mekanizmalarının hücre içi ROS analizleri ile belirlenmesi .....	65
4. BULGULAR .....	68
4.1. Karakterizasyon İle İlgili Bulgular .....	68



4.2.	Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Hücre İçine Alınması .....	69
4.3.	Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Hayatta Kalış (%Canlılık) Oranına etkisi .....	70
4.3.1.	Klonojenik test bulguları .....	70
4.3.2.	XTT test bulguları .....	71
4.4.	Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri .....	73
4.4.1.	Mikronükleus testi bulguları .....	72
4.4.2.	Komet testi bulguları .....	76
4.4.3.	$\gamma$ -H2AX fokus testi bulguları .....	81
4.4.4.	M30 testi ve M65 testi bulguları .....	82
4.3.5	ROS testi bulguları .....	86
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	88
	KAYNAKLAR.....	100
	ÖZGEÇMİŞ.....	113

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

Ag  
Al  
A431  
A549  
BEAS-2B  
°C  
-COOH  
Caco-2  
Cu  
Cu-Zn  
ZnO  
DNA  
Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
HEp-2  
HepG-2  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
KCl  
O<sub>2</sub>  
1O<sub>2</sub>  
OH<sup>•</sup>  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>  
-OH  
SiO<sub>2</sub>  
V  
Zn

### Açıklamalar

Gümüş  
Alüminyum  
İnsan epidermal hücre hattı  
İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı  
Sağlıklı insan akciğer bronşial epitel hücre hattı  
Santigrad Derece  
Karboksil grubu  
Kolon kanseri hücre hattı  
Bakır  
Bakır-Çinko alaşım nanopartikülü  
Çinko oksit  
Deoksiribonükleik Asit  
Demir oksit  
Solunum yolu epitel hücre hattı  
İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı  
Hidrojen peroksit  
Potasyum klorür  
Oksijen molekülü  
Singlet oksijen  
Hidroksil radikali  
Süperoksit anyonu (radikali)  
Hidroksil grubu  
Silisyum oksit  
Volt  
Çinko

### Kısaltmalar

ATCC  
Cyt-B  
ÇBİ  
ÇZK  
DAPI  
ELISA  
DLS  
DMSO  
DNA  
DNH  
EDTA  
EtOH  
GSH  
H2AX

### Açıklama

American Type Culture Collection  
(Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)  
Sitokalsin-B  
Çekirdek Bölünme İndeksi  
Çift Zincirli DNA Kırığı  
4',6-diamidino-2-fenilindol  
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi  
Dimetil Sülfoksit  
Deoksiribo Nükleik Asit  
Dört Nükleuslu Hücre  
Etilen Diamin Tetra Asetikasit  
Etanol  
Glutasyon  
H2A histon varyantı

$\gamma$ -H2AX	H2AX histonunun fosforillenmiş hali
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ g/ml	Mikrogram / mililitre
MI	Bir çekirdekli hücrelerin sayısı
MII	İki çekirdekli hücrelerin sayısı
MIII	Üç çekirdekli hücrelerin sayısı,
MIV	Dört çekirdekli hücrelerin sayısı
MN	Mikro Nükleus
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tuzlu Fosfat Tamponu)
PE	Petri kaplama etkinliği
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SF	Sağkalım fraksiyonu
SOD	Süperoksit dismutaz
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopisi
TZK	Tek Zincirli DNA Kırığı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1.	Nanoobjelerin ISO tanımı .....	5
Şekil 2.2.	Nanopartiküllerin hücreye etki şeması .....	10
Şekil 2.3.	Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin interfaz evresindeki olası etkileri .....	11
Şekil 2.4.	Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin metafaz evresindeki olası etkileri .....	12
Şekil 2.5.	Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin anafaz ve telofaz evresindeki olası etkileri .....	12
Şekil 2.6.	Nanopartiküllerin neden olduğu oksidatif stres ve toksik sonuçları .....	14
Şekil 2.7.	Nanopartiküllere bağlı toksisitenin oksidatif yolağı .....	15
Şekil 2.8.	Apoptoz (2-6) ve nekrozda (7 ve 8) yapısal değişiklikler .....	18
Şekil 2.9.	Parçacık boyutunun bir fonksiyonu olarak yüzey molekülleri .....	21
Şekil 2.10.	Agregat ve aglomeratlar .....	22
Şekil 2.11.	Nanopartiküllerin yüzey reaktivliği .....	24
Şekil 2.12.	XTT tetrazolium ve formazan .....	27
Şekil 2.13.	Mikronükleus oluşumuna yol açan farklı mekanizmalar .....	28
Şekil 2.14.	Komet testi aşamaları .....	31
Şekil 2.15.	$\gamma$ -H2AX histonunun kromatin içerisindeki görünümü H2AX histonunun kromatin içerisindeki görünümü .....	32
Şekil 2.16.	$\gamma$ -H2AX fosforilasyonunun immünofloresan analizi .....	34
Şekil 2.17.	M30 test kitinin çalışma mekanizması .....	35
Şekil 2.18.	M65® Elisa testi ile nekrozun belirlenmesi .....	36
Şekil 2.19.	DCF testinin mekanizması .....	38
Şekil 4.1.	Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin TEM görüntüleri .....	68
Şekil 4.2.	BEAS-2B hücrelerinden alınan enine kesitlerde agregat oluşturmuş halde sitoplazmada bulunan Cu-Zn nanopartiküllerinin genel görüntüleri .....	69
Şekil 4.3.	Klonojenik test sonucu oluşan kolonilerin petri ve mikroskopik görüntüsü .....	70
Şekil 4.4.	Klonojenik test sonucu belirlenen (%) canlılık oranları .....	71
Şekil 4.5.	XTT testi sonucu belirlenen % canlılık oranları .....	72
Şekil 4.6.	MN testi bulguları .....	73
Şekil 4.7.	MN testi preparatlardan elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri .....	75
Şekil 4.8.	MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları .....	76
Şekil 4.9.	Komet testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örneği ..	77
Şekil 4.10.	Komet testi kuyruk uzunluğu ( $\mu$ m) değerleri .....	78
Şekil 4.11.	Komet testi kuyruk %DNA değerleri .....	79
Şekil 4.12.	Komet testi olive kuyruk momenti değerleri .....	80
Şekil 4.13.	$\gamma$ -H2AX fokus oluşumları .....	81
Şekil 4.14.	Her doz grubu için hücre başına düşen ortalama fokus sayısı .....	82
Şekil 4.15.	Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M30 değerleri .....	83
Şekil 4.16.	Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M65 değerleri .....	84

Şekil 4.17. Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M30 ve M65 değerlerinin karşılaştırılması .....	85
Şekil 4.18. M30 Apoptoz / M65 Nekroz oranı.....	85
Şekil 4.19. Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen ROS değerleri .....	86

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Bazı metal nanopartiküller ve uygulama/kullanım alanları .....	7
Çizelge 2.2. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması .....	17
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman .....	43
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler .....	44
Çizelge 3.3. Hücrelerin pasajlanması için gereken malzemeler ve kimyasallar .....	52
Çizelge 3.4. Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları .....	52
Çizelge 3.5. Sitotoksikite testleri için kullanılan dozlar .....	53
Çizelge 3.6. Genotoksikite testleri için kullanılan dozlar .....	53
Çizelge 4.1. MN testi bulguları .....	73
Çizelge 4.2. İn vitro komet testinde elde edilen ortalama değerler .....	77

## 1. GİRİŞ

Son on yılda nano ölçekteki bilim ve teknoloji alanında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Günümüzde giyim, gıda, enerji, uzay araştırmaları, arıtma ve savunma sanayi gibi birçok alanda nanomateryallerin kullanıldığı bilinmektedir. Bu materyallerin gerek üretim aşamalarında gerekse kullanımı ve sonrasında doğrudan veya dolaylı yollarla insan ve çevre üzerine olan etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Böylece nanomateryallerin olası zararlarının önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınması sağlanabilir.

Nanometre, ölçü olarak metrenin milyarda birini ifade etmekte olup bir nanometre, düzlemine 2-3 tane atomun dizilebileceği kadar küçüktür. Bu boyut aralığındaki materyaller çevreleri ile beklenenden farklı fiziksel veya kimyasal etkileşimler oluşturabilir (Oberdorster ve ark. 2005a). Bunun dışında, nanomateryallerin çok küçük boyutları nedeniyle, oldukça yüksek yüzey alanı ve hacim oranına sahip olmaları, onları son derece reaktif hale getirmektedir. Bu yüksek reaktivite potansiyelleri nedeniyle nanomateryaller biyolojik sistemler ve çevre ile zararlı etkileşimleri toksisiteye neden olabilmektedirler (Oberdorster ve ark. 2005b).

Amerikan Çevre Koruma Örgütü USEPA (Anonim 2007) nanomateryalleri 4 ana kısma ayırmıştır. Bunlar,

- 1) Karbon bazlı nanomateryaller (karbon nanotüp, fulleren),
- 2) Metal bazlı nanomateryaller (nanogümüş, nanoaltın, TiO<sub>2</sub>, metal oksitler),
- 3) Dendrimer (nanoölçekli polimerler),
- 4) Nanokompozitler

Mevcut nanopartiküller arasında en geniş kullanım alanına sahip gruptan birini metal nanopartikülleri oluşturmaktadır. Metal nanopartiküller, nanoboyuttaki büyük potansiyelleri sayesinde farklı disiplinlerarası uygulamalarda yoğun olarak ilgi odağı haline gelmiştir. Birçok metal tabanlı nanopartikül, antimikrobiyal (antiviral, antibakteriyel, zehirli boya ve antifungal), biyosit, antibiyotik tedavi alternatifleri ve

nanokompozit kaplamalar gibi uygulamalar için aday olarak araştırılmıştır (Cioffi ve ark. 2005).

Metallerin en tipik özelliklerinden biri de çeşitli amaçlar için alaşım formuna dönüştürülebilmeleridir. Temel olarak alaşım; bir metale belirli bir özellik sağlamak üzere en az bir başka elementin (metal/ametal) eklenmesi ile elde edilen metal karakterli malzeme olarak tanımlanmaktadır. Alaşım metallerin kendisini oluşturan bileşenlere göre daha farklı özellikler kazanabildikleri bilinmektedir. Yapılabilecek alternatifler göz önüne alındığında metal alaşım partiküller birçok alanda kendilerine uygulama alanı bulmaktadır.

Pirinç, bakır ve çinko alaşımlarının ortak adıdır. Oldukça sert ve kolay işlenebilen bir malzeme olması nedeniyle günümüzde vazgeçilmez alaşımların başında gelir. Pirinçte bakır oranı % 60–90, çinko oranı ise % 10–40 arasında değişir. Uygun kimyasal bileşimindeki bakır ve çinko alaşımının yani pirincin seçilmesi ile istenilen mukavemet, süneklik, sertlik, iletkenlik, şekillendirilme, aşınma dayanımı, renk ve korozyon dayanımı özelliklerine sahip malzemeler elde edilebilir. Bakır ve bakır alaşımları kolay şekillendirilmesi nedeniyle dünyada ve ülkemizde yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Gerengi 2008).

Bakır-çinko (Cu-Zn) alaşım nanopartiküller, mikropiller, mikro elektronik devreler, nanokablolar ve nanosıvıların üretim aşamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, antibakteriyal özelliği nedeniyle de biyomedikal alandaki kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Tripathi ve ark. 2012). Bu alaşımları oluşturan partiküllerle ilgili, bakır (Ahamed ve ark. 2010) ve çinko (Kumari ve ark. 2011) için tekli genotoksikite verileri bulunmasına rağmen alaşım formlarına (Cu-Zn) ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada bakır-çinko (Cu-Zn) metal alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



Bu çalışma aşağıda belirtilen sorulara cevap bulmak için gerçekleştirilmiştir:

1. Cu-Zn alaşım nanopartiküller, besiyeri içerisinde ne tür fiziko-kimyasal zelikler göstermektedir?
2. Cu-Zn alaşım nanopartikülleri, in vitro şartlarda hücre içine ve çekirdeğe girebilmekte midir?
3. Cu-Zn alaşım nanopartikülleri, akciğer epitel hücreleri (BEAS-2B hücre hattı) zerinde sitotoksik bir etkiye sahip midir?
4. Cu-Zn alaşım nanopartikülleri BEAS-2B hücre hattı üzerinde genotoksik etkiye sahip midir?
5. Bu etkilerin olası mekanizmaları neler olabilir?

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller

#### 2.1.1. Tanımı ve tarihçesi

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzeme tasarlayıp üretmeyi, bu malzemelerden yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aygıtlar ve aletler üretmeyi amaçlamaktadır (Çıracı 2005). Nanoteknoloji kullanılarak üretilen ürünlerin satışının 2015 yılına kadar yıllık 1 trilyon \$'a ulaşabileceği tahmin edilmektedir (Xia ve ark. 2009).

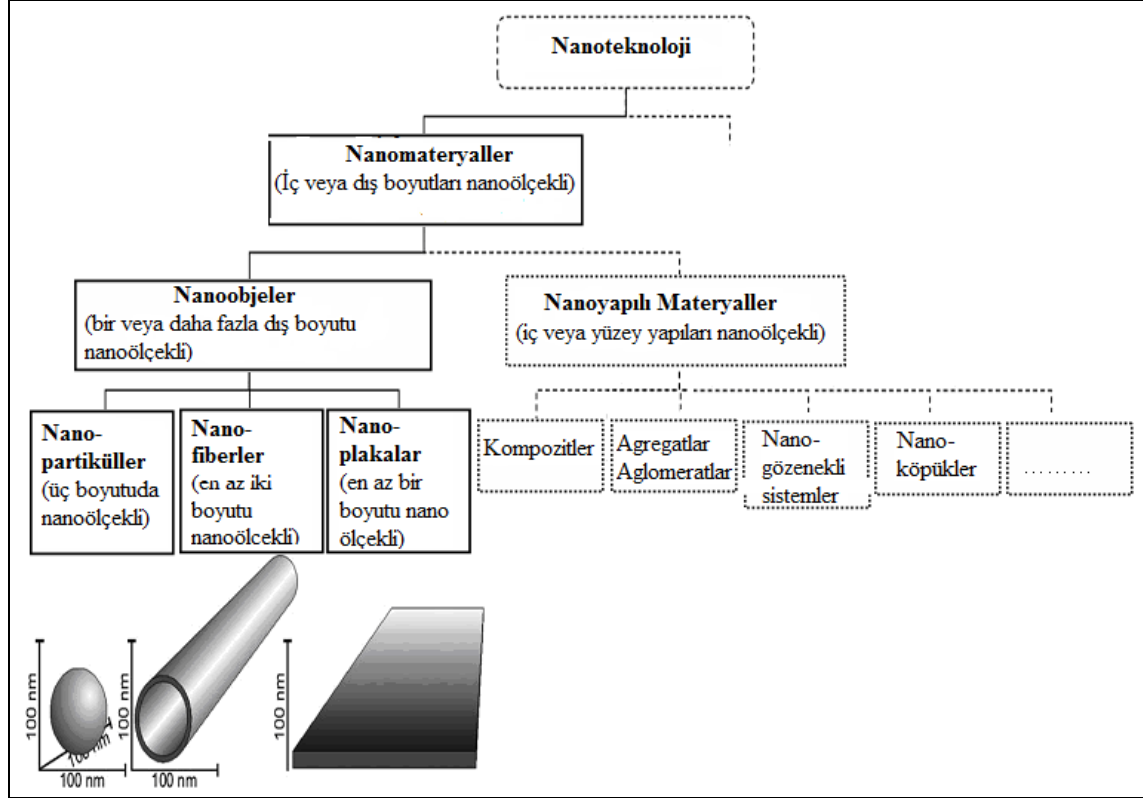
Nanomateryal terimi, en az bir boyutu 1-100 nm aralığında olan materyalleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Nanomateryallerin içerisinde nanopartiküller, nanofiberler, nanotüpler ve nanokompozitler yer almaktadır (Borm ve ark. 2006).

Nanomateryallerin önemli bir kısmını oluşturan nanopartiküller ise 0,1-100 nm büyüklüğündeki parçacıklardır. Nanopartiküller amorf, kristalin, sferik, iğneli vs. şekillerde olabilirler ve 1-100 atom ya da molekülden oluşurlar (Buzea ve ark 2007). Şekil 2.1'de nanoobjeler ve tanımları belirtilmiştir.

Mühendislik ürünü nanopartiküller, özellikleri ve boyutları ile ilgili fonksiyonlarından yararlanmak için insanlar tarafından tasarlanmış veya üretilmiş, belirli bir fiziko-kimyasal kompozisyona ve yapıya sahip nano ölçekli parçacıklardır.

Nanopartiküller, mikropartiküller ile karşılaştırıldığında, birim kütle başına çok daha geniş bir yüzey alanına ve çok daha fazla partikül sayısına sahiptir. Örneğin, 60 µm çapına sahip bir karbon mikropartikülü 0,3 µg kütle ve 0,01 mm<sup>2</sup> yüzey alanına sahiptir. Her bir partikülü 60 nm çapa sahip aynı kütledeki karbon nanopartiküller, 11,3 mm<sup>2</sup> yüzey alanına sahiptir ve 1 milyar nanopartikülden oluşur. 60 nm çapa sahip bir partikülün, yüzey alanı / hacim oranı (veya kütle) 60 mikron çapa sahip bir partikülden

1000 kat daha büyüktür. Nanopartikül şeklindeki malzeme kimyasal reaksiyon için daha büyük bir yüzey alanına sahiptir (Buzea ve ark. 2007).



**Şekil 2.1.** Nanoobjelerin ISO tanımları (Nanopartiküller (her üç boyutu da nano ölçekli), nanolifler (iki boyutu nano ölçekli) ve nanoplakalar veya nano katmanları (sadece boyutu bir nano ölçekli) içeren Nanoobjelerdir. \* Nanoölçek: 1 ve 100 nm arasındaki boyut) (Krug ve Wick 2011).

Nanopartiküller, genelde modern bilimin keşiflerinden biri olarak düşünülse de aslında çok daha uzun bir geçmişe sahiptir. 9.yy.'da, Mezopotamya'da, sanatkârlar çanak ve çömlekleri parlatmak amacıyla nanopartiküllerden yararlanmışlardır. Orta Çağ ve Rönesans dönemlerinde, çömlekçilikte, altın ve bakır renkli metalik parlaklığı koruma amacıyla cilalama işlemleri yapılmıştır. Cilalama işlemlerinde gümüş ve bakır nanopartikülleri seramik sırnı camsı matriksinde homojen olarak dağılarak ince bir tabaka oluşturmuş ve atmosferik oksidasyonu engellemiştir. Sanatkârlar, bakır ve gümüş tuzlarını oksitlerle birlikte sirke, toprak boyası ve kil karışımına eklemişler ve bu karışımı önceden sırlanmış çömlek yüzeyine uygulamışlardır. Daha sonra bu çömleği

600 °C’de fırınlarak çömlek yüzeyinde renk veren ve optik özellikler gösteren bu nanopartikülleri elde etmişlerdir (Rawson, 1984).

Nanopartiküller gerek boyutları gerekse fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle hem birçok teknik alanda hem de tıbbi uygulamalarda büyük avantajlar sunmaktadır. Ancak nanoteknoloji gibi gelişen yeni teknolojiler, belirsizlikleri ve riskleri de beraberinde getirmektedir. Sahip olduğu bazı özellikler açısından insan ve çevre açısından yararlı olabileceği gibi her ikisi için de zararlı olabilir. Hem gereksiz risklerden kaçınmak ve güvenli nanoteknoloji kullanımını kolaylaştırmak hem de nanopartiküller ve nanoteknolojinin ortaya çıkardığı risklerin değerlendirilmesi için detaylı toksikoloji araştırmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

### **2.1.2. Metal nanopartiküller**

Nanomateriyallerin farklı türleri arasında, metal ve metal oksit nanopartiküller küçük boyutları ve geniş yüzey alanlarının yanı sıra büyük boyuttaki formlarından yüzey yükleri, şekilleri, iletkenlikleri, erime ve donma noktalarının farklılıkları gibi birçok fiziksel ve kimyasal özellikleri ile de farklılık göstermektedirler (Roduner 2006).

Benzersiz özellikleri nedeniyle günümüzde birçok metal, metal oksit ve alaşım nanopartikül üretilmekte ve pek çok alanda kullanılmaktadır (Karlsson ve ark. 2008). Örneğin, titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>), bakır (Cu), çinko (Zn), alüminyum (Al) ve gümüş (Ag) nanopartikülleri gibi metal nanopartiküller tüketici ve endüstriyel ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Altın nanopartiküller, işlemleri ve yüzey modifikasyonları oldukça kolay olduğundan ve DNA gibi birçok biyolojik molekül ile ligand oluşturabildiklerinden dolayı biyolojik görüntüleme, ilaç uygulaması, hücre işaretleme, hedefe yönlendirme, kanser terapisi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Yah 2013). Alüminyum nanopartikülleri yine ilaç uygulamaları ve ilaç kapsülasyonu gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Kim ve ark. 2009, Schrand ve ark 2010). Metal nanopartikülleri ile ilgili yapılan toksisite ve genotoksisite çalışmalarında altın, gümüş, titanyum ve çinko gibi metal partiküllerinin yaygın olarak kullanıldığı dikkati çekmektedir. Bu partiküllerle yürütülen in vivo ve in vitro çalışmalarında elde edilen

verilerin genellikle toksik etkilerin kullanılan yöntem, hücre hattı ve konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği ortaya konulmaktadır (Lanone ve ark 2009, Singh ve ark. 2009, Shinde ve ark 2012). Çizelge 2.1’de bazı metal nanopartiküller ve uygulama alanları gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Bazı metal nanopartiküller ve kullanım alanları (Schrand ve ark. 2010)

<b>Nanopartikül</b>	<b>Simge</b>	<b>Uygulama Alanları</b>
Aluminyum	Al	Yakıt katkısı, patlayıcılar, ilaç uygulamaları
Altın	Au	Hücresel görüntüleme, fotodinamik terapi
Demir	Fe	Manyetik görüntüleme, çevre temizliği
Gümüş	Ag	Antimikrobial ajan, fotoğrafçılık, piller, elektronik
Bakır	Cu	Antibiyotik uygulamaları, iletkenler, lubrikantlar vb.
Seryum	CeO <sub>2</sub>	Parlaticılar, bilgisayar çip üretimi, yakıt katkısı
Mangan	Mn	Katalizör, piller
Nikel	Ni	Baskı mürekkepleri, manyetik uygulamalar, pil üretimi
Titanyum	TiO <sub>2</sub>	Fotokatalizör, antibakteriyel kaplama, boya, kozmetik
Çinko	Zn	Cilt koruyucular, güneş kremleri

### **2.1.3. Metal alaşım nanopartiküller**

Metaller değişik oranlarda karıştırılarak, farklı özelliklere sahip yeni metalik sistemler oluşturulabilir (Ferrando ve ark. 2008). Alaşım nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, kendisini oluşturan atomların sırası, bileşenleri ve büyüklüğü değiştirilerek ayarlanabilir. Ayrıca, mikroboyutta iken alaşım oluşturmeyen metal çiftleri nanoboyutta karıştırılarak yeni metal alaşımları ortaya çıkarılabilmektedir. Bu şekilde üretilen alaşımlar özelliklerine, yapılarına ve bileşenlerinin çeşitliliğine bağlı olarak optik, manyetik, termik, elektrik ve sensör cihazlarda kullanımının yanı sıra kozmetik ve biyomedikal alanda da kullanılmaktadır (Prabhu ve ark. 2010, Chaloupka ve ark. 2010).

## 2.2. Nanotoksikoloji

1990'lı yılların başlarında çapı 100 nm'den küçük inhale partiküllerin beklenenden daha fazla bir pulmoner yanıt (Oberdorster ve ark. 1990, Ferin ve ark. 1990) oluşturup oluşturmadığını araştıran iki makale art arda yayınlanmıştır.  $TiO_2$  ve  $Al_2O_3$ 'nin nanometre ölçekli parçacıkları, aynı kimyasal bileşime sahip daha büyük partiküller ile karşılaştırıldığında sıçanların akciğerlerinde anlamlı olarak daha fazla inflamatuvar yanıt oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır. İki çalışmada da “partiküle maruz kalmaya yanıtın partiküllerin kimyasal bileşimi açısından anlaşılabilir olmalı ve nanometre ölçeğindeki malzemeler ile ilgili sıra dışı biyolojik aktivite ile ilgili fikir vermeli” şeklinde iki öncülü vardı. Daha sonra, Donaldson ve ark. (2004) nanotoksikolojinin, nanopartiküllerin neden olduğu özel problemleri ele almak ve bu alanda bilgi eksikliğini doldurmak için toksikolojinin yeni bir alt kategorisi olmasını önermişlerdir. Böylece, bu araştırma alanı, “nanotoksikoloji” alanı olarak resmiyet kazanmıştır.

Nano-genotoksikoloji ise sürekli olarak yeni nanoboyutlu materyallerin üretildiği nanoteknoloji endüstrisinde görülen hızlı ilerlemeye bağlı olarak ortaya çıkmış olan bir disiplindir (Doak ve ark. 2009, Landsiedel ve ark. 2009, Singh ve ark. 2009).

Nanotoksikoloji aynı zamanda toksisite çalışmalarında kullanılan nanomateryallerin uygun şekilde karakterizasyonunu da kapsamaktadır (Oberdörster ve ark. 2005a). Son yıllarda, karakterize etme ve miktar belirlemeyi içeren doz çevresindeki sorular, nanomalzemelerin toksisitesinin merkezini oluşturmuştur. Nanopartiküller yüzey özellikleri ve kuantum etkileri nedeniyle aynı formdaki daha büyük malzemelerden önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Roduner 2006). Bu etkenler, maddelerin kimyasal reaktivitelerinin yanı sıra, mekanik, optik, elektrik ve manyetik özelliklerini de etkilemektedir.

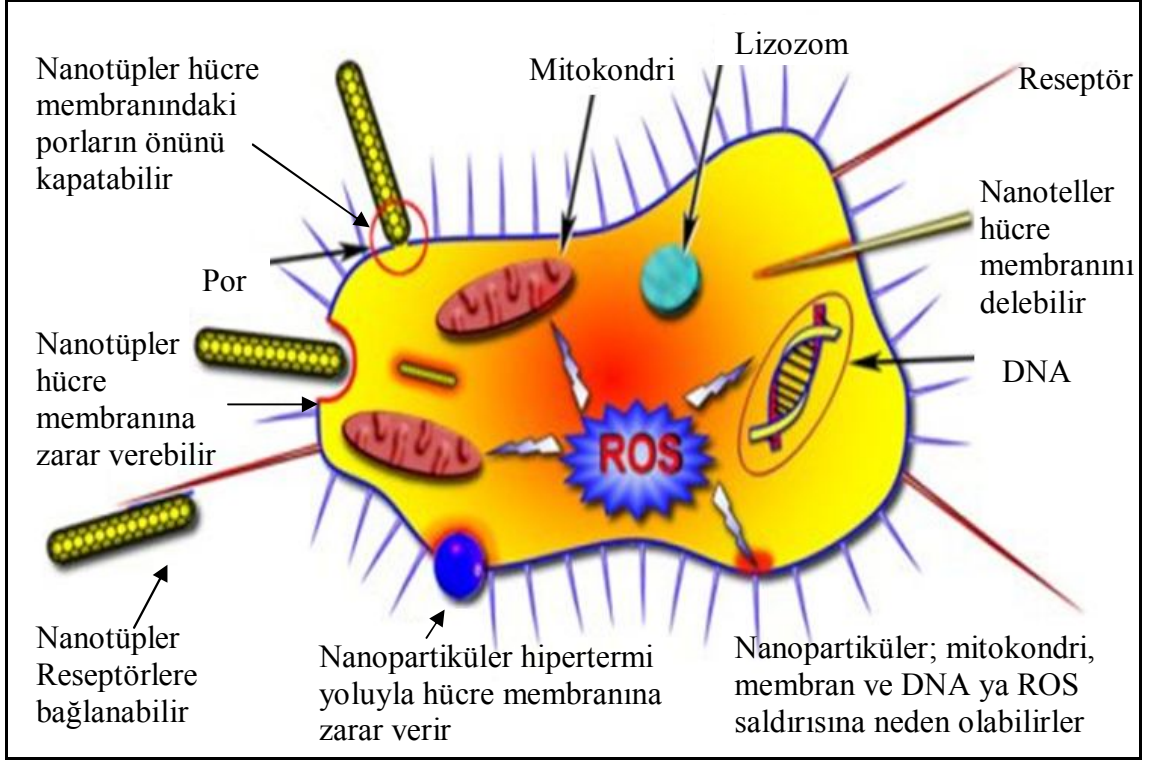
Nanotoksikoloji, sürdürülebilir ve güvenli bir nanoteknoloji gelişimi için önemli katkılar sağlayacak bir disiplindir (Donaldson ve ark. 2004).

### 2.2.1. Nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri

Küçük boyutları ve büyük yüzey alanları ile birlikte çok çeşitlilik gösterebilen fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak nanomateryallerin, daha büyük ölçekli formlarına göre öngörülemeyen genotoksik etkilere sahip olabilecekleri tahmin edilmektedir. DNA hasarının incelenmesi toksikoloji araştırmalarının tüm alanlarında önemlidir. Doğru tamir edilmezse mutasyonlara yol açabilir (Karlsson 2010). DNA hasarının ölçülmesi, kanser gelişimi ve çeşitli gen mutasyonlarının belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle kromozom anomalileri ve DNA zincirinde meydana gelen kırılmalar kanser risk değerlendirmesinde kullanılabilir (Schins ve Knaapen 2007).

Nanopartiküllerin DNA'ya zarar verme mekanizmaları:

1. Nanopartiküller mitoz sırasında nükleer gözenekler yoluyla, çekirdeğin içine geçebilir. Çekirdekte, nanopartiküller DNA'ya doğrudan temas edebilir ve zarar verebilir (Karlsson 2010).
2. Nanopartiküllerin yüzeyinde reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumu veya partikül yüzeyinden salınan metal iyonları hücresel bileşenler ile etkileşerek, DNA'ya zarar verebilir (Nel ve ark. 2006).
3. Nanopartiküller mitokondri içinde elektron taşınmasını etkileyerek veya sitokrom P450 enzimlerini uyararak veya NADPH-oksidadı uyararak ROS üretimine neden olabilir ve bu şekilde hedef hücreleri uyararak veya zarar vermek için etkileşime girebilir (Risom 2005, Karlsson 2010).
4. Nanopartiküller, nötrofiller ve makrofajlar gibi aktifleştirilmiş fagositlerin etkinleşmesine neden olabilir ve inflamatuvar hücrelerden üretilen ROS, DNA hasarına neden olabilir (Karlsson 2010, Fubini ve ark. 2010). Şekil 2.2'de nanopartiküllerin DNA hasarına neden olduğu belirtilen mekanizmalar verilmiştir.



**Şekil 2.2.** Nanopartiküllerin hücreye etki şeması (Han ve ark. 2011)

Doğrudan ya da dolaylı olarak partiküler tarafından oluşturulan genetik hasar birincil genotoksisite olarak tanımlanır. Nanopartikül dozuna bağlı olarak bir inflamatuvar etki sonucu oluşan DNA hasarı ise ikincil genotoksisite olarak adlandırılır. İkincil genotoksisite için doz miktarının yeterince yüksek olması ve inflamasyonu tetiklemek için doz miktarının belirli bir doz eşliğini aşması gerekmektedir (Stone ve ark. 2009). İkincil genotoksisitenin tersine, birincil genotoksisite için doz eşik değeri yoktur ve DNA hasarı doğrusal olarak doz artışı ile ilişkilidir. DNA hasarları sırasında özellikle hasar ve onarım arasında bir denge ile geçici lezyonlar oluşur (Dusinska ve Collins 2008). Bir eşik olmadığında dahi teorik olarak tek bir DNA lezyonu bile bir mutasyona neden olabilir ve her DNA hasarı için artan kanser riski küçük olmasına rağmen kanser görülme oranında artışa yol açar (Anonim 2009a).

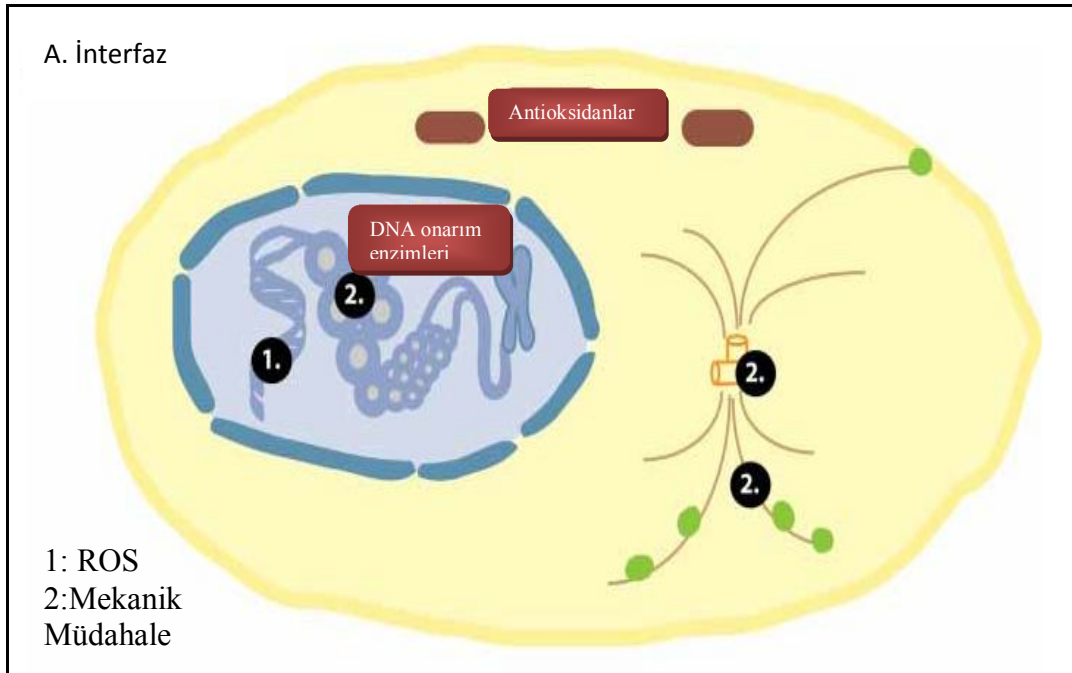
Nanopartiküllerin kristal yapıları ya da kuantum etkileri, enerji absorpsiyonu ve transferini tetikleyebilir, bu durum oksijen radikallerinin oluşumuna veya hidrokarbon bozulmasına neden olur. Ayrıca, nanopartiküller, proteinler veya DNA gibi karşılaştırılabilir büyüklükteki biyolojik makromoleküllere bağlanabilir. Bu tür



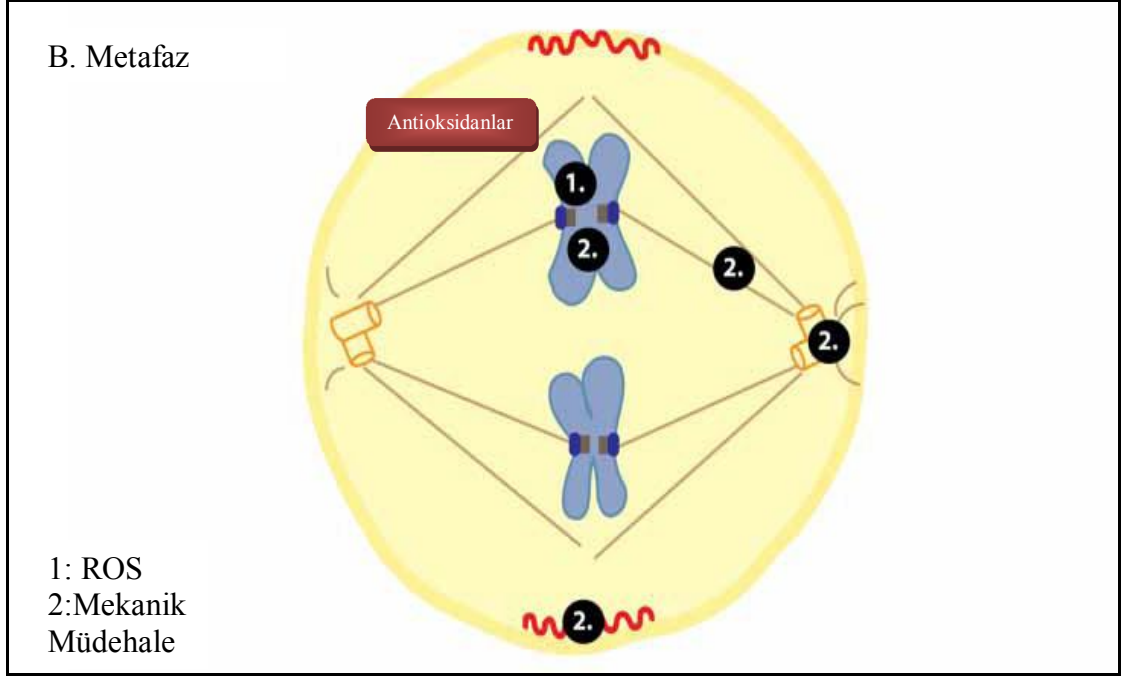
reaksiyonlar hücrel homeostazi içinde yan etkilere neden olabilir. Partiküller çekirdeğe girer ve doğrudan bölünme sırasında, iğ iplikleri veya DNA ile etkileşir. Şekil 2.3, 2.4 ve 2.5'te nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri gösterilmiştir.

DNA, hücre döngüsünün tüm aşamalarında ROS tarafından zarar görebilir. Nanopartiküller tarafından mekanik müdahale interfaz boyunca mikrotübül ve sentrozom gibi hücrel bileşenleri hedef alarak hücrel trafiğin gecikmesine yol açabilirler.

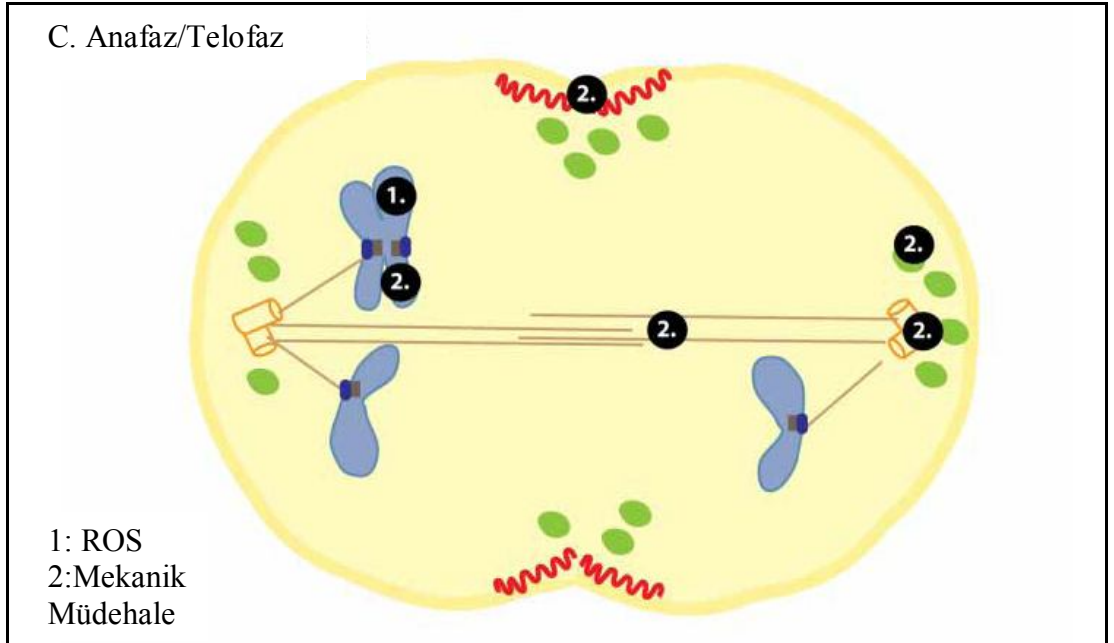
Nanopartiküller nükleer membranı geçerek nükleozom organizasyonuna engel olabilir ve değişmiş gen ekspresyonuna neden olabilir. Mitoz sırasında, mikrotübüllere müdahale anöploid veya poliploid hücrelere yol açan yanlış kinetokora bağlanmaya neden olabilir (Singh ve ark. 2009).



**Şekil 2.3.** Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin interfaz evresindeki olası etkileri (Gonzalez ve ark. 2008)



**Şekil 2.4.** Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin metafaz evresindeki olası etkileri (Gonzalez ve ark. 2008)



**Şekil 2.5.** Nanopartiküllerin hücre bölünmesinin anafaz ve telofaz evresindeki olası etkileri (Gonzalez ve ark. 2008)

Dolaylı mekanizmalar da genotoksisiteye yol açabilir. Nanomateryaller DNA hasarı ve transkripsiyon kalıplarını değiştirme potansiyeline sahip olduğu için oksidatif stres ya da inflamatuvar yanıtlara neden olabilirler. Klinik ve deneysel çalışmalar, nanopartiküllerin küçük boyutları nedeniyle daha geniş bir yüzey alanına sahip oldukları için Reaktif oksijen türevleri (ROS) meydana getirebildiklerine ve hücre hasarına sebep olduklarına işaret etmektedir (Colvin 2003, Nel ve ark. 2006).

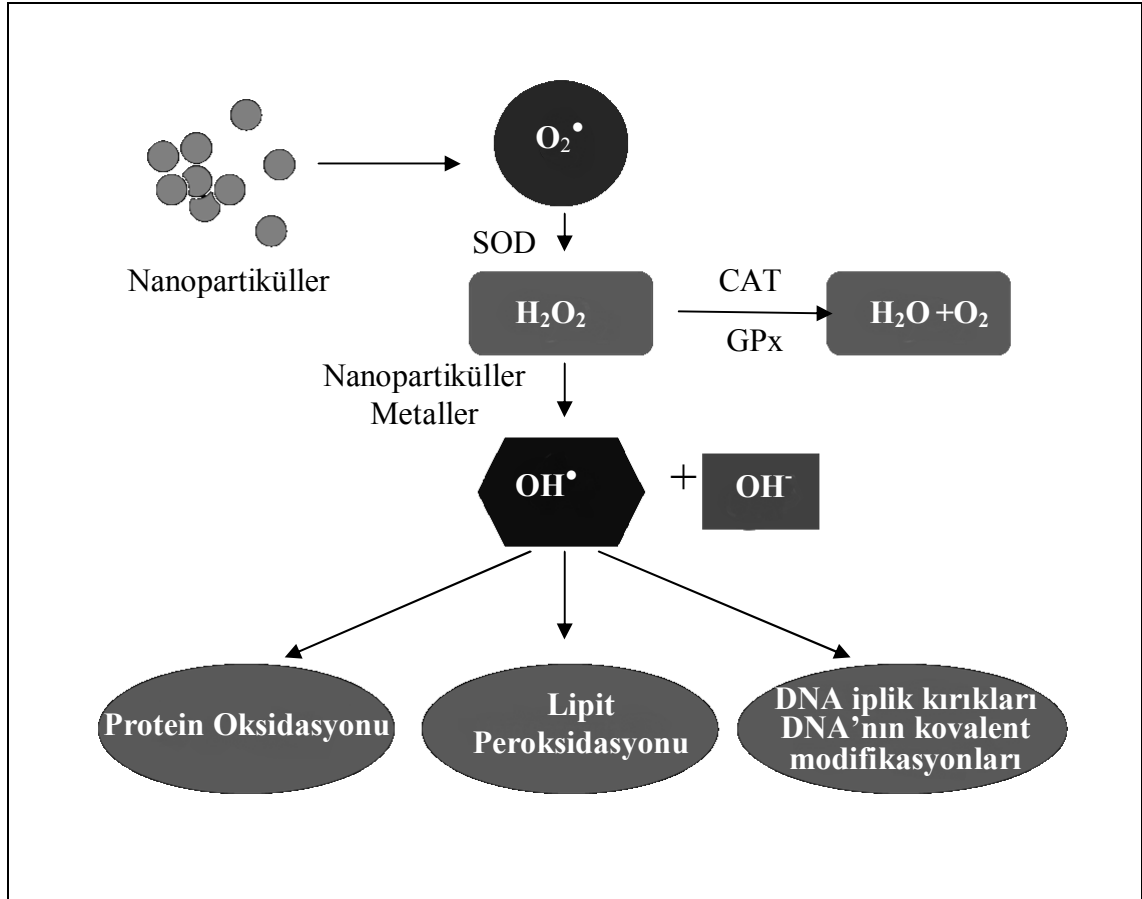
### **2.2.2. Nanopartiküllerin hücre içi ROS oluşumundaki rolü**

Hücre içinde veya dışında oluşan ROS nanoyapılı materyallerin toksisitesinin değerlendirilmesinde temel faktörlerden biridir (Nel ve ark. 2006). Deneysel kanıtlar metal - metal oksit nanopartiküllerinin ROS üretimini ve oksidatif stres aracılığıyla DNA hasarı ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Park ve ark. 2008, Asharani ve ark. 2009, Ahamed ve ark. 2011).

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküller, serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilir olmasıdır (Dormandy 1983, Halliwell ve Gutteridge 1989). Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı üretilmektedirler (Urso ve Clarkson 2003). Vücutta serbest radikaller ya da ROS fazlalığı olduğunda oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, hücre içerisinde serbest oksijen radikallerinin artmasına ve antioksidan seviyelerinin düşmesine bağlı olarak bozulan redoks dengesini tanımlamaktadır (Singh ve ark. 2009). Organizmada oksidatif strese neden olan radikal yapımı endojen ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir (Young ve Woodside 2001).

Oksidatif stresin, birçok nanopartikül türünün neden olduğu hücre hasarının ortak bir mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (Stone ve ark. 2007). Önceki çalışmalar, gümüş nanopartiküller, bakır oksit nanopartiküller ve silika nanopartiküllerin lipid peroksidasyonu, ROS üretimi ve oksidatif stres aracılığıyla kültüre edilmiş insan hücrelerinde sitotoksisite, DNA hasarı ve apoptozise neden olduğunu göstermiştir (Ahamed ve ark. 2008, Ahamed ve ark. 2010, Akhtar ve ark. 2012).

Belirli bazı nanopartiküllerden salınan kadmiyum (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), nikel (Ni), titanyum (Ti) ve çinko (Zn) gibi geçiş metali iyonları,  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit) ve  $O_2^{\bullet-}$  (Süperoksit anyonu) gibi hücrel metabolik oksijen ürünlerinin  $OH^{\bullet}$  (Hidroksit) radikaline dönüşmesine neden olmaktadır.  $OH^{\bullet}$  radikali ise DNA'ya zarar veren en önemli serbest radikaldir (Şekil 2.6).



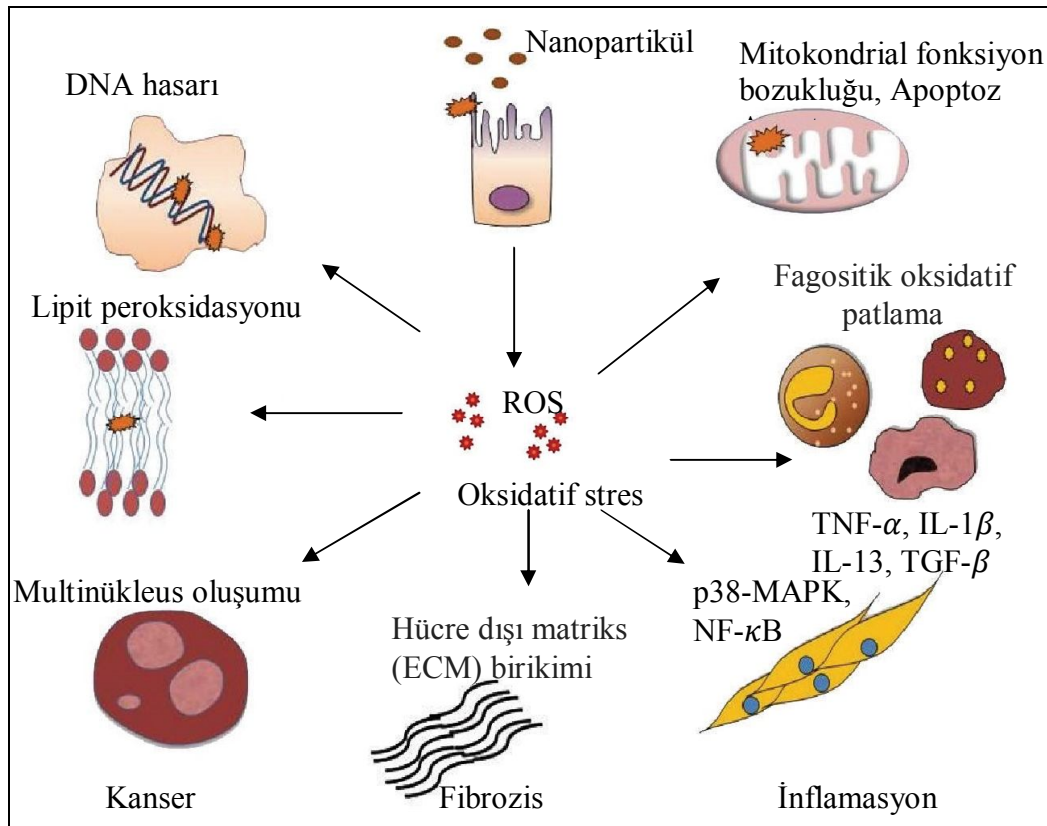
**Şekil 2.6.** Nanopartiküllerin neden olduğu oksidatif stres ve toksik sonuçları (Huang ve ark. 2010a) SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz GPx: Glutasyon peroksidaz

Nanopartiküllerin yapılarında geçiş metalleri bulundurmalarına ilave olarak geniş yüzey alanına sahip olmaları da ROS oluşumunu teşvik etmektedir. O nedenle daha küçük boyuttaki nanopartiküller oksidatif stresi daha fazla indüklemektedir. Park ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada, titanyum dioksit ( $TiO_2$ ) nanopartiküllerinin perinükleer dağılımı ile aynı bölgede oluşan ROS ilişkisini floresan bir ajan yardımıyla göstermişlerdir.

Risom ve ark. (2005) göre ROS oluşumuna neden olan etmenler aşağıdaki gibidir:

- 1) ROS nanomateriyallerin yüzeylerinde doğrudan meydana gelebilir.
- 2) Geçiş metalleri ROS oluşumu için katalizör olarak işlev görebilir.
- 3) Nanomateriyaller solunum zinciri dengesini bozarak, mitokondri hasarına neden olur (Li ve ark. 2003).
- 4) Nanomateriyaller tarafından makrofaj ve nötrofillerin aktivasyonu sırasında, bu hücreler kendi kendilerine ROS veya RNS (reaktif nitrojen türleri) üretirler.

Nanomateriyallerin yüzeyleri kendilerine özgüdür. Endojen antioksidanlar tarafından bağlanmamışsa (örneğin C vitamini) veya antioksidan enzimlerin yapıları nanopartiküller tarafından bozulmuş ise bu radikaller inflamatuvar reaksiyonları tetikler. İnflamasyon; yaralanma olaylarında, bağışıklık sistemini aktive edip, iyileşme sürecini başlatan doğal bir tepkidir. TNF $\alpha$  veya interlökinler (IL-8, IL-6, IL-2) gibi sitokinler, bu işlem sırasında açığa çıkar. Şekil 2.7’de nanopartiküllerin neden olduğu toksisitenin oksidatif yolağı gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Nanopartiküllere bağlı toksisitenin oksidatif yolağı (Manke ve ark. 2013)

Partikül boyutu azaldıkça, bazı metal-tabanlı (Ag, Au ve Cu) nanopartiküllerin toksisitesi artış göstermektedir. Nanopartiküller, hücre içindeki proteinler ve enzimlerle etkileşir ve ROS'ların üretimine yol açarak antioksidan savunma mekanizmalarını engelleyebilir, inflamatuvar yanıt başlatır ve mitokondrinin yıkımına, apoptoz veya nekroza neden olur (Schrand ve ark. 2010).

### **2.2.3. Apoptoz ve nekroz**

Apoptoz ve nekroz kavramları hücre ölüm süreçlerinin iki farklı şeklini belirtmektedir. Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen hücre ölümüne nekroz adı verilir. Apoptoz terimi ise ilk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından nekroza farklı olarak gerçekleşen kontrollü hücre ölümünü belirtmek için önerilmiştir. Apoptosis için fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre delesyonu ya da programlanmış hücre ölümü terimleri de kullanılmıştır.

Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir (Ulukaya 2003). DNA hasarı olan hücreler organizmayı korumak için intihar ederler (Mondello ve Scovassi 2011). Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ile gerçekleşir.

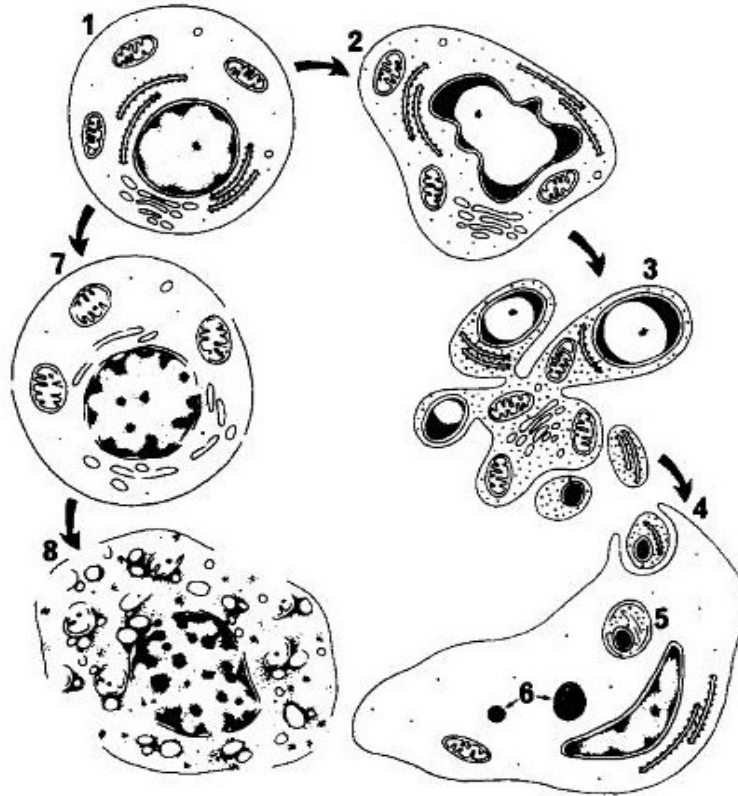
Nekrotik hücre ölümünde; enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile suyun hücre içerisine girmesine neden olur, böylece hücre şişer. Ayrıca hücreyle birlikte mitokondrilerde değişme gözlenir, diğer organeller ise plazma içinde dağılır. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder. Proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızarak doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluşturur (Nanji ve Hiller-Sturmhöfel 1997, Israels ve Israels 1999). Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (Ulukaya 2003)

<b>ÖZELLİK</b>	<b>NEKROZİS</b>	<b>APOPTOZİS</b>
<b>Yol açan nedenler</b>	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları, Şiddetli oksidatif stress.	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması "Senescence", HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Yüksek doz glukokortikoid, Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler, Çok şiddetli olmayan oksidatif stress.
<b>Morfolojik özellikler</b>	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı, Kromatin "flocculation"u, Hücre şişmesi, Organellerin disintegrasyonu, Endoplazmik retikulumun dilatasyonu, Büyük vakuollerin oluşumu, Hücre lizisi.	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu, Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması, Hücre küçülmesi, Organellerde disintegrasyon yok. Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması.
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	Bozulmuş iyon homeostazisi, ATP gerekmez (pasif süreç). +4 °C'de gerçekleşebilir.	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması, ATP gereklidir (aktif süreç). +4 °C'de gerçekleşmez.
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü). Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümünün geç safhasında).	DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci). Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir).
<b>Diğer özellikler</b>	Hücreler gruplar halinde ölür. Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. İnflamasyona neden olur.	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.

Apoptoz; gelişim, dokularda hücre populasyonunun korunması ve yaşlanma gibi homeostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir.

Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immün reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar (Thompson 1995, Vaux ve Flavell 2000). Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Cohen 1993). Apoptoz ve nekrozun oluşma süreci Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.8.** Apoptoz (2-6) ve nekrozda (7 ve 8) yapısal değişiklikler (Kerr ve ark. 1994)

Apoptozu çeşitli faktörler indükler ama hücre içi ve hücre dışı faktörler en önemlileri olarak sınıflandırılabilir. Hücre dışı faktörler granzim/perforin sistemi ya da hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılığıyla rol oynar. Hücre içi faktörler mitokondriyal aktivasyona neden olur. Bununla birlikte mitokondriyal aktivasyon hücre dışı faktörler tarafından da tetiklenebilir. Bu sebeple hücre içi faktörlerde mitokondri anahtar rol oynar. Mitokondri, sitokinler, büyüme faktörleri ve ölüm reseptörleri gibi hem ölüm hem de canlılık sinyallerinin kesişim noktasıdır. Apoptoz işlemi boyunca geri dönüşümsüz olarak mitokondriden sitozole sitokrom c salınır. Mitokondriyal



aktivasyonda ana faktör Bcl-2 protein ailesidir. Bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri sitozole sitokrom c salınımını ya inhibe etmek ya da indüklemek için mitokondride etkilerini gösterirler (Wang ve Youle 2009).

### **2.3. Nanopartiküllerin Genotoksisitesini Etkileyen Faktörler**

Nanopartiküller aynı kimyasal bileşimine karşılık gelen daha büyük formları ile karşılaştırıldığında olağanüstü eşsiz özellikleri ve etkileri olduğu bilinmektedir. Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ile biyolojik yanıtları arasındaki ilişkiyi anlamak disiplinler arası bir yaklaşım gerektirir (Pettibone ve ark. 2008).

Nanotoksikoloji klasik toksikoloji çalışmalarına göre daha karmaşık bir alanı temsil etmektedir. Bunun temel nedeni nanopartiküllerin toksik etkilerini farklı kılabilen birçok parametrenin olmasıdır. Bu parametreler temel olarak partikülün fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanmaktadır (Teeguarden ve ark. 2007). Bu parametrelerden en az birkaçını ortaya koymak yani çalışılan partikülü karakterize etmek, nano toksikoloji çalışmalarının ilk ve en önemli adımını oluşturmaktadır.

Hangi özelliğin bir nanopartikülün toksisitesini daha fazla etkileyebileceği henüz tam olarak bilinmemekle birlikte nanopartikül toksisitelerini etkileyen bazı faktörler şunlardır:

1. Partikül boyutu ve yüzey alanı
2. Agregasyon ve aglomerizasyon
3. Zeta potansiyeli
4. Partikül şekli ve kristal yapısı
5. Yüzey kimyası ve yüzey reaktivitesi

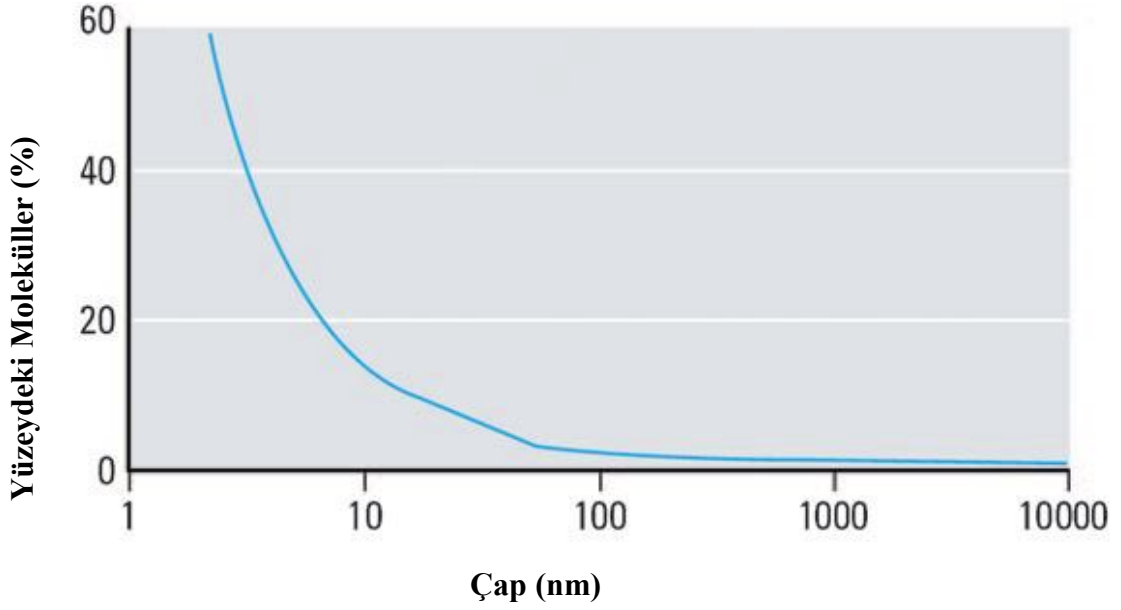
Bu etmenler toksik etkilerde farklılıklara yol açabilecek ana faktörler arasında sayılmaktadırlar. Bu faktörlerin çeşitliliği nanotoksikoloji çalışmalarını zorlaştıran en önemli unsurların başında gelmektedir. Bu nedenle toksik etkisi çalışılan partikülün, ilk olarak düzgün bir biçimde karakterize edilmesi gerekmektedir.

### 2.3.1. Partikül boyutu ve yüzey alanı

Nanoboyutlu partiküllerin sağlık üzerine etkileri araştırılırken parçacık büyüklüğü de önemli bir faktördür (Schlesinger ve ark. 2006). Büyüklük faktörünün en önemli etkisi küçülen boyut ile birlikte biyolojik bariyerleri geçerek hedefe daha kolay ulaşılabilme dolayısıyla daha yüksek etki gösterebilme ile ilişkilidir (Shukla ve ark. 2005). Gurr ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, fotoaktivasyon yokluğunda 10 ve 20 nm boyutlu TiO<sub>2</sub> anataz partiküllerinin BEAS-2B hücrelerinde, oksidatif DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, mikronükleus oluşumu ve artan hidrojen peroksit ve nitrik oksit üretimini uyardığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, 200 ve > 200 nm boyutlu anataz parçacıklarının radyasyon yokluğunda oksidatif strese neden olmadığı tespit edilmiştir.

Mesleki ve çevresel ortamlarda partikül konsantrasyonları üzerinde limit değerleri belirlerken kendi küçük boyutu ve yüksek bolluğu nedeniyle, nanopartiküllerin yüzey-ağırlık oranının dikkate alınması gerekmektedir (Nel ve ark. 2006). Toksikolojik kanıtlar nano boyutlu maddelerin kardiyovasküler sistem üzerinde özellikle zararlı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir (Brook ve ark. 2010). Bu seviyede malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri genellikle aynı kompozisyondaki büyük malzemelerden farklıdır. Örneğin, indiyum ve kalayın erime noktası yaklaşık 100 ° C iken partikül çapı 100 nm'den 10 nm'ye düşürüldüğünde ve 15 nm altında erime noktasına katlanarak azalır (Auffan ve ark. 2009).

Daha küçük partiküllerin partikül yüzeylerinde daha fazla atom vardır, bu yüzden daha etkin bir şekilde, çevre ile etkileşimde bulunabilmektedir. Partikül çapı ile yüzeyde yer alan molekül arasındaki ilişki şekil 2.9'da gösterilmektedir.



**Şekil 2.9.** Parçacık boyutunun bir fonksiyonu olarak yüzey molekülleri (Oberdörster ve ark. 2005b)

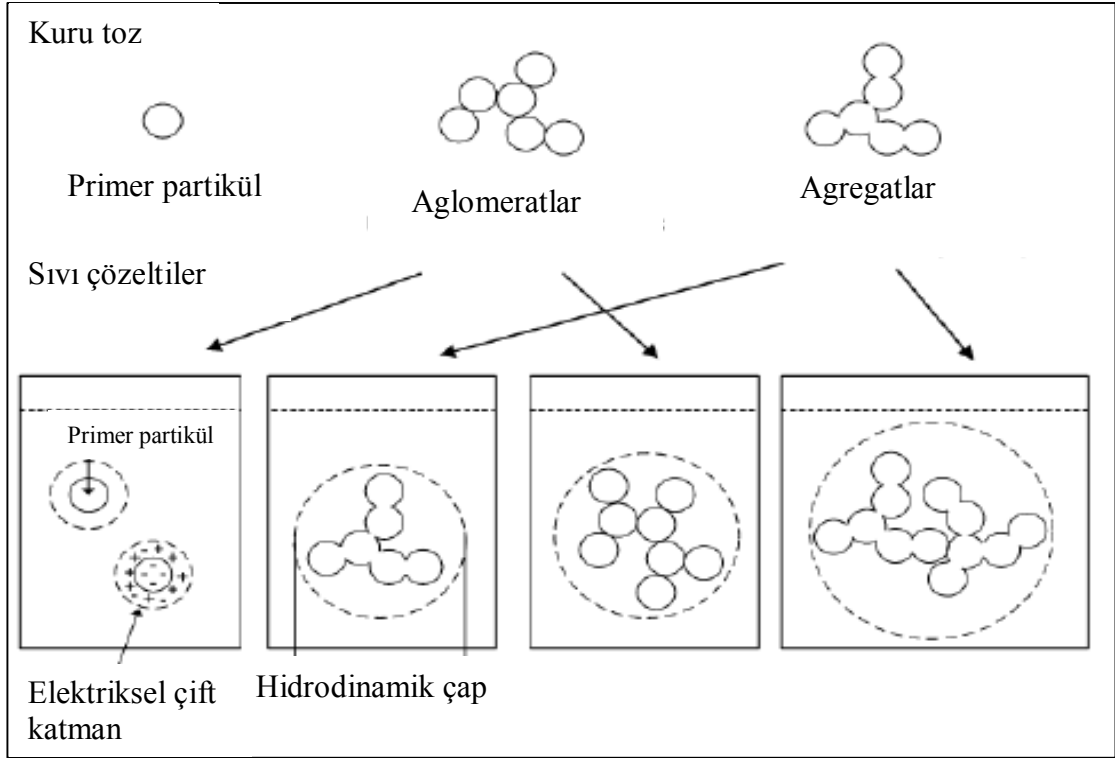
### 2.3.2. Agregasyon ve aglomerizasyon

Partikül boyutunu belirleyen aglomerasyon ve agregasyon olmak üzere iki önemli süreç vardır (Jiang ve ark. 2009). Nanopartiküller, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik güç ve/veya yüzey gerilimi gibi zayıf kuvvetler tarafından bir arada tutulduğu zaman aglomerat (topak) olarak adlandırılır. Partiküller kovalent ya da metalik bağ gibi daha güçlü bağlar tarafından birbirine bağlı ise agregat adını alır (Anonim 2008, Anonim 2011). Canlı sistemlerin partiküllere maruz kalma sürecinde partiküllerin tam olarak nasıl davrandığını saptamak toksik etkilerinin belirlenmesi için gereklidir.

Nanopartiküllere maruz kalma durumunda maruz kalınan nanomateryaller tekli partiküllerden ziyade agregat formunda olacaklardır ve birçok toksisite testinde nanomateryallerin uygulaması sulu bir çevrede ya da taşıyıcıda gerçekleşeceğinden dolayı gözlenen etkiler temelde aglomere formdaki nanomateryallerin etkileri olacaktır (Thess ve ark. 1996, Singh ve ark. 2009).

Nanopartiküller fizyolojik sıvılarda aglomerat oluşturma eğilimindedir ama aynı zamanda kararlı agregatlar da meydana getirebilirler. Hidrodinamik çap ile karakterize

edilen aglomerat ve agregatlar birincil partikül çapından önemli derecede farklılık gösterebilir (Jiang ve ark. 2009). Şekil 2.10'da agregat ve aglomeratlar yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Agregat ve aglomeratlar (Jiang ve ark. 2009)

### 2.3.3. Zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli partiküller arasındaki itme veya çekme değeri olup, yüzey yükünün bir ölçüsü olarak da adlandırılır. Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir (Hunter 1981).

Powers ve ark. (2006) nanomateryallerin karakterizasyonunda farklı yöntemler kullanarak çözeltideki nanomateryallerin zeta potansiyeli, partikül boyutu ve boyut dağılımı değerlendirmek için yararlı bir teknik olarak dinamik ışık saçılımını (DLS) önermiştir. DLS, çözelti içindeki partikül boyutunun ölçümü ve süspansiyon stabilitesini analiz etmek için basit bir yöntem olarak yeni ve son çalışmalarda

kullanılmaktadır (Berne ve Pecora 1975, Wu ve ark. 2005, Simakov ve Tsur 2006, Williams ve ark. 2006).

#### **2.3.4. Partikül şekli ve kristal yapısı**

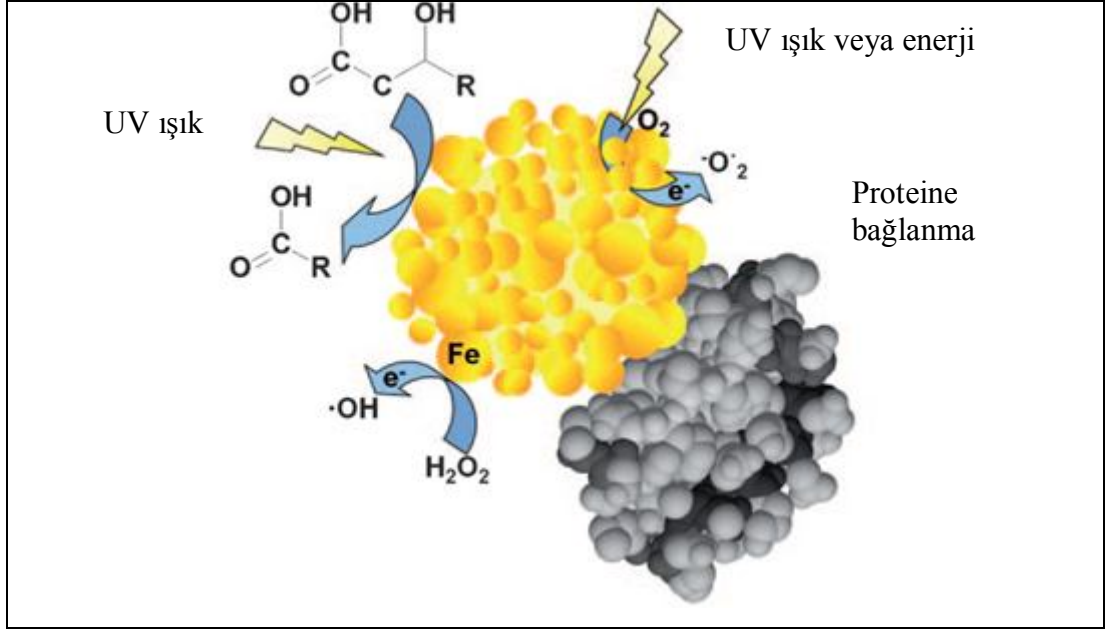
Nanopartiküller yıldız, şerit, tüp, çubuk, kurdele, küre, tanecik gibi birçok şekillerde bulunabilirler. Bu şekillerin her biri hücre içerisine alınım ya da hedef moleküllerle etkileşimde farklı reaksiyonlara yol açarlar (Obersorster ve ark. 2007). Aynı kütleye sahip uzun şekilli nanopartikül ile küresel şekilli nanopartikül arasındaki hidrodinamik çapın farklı olması hem nanopartiküllerin difüzyonunu ve hem de difüzyon hızını etkiler.

Partikül kimyası nanopartiküllerin toksisitesinin belirlenmesinde önemlidir. Partiküller kimyasal yapılarına bağlı olarak, hücre alımı, hücre içi lokalizasyonu ve ROS oluşturma yeteneği açısından farklılık gösterebilir (Xia ve ark. 2006).

Partiküller aynı bileşime sahip olsa bile farklı kimyasal ya da kristal yapıya sahip olabilir. Bir malzemenin toksisitesi kristalin formunun tipine bağlıdır. Örneğin rutil ve anataz, titanyum dioksidin aynı kimyasal bileşime sahip iki allotropudur. Ancak farklı kristal yapıya sahip oldukları için değişik kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Rutil nanopartiküllerin (200 nm) fotoaktivasyon yokluğunda oksidatif DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur ama aynı boyutta anataz nanopartiküllerinin zarar vermediği tespit edilmiştir (Gurr ve ark. 2005).

#### **2.3.5. Yüzey kimyası ve yüzey reaktivitesi**

Absorbe edilen ve partikül tarafından depolanan enerji tekrar serbest bırakıldığında radikal oluşturabilir veya hidrokarbonların bozulmasına neden olabilir (Şekil 2.11). Ayrıca, proteinlerle aynı boyuta sahip moleküller doğrudan yüzeylere tutunabilir (Cedervall ve ark. 2007, Lundqvist ve ark. 2008) ve proteinlerin inhibisyonuna ya da diğer protein modifikasyonlarına neden olabilir.



**Şekil 2.11.** Nanopartiküllerin yüzey reaktivliği (Krug ve Wick 2011)

Kristal yapıları ya da kuantum etkileri, enerji absorpsiyonu ve transferini tetikleyebilir bu durum oksijen radikallerinin oluşumuna veya hidrokarbon bozulmasına neden olur. Ayrıca nanopartiküller, protein veya DNA gibi karşılaştırılabilir büyüklükteki biyolojik makromoleküllere bağlanabilir. Bu tür reaksiyonlar hücresel homeostazı içinde yan etkilere neden olabilir (Krug ve Wick 2011).

#### 2.4. Toksikite Testleri

Nanopartiküller oksidatif hasar oluşturarak DNA hasarına yol açabilecekleri gibi yeterince küçük boyutlu iseler hücre zarından içeri girebilir ve DNA ile interaksiyona girerek hasara yol açabilirler. Hücre zarını geçerek sitoplazmaya giren nanopartiküller çekirdek zarını geçemeseler bile hücre bölünmesi esnasında çekirdek zarının erimesinden dolayı DNA ile karşı karşıya gelebilir ve çeşitli hasarlara yol açabilirler. Nanopartiküllerin sitotoksikite ve etki mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan yöntemlerin başında klonojenik test, XTT, M30, M65 ve Oksidatif hasarların belirlenmesine olanak sağlayan ROS ve GSH testleri gelmekte, genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ise mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX testleri sıklıkla kullanılmaktadır (Oberdorster ve ark. 2007, Singh ve ark. 2009).

## 2.4.1. Sitotoksisite testleri

### Klonojenik test

Klonojenik test, bir hücrenin geniş bir koloni ya da klon oluşturacak şekilde üreme kabiliyetini korumasına ve süresiz olarak proliferasyon olabilmeye dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücreler denilmektedir. Diğer taraftan, DNA ve protein sentezleme özelliğini koruyan, 1-2 mitoz geçiren fakat yeterli düzeyde proliferasyon olup koloni oluşturamayan hücreler ölü olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle koloni sayımı yapılırken en az 50 hücre içeren koloniler sayılmaktadır (Franken ve ark. 2006).

İlk zamanlarda, klonojenik test radyasyonun hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde kullanılırken günümüzde daha çok klinik uygulamalardaki çeşitli ajanların sitotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (Munshi ve ark. 2005).

Klonojenik testin değerlendirilmesinde aşağıdaki formüller sıkça kullanılır:

Her bir doz için 4 tekrar yapılan çalışmalarda;

1. petrideki toplam koloni sayısı: K1
2. petrideki toplam koloni sayısı: K2
3. petrideki toplam koloni sayısı: K3
4. petrideki toplam koloni sayısı: K4 olmak üzere;

Kontrol grubu için petri başına ortalama koloni sayısı:  $(L) = (K1+K2+K3+K4)/4$

Diğer gruplar için petri başına ortalama koloni sayısı ise:  $(N) = (K1+K2+K3+K4)/4$  formülü ile hesaplanır.

Kaplama Etkinliği (KE) ya da Plating Efficiency (PE) terimi ise petriye ekilen hücrelerden proliferasyon olarak koloni oluşturanların %'sini ifade etmektedir. Örneğin; 50 hücre ekilen bir petride sonuç olarak 25 koloni sayılıyorsa PE: %50 olarak hesaplanır.

Bir örnek (petri) için Kaplama Etkinliği (Plating Efficiency) (PE);

$PE = (\text{Sayılan Koloni Sayısı} / \text{Ekilen Hücre Sayısı}) * 100$  formülü ile hesaplanır.

Hücre sağkalım fraksiyonu (SF), belirli bir konsantrasyonda uygulanan ajan ile buna bağlı olarak üreme yeteneğini koruyabilen ve koloni oluşturan hücre sayısı arasındaki ilişki olarak tanımlanmaktadır (Franken ve ark. 2006 ).

Her doz grubu için  $SF = (\text{Doz PE} / \text{Kontrol PE}) * 100$

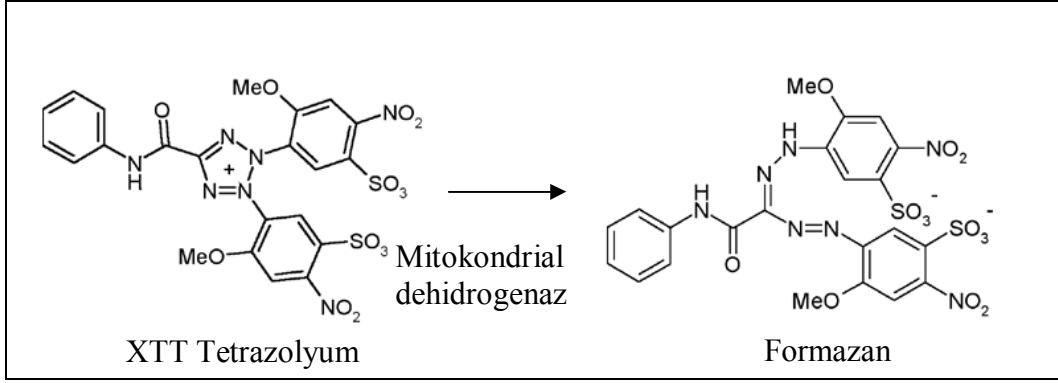
Her doz grubu için % Canlılık =  $(N/L) * 100$  formülüyle hesaplanır.

### **XTT testi**

XTT hücre canlılık testi kiti renk değişimine dayanan hücre metabolik aktiviteyi ölçen bir testtir. Bu test yöntemi ilk defa 1988 yılında P. A. Scudiero tarafından tanımlanmıştır (Scudiero ve ark. 1988).

Test süresince sarı tetrazolium tuzu XTT metabolik olarak aktif olan hücrelerde dehidrogenaz enzimi tarafından yoğun renkli formazan boyasına indirgenir (Şekil 2.12). Bu mitokondrial enzim hücre öldükten kısa süre sonra inaktive edildiği için turuncu renkli formazan boyası sadece canlı hücrelerde oluşur. Üretilen formazanın miktarı örnekteki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Testte oluşan formazan boyası sulu çözeltilerde çözünebilir ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak absorbans ölçülerek hesaplanır. PMS (N-Methylphenazonium methyl sulfate) gibi elektronla bağlanan reajan hücrelerde XTT indirgenmesinin etkinliğini anlamlı şekilde artırır (Roehm ve ark. 1991).





**Şekil 2.12.** XTT tetrazolium ve formazan (Anonim 2010a) XTT tetrazolyum tuzu (2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit tuzu) mitokondriyal solunum zincirinin dehidrogenaz sistemi tarafından formazana parçalanabilen bir tuzdur.

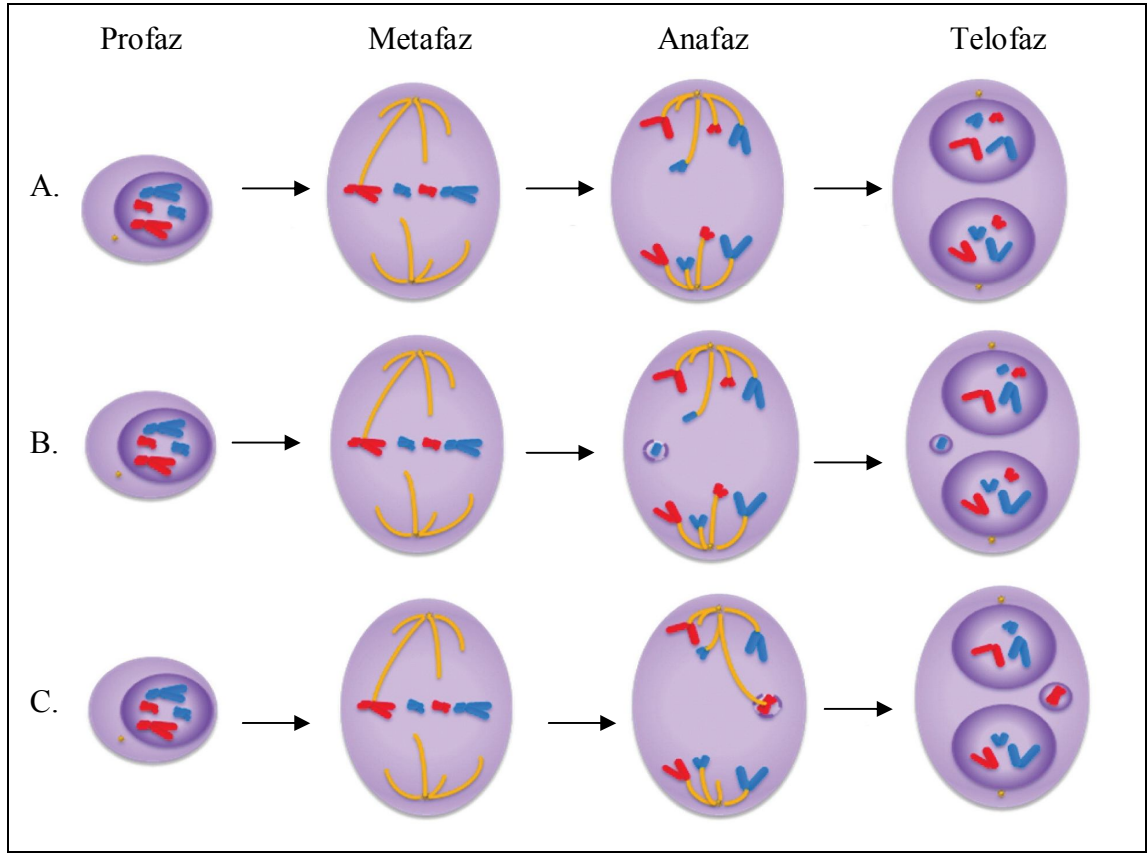
#### 2.4.2. Genotoksisite testleri

##### Mikronükleus testi

Mikronükleuslar (MN) interfaz hücrelerinde gözlenen ve mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Bu oluşumlar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna yol açmaktadırlar (Şekil 2.13). Bu nedenle hücrelerde MN sayısındaki artış, genotoksik ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Demirel ve Zamani 2002, Niwa ve ark. 2006, Çavaş ve Könen 2008).

MN'ler temel olarak DNA kırıklarından kaynaklanan asentrik kromozom ya da kromatit parçalarından oluşur. MN'ler mikrotübüllerin kinetokorlara yanlış bağlanmasından dolayı, kromozom ya da kromatidlerin anafazda geride kalması sonucu veya

sentromerik DNA'daki kinetokor proteinlerindeki ya da kinetokor aygıtındaki defektler nedeniyle oluşabilir (Cimini ve Degrossi 2005, Mateuca ve ark. 2006).



**Şekil 2.13.** Mikronükleus oluşumuna yol açan farklı mekanizmalar A. Normal mitoz B. Klastojenik etki C. Anojenik etki (Zelazna ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

MN testi yapısal ve sayısal kromozom hasarlarının tespitinde, metafaz kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde etme avantajı sağlamasıyla birçok hücre tipine uygulanabilen ve yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur. Basitliği, güvenilirliği, geçerliliği ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği gibi avantajlara sahip olması nedeniyle yıllardır kullanılmakta olan MN testi, gelecekte de mutajenitenin belirlenmesi ve önlenmesinde önemli bir rol üstlenecektir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu 2011).

In vitro çalışmalarda MN testi protokolüne göre preperat hazırlanırken; her bir doz grubu için; A, B, Tekrar-A ve Tekrar-B olmak üzere 4 preperat hazırlanır (4

tekrarlı çalışılır). Sayım yapılırken mono, bi, tri ve tetra nükleuslu hücreler ve binükleuslu hücrelerin içindeki MN'ler dikkate alınarak her bir preparattan öncelikle toplam 1000 hücre sayılır. Daha sonra binükleuslu hücrelerin sayısını 1000'e tamamlayana kadar sadece binükleuslu hücreler ve varsa binükleuslu hücrelerdeki MN'ler sayılır. Binükleuslu hücrelerdeki toplam MN sayısı belirlenerek, MN taşıyan binükleuslu hücrelerin oranı ve toplam MN sayısının incelenen binükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen MN ortalaması ve % MN hesaplanır. Ayrıca çekirdek bölünme indeksi (ÇBİ), fiziksel ya da kimyasal bir ajanın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için önemli bir parametredir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu 2011). ÇBİ'deki bir azalma hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. ÇBİ;

$$\text{ÇBİ} = (1 * \text{Mononükleus} + 2 * \text{Binükleus} + 3 * \text{Trinükleus} + 4 * \text{Tetranükleus}) / (\text{Toplam hücre sayısı})$$
 formülüyle hesaplanmaktadır.

### **Komet testi**

İlk olarak 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik, nötral pH'daki lizis şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmektedir. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolde bir takım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizis koşullarında uygulanmıştır. Alkali koşullar altında uygulandığından dolayı DNA iplikleri birbirinden ayrılmakta ve tek iplik hasarların belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Pitarque ve ark. 1999; Çavaş ve Könen 2008). Bu metot, oksidatif stres, toksik 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 kullanılmaktadır (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

İn vitro ve in vivo olarak uygulanabilen alkali komet yöntemi, DNA'da tek zincir kırıklarını, yüksek alkali çözelti içerisinde hızlı bir şekilde DNA kırıklarına dönüşen

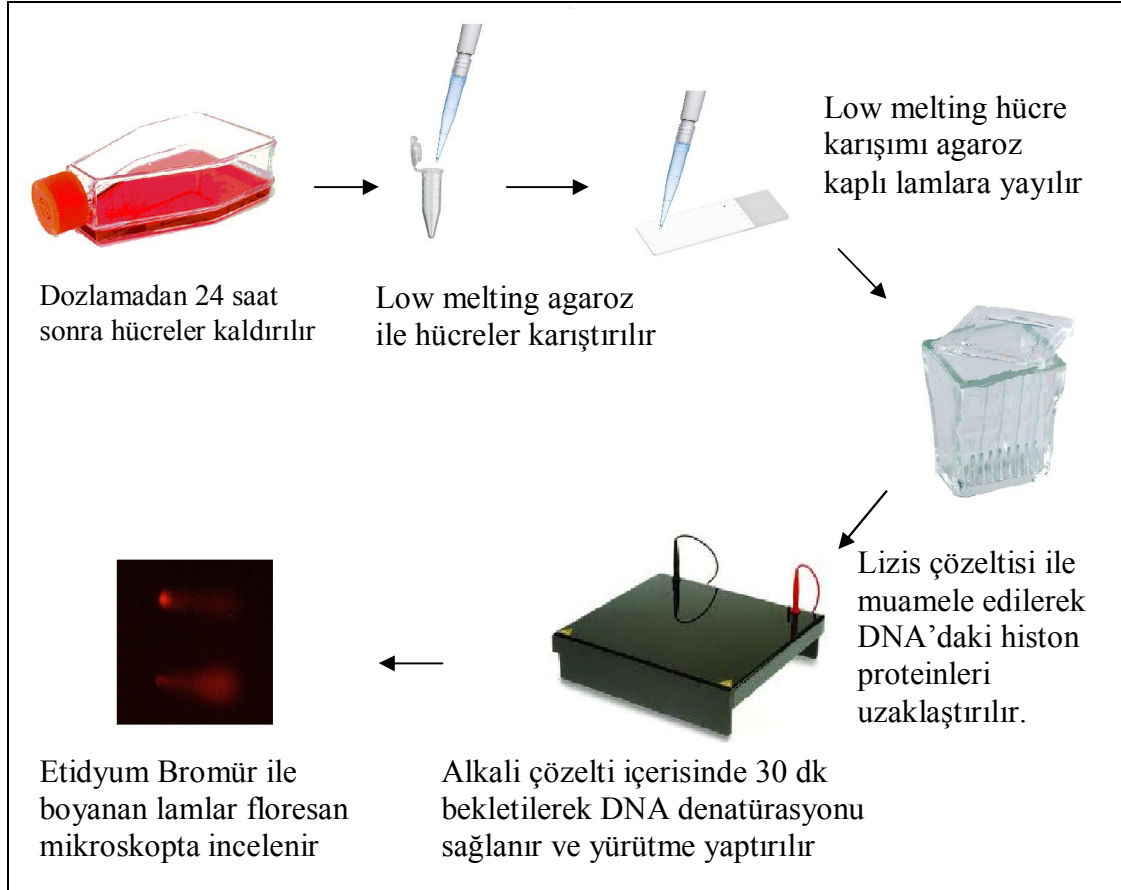
alkalilenebilecek noktaları oldukça hassas bir şekilde belirleyebilmektedir. Piperakis (2009), komet yönteminin diğer genotoksite yöntemleri ile karşılaştırıldığında çeşitli avantajlara sahip olduğunu belirtmiştir. Piperakis'e göre bu avantajlar;

- 1) Komet yöntemi hücre hatlarına uygundur.
- 2) Komet yöntemi, bitkileri de içeren herhangi bir ökaryotik hücreye ve pek çok prokaryotik hücreye başarılı bir şekilde uygulanabilir.
- 3) Yöntem, tek hücre seviyesinde hasar belirleyebilir.
- 4) Yöntem, hücre başına 50–15000 kırık belirleyebilecek kadar hassastır.
- 5) Yöntem sayesinde, aynı günde sonuç alınabilir.
- 6) Yöntem, hasarları siklusta olmayan hücrelerdeki kadar siklustaki hücrelerde de belirleyebilir.
- 7) Oldukça hızlı ve pahalı olmayan bir yöntemdir.
- 8) Noninvaziv bir tekniktir.
- 9) Taze veya dondurulmuş örneklere uygulanabilir.
- 10) Yöntem az sayıdaki hücre ile gerçekleştirilebilir (Piperakis 2009).

Yöntemin temel prensibi, tek hücre DNA'sının agaroz jel içerisinde elektroforetik alanda göç etmesi esasına dayanmaktadır. Bu nedenle ilk önceleri, tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE) olarak isimlendiriliyordu. Daha sonra, sonuçta elde edilen görüntü kuyruklu yıldız andırdığı için komet (comet; kuyruklu yıldız) ismini almıştır. Mikroskoptaki görüntü tıpkı bir kuyruklu yıldız benzemektedir, nükleusu içeren geniş bir baş kısmı ve DNA fragmentlerini içeren bir kuyruk kısmı bulunmaktadır. Yani yöntem fragmente olmuş DNA'nın non fragmente DNA'dan ayrılmasına izin vermektedir. Bu sayede birçok çeşit DNA hasar ürününü belirleyebilmek mümkündür (Çavaş ve Könen 2008).

Bu teknikte temel olarak agaroz gömülen hücreler lam üzerine yayıldıktan sonra lizis işlemine tabi tutulurlar. Lizis işlemi takiben alkali ortamda muamele edilen hücreler elektroforeze tabi tutulduklarında kırık DNA ilmekleri ana nükleustan uzaklaşacak şekilde katoda doğru yürürler. Etidyum bromür gibi boyalarla boyandıktan sonra floresan mikroskop altında kuyruklu yıldız (komet) benzeri bir görüntü ortaya

çıkarak (Şekil 2.14). Böylece komet kuyruğu ve baş bölgesi arasındaki oranlara bağlı olarak görsel ya da görüntü işleme programları aracılığı ile yapılan çeşitli hesaplamalar ile DNA hasar miktarları belirlenebilmektedir (Collins ve ark. 2008).

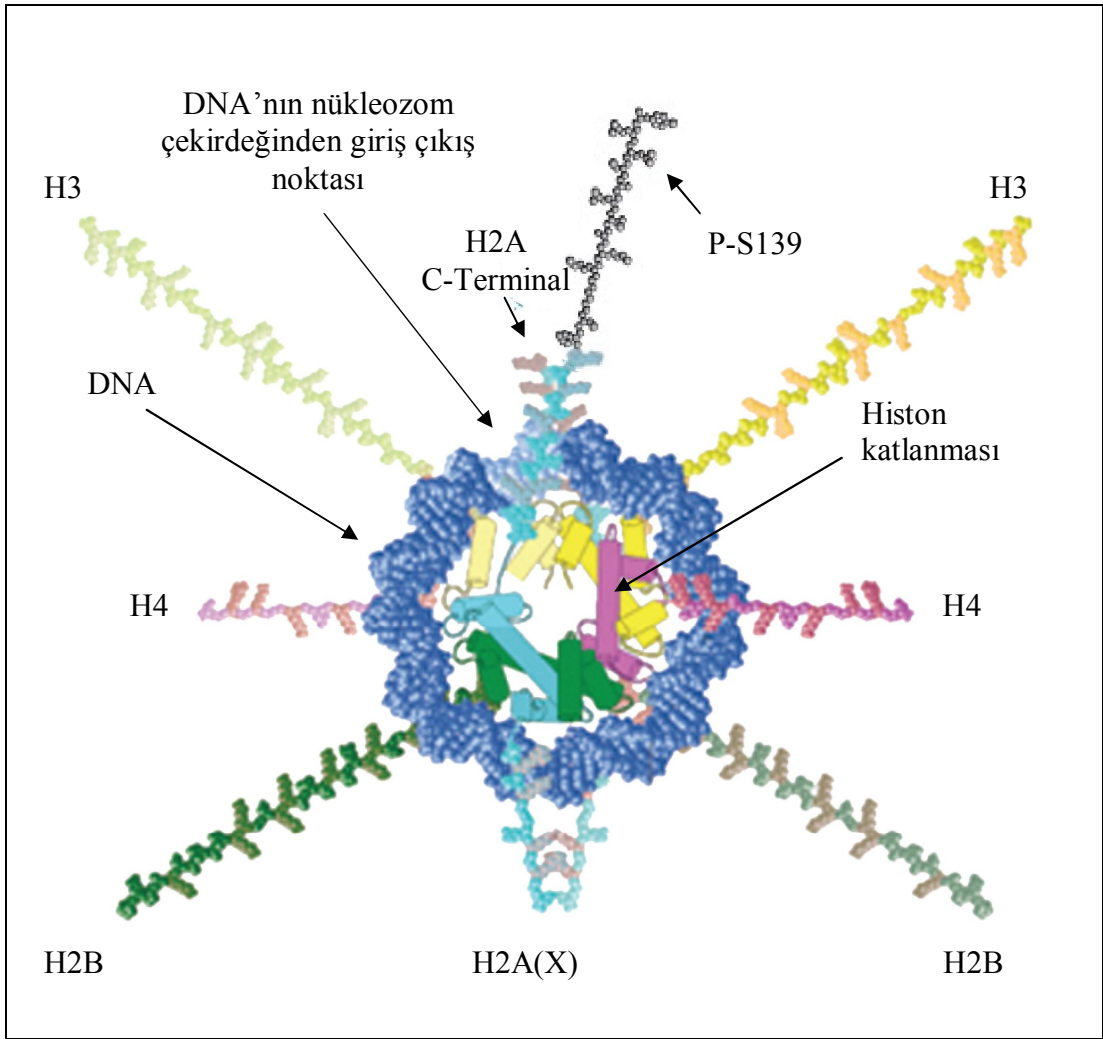


**Şekil 2.14.** Komet testi aşamaları

### **$\gamma$ -H2AX fokus testi**

Çift iplik DNA kırıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar genetik toksikolojide en çok üzerinde durulan konulardan birisidir. DNA çift iplik kırıklarının belirlenmesinde,  $\gamma$ -H2AX testi önemli bir yer tutmaktadır (Ibañez ve ark. 2009). Yakın bir zamanda ortaya çıkan bu test yöntemi sadece daha ekonomik bir yöntem olmakla kalmayıp, diğer tekniklere göre çok daha hassas olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, hücre içerisindeki DNA hasarlarının fiziksel lokasyonlarının floresan yöntemler ile görülebilmesine olanak sağlayan bu yöntem çift iplik kırıklarının belirlenmesinde son dönemlerde oldukça kullanışlı bir teknik haline gelmiştir (Smart ve ark. 2008).

H2AX histonunu H2A ailesinin diğer üyelerinden ayıran özelliği ise evrimsel süreçte korunmuş –KKATQASQEY karboksi terminal motifine sahip olmasıdır. Karboksi terminalin 139. pozisyonundaki serin aminoasidi (Ser139), çift zincirli DNA kırığı oluşan bölgelerde hızlı bir şekilde fosforilasyona uğramaktadır (Şekil 2.15). H2AX histonunun fosforilasyonu, kromatinde çift zincir kırığı oluşan bölgenin her iki ucundan başlayarak megabaz çifti uzunluğundaki geniş mesafelere kadar yayılmaktadır (Löbrich ve ark. 2010).



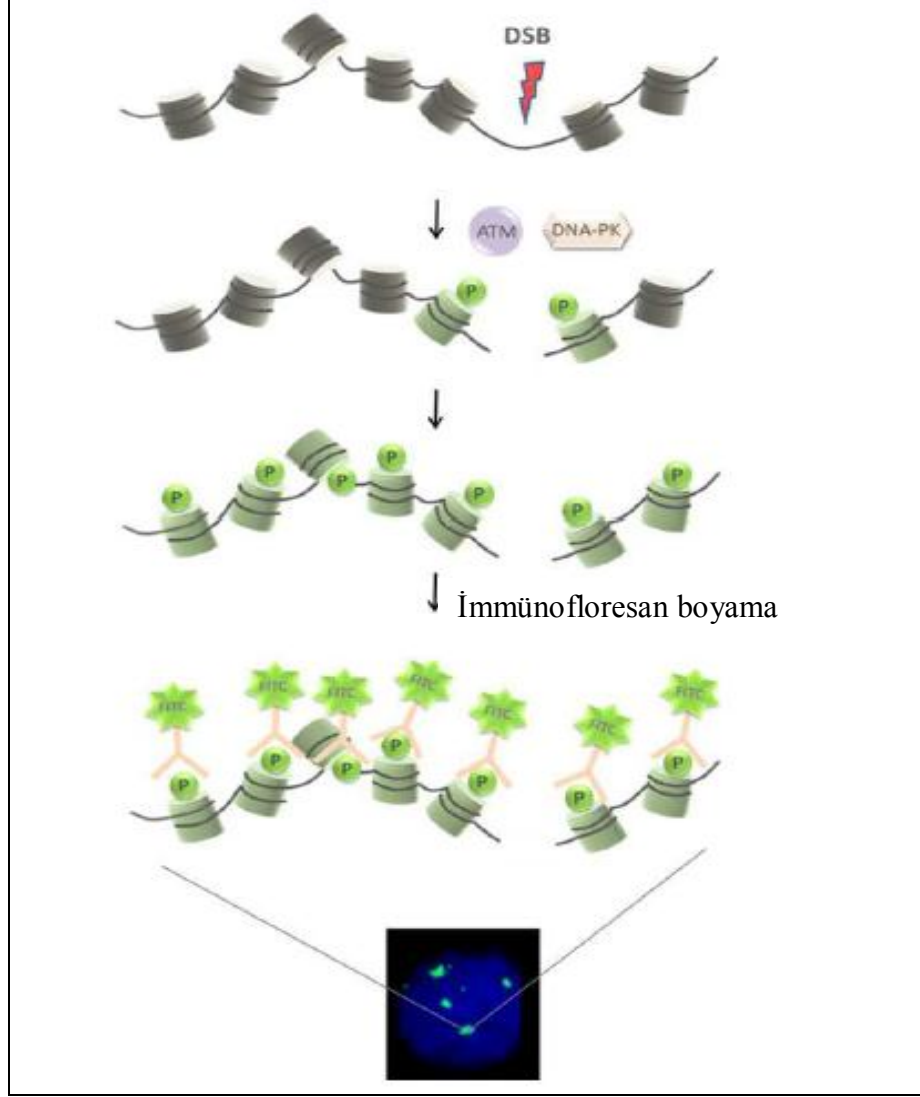
**Şekil 2.15.**  $\gamma$ -H2AX histonunun kromatin içerisindeki görünümü (Kinner ve ark. 2008). H2A: H2A histonunu, H2B: H2B histonunu, H3: H3 histonunu, H4: H4 histonunu, P-S139: 139. pozisyonundaki serin aminoasidini belirtmektedir

$\gamma$ -H2AX fokus testinde H2AX histonunun fosforilasyonu ile oluşan  $\gamma$ -H2AX molekülleri, immunofloresan boyama yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatlarda,

floresan mikroskop altında  $\gamma$ -H2AX fokusları olarak görülebilmektedir. Her bir çift zincir kırığı için binlerce  $\gamma$ -H2AX molekülü oluşmakta ve bu moleküllerin immünofloresan olarak işaretlenmesiyle bir  $\gamma$ -H2AX fokusu ortaya çıkmaktadır (Muslimovic ve ark. 2012). Dolayısıyla her  $\gamma$ -H2AX fokusu bir çift zincir kırığına karşılık gelmektedir.

Bir çift zincir kırığı için binlerce  $\gamma$ -H2AX molekülünün oluşması bu testin çift zincir kırığının belirlenmesindeki duyarlılığını ortaya koymaktadır. Ayrıca çift zincir kırığının tamir edilmesi ile o bölgedeki  $\gamma$ -H2AX fokusun ortadan kalkması arasında çok yakın bir ilişki vardır. Bu noktadaki bir sınırlama ise düşük sitotoksik dozların kullanımını esas almaktadır. Genomda, 100 – 150 civarı çift zincir kırığı oluşturan düşük sitotoksik dozlar kullanıldığında oluşan fokus sayısı ile çift zincir kırığı arasındaki oran çok daha anlamlıdır.  $\gamma$ -H2AX fokusları DNA tamir proteinlerine göre çok daha duyarlı bir çift zincir kırığı belirteçidir. Çünkü DNA tamir proteinleri hücre içinde sürekli bulunurken  $\gamma$ -H2AX fokusları çift zincir kırığı oluşan bölgelerde hızlı bir şekilde oluşmakta ve çift zincir kırığı tamirine bağlı olarak aynı oranda ortadan kalkmaktadır (Ismail ve Hendzel 2008).

$\gamma$ -H2AX fokus testinin temelini immünofloresan boyama yöntemi oluşturmaktadır. Bu yöntem dâhilinde, sırasıyla hücrelerin fiksasyonu ve permeabilizasyonu sağlanır. Daha sonra blokaj işlemi uygulanarak spesifik olmayan bölgelere primer antikorun bağlanması engellenir. Blokaj işlemi takiben hücreler, önce anti-fosfo histon H2AX monoklonal primer antikoru ile daha sonra da florokrom boya ile işaretlenmiş sekonder antikor ile bir süre inkübe edilirler. Son olarak floresan DAPI/Antifade boya solüsyonu ile nükleusun karşıt boyanması sağlanır. Şekil 2.16'da  $\gamma$ -H2AX fosforilasyonunun immünofloresan analizi gösterilmiştir.



**Şekil 2.16.**  $\gamma$ -H2AX fosforilasyonunun immünofloresan analizi (Muslimovic ve ark. 2012)

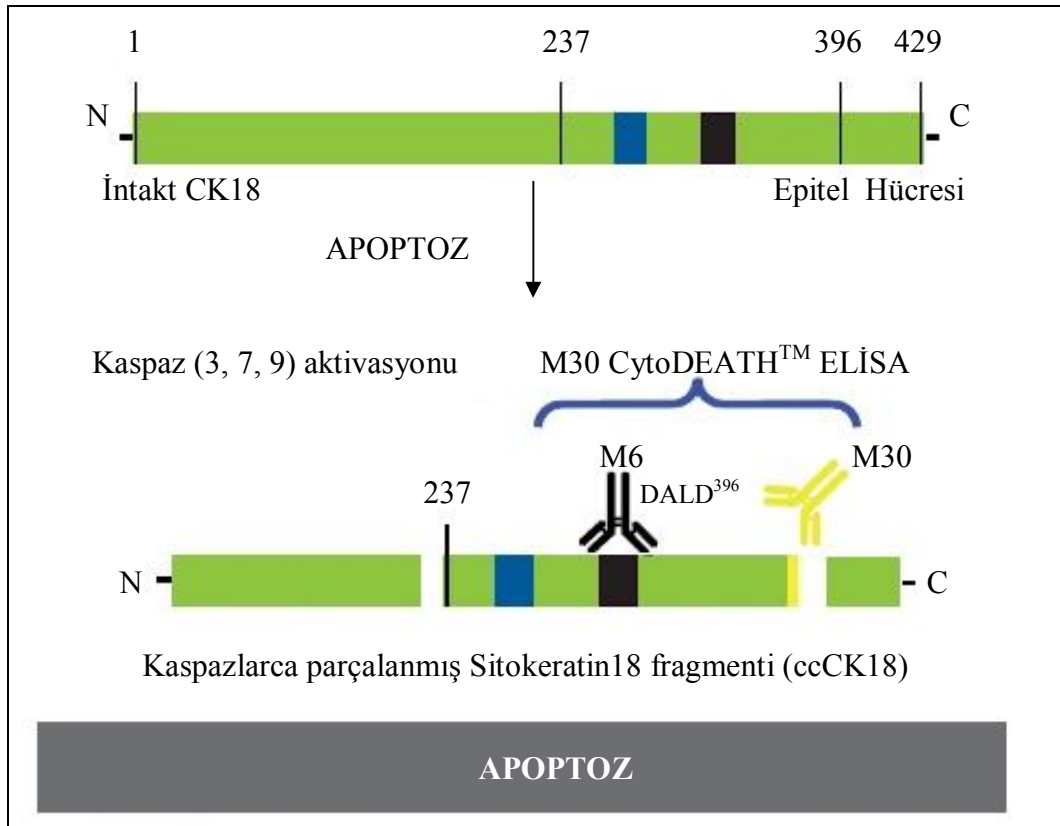
$\gamma$ -H2AX fokus sayımı yapılırken nükleusların kesin sınırlarının bilinmesi fokusların doğru değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle  $\gamma$ -H2AX fokuslarının sayımı için floresan mikroskoba entegre dijital bir fotoğraf makinesi ve ilgili bilgisayar programı yardımıyla fotoğraflar çekilir. FITC filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflarda değerlendirmeye alınacak nükleuslar için öncelikle DAPI filtresi kullanılarak çekilmiş fotoğrafları incelenmeli ve nükleusların sınırları belirlenmelidir. Daha sonra FITC filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflar manuel sayımla ya da Foci Counter benzeri programlarla değerlendirilebilir.  $\gamma$ -H2AX fokuslarının sayımında, her doz grubu için en az 50 nükleus değerlendirmeye alınır (Muslimovic ve ark. 2012).



### 2.4.3. M30 ve M65 testleri

#### M30 testi

Apoptoz sırasında kaspazlar çeşitli hücre proteinleri parçalar. Epitel hücrelerinde, bu substratlardan biri de ara filament sitokeratin 18 proteini (CK18) dir. CK18 apoptoz süresince kaspazlarca iki ayrı bölgeden (Asp 237 ve Asp 396) parçalanır. M30 antikor, CK18'in kaspazlarca parçalanmasından sonrası açığa çıkan 396. aspartik asit kalıntısının neo-epitopunu tanır (Şekil 2.17). Bu pozisyonda parçalanma kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 tarafından meydana getirilir (Leers ve ark. 1999). M30 CytoDeath Elisa, K18Asp396 neo-epitoplarını içeren kaspazla kırılmış CK18 (ccK18) fragmentlerinin miktarını ölçer. Epitel hücrelerinde apoptosisin indüklenmesinden sonra ccK18 artışı ilk olarak hücre ekstraktlarında gözlenir. Antijenin hücre dışı boşluğa salınması daha sonra gerçekleşir (Hägg ve ark. 2002).

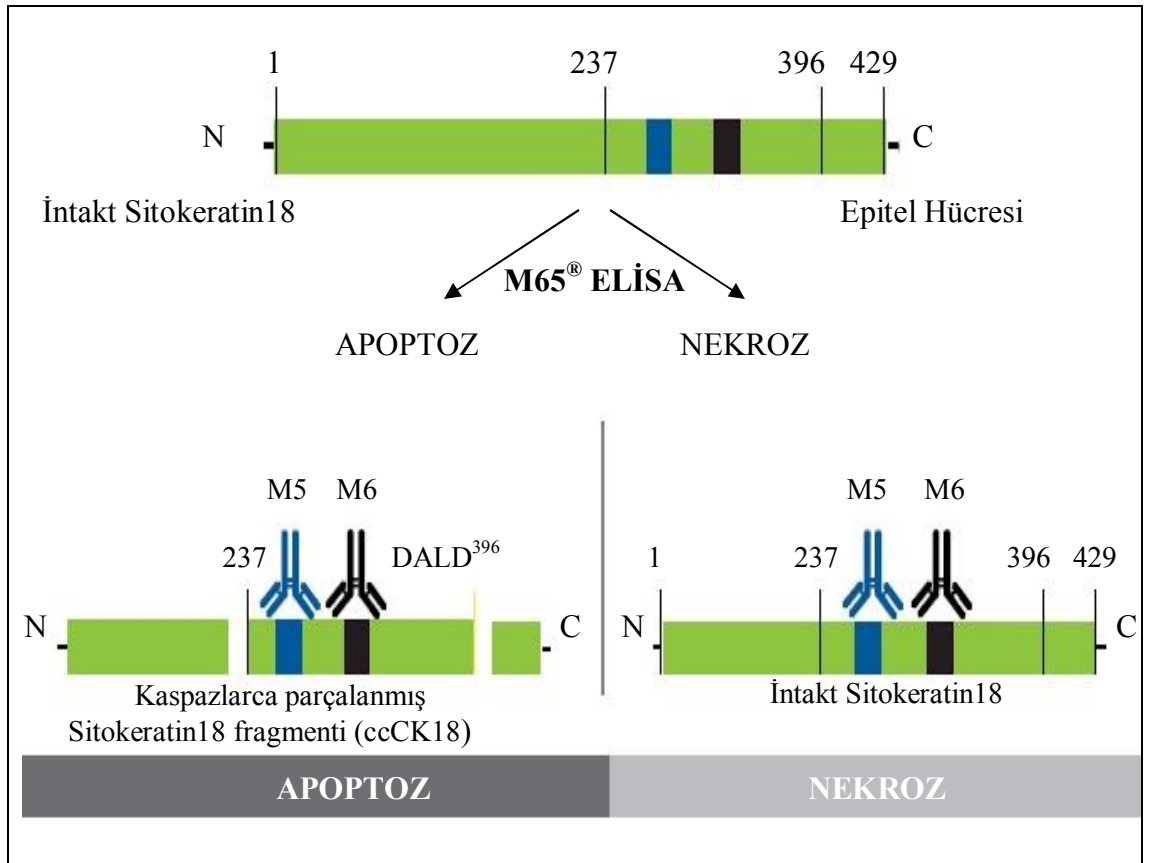


Şekil 2.17. M30 test kitinin çalışma mekanizması (Anonim 2010b) (<http://www.enzolifesciences.com>, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır)

Ölçülen absorbansa karşı bilinen konsantrasyonun standart eğrisinin çizilmesi ile örnekteki antijen miktarı ölçülebilir. Antijenin konsantrasyonu litredeki birim olarak (U/L) ifade edilir (Altun ve ark. 2010).

### M65 testi

Hücre dışı CK18, epitel hücre ölümü için bir belirteç gibi de kullanılabilir (Altun ve ark. 2010). Nekroz sırasında hücre membran bütünlüğünün kaybı, hücre dışına, CK18 gibi hücre içi proteinlerin serbest bırakılması ile sonuçlanır. Apoptosis, plazma membranı bütünlüğünü koruyan hücre ölümünün aktif bir formunu temsil eder, fakat genellikle hücre içi bileşenleri serbest kalan nekroz tarafından takip edilir. M65<sup>®</sup> Elisa testi, ölü hücrelerden serbest kalan çözünebilir CK18'i ölçer (Şekil 2.18).



**Şekil 2.18.** M65<sup>®</sup> Elisa testi ile nekrozun belirlenmesi (Anonim 2010b) (<http://www.enzolifesciences.com> 2010'dan değiştirilerek alınmıştır)

M65<sup>®</sup> Elisa, hücre kültürü süpernatantları ya da insan serum / plazma örneklerinden toplam epitel hücre ölüm miktarını ölçmektedir (Leers ve ark. 1999, Kramer ve ark. 2004, Linder ve ark. 2010).

Ölçülen absorbansa karşı bilinen konsantrasyonun standart eğrisinin çizilmesi ile örnekteki antijen miktarı ölçülebilir. Antijenin konsantrasyonu litredeki birim olarak (U/L) ifade edilir.

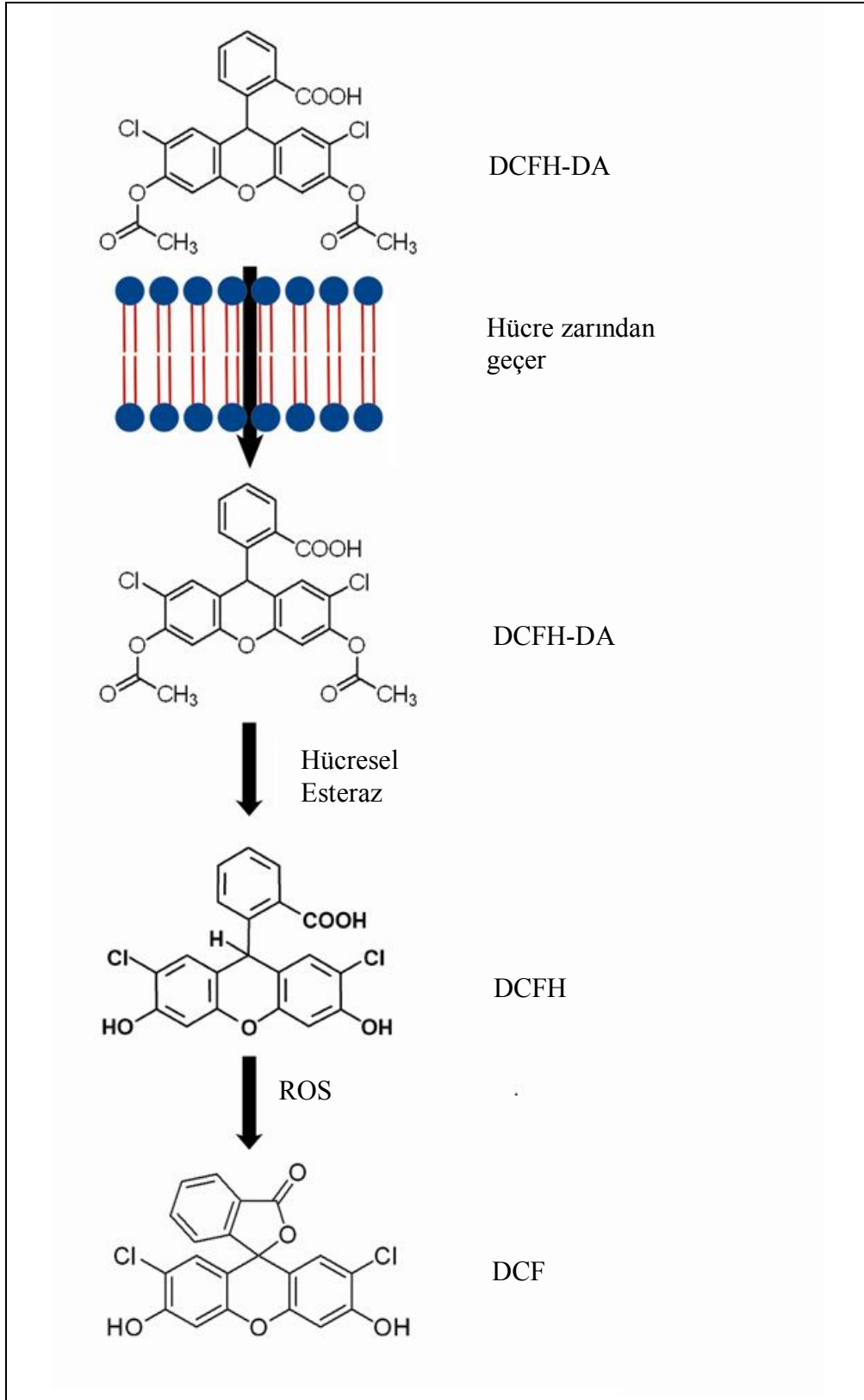
M30 testi (kaspazlarca parçalanmış CK18 miktarı) ile M65 testi (Toplam CK18) arasındaki oran hücre ölüm modunu yansıtmaktadır. M30/M65 oranının yüksek olması apoptozu işaret ederken, oranın düşük olması hücrelerin nekroz yoluyla öldüğünü ortaya koymaktadır (Linder ve ark. 2010).

#### **2.4.4. Enzimatik analizler**

##### **ROS testi**

Cell Biolabs' OxiSelect™ Hücre içi ROS test kiti (Yeşil floresan) hidroksil, peroksil veya hücre içinde reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılan hücre tabanlı bir testtir. Bu testte hücreye giren fluorojenik prob 2', 7'-Diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılır. Kısaca, DCFH-DA hücre içine difüze olur ve hücre esteraz tarafından deasetillenerek floresan olmayan 2', 7'-Diklorodihidrofloresine dönüştürülür. Bu yapı ise ROS tarafından oldukça floresan özellikteki 2', 7'-Diklorodihidrofloresin (DCF)'e hızlı bir şekilde oksitlenir. Floresan yoğunluğu hücre sitozolü içindeki ROS seviyesi ile orantılıdır (Pogue ve ark. 2012).

Hücreler, 96 kuyucuklu mikrotiplerde kültüre edilir ve sonra DCFH-DA ile birlikte inkübasyona bırakılır. Etkisi araştırılan antioksidan veya ROS örnekleri hücrelere eklenir. Kısa bir inkübasyondan sonra, hücreler standart floresan plate okuyucuda okunabilir. İncelenen örneklerin ROS ya da antioksidan içeriği DCF standart eğri ile karşılaştırılarak belirlenebilir (Şekil 2.19).



**Şekil 2.19.** DCF testinin mekanizması (Anonim 2009b) (Biolabs Inc. izniyle kullanılmıştır).

## 2.5. Metal ve Metal Alaşım Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri

Metal ve metal alaşım nanopartiküller, küçük boyutu ve geniş yüzey alanları ile birlikte aynı bileşimdeki daha büyük formlarından çok farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip olmaları sebebiyle birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı doğaya ve insan sağlığına olumsuz etkileri olabileceği düşüncesiyle bilim insanlarının dikkatini çekmişlerdir. Yakın zamanda başlanan nanotoksisite çalışmaları, nanopartiküllerin hücre içerisine farklı yollarla girerek, hücre içi yapılarla ve çekirdek materyali ile etkileştiğini ve sonuçta toksik etkiler oluşturduklarını ortaya koymuştur. Ancak günümüze kadar alüminyum, altın, gümüş, bakır, çinko gibi bazı metal ve metaloksit tabanlı nanopartiküllerin çeşitli hücre tipleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmış olmasına rağmen metal alaşımlarına ait çalışmalar sınırlıdır.

Fahmy ve Cormier (2006), solunum sistemi üzerinde, havadaki kirleticilerin etkisini belirlemek için, HEp-2 solunum yolu epitel hücrelerini, silisyum oksit ( $\text{SiO}_2$ ), demir oksit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ve bakır oksit ( $\text{CuO}$ ) nanopartiküllerin artan dozlarına maruz bırakmışlardır. Çalışma sonucunda  $\text{SiO}_2$  ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 'ün yüksek dozlarda bile HEp-2 hücreleri için toksik etki göstermez iken bakır oksitin ( $\text{CuO}$ ), doz artışına bağlı olarak sitotoksisiteye neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

Farklı metal oksitlerin ( $\text{CuO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ve karbon nanotüplerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, farklı nanopartiküllerin toksik etkilerinin de farklı olduğu bildirilmiştir. Bu nanopartiküller arasında sitotoksik ve genotoksik etkiler bakımından  $\text{CuO}$  nanopartiküllerinin en toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Karlsson ve ark. 2008).

Sharma ve ark.(2009) kozmetikte yaygın olarak kullanılan maddelerden biri olan çinko oksit ( $\text{ZnO}$ ) nanopartiküllerin, A431 insan epidermal hücre hattı üzerindeki genotoksik etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada,  $\text{ZnO}$  nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda dahi lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres yoluyla insan epidermal hücrelerinde genotoksik etkiye yol açtıklarını göstermişlerdir.

Ostrovsky ve ark. (2009) ZnO nanopartiküllerinin birçok insan glioma hücre hatında (A172, U87, LNZ308, LN18 ve LN229) sitotoksik etki yaptığını ancak normal insan astrositlerde hiçbir sitotoksik etki yapmadığını bildirmişlerdir. ZnO nanopartiküllerin normal periferik kan mononükleer hücreleri ile karşılaştırıldığında HL60 insan myeloblastik lösemi hücrelerini öldürmek için tercihli bir yol izlediğini saptamışlardır (Premanathan ve ark. 2011).

İki insan akciğer hücre hattı (A549 ve THP-1) üzerinde benzer eşdeğer küresel çapa sahip çeşitli elemental kompozisyondaki 24 nanopartikülün toksik etkisinin değerlendirildiği çalışmada, bakır ve çinko tabanlı nanopartiküllerin en toksik olduğu tespit edilmiştir. Titanyum, alüminyum, seryum ve zirkonyum tabanlı nanopartiküller orta derecede toksisite gösterirken tungsten karbür nanopartiküller hiçbir toksisite göstermemiştir. Ayrıca sitotoksisite ve eşdeğer küresel çap veya spesifik yüzey alanı arasında hiçbir korelasyon bulunmamıştır (Lanone ve ark. 2009).

Ahamed ve ark. (2010) A549 insan akciğer epitel hücrelerinde p53 yolağı aracılığıyla CuO nanopartiküllerince indüklenen genotoksik yanıtı değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığını ve CuO nanopartiküllerinin doza bağlı olarak oksidatif stres yoluyla genotoksik hasara neden olduklarını göstermişlerdir.

Moschini ve ark. (2010) bakıroksit ve titanyumdioksit (CuO ve TiO<sub>2</sub>) nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini karşılaştırmak için nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonunu yaptıktan sonra hücrelere uygulamış ve hücre-partikül etkileşimleri, membran bütünlüğü, canlılık ve oksidatif stres durumlarını incelemişlerdir. TiO<sub>2</sub>'ye maruz kaldıktan sonra hiçbir etki gözlenmezken CuO'ya maruz kalma durumunda hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir.

Papageorgiu ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada nanoboyutlu kobalt-krom alaşımının insan fibroblastları üzerindeki genotoksik etkileri komet testi yapılarak araştırılmış ve DNA hasarında artış olduğu ortaya konulmuştur. Bir diğer çalışmada ise

yine kobalt-krom alaşımlarının primer insan fibroblastları üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri trypan blue ve mikronükleus testleri ile değerlendirilmiş ve çalışma sonunda hem sitotoksisite hem de genetik hasar frekanslarında anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir (Tsaousi ve ark. 2010).

Gomez ve ark. (2011) medikal implantlarda kullanılan titanyum alaşım nanopartiküllerin (Ti-6Al-4V) CHO-K1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirdikleri araştırmada Ti-6Al-4V alaşımından salınan iyonların DNA ve nükleer hasara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Akhtar ve ark. (2012) ZnO nanopartiküllerinin HepG-2 insan hepatoselüler karsinom, A549 insan akciğer adenokarsinom, BEAS-2B insan bronşiyal epitel ve primer sıçan astrositler ve hepatositleri üzerindeki etkilerini araştırmış ve sitotoksik etkilerin hücre tipine göre farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir.

Klien ve Godnić-cvar (2012) metal nanopartiküllerin in vivo genotoksik etkilerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, bazı nanopartikül türlerinin deney hayvanlarında hem DNA zincirinde kırılmalara hem de kromozomal hasarlara neden olduğunu, bu genotoksik etkilerin, sadece partikül büyüklüğü, yüzey modifikasyonu (partikül kaplama) ve maruz kalma biçimine değil, aynı zamanda maruziyet süresine de bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Hahn ve ark. (2012) primer endotelyal ve düz kas hücrelerine farklı dozlarda alaşım nanopartiküller uyguladıkları çalışmada, kobalt ve nikel nanopartiküllerin en yüksek sitotoksisiteye neden olduğunu, titanyum, nikel-demir ve nikel-titanyum nanopartiküllerin ise 10 µM'nin altındaki nanopartikül konsantrasyonlarında hücreler üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Gümüş ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ZnO nanopartiküllerinin insan periferel lenfosit hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik, klastojenik ve mutajenik etkiler meydana getirdiği belirtilmiştir.

Shukla ve ark. (2013) TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin HepG2 insan karaciğer hücrelerinde oksidatif hasar oluşturarak apoptozise neden olduğunu bildirmişler. 1µg/ml konsantrasyonda bile oksidatif hasar oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Valdiglesias ve ark. (2013) ZnO nanopartiküllerin insan SHSY5Y nöral hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada ZnO nanopartiküllerin hücre içerisine girmediği ancak ortamda bulunması sebebiyle dahi canlılığı azaltması, MN oluşumu, H2AX fosforilasyonu ve DNA hasarı oluşturmak suretiyle doza ve zamana bağlı olarak toksisiteyi indüklediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise ZnO nanopartiküllerin L132 insan akciğer epitel hücrelerinde oksidatif stress aracılığıyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Sahu ve ark. 2013).

Metal nanopartiküller ile ilgili yoğun miktarda çalışma bulunmasına karşın, metal alaşım partükülleri ile ilgili son derece sınırlı sayıda çalışmaya rastlanabilmektedir. Metal nanopartiküllerin boyutları küçüldükçe aynı elemental yapıdaki daha büyük saf metallere çok farklı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterdiği ve metal alaşım nanopartiküllerin ise kendilerini oluşturan metal partüküllerden farklı özelliklere sahip oldukları göz önüne alındığında nanotoksikite çalışmalarının artarak devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Bakır-Çinko (Cu-Zn) metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B sağlıklı insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılacak olan alaşım partikülün sitotoksitesi ve genotoksitesi ile ilgili veriler ilk kez ortaya konulacağı için çalışma özgün değere sahiptir.

Ayrıca elde edilen bulgular, adı geçen alaşım formlarının biyolojik uygulamalarında dozaj belirlenmesi ve çevresel regülasyonlarda konsantrasyon belirlenmesi açısından veri sağlayacaktır.



### 3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan akciğer epiteli (BEAS-2B) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla klonojenik test, XTT testi, MN testi, komet testi,  $\gamma$ -H2AX testi ile M30, M65 ve ROS testleri uygulanmıştır. Çalışma Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmalarda kullanılan ekipman

<b>Ekipman</b>	<b>Marka / Model</b>
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Görüntüleme sistemi	KAMERAM
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA – HI 221
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CHL
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO <sub>2</sub> takviyeli)	BINDER – CB 150

**Çizelge 3.1.** Çalışmalarda kullanılan ekipman (devam)

<b>Ekipman</b>	<b>Marka / Model</b>
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO
Inverted mikroskop	SOIF
Elisa Reader	
Fluoroskan Ascent FL 2.6	THERMO
Hücre sayım cihazı	ROCHE

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma / Katalog No</b>
8 kuyucuklu lamalar	BD BIOCOAT – LOT:87501
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml’lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril 15 ml lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Steril petriler (60 ve 100 mm’lik)	FALCON
Etil alkol	AY-KİM
Metanol	MERCK 1060082500
Asetik asit	MERCK 1000632511
Potasyum	MERCK 1049361000
Sitokalsin-B	SIGMA C6762
Giemsa	MERCK 1092040500
Kristal viyole	MERCK 1159400100
Paraformaldehit	SIGMA – ALDRICH P6148
Triton X-100	GERBU 2000
Bovine Serum Albumin	SIGMA- ALDRICH A9418
Anti-H2AX primer antikor	PIERCE MA-5 15310
Alexa Fluor 488 sekonder antikor	INVITROGEN – A11008
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA 12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA 08537
Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler (devam)

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma / Katalog No</b>
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA	SIGMA – ALDRICH T4049
DPBS/Modified	THERMO SH30028.02
DAPI/antifade boyası	VECTASHIELD H-1200
XTT Test Kiti	BI
M30 CytoDeath™ Elisa	PEVİVA
M65® Elisa testi	PEVİVA
OxiSelect™ Hücreiçi ROS test kiti	CELL BİOLABS

### **3.2. Çözeltiler**

#### **Cu-Zn alaşım nanopartikül kolloidlerinin hazırlanması**

Yapılan çalışmada bileşiminde % 60 Cu - % 40 Zn bulunan 150 nm den daha küçük boyuta (<150 nm) sahip Cu-Zn metal alaşım nanopartikül kullanılmıştır.

Cu-Zn metal alaşım nanopartikülleri toz formda temin edilmiştir. Distile su içerisinde 1 mg/ml oranda süspanse edilen Cu-Zn metal alaşım nanopartiküller, ultra sonikatörde 20 dakika aralıksız sonike edilerek hazırlanmıştır.

#### **Besiyeri hazırlanması**

500 ml'lik şişedeki RPMI-1640 medyum içerisine; 60 ml fetal bovine serum (FBS), 6 ml penisilin – streptomisin, 6 ml sodyum piruvat, 3 ml L-glutamin eklenerek hazırlanmıştır.

#### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solüsyonunun hazırlanması**

% 35'lik stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 6,318 µl çekilerek 4993,682 µl steril distile su içeren falkon tüpüne eklenmiş ve 5 ml'lik yeni bir stok oluşturulmuştur.

**Klonojenik test için:****Kristal viyole boyasının hazırlanması**

0,5 g toz halindeki kristal viyole boyası 20 ml metanol içerisinde çözdürülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**XTT testi için:****XTT ajanlarının hazırlanması**

-20 °C'de bulunan XTT<sup>I</sup> ve XTT<sup>II</sup> çözeltileri ışıksız ortamda 1:50 oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

**MN testi için:****Sitokalsin-B hazırlanması**

0,001 g Sitokalsin-B, % 70'lik bir miktar etanolde çözülmüş ve steril saf su ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. -20 °C'de alıquotlanarak saklanmıştır.

**KCl çözeltisinin (Hipotonik) hazırlanması**

1,397 g KCl 250 ml suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

**Carnoy çözeltisinin (Fiksatif) hazırlanması**

Metanol: Asetik asit (3:1) oranında karıştırılarak taze olarak hazırlanıp soğuk olarak kullanılmıştır.

**Dulbecco's fosfat tampon çözeltisinin (DPBS) hazırlanması**

0,48 g DPBS 500 ml distile suda çözdürülmüştür.

**Giemsa boyasının hazırlanması**

5 ml Giemsa boyası üzerine 95 ml DPBS eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan boya filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

### **Komet testi için:**

#### **Lamların agar ile kaplanması**

0,75g normal melting agaroz 100ml suda çözülmüştür. Lamlar rodajlı kısmının yarısına kadar agarozla batırılmış, lamların alt yüzeyleri silinerek havada kurumaya bırakılmıştır.

#### **Lizis Buffer Hazırlanması**

178ml suda 2,5M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA, ve 100mM Tris karıştırılmıştır (pH= 10). Uygulamadan önce solüsyona toplam hacmin % 1'i kadar Triton X 100 ve % 10'u kadar DMSO eklenmiştir.

#### **Running Buffer Hazırlanması**

1,5lt suda 0,56g Na<sub>2</sub>EDTA,ve 8g NaOH çözümlenerek (pH 13) kullanılmıştır.

#### **Nötralizasyon Buffer Hazırlanması**

100 ml suda 4,8456g Tris (pH=7,5) çözülmüştür. +4 °C'de saklanmıştır.

#### **Low melting agaroz (LMA) için PBS hazırlanması**

0,48g PBS, 50ml suda çözülmüştür.

#### **Low melting agaroz (LMA) hazırlanması**

0,065g LMA 10ml PBS'de çözülmüştür.

#### **Etidyum bromür boyasının hazırlanması**

Etidyum bromür 20 µg/ml konsantrasyonda distile su içerisinde çözülmüştür.

### **γ-h2ax testi için:**

#### **% 1 BSA hazırlanması**

100 mg BSA tartılarak 10 ml suda çözülmüştür.

#### **% 0,2'lik Triton X-100 hazırlanması**

9.98 ml DPBS üzerine 20 µl Triton X-100 eklenmiştir.

#### **% 4 Paraformaldehit hazırlanması**

200 mg paraformaldehit 5 ml suda çözülmüştür.

#### **Primer antikor hazırlanması**

1/200 primer antikor: 1 ml BSA üzerine 5 µl primer antikor eklenmiştir.

#### **Sekonder antikor hazırlanması**

1/50 sekonder antikor: 5 ml BSA üzerine 100 µl sekonder antikor eklenmiştir.

#### **M30 testi için:**

##### **M30 cytodeath HRP konjugat seyreltilmesi**

M30 cytodeath konjugat seyreltme tampon ile M30 cytodeath HRP konjugat ile seyreltilmiştir. Doğrudan HRP konjugat içeren şişeye M30 cytodeath konjugat seyreltme tamponundan 9,2 ml eklenmiştir.

##### **M30 cytodeath yıkama tabletin çözüldürülmesi**

500 ml deiyonize suda bir yıkama tableti çözümlenerek kullanılmıştır.

#### **M65 testi için:**

##### **M65 HRP konjugatının seyreltilmesi**

M65 HRP konjugatı, M65 konjugat dilüsyonu tamponu kullanılarak seyreltilmiştir.

##### **Yıkama çözeltilisinin seyreltilmesi**

50 ml yıkama çözeltilisi, 450 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir.

##### **Metafosforik asit (MPA) hazırlanması**

Deiyonize suda % 5 (w/v) metafosforik asit (MPA) çözeltilisi taze olarak hazırlanmıştır.

## **ROS analizi için reaktiflerin hazırlanması**

### **1X DCFH-DA**

FBS'siz hücre kültür besiyerinde 20X DCFH-DA stok çözeltisi 1X'e seyreltilerek kullanılmıştır.

### **3.3. Deney Planı**

Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan akciğer epitelyum hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için;

1. Nanopartikül kolloidlerinin karakterizasyonunun yapılması
2. Hücre hattının deney protokolleri için hazırlanması
3. Kontrol ve doz gruplarının belirlenmesi
4. Sitotoksisite testlerinin (klonojenik test ve XTT testi) yapılması
5. Genotoksisite testlerinin (MN, komet ve  $\gamma$ -H2AX) yapılması
6. Nanopartikülün neden olduğu hücre ölüm yolağının M30 ve M65 testleri ile belirlenmesi
7. Olası etki mekanizmalarının hücre içi ROS analizleri ile belirlenmesi planlanmıştır.

#### **3.3.1. Bakır-çinko metal alaşım nanopartikül kolloidlerinin karakterizasyonu**

Yapılan çalışmada 1 mg Cu-Zn metal alaşım nanopartikülleri 1 ml distile su içinde 20 dk ultra sonikatörde sonike edilmiştir. Elde edilen çözeltinin karakterizasyonu hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda zeta potansiyeli ölçümü, dinamik ışık

saçılım spektrofotometresi (DLS) ve transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizleri yaptırılmıştır.

### **Zeta potansiyeli ölçümü**

Zeta potansiyeli tanecikler arasındaki itme veya çekme değerinin ölçüsünü ifade etmektedir (Hunter 1981). Partiküller yüzey yüklerine bağlı olarak bir araya gelip agregat oluşturabilirler. Genellikle 15 mV'dan yüksek ya da -15mV'dan küçük değere sahip partiküller stabil olarak kabul edilirler. Bundan dolayı nanopartikül çalışmalarında kullanılacak bir çözeltideki partiküllerin zeta potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin zeta potansiyeli 25 °C'de Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins.) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

### **Dinamik ışık saçılım (DLS) spektrofotometresi analizi**

Yapılan çalışmada, Cu-Zn alaşım nanopartikül çözeltisindeki partiküllerin büyüklükleri Malvern CGS-3 (Malvern Inst.) dinamik ışık saçılım spektrofotometresi kullanılarak 25 °C sıcaklıkta ve 90 derece açıda ölçülmüştür.

### **Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizleri**

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin büyüklük ve dağılımı hakkında veri elde etmek ve DLS analizi ile elde edilen verileri doğrulamak için transmisyon elektron mikroskopik (TEM) analizler gerçekleştirilmiştir. Bunun için örnekler 300 mesh'lik bakır gridler üzerine damlatıldıktan sonra bir gece kurumaya bırakılmıştır (Dhawan ve ark. 2006). Kurutma sonrasında gridler FEI marka Technai Spirit G2 model 120 kV transmisyon elektron mikroskobu altında incelenmiştir. Uygun görüntü alanlarının Morada TEM kamerası ve Soft Imaging system programı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.



### 3.3.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı

Genotoksisite araştırmalarında kullanılabilirliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş, ATCC kökenli CRL 9609 numaralı hazır hücre hatları olan normal insan akciğer BEAS-2B epitel hücre hattı seçilmiştir (Gurr ve ark. 2005, Park ve ark. 2008, Xia ve ark. 2008, Kim ve ark. 2009).

Sağlıklı insan alveolar bazal epitel hücreleri (BEAS-2B), filtre kapaklı T-75 flasklarda, RPMI-1640 ile hazırlanmış besiyeri ortamında çoğaltılmıştır. BEAS-2B hücre kültürleri, havalandırılmalı T75 flasklar içerisinde 37°C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortama sahip inkübatör içerisinde yaşatılmıştır. Flasklara konulacak olan besiyeri; RPMI-1640 + % 1 sodyum pirüvat+ % 10 fetal bovin serum + 2 mM L-glutamin, 50 µg/ml penisilin - streptomisinden oluşmuştur. Hücreler haftada 2 kez pasajlanmıştır.

#### Hücrelerin pasajlanma protokolü

1. Pasajlanması gereken kültür flasksındaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
2. Hücre tabakası uygun miktarda PBS ile ~1 dk yıkanmış ve PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
3. Tripsin eklenerek 1 – 2 dk beklenmiş ve invert mikroskop altında hücrelerin zeminden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir.
4. Tripsin reaksiyonunu durdurmak için flaska tripsin ile aynı miktarda besiyeri eklenmiştir.
5. Flasktaki hücre süspansiyonu uygun bir serolojik pipet ile toplanarak 15 ml'lik falkon tüpüne konulmuştur.
6. Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 500 µl kalacak şekilde aspire edilerek, kalan pellet yeniden süspanse edilmiştir.
8. Hücre sayım cihazı ile toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
9. Yeni flaska uygun miktarda besiyeri eklenmiş ve belirlenen hacimdeki hücre süspansiyonu flaska aktarılarak inkübatöre kaldırılmıştır.

Hücrelerin pasajlanması için gereken malzemeler ve kimyasallar Çizelge 3.3'te, flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları ise Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Hücrelerin pasajlanması için gereken malzemeler ve kimyasallar

<b>GEREKLİ MALZEMELER</b>	<b>KİMYASALLAR</b>
15 ml steril tüpler	PBS
Steril pipetler	Tripsin (% 0,25'lik)
Flask(lar)	Hazırlanmış besiyeri

**Çizelge 3.4.** Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları

<b>FLASKLAR</b>	<b>(D)PBS</b>	<b>TRİPSİN</b>	<b>BESİYERİ</b>
T-12,5	1 – 2 ml	1 ml	2,5 ml
T-25	2 – 3 ml	2 – 3 ml	5 ml
T-75	5 – 6 ml	4 – 5 ml	10 ml

### **3.3.3. Bakır–çinko metal alaşım nanopartiküllerin hücre içine alınımı**

1 mg/ml oranında hazırlanan Cu-Zn metal alaşım stok çözeltisinden BEAS-2B hücre hattı besiyerine 2 µg/ml olacak şekilde dozlama yapılmış ve partiküllerin hücre içine alınıp alınmadıkları elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Bu işlem hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.4. Kontrol ve doz grupları**

Bu çalışmada büyüme, solvent ve pozitif olmak üzere üç tip kontrol grubu kullanılmıştır.

**Büyüme Kontrol:** Hücreler herhangi bir ajana maruz bırakılmamıştır.

**Solvent Kontrol:** Hücreler sitotoksisite testlerinde 100 µl/ml, genotoksisite testlerinde ise 3,2 µl/ml steril su ile muamele edilmiştir.

Pozitif Kontrol: Sitotoksisite ve genotoksisite testlerinde test sistemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla hücreler Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol grubunda besiyerinde 147µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olacak şekilde dozlama yapılmıştır.

Sitotoksisite test grupları:

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için BEAS-2B hücreleri 24 saat boyunca Çizelge 3.5'te belirtilen doz konsantrasyonlarındaki nanopartikül çözeltisine maruz bırakılarak, klonojenik test ve XTT testleri yapılmıştır. Testlerin sonucuna göre IC50 değeri belirlenmiştir.

**Çizelge 3.5.** Sitotoksisite testleri için kullanılan dozlar

KONTROL GRUPLARI		DOZLAR	
Büyüme Kontrol	0,1 µg/ml	8 µg/ml	20 µg/ml
Solvent Kontrol	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml
Pozitif Kontrol	4 µg/ml	12 µg/ml	50 µg/ml
	5 µg/ml	16 µg/ml	100 µg/ml

Genotoksisite test grupları:

Sitotoksisite testlerinin değerlendirilmesi sonucunda genotoksik dozlar belirlenmiştir. Test sonuçlarına göre düşük sitotoksik etkiye sahip değerler seçilerek genotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenen genotoksik doz değerleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Genotoksisite testleri için kullanılan dozlar

KONTROL GRUPLARI		DOZLAR	
Büyüme Kontrol	0,1 µg/ml	0,8 µg/ml	
Solvent Kontrol	0,2 µg/ml	1,6 µg/ml	
Pozitif Kontrol	0,4 µg/ml	3,2 µg/ml	

### 3.3.5. Sitotoksisite testlerinin yapılması

#### Klonojenik Test

Bu testte Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerin sitotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla BEAS-2B hücre hatları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda klonojenik test analizi yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

Klonojenik test protokolü:

1. Hücreler 15 ml'lik falkon tüpünde toplanmıştır.
2. Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 1 ml kalacak şekilde aspire edilmiş ve kalan pellet süspanse edilmiştir.
4. Hücre sayımı yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
5. Flaskalara 50000 hücre ekilmiştir.
6. Flaskalara ekilen hücreler %80 ve üzeri konfluent hale geldiği zaman besiyeri değiştirilerek dozlama yapılmıştır.
7. Flaskalara Cu-Zn alaşım nanopartikül solüsyonunun farklı konsantrasyonları uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
8. Klonojenik test analizi için 5 miligram Cu-Zn alaşım nanopartikül 5 ml steril distile suda çözülmüştür.
9. Cu-Zn alaşım nanopartikül HD 2070 Bandelin Sonoplus marka sonikatörde 20 dakika boyunca sonike edilmiştir.
10. Belirlenen dozlar bu süspansiyondan herhangi bir seyreltme işlemi yapılmaksızın 2 gün önce ekim yapılmış olan flaskalara aktarılmıştır.
11. İnkübasyon süresinden sonra flaskaların içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
12. Hücreler PBS ile iki kez yıkanmış ve PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
13. Hücreler, tripsinlenerek 15 ml'lik falcon tüplerine alınmıştır.
14. Tüpler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
15. Süpernatant hücreler aspire edilmiş ve kalan pellet yeniden süspanse edilmiştir.
16. Bu hücre süspansiyonundan canlı hücre sayımı yapılmıştır.

17. Toplam canlı hücre sayısı belirlendikten sonra 60 mm'lik petrilere 500 canlı hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu eklenmiş ve petrilere inkübatöre kaldırılmıştır. Her doz için 4 adet 60 mm'lik petriye hücre ekimi yapılmıştır. Ancak 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml dozlarda eklenen 25 lik flasklarda tüm hücreler öldüğü için petrilere ekim yapılamamıştır.

18. Hücre hattının büyüme hızına göre petrilere besiyeri belirli sürelerle tazelenmiştir. BEAS-2B hücre hattı için ekim yapıldıktan 3 – 4 gün sonra ilk besiyeri değişimi yapılmıştır. Bu hücrelerin koloniler oluşturarak büyümeleri ve boyanacak duruma gelmeleri için 7 – 8 gün beklenmiş ve bu süre esnasında, invert mikroskopta koloni gelişimi kontrol edilmiştir.

19. Oluşan koloniler PBS ile yıkanmış, etanol ile 5 dk fikse edilmiş ve kristal viyole boyası ile 5 dk boyanmıştır.

20. Daha sonra her petri için en az 50 hücre içeren kolonilerin sayımı yapılmıştır.

Büyüme kontrol grubu için petri başına ortalama koloni sayısı (L), diğer gruplar için petri başına ortalama koloni sayısı (N) olarak belirtilirse; her doz grubu için % Canlılık =  $(N/L) \cdot 100$  olarak hesaplanmıştır. Bu formülden yararlanılarak, herbir kontrol ve doz gruplarına ilişkin % canlılık hesaplanmış ve elde edilen değerlerden bir dağılım grafiği çizilmiştir. Dağılım grafiği üzerinde düzgün eğim gösteren üç nokta belirlenmiştir. Bu üç noktadan geçen eğim çizgisi çizdirilerek eğim formülü elde edilmiştir.  $Y=aX+b$  şeklinde elde edilen formülde Y değeri yerine 50 yazılarak X değeri hesaplanmıştır.  $Y=50$  iken elde edilen X değeri IC50 olarak kabul edilmiştir.

Her uygulama grubu için 4 petri kullanılmıştır. Deney farklı zamanlarda iki kez 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirlemek için regresyon ve korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Parametrik veriler için Pearson korelasyonu, parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyonu yapılmıştır. Büyüme kontrol grubu ile doz grupları arasındaki farklılık Dunnett testi ile değerlendirilmiştir.

## XTT testi

Yapılan testte Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerin sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla klonojenik testte uygulanan aynı konsantrasyondaki dozlar kullanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

XTT test protokolü:

1. Su eklenmesi gereken kuyucuklara 200 µl su, diğer kuyucuklara blanklar dâhil 200 µl besiyeri eklenmiştir.
2. Hücre sayımı yapılarak blanklar dışındaki besiyeri içeren herbir kuyucuğa 5000'er hücre ekilmiş ve hücreler 24 saat süreyle 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır.
3. 24 saat sonunda besiyeri değiştirilmiştir. Her kuyucuğa yine 200 µl besiyeri eklenmiştir.
4. XTT testi için klonojenik test için belirlenen dozlar kullanılmıştır. Dozlamadan sonra hücreler tekrar inkübasyona kaldırılmıştır.
5. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücreler besiyeri aspire edilerek kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır.
6. Kuyucuklara 100 µl besiyeri eklenmiştir.
7. Mikropakanın her bir kuyucuğuna 50 µl XTT ölçüm solüsyonu eklenmiştir.
8. Hücreler tekrar 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda Elisa cihazında hem 450 nm de hemde 630 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

Bu çalışmada herbir kontrol ve doz grupları farklı zamanlarda üçer tekrarlı olmak üzere dört kez test edilmiştir. XTT testinin sonuçlarına göre aşağıdaki formülle % canlılık hesaplanmıştır. Körler (sadece besiyeri içeren kuyucuklar) dâhil herbir grubun ortalaması alınmıştır. Körlerin ortalamaları, tüm kontrol ve doz gruplarının ortalamalarından çıkarılmıştır. Bu şekilde herbir doz için elde edilen değerlerden aşağıdaki formül kullanılarak dozlara göre inhibisyon hesaplaması yapılmıştır.

$$\text{İnhibisyon} = (1 - \text{İnhibisyonu Hesaplanan Doz Ort.} / \text{Büyüme Kontrol Ort.}) * 100$$

% Canlılık = (100- Hesaplanan Doz İnhibisyonu)

Herbir kontrol ve doz gruplarına ilişkin % canlılık hesaplanarak, elde edilen değerlerden bir dağılım grafiği çizilmiştir. Dağılım grafiği üzerinde düzgün eğim gösteren üç nokta belirlenmiştir. Bu üç noktadan geçen eğim çizgisi çizdirilerek eğim formülü elde edilmiştir.  $Y=aX+b$  şeklinde elde edilen formülde Y değeri yerine 50 yazılarak X değeri hesaplanmıştır.  $Y=50$  iken elde edilen X değeri IC50 olarak kabul edilmiştir.

Deney farklı zamanlarda her seferinde üç tekrarlı olmak üzere dört kez gerçekleştirilmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirleyebilmek için regresyon ve korelasyon analizi yapılmıştır. Parametrik veriler için Pearson korelasyonu, parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyonu yapılmıştır. Kontrol grubu ile doz grupları arasındaki farklılık Dunnett testi ile değerlendirilmiştir.

Sitotoksisite testlerinden elde edilen verilere göre belirlenen konsantrasyonlara göre genotoksisite testleri (mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX testleri ) yapılmıştır.

### **3.3.6. Genotoksisite testlerinin yapılması**

#### **Mikronükleus testi**

Bu test Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerin BEAS-2B hücrelerinde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin (mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumların) tespiti gerçekleştirilmiştir.

Mikronükleus test protokolü:

1. Hücreler 15 ml'lik falkon tüpüne toplanmıştır.
2. Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 1 ml kalacak şekilde aspire edilmiş ve kalan pellet yeniden süspanse edilmiştir.

4. Hücre süspansiyonundan hücre sayımı yapılmış ve tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
5. Flasklara hücre süspansiyonundan 50000 hücre ekilmiş ve ekilen hücreler %80 ve üzeri konfluent hale geldiği zaman belirlenen konsantrasyonlarda dozlama yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre sonunda flaskların içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile 1–2 kez yıkanmış ve PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
7. Flasklara 5 ml taze besiyeri ve 150 µl Sitokalsin-B eklenerek 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.
8. Hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplere toplanmış ve +4 °C’de, 1000 rpm’de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplere oda sıcaklığında taze hazırlanmış hipotonik (KCl) çözeltiden 5 ml eklenmiş ve 3 dk beklenilmiştir.
10. Süre sonunda tüpler tekrar +4 °C’de, 1000 rpm’de, 5 dk santrifüj edilmiş ve hipotonik çözelti uzaklaştırılarak, kalan kısım tekrar süspansiyon edilmiştir.
11. Tüplere taze hazırlanan Carnoy fiksatifinden 5 ml eklenerek 5 dk beklenilmiştir.
12. Tüpler +4 °C’de, 1000 rpm’de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.
13. Pellet süspansiyon edilerek lam üzerine damlatma yöntemi ile yayılmıştır. Lamlar havada kurumaya bırakılmıştır.
14. Daha sonra lamlar Giemsa boyası ile 15 dk boyanmıştır. Süre sonunda lamlar havada kurumaya bırakılmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Deney farklı zamanlarda üç kez gerçekleştirilmiş olup, her tekrarda deney grupları için ikişer preparat değerlendirilmiştir. Mikroskopik değerlendirmeler 40X büyütmede gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme aşamasında 1000 adet hücre sayılmış ve daha sonra binökleusların sayısı 1000’e tamamlanmıştır. Toplam MN sayısı kaydedilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra parametrik ve non-parametrik testler kullanılarak verilerin istatistik analizleri yapılmıştır. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve Tukey HSD testi ile değerlendirilmiştir. Doz gruplarını, kontrol grubu ile



karşılaştırmak için ise Dunnett testi uygulanmıştır. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirleyebilmek için regresyon ve Pearson korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

### **Komet testi**

Bu test, Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinde neden olduğu tek iplik kırıklarının belirlenmesi için Dhawan ve ark. (2009) metoduna göre bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Komet testi sonuçlarından, 2001 yılında Almanya'da gerçekleştirilen uluslararası komet çalıştayında kabul gören ve komet çalışmalarında değerlendirilmesi önerilen (Browne 2009) üç parametre olan; Olive Tail Moment (OTM), Tail DNA (Kuyruk % DNA) ve Tail length (Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )) parametreleri değerlendirilmiştir.

Komet testi protokolü:

1. Hücreler 15 ml'lik falcon tüpüne toplanmış ve +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant kısım aspire edilmiş ve kalan pellet yeniden süspansiyon edilmiştir.
3. Hücre süspansiyonundan hücre sayımı yapılmış ve tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
4. Hücrelerin yoğun olduğu tüpler süspansiyon edildikten sonra üzerine PBS eklenerek seyreltilmiştir.
5. PBS hücre süspansiyonundan 100  $\mu\text{l}$  kullanılarak LMA ile süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyondan 35  $\mu\text{l}$  alınarak önceden agarla kaplanmış olan rodajlı lamlara yavaşça yayılmış ve üzerine 24x60 mm'lik lamel kapatıldıktan sonra donması beklenmiştir.
6. Lamel ile kaplanan preparatlar buz akülerinin üzerine konularak soğumaya bırakılmıştır.
7. Daha sonra lamel +4°C'de 15 dk bekletilmiş ve preparatların üzerindeki lameller yavaşça yana doğru kaydırılarak alınmıştır.
8. Lamel, lizis buffer solüsyonu (100mM EDTA, 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100 ve 10% DMSO) ile muamele edilmiş ve +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

9. Lamlar elektroforez tankına dizilmiş ve Running Buffer solüsyonu (0.3 M NaOH, 1mM EDTA, pH 13) lamların üzerini kaplayacak şekilde tanka doldurulmuş ve 20 dk bekletilmiştir.
10. Güç kaynağı, 25 V 300 mA olarak ayarlanarak 25 dakika yürüme yaptırılmış ve karanlıkta, +4 °C nötralizasyon tamponunda (400 nm Tris, pH 7.5) 5dk bekletilmiştir.
11. Süre sonunda lamlar yıkanmış ve havada kurumaya bırakılmıştır.
12. Lamlar soğuk etanolde 5dk fiske edilerek tekrar kurumaya bırakılmıştır.
13. Daha sonra lamlar Etidyum Bromür ile 1 dk süreyle boyanmış ve komet lamı ile kapatılarak floresan mikroskopta 40X büyütmede fotoğrafları çekilmiştir.

Deney farklı zamanlarda üç tekrarlı olarak yapılmış olup, her tekrarda deney grupları için iki preparat hazırlanmış ve her preparattan 50 hücre incelenmiştir. Kometlerin değerlendirilmesi Kameram21 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra uygun parametrik ve non-parametrik testler kullanılarak verilerin istatistik analizleri hazırlanmıştır. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Grup varyanslarının homojen olduğu durumlarda Tukey HSD testi, homojen değilse Tamhane's T2 testi, kontrol grubu ile karşılaştırmak için ise Dunnett testi uygulanmıştır. Parametrik olmayan veriler Kruskal Wallis (KW) H kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirlemek için regresyon ve korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Parametrik veriler için Pearson korelasyonu, parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyonu yapılmıştır.

### **$\gamma$ -H2AX fokus testi**

Bu testte, Cu-Zn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinde meydana getirdiği çift zincir DNA kırıklarının tespiti amaçlanmıştır.

$\gamma$ -H2AX fokus testi protokolü:

1. BEAS-2B hücreleri tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmıştır.

2. Hücre sayımı yapılarak  $\gamma$ -H2AX testi için kullanılacak olan 8 kuyucuklu kültür lamalarına 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 750  $\mu$ l besiyeri eklenmiştir.
3. İnkübasyon süresi sonunda hücreler ilgili ajanlara 24 saat maruz bırakılmıştır.
4. Süre sonunda kuyucukların içindeki besiyeri aspire edilmiş ve hücreler 300  $\mu$ l PBS/kuyucuk ile 2 kez yıkanmıştır.
5. PBS uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara 100'er  $\mu$ l taze hazırlanmış % 4'lük paraformaldehit eklenerek oda sıcaklığında 10 dk fiksasyon işlemi yapılmıştır.
6. Hücreler 3 kez, 300  $\mu$ l PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100'er  $\mu$ l % 0,2 Triton X-100 eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
7. Hücreler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100'er  $\mu$ l % 1'lik BSA eklenerek oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir.
8. Süre sonunda BSA uzaklaştırılmış ve 1000  $\mu$ l BSA içerisine 5 $\mu$ l primer antikor eklenmiştir. Her kuyucuğa %1'lik BSA ile 1/200 oranında seyreltilmiş olan primer monoklonal anti-fosfo histon H2AX antikorundan 100  $\mu$ l ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.
9. Hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkanmış ve kuyucuklara % 1'lik BSA içerisinde 1/50 oranında seyreltilmiş Alexa-Fluor 488 işaretli sekonder antikordan 100  $\mu$ l eklendikten sonra +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
10. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra kuyucuklar çıkarılmış ve lamdaki hücreler antifade/DAPI ile boyanarak saklanmıştır.
11. Boyama işleminden sonra preparatlar floresan mikroskopta incelenerek 100X büyütmede fotoğrafları çekilmiştir. Her bir çekirdekteki sinyal/fokus sayıları foci counter yazılımı kullanılarak belirlenmiş ve ortalama fokus/hücre sayısı hesaplanmıştır.

Her bir doz grubu için 50+50 olmak üzere 100 hücre analiz edilmiş ve deneyler iki tekrarlı olarak üç kez gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analizler SPSS 15 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra uygun parametrik ve non-parametrik testler kullanılarak verilerin istatistik analizleri yapılmıştır. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (one-way

ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası farklılıkları karşılaştırmak için Tamhane's T2 testi, kontrol grubu ile karşılaştırmak için ise Dunnett testi uygulanmıştır. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirleyebilmek için regresyon ve korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Parametrik veriler için Pearson korelasyonu, parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyonu yapılmıştır.

### **3.3.7. Nanopartikülün neden olduğu hücre ölüm yolağının M30 ve M65 testleri ile belirlenmesi**

#### **M30 testi**

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin apoptotik etkileri Peviva marka M30 CytoDeath Elisa kitinde belirtilen yöntem uygulanarak belirlenmiştir.

M30 test protokolü:

**1. Gün:** 96 kuyucuklu mikropalakada herbir kuyucuğa 200 µl besiyeri konulmuş ve herbir kuyucukta 5 000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

**2. Gün:** Besiyeri aspire edilmiş ve kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara 200 µl taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler, 1,6 µg/ml, 3,2 µg/ml, 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml dozlarda Cu-Zn alaşım nanopartiküllere maruz bırakılmış ve pozitif kontrol olarak 26,56 µM Cis-platin kullanılmıştır.

**3. Gün:** Mikropalaka -20°C ya da daha düşük sıcaklıkta dondurularak işlem sonlandırılmıştır.

**4. Gün:** 24 saatlik dondurma işleminden sonra M30 CytoDeath™ Elisa testi, oda sıcaklığında (24 ± 3 ° C) yapılmıştır.

1. -20 °C saklanan mikropalaka ve tüm reaktiflerin uygulamadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.

2- Yıkama tableti taze deiyonize suda çözülerek hazırlanmıştır.

- 3- M30 CytoDeath Konjuge Seyreltme Tamponu ile M30 CytoDeath HRP konjugatı seyreltilmiştir.
4. Mikroplakada 200 µl medium ihtiva eden kuyucuk başına 10 µl %10 Triton X eklenerek oda sıcaklığında 5 dk boyunca bir plâka çalkalayıcısı üzerinde lizis oluşmasına izin verilmiştir.
5. Herbir kuyucuktaki lizat toplanarak ependorflara konulmuştur.
6. Ependorflar 2000 rpm'de 30 sn santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır.
7. Ependorfun üst kısmında kalan medyum/lizat karışımından her bir doz ve standart için her kuyucuğa 2×25 µL M30 cytodeath kaplı mikroşeritlere transfer edilmiştir.
8. Her kuyucuk başına 75 µL seyreltilmiş M30 cytodeath HRP konjugat solüsyonu eklenmiştir.
9. Karanlıkta 600 rpm'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
10. İnkübasyon solüsyonu atılmış ve herbir kuyucuğa her seferinde seyreltilmiş 250 µl yıkama solüsyonu konularak 5 kez yıkama yapılmıştır.
11. Her kuyucuğa 200µl TMB substratı eklenerek 20±1 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
12. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek mikroplaka 5-10 saniye çalkalanmıştır.
13. Absorbans okumadan önce mikroplaka 5 dakika bırakılmıştır.
14. 30 dakika içinde mikromikroplaka okuyucuda 450 nm de absorbans ölçülmüştür.
15. Analitik sonuçların hesaplanması: M30 cytodeath Elisa test kitindeki standartlardan yararlanılarak, X ekseninde konsantrasyon y ekseninde absorbans olacak şekilde dağılım grafiği çizilmiş ve eğim formülü hesaplanmıştır.
16. Eğim formülünde X yerine M30 testinde kullanılan herbir dozun ortalaması yazılarak doz gruplarına göre U/L değerleri hesaplanmıştır.

Deney farklı zamanlarda ikişer tekrarlı olmak üzere üç kez gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra parametrik ve non-parametrik testler kullanılarak verilerin istatistik analizleri

gerçekleştirilmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirlemek için regresyon analizi yapılmıştır.

### **M65 testi**

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin nekrotik etkileri Peviva marka M65 Elisa kiti kullanılarak belirlenmiştir. Test protokolü test kitinde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

M65 test protokolü:

**1. Gün:** 96 kuyucuklu mikropalkanın herbir kuyucuğuna 200 µl besiyeri konulmuş ve herbir kuyucuğa 5 000 hücre ekimi yapılmıştır.

**2. Gün:** Eski besiyeri aspire edilerek, kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara 200 µl taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler 1,6 µg/ml, 3,2 µg/ml, 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml dozlarda Cu-Zn alaşım nanopartiküllere maruz bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak 147 µM hidrojen peroksit kullanılmıştır.

**3. Gün:** Nanopartikül muamelesinden 24 saat sonra M65 Elisa testi, oda sıcaklığında ( $24 \pm 3^\circ \text{C}$ ) yapılmıştır.

1. Tüm reaktiflerin deneye başlamadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.
- 2- Deiyonize su ile yıkama solüsyonu seyreltilmiştir.
- 3- M65 konjuge seyreltme tamponu ile M65 HRP konjugatı seyreltilmiştir.
4. Her kuyucuktaki lizat toplanarak ependorflara konulmuştur.
5. Ependoflar 2000 rpm'de 30 sn santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır.
6. M65 mikropalakasındaki kuyucuklara, 25'er µl M65 standart (A-G), M65 düşük kontrol, M65 yüksek kontrol ve örnekler eklenmiştir.
7. Ependorfun üst kısmında kalan medyum/lizat karışımından her doz ve standart için kuyucuk başına  $2 \times 25$  µL mikroşeritlere transfer edilmiştir.

8. Her kuyucuğa 75 µl seyreltilmiş M65 HRP konjugatı eklenmiş ve mikropilaka çalkalayıcıda 600 rpm hızda 2 saat inkübe edilmiştir.
9. Kuyucuklar 5 kez 250 µl seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve her kuyucuğa 200 µl TMB substratı eklenerek oda sıcaklığında  $20 \pm 1$  dk inkübe edilmiştir.
10. Kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir. Absorbansı okumadan önce mikropilaka 5 dk bırakılmıştır.
11. 30 dakika içinde mikropilaka okuyucuda 450 nm de absorbansı belirlenerek sonuçlar kaydedilmiştir.
12. Analitik sonuçların hesaplanması: standartlardan elde edilen değerlerden, x ekseninde konsantrasyon y ekseninde absorbans olacak şekilde dağılım grafiği çizilmiştir.
13. Elde edilen grafikten eğim formülü hesaplanmıştır.
14. Eğim formülünde X yerine M65 testinde kullanılan herbir dozun ortalaması yazılarak doz gruplarına göre U/L değerleri hesaplanmıştır.

Deney farklı zamanlarda ikişer tekrarlı olmak üzere üç kez gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra parametrik testler kullanılarak verilerin istatistik analizleri yapılmıştır. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve LSD testi ile değerlendirilmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirlemek için regresyon analizi yapılmıştır.

### **3.3.8. Olası etki mekanizmalarının hücre içi ROS analizleri ile belirlenmesi**

#### **ROS testi**

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin hücre içi ROS oluşumuna etkisi Cell Biolabs' OxiSelect™ Hücreiçi ROS test kiti kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, 3,2 µg/ml ve 6,4 µg/ml dozlarında Cu-Zn alaşım nanopartiküllere maruz bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır. Kısa bir inkübasyondan sonra, hücreler standart floresan plate okuyucuda

okunmuştur. Genotoksik dozların, ROS ya da antioksidan içeriği DCF standart eğri ile karşılaştırarak belirlenmiştir.

ROS testi protokolü:

a. Standart eğrinin hazırlanması:

1. Hücre kültürü besiyerinde 1mM DCF stoğunu seyrelterek 0  $\mu$ m – 10  $\mu$ M konsantrasyon oranında DCF standartının 1:10 seyreltme serisi hazırlanmıştır.
2. Floresan ölçümü için uygun mikropalakaya her DCF standartından ikişer kuyucuğa 75  $\mu$ l ve 2X Hücre Lizis tamponundan 75  $\mu$ L eklenmiştir.
3. 480nm ve 530nm’de floresan plate okuyucuda okuma yapılmıştır.

b. DCF boya yükleme:

1. Tüm ajanlar kullanımdan önce hazırlanmıştır. Her doz iki tekrarlı olarak ölçülmüştür.
2. Hücreler siyah 96 kuyucuklu mikropalakada kültüre edilmiştir.
3. Florometre okuyucudan uygun mikropalaka tabanı seçilmiştir.
4. Tüm kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler 2-3 kez DPBS ile yıkanmıştır.
5. Hücrelere 1X DCFH-DA/besiyeri çözeltisinden 100  $\mu$ l eklenmiş ve 37°C’de 60 dk inkübe edilmiştir.
6. Çözelti uzaklaştırılarak DPBS ile hücreler 2-3 kez yıkanmıştır.
7. Son yıkama yapıp çözelti uzaklaştırıldıktan sonra 100 $\mu$ l besiyerinde belirlenen dozlarda Cu-Zn alaşım nanopartikül çözeltisi ile DCFH-DA yüklü hücreler muamele edilmiştir.
8. Mikropalaka kinetik analiz için 480 nm/530 nm’de florometrik plaka okuyucuda 1 saate kadar 5 dk artışlarla okunmuştur.
9. Analitik sonuçların hesaplanması: standartlardan yararlanılarak dağılım grafiği çizilmiştir.
13. Elde edilen grafikten eğim formülü hesaplanmıştır.
14. Eğim formülünde X yerine ROS testinde kullanılan herbir dozun ortalaması yazılarak doz gruplarına göre relatif floresan değerleri hesaplanmıştır.

Deney farklı zamanlarda ikişer tekrarlı olmak üzere iki kez gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normal



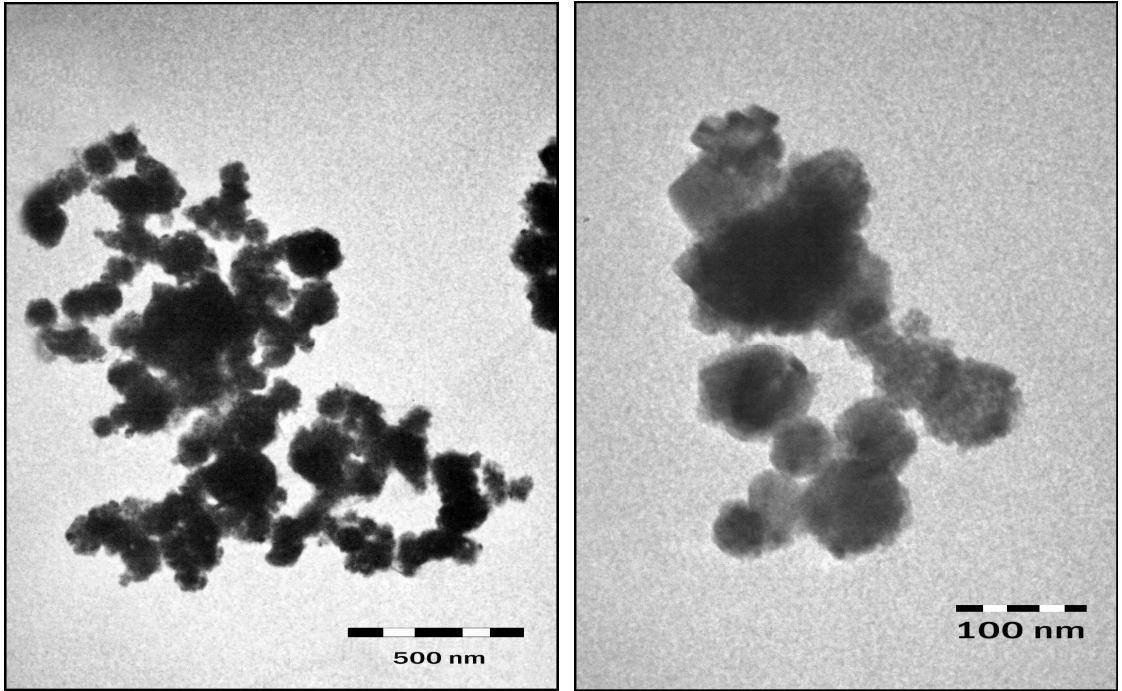
dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile doz gruplarını karşılaştırmak için Dunnett testi uygulanmıştır.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada Cu-Zn alaşım partiküller besiyeri ortamında fizikokimyasal özellikleri ve davranışları ile ilgili karakterize edilmiştir. Partikülün hücre içi lokalizasyonu TEM analizleri ile belirlenmiştir. Maruziyet sonucu oluşan sitotoksik etkileri belirlemek için klonojenik ve XTT testleri, genotoksik etkileri belirlemek için mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX testleri, ölüm yolağını belirlemek için M30 apoptoz ve M65 nekroz testleri, olası etki mekanizmaları ise ROS testi uygulanarak belirlenmiştir.

### 4.1. Karakterizasyon ile İlgili Bulgular

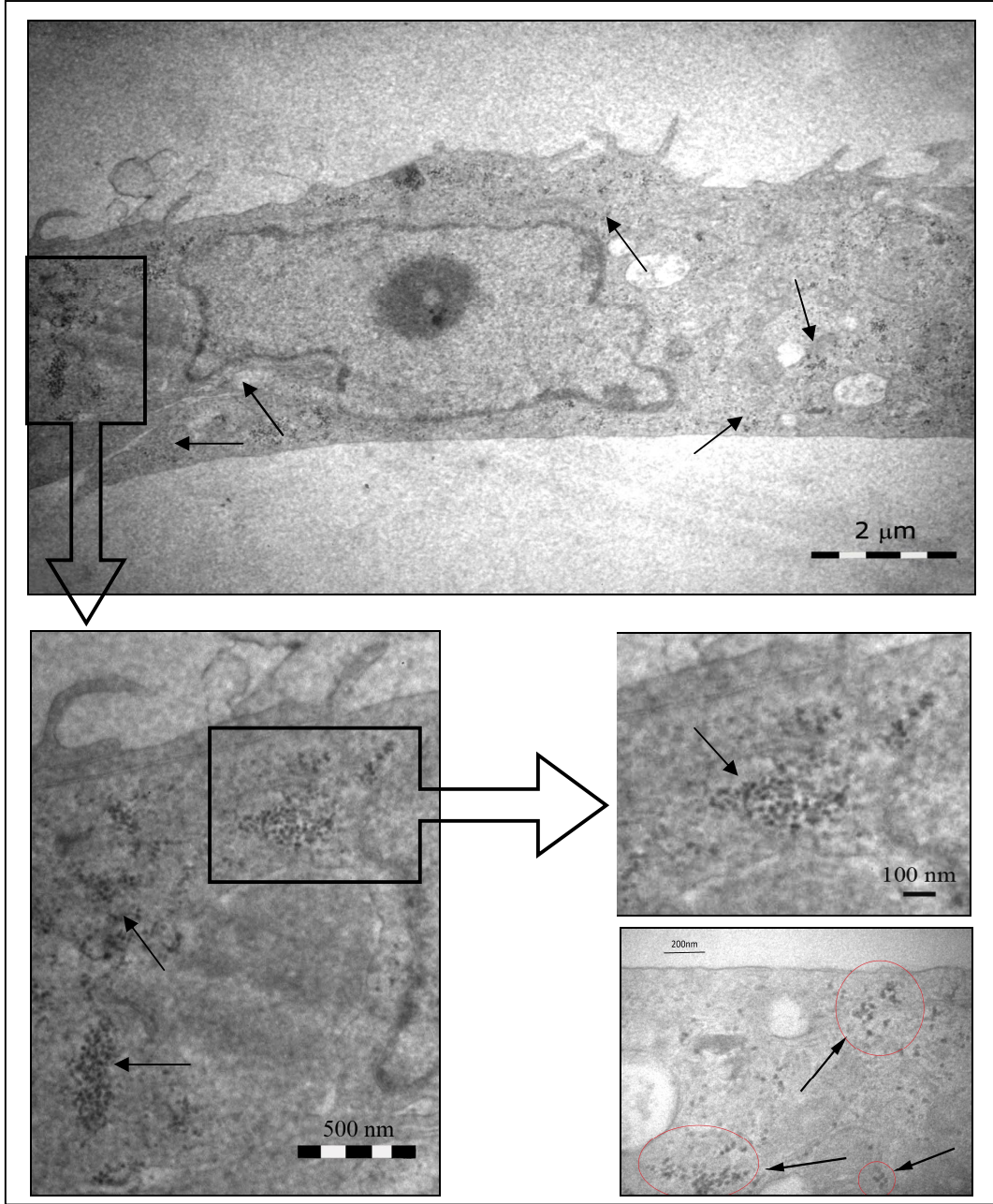
Cu-Zn nanopartikül solüsyonunun karakterizasyonu transmisyon elektron mikroskopi, zeta potansiyel ve DLS analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Cu-Zn nanopartikül süspansiyonunun zeta potansiyeli değeri -22 mV olarak belirlenmiştir. Bu değer çözeltinin stabil olduğunu göstermektedir. DLS ve TEM analizlerinden elde edilen bulgular ise partikül boyutlarının ortalama 200 nm olduğunu göstermiştir. TEM ile çekilmiş olan partikül dağılımını gösteren bir fotoğraf Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin TEM görüntüleri

#### 4.2. Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Hücre İçine Alınması

Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin hücre içine girip girmediklerini belirlemek için 5 ml besiyeri içeren BEAS-2B hücre kültürüne 2 µg/ml oranında Cu-Zn alaşım nanopartikül çözeltisi uygulanmış ve elektron mikroskobu görüntüleri fotoğraflanmıştır. Elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



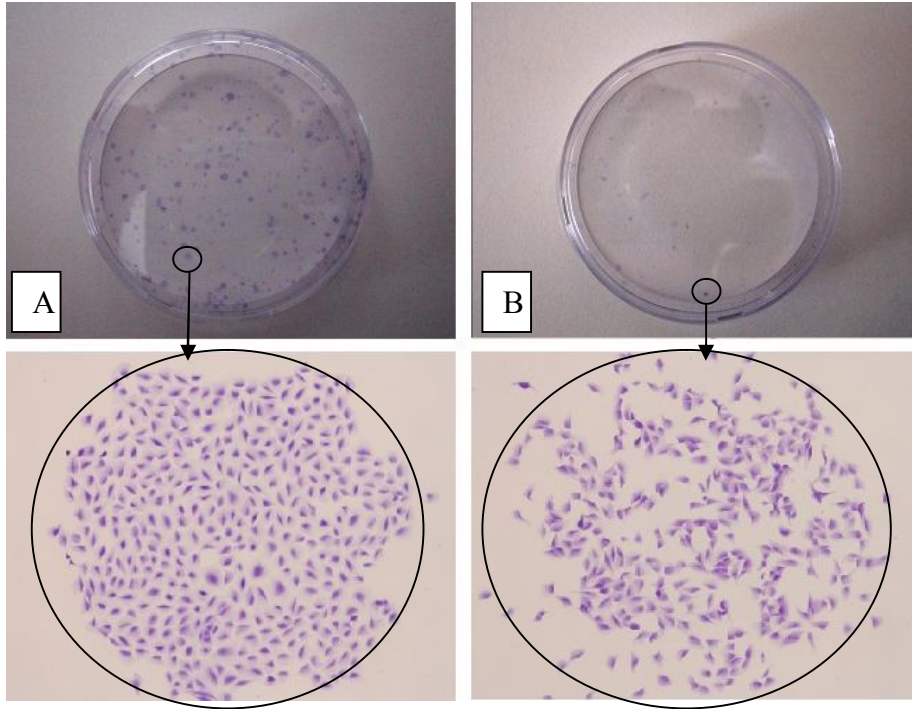
**Şekil 4.2.** BEAS-2B hücrelerinden alınan enine kesitlerde agregat oluşturmuş halde sitoplazmada bulunan Cu-Zn nanopartiküllerinin genel görüntüleri

### 4.3. Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Hayatta Kalış (% Canlılık) Oranına Etkisi

Çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin IC50 doz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla, BEAS-2B hücre hattı 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Cu-Zn alaşım nanopartikülleri ile 24 saat süresince muamele edilerek klonojenik test ve XTT testi uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

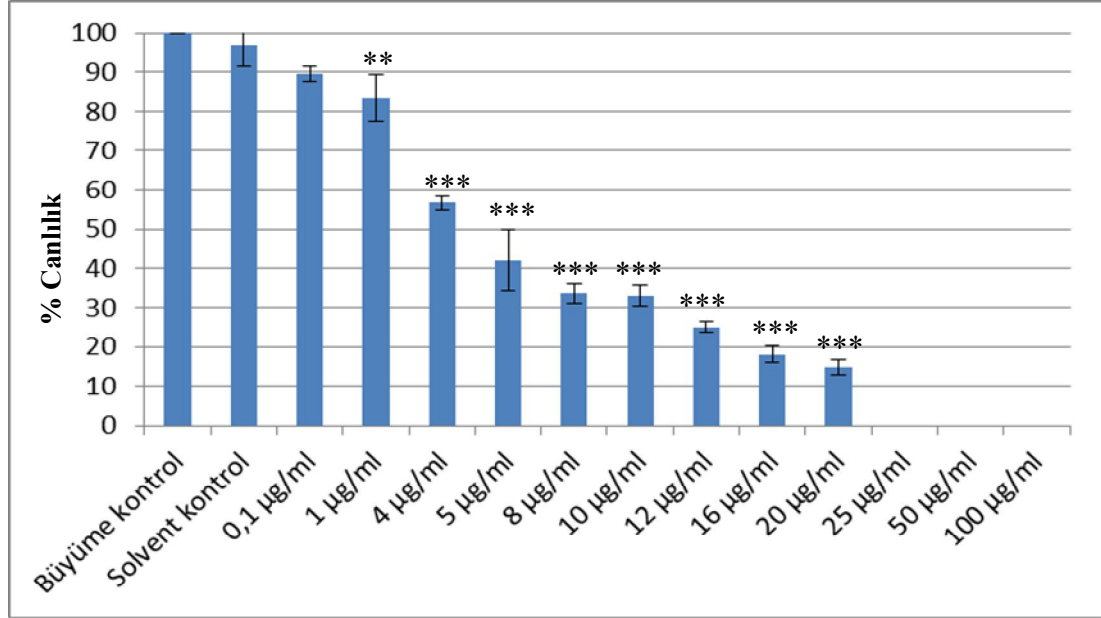
#### 4.3.1. Klonojenik test bulguları

Klonojenik test sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında, en az 50 hücre içeren kolonilerin sayımı yapılmıştır (Şekil 4.3). Elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılarak yaşayabilirlik eğrileri çizilmiştir.



**Şekil 4.3.** Klonojenik test sonucu oluşan kolonilerin petri ve mikroskobik görüntüsü A. Büyüme kontrol grubu B. 16 µg/ml Cu-Zn alaşım nanopartikül uygulaması sonucu oluşan koloniler

Klonojenik test uygulaması sonuçlarına göre test gruplarından elde edilen ortalama % canlılık oranları ve standart sapma miktarları Şekil 4.4'te belirtilmiştir.



**Şekil 4.4.** Klonojenik test sonucu belirlenen % canlılık oranları (Büyüme kontrole göre fark \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001)

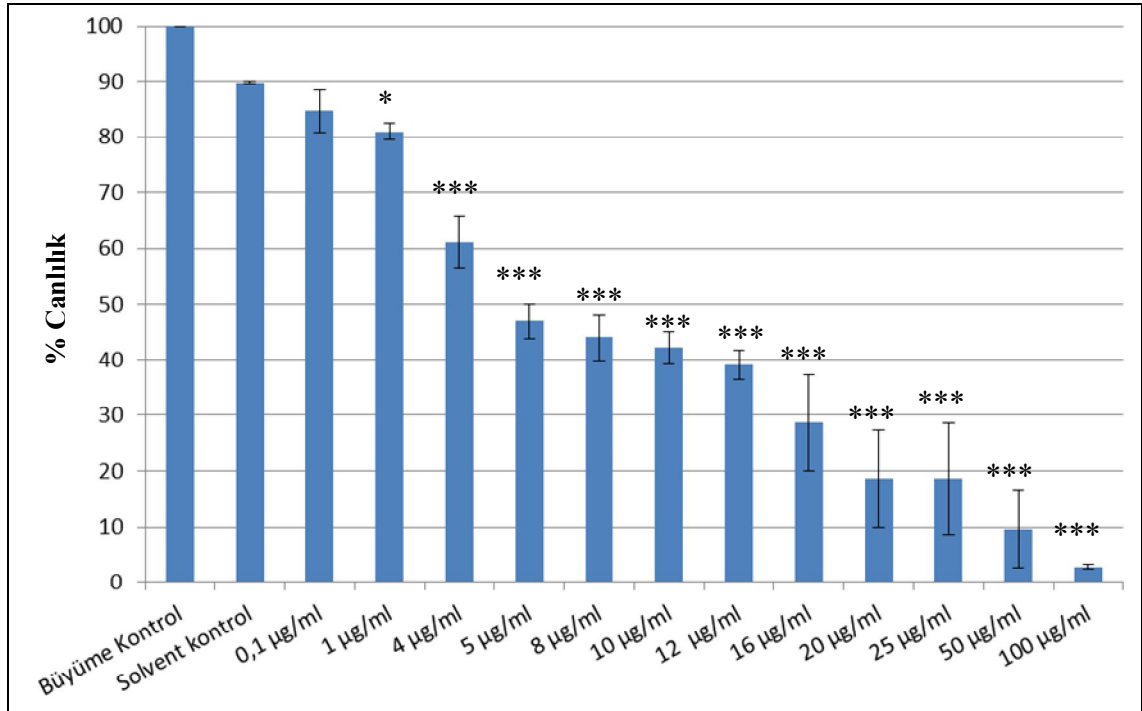
25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml dozlarda eklenen 25 lik flasklarda tüm hücreler öldüğü için petrilere ekim yapılamamıştır. Klonojenik test sonuçlarına göre ortalama IC50 değeri 4,66 µg/ml olarak belirlenmiştir. Uygulama gruplarında doza bağlılığı belirleyebilmek için regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Regresyon analizi sonucu doz artışı ile canlılık arasındaki ilişkinin P<0,01 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ( $R^2=0,829$ ). İlişkinin yönünü ve şiddetini belirlemek için uygulanan Spearman korelasyon testi sonucunda  $r = -0,943$  değeri bulunmuş olup, bu değer doz artışı ile canlılık arasında çok güçlü negatif doğrusal bir ilişkinin olduğunu yani doz artışına bağlı olarak canlılığın azaldığını istatistiksel olarak ortaya koymuştur.

#### 4.3.2. XTT test bulguları

Yapılan çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin IC50 doz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla XTT testi uygulanmıştır. XTT test sonuçlarına göre ortalama IC50 değeri 4,55 µg/ml olarak bulunmuştur. XTT testleri



sonucu belirlenen ortalama % canlılık oranları ve standart sapma miktarları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** XTT testi sonucu belirlenen % canlılık oranları (Büyüme kontrole göre fark \*P<0,05, \*\*\*P<0,001)

XTT testi sonuçlarına göre uygulama gruplarında doza bağıllığı belirleyebilmek için regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Regresyon analizi sonucu doz artışı ile canlılık arasındaki ilişkinin P<0,01 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ( $R^2=0,972$ ).

Klonojenik test sonuçlarından elde edilen IC50 değerleri ile XTT testi sonuçlarından elde edilen IC50 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek amacıyla Wilcoxon İlişkili İki Örneklem testi uygulanmıştır. P>0,05 olduğu için Klonojenik test ve XTT testleri sonucu elde edilen IC50 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

#### 4.4. Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

##### 4.4.1. Mikronükleus testi bulguları

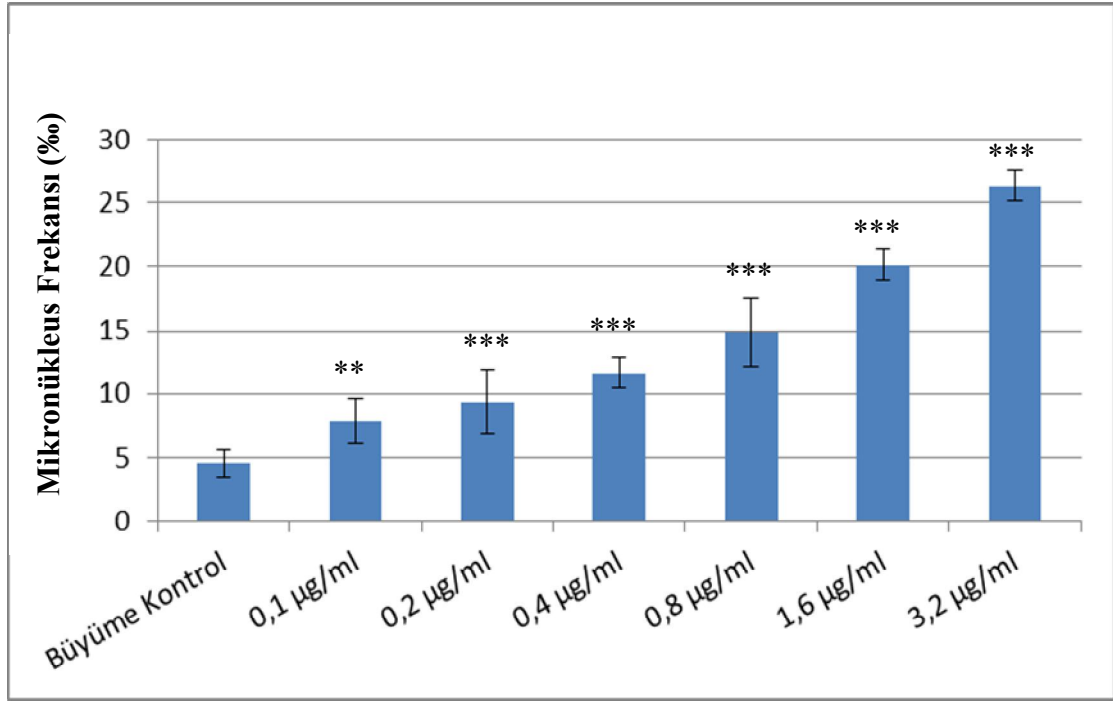
Yapılan çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla mikronükleus testi uygulanmıştır. MN preparatlarının değerlendirilmesinde bir, iki, üç ve dört çekirdekli toplam 1000 hücre sayılmış ve iki çekirdekli hücrelerin sayıları 1000'e tamamlanmıştır. Böylece her doz grubu için % mikronükleus frekansı (MN) ve çekirdek bölünme indeksi bulunmuştur. Elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** MN testi bulguları. MN; % mikronükleus frekansı, ÇBİ; Çekirdek Bölünme İndeksi, SS; Standart Sapma.

	MN ± SS	ÇBİ ± SS
Büyüme Kontrol	4,5 ± 1,048	1,757 ± 0,141
Solvent Kontrol	5,17 ± 1,169	1,758 ± 0,142
Pozitif Kontrol	96,16 ± 1,722	1,292 ± 0,093
0,1 µg/ml	7,83 ± 1,722	1,745 ± 0,145
0,2 µg/ml	9,3 ± 2,581	1,737 ± 0,148
0,4 µg/ml	11,6 ± 1,211	1,730 ± 0,151
0,8 µg/ml	14,83 ± 2,714	1,724 ± 0,156
1,6 µg/ml	20,16 ± 1,169	1,718 ± 0,158
3,2 µg/ml	26,33 ± 1,211	1,7 ± 0,167

MN frekansı kontrol grubunda  $4,5 \pm 1,048$ , Pozitif kontrol ( $H_2O_2$ ) grubunda ise  $96,16 \pm 1,722$  olarak belirlenmiştir. 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,6 µg/ml ve 3,2 µg/ml uygulamalarında ise sırasıyla  $7,83 \pm 1,72$ ;  $9,3 \pm 2,581$ ;  $11,6 \pm 1,211$ ;  $14,83 \pm 2,714$ ;  $20,16 \pm 1,169$  ve  $26,33 \pm 1,211$  olarak belirlenmiştir. Bu verilerden elde edilen MN testi bulguları Şekil 4.6'da verilmiştir.

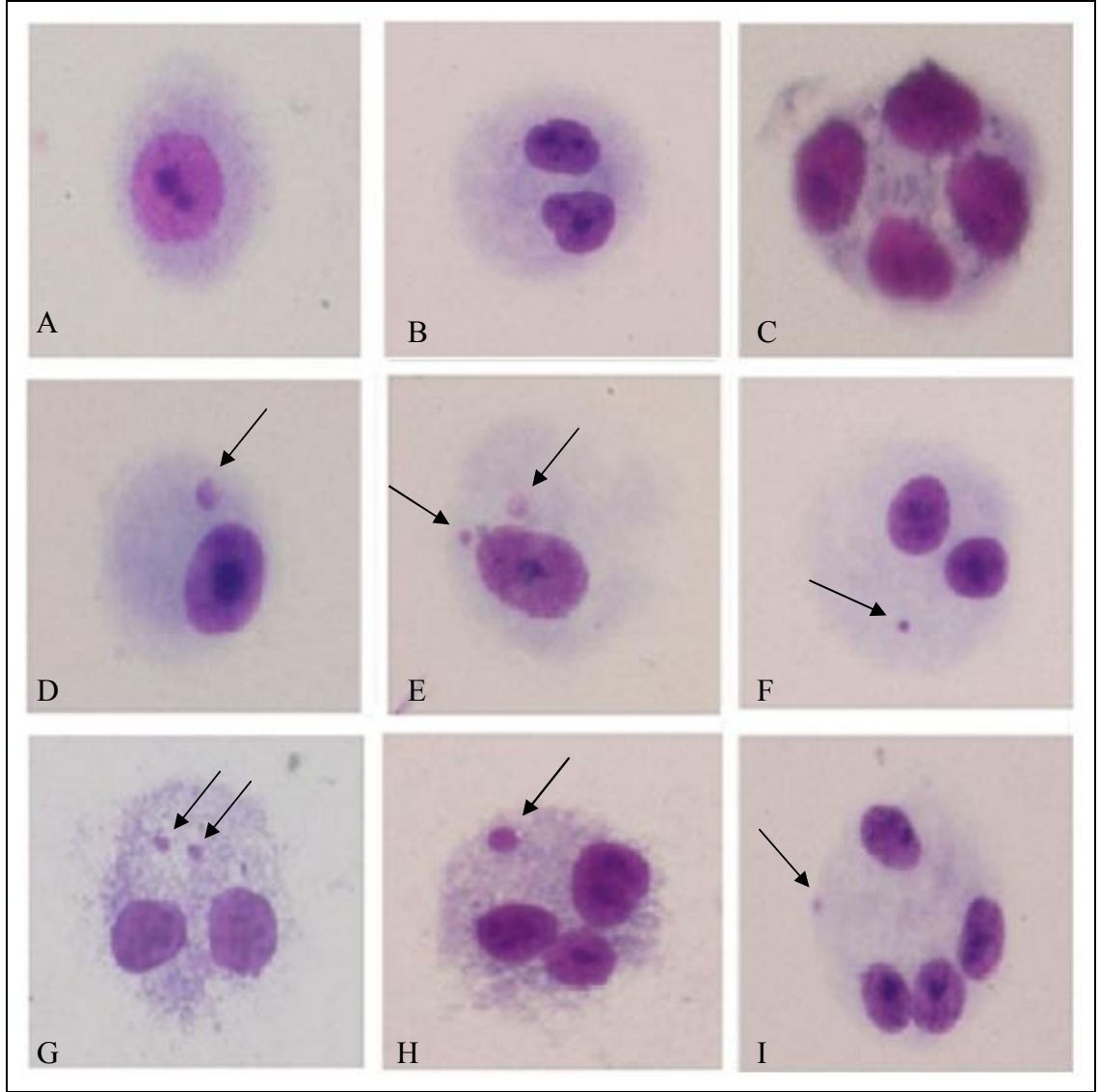
Doz artışına bağlı olarak, MN frekansı  $P < 0,001$  düzeyinde anlamlı bir artış göstermiştir. Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak MN frekansının arttığı belirlenmiştir ( $R^2 = 0,899$ ;  $P \leq 0,001$ ). Regresyon denklemi  $y = 3,417x + 3,274$  olarak bulunmuştur. Korelasyon testi sonucu, doz miktarı ile MN sayısındaki artış arasında pozitif doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir ( $r = 0,948$ ).



**Şekil 4.6.** MN testi bulguları. İki çekirdekli 1000 hücredeki MN sayısı(%) (Büyüme kontrole göre fark \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ )

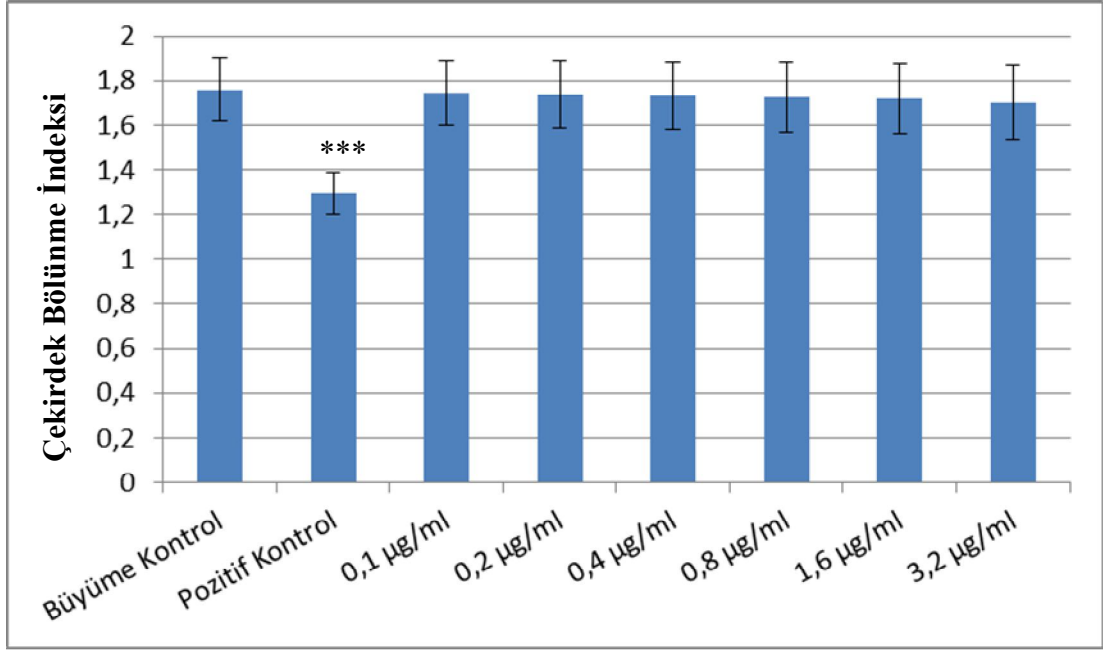
Cu-Zn alaşım partikül uygulaması sonucu oluşan mikronükleus örnekleri Şekil 4.7'de verilmiştir.





**Şekil 4.7.** MN testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (20X)  
A. Bir çekirdekli hücre B. İki çekirdekli hücre C. Dört çekirdekli hücre D. Bir çekirdekli hücre bir MN E. Bir çekirdekli hücre iki MN F. İki çekirdekli hücre bir MN G. İki çekirdekli hücre iki MN H. Üç çekirdekli hücre bir MN I. Dört çekirdekli hücre bir MN

Çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartikül konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çekirdek bölünme indeksi değerleri (ÇBİ) hesaplanmıştır. MN testi ÇBİ bulguları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8.** MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları (Kontrolle fark \*\*\*P<0,001)

MN testi sonucunda ÇBİ değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

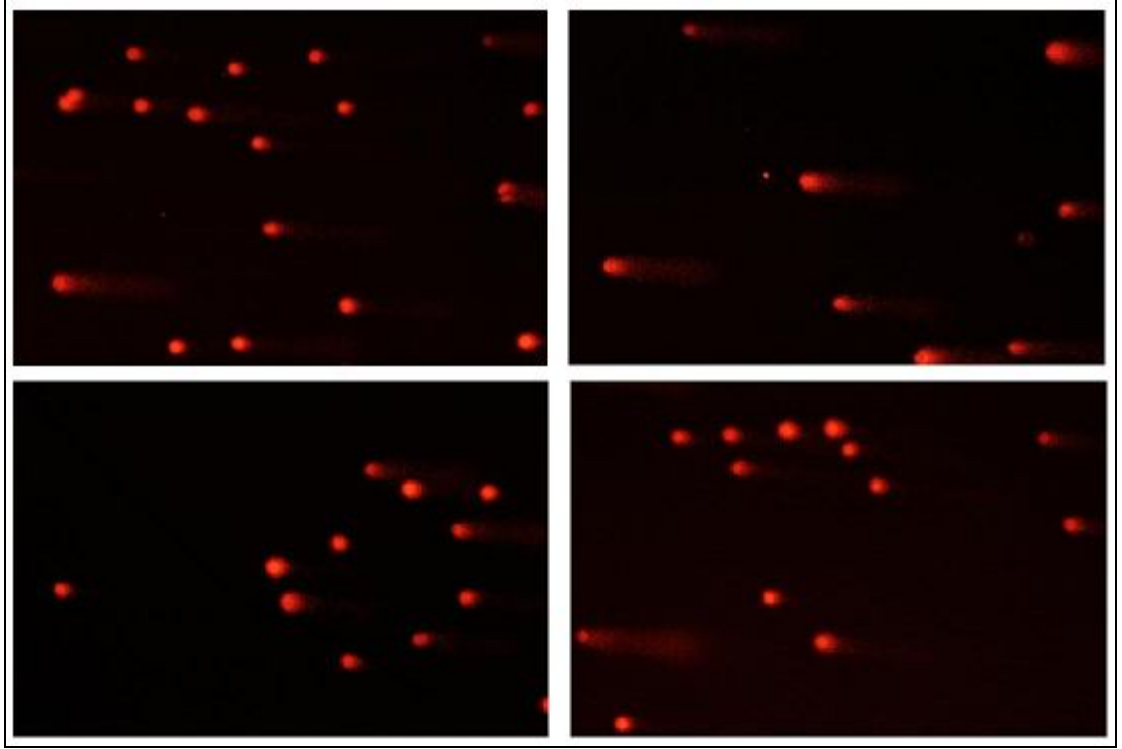
$$\text{ÇBİ} = (\text{MI} + 2\text{xMII} + 3\text{xMIII} + 4\text{xMIV}) / \text{N} ; \text{N} = \text{MI} + \text{MII} + \text{MIII} + \text{MIV}$$

(MI: Mononükleuslu hücrelerin sayısı, MII: Binükleuslu hücrelerin sayısı  
MIII: Trinükleuslu hücrelerin sayısı, MIV: Tetranükleuslu hücrelerin sayısı).

Pozitif kontrol grubunun ÇBİ değeri kontrol grubuna göre P<0,001 düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek  $1,292 \pm 0,093$ 'e düşmüştür. Ancak Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin doza artışına bağlı olarak ÇBİ değerleri, kontrol grubuna göre P<0,05 düzeyinde anlamlı bir düşüş göstermemiştir (P>0,05).

#### 4.4.2. Komet testi bulguları

Komet testi bulguları içerisinde Kuyruk uzunluğu (K.U.) (µm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. Komet testinde elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen verilerin ortalama değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

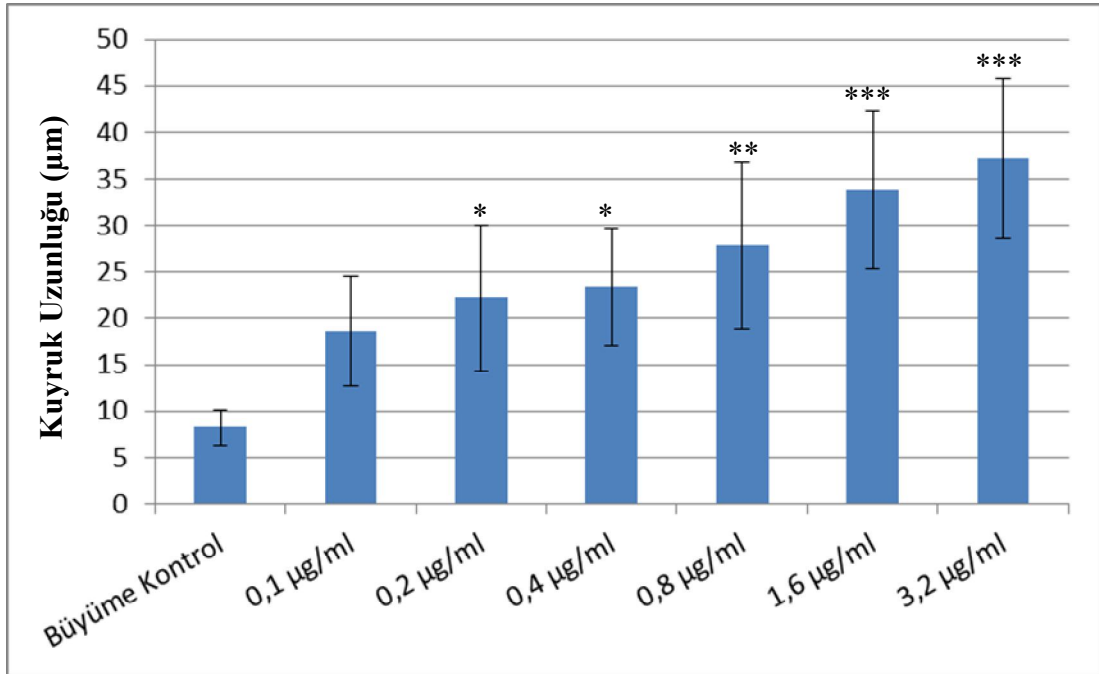


**Şekil 4.9.** Komet testi preparatlarından elde edilen mikroskobik görüntü örnekleri (X20).

**Çizelge 4.2.** Komet testinden elde edilen ortalama değerler. K.U.: Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), K.%DNA: Kuyruk %DNA miktarı, OTM: Olive kuyruk momenti, SS: Standart sapma

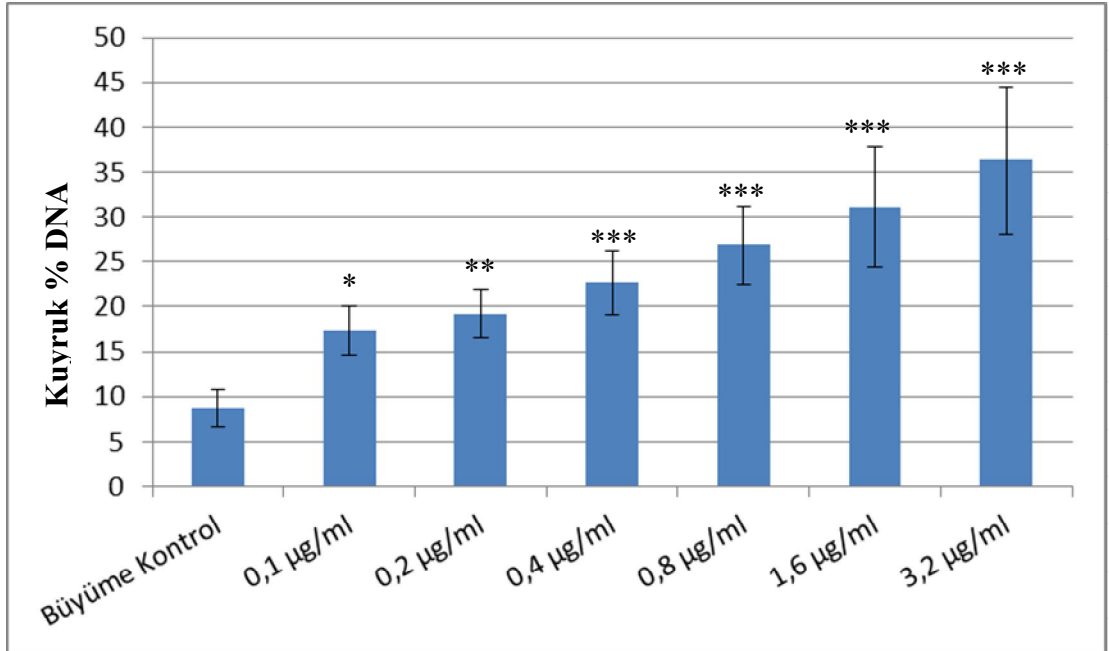
	K.U $\pm$ SS	K.%DNA $\pm$ SS	OTM $\pm$ SS
Büyüme Kontrol	8,2 $\pm$ 1,923	8,799 $\pm$ 2,030	1,6 $\pm$ 0,894
Solvent Kontrol	10 $\pm$ 4,358	9,700 $\pm$ 1,623	2 $\pm$ 1,224
Pozitif Kontrol	44,4 $\pm$ 10,382	37,859 $\pm$ 8,330	15 $\pm$ 6
0,1 $\mu\text{g/ml}$	18,6 $\pm$ 5,941	17,385 $\pm$ 2,724	5 $\pm$ 2,120
0,2 $\mu\text{g/ml}$	22,2 $\pm$ 7,886	19,151 $\pm$ 2,667	5,6 $\pm$ 2,07
0,4 $\mu\text{g/ml}$	23,4 $\pm$ 6,348	22,669 $\pm$ 3,491	6,2 $\pm$ 2,580
0,8 $\mu\text{g/ml}$	27,8 $\pm$ 9,038	26,879 $\pm$ 4,317	9 $\pm$ 3,464
1,6 $\mu\text{g/ml}$	33,8 $\pm$ 8,497	31,116 $\pm$ 6,686	10,8 $\pm$ 3,962
3,2 $\mu\text{g/ml}$	37,2 $\pm$ 8,613	36,304 $\pm$ 8,129	12,2 $\pm$ 2,774

Bu parametreler içerisinde K.U. değerlerinden elde edilen grafik Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Kuyruk uzunluğu bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve doz artışı ile kuyruk uzunluğu arasındaki ilişkinin  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile diğer dozları karşılaştırmak için Dunnett testi yapılmıştır. Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri  $8,2 \mu\text{m} \pm 1,923$  olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda  $10 \pm 4,358$ , Pozitif kontrol ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) grubunda ise  $44,4 \pm 10,382$  olarak belirlenmiştir.  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,4 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,8 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,6 \mu\text{g/ml}$  ve  $3,2 \mu\text{g/ml}$  uygulamalarında ise sırasıyla  $18,6 \pm 5,941$ ;  $22,2 \pm 7,886$ ;  $23,4 \pm 6,348$ ;  $27,8 \pm 9,038$ ;  $33,8 \pm 8,497$  ve  $37,2 \pm 8,613$  olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu, solvent kontrolle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P > 0,05$ ). Ancak kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak kuyruk uzunluğunda artış olduğu tespit edilmiştir ( $R^2 = 0,627$ ;  $P \leq 0,001$ ). Regresyon denklemi  $y = 4,393x + 11,279$  olarak bulunmuştur.



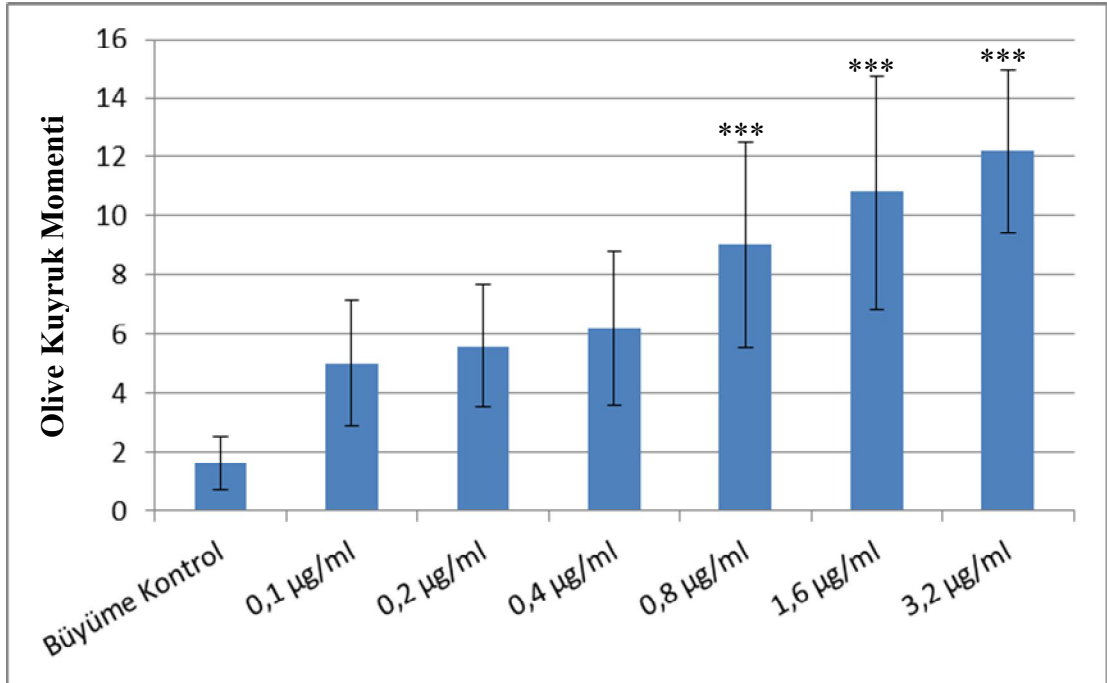
**Şekil 4.10.** Komet testi Kuyruk Uzunluğu (µm) değerleri (Kontrolle fark \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ )

Komet testinde belirlenen bir başka ölçüm kuyruk % DNA miktarıdır. Beas- 2B hücre hattında Cu-Zn alaşım nanopartikül muamelesi sonrasında yapılan Komet testinde ölçülen Kuyruk % DNA grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Kuyruk % DNA bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve doz artışı ile kuyruk % DNA arasındaki ilişkinin  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane’s T2 testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile diğer dozları karşılaştırmak için Dunnett testi yapılmıştır. Kontrol grubunda kuyruk % DNA değeri  $8,79 \pm 2,03$  iken solvent kontrolde  $9,70 \pm 1,62$  Pozitif kontrolde ise  $37,85 \pm 8,33$  olarak belirlenmiştir. Büyüme kontrol grubu, solvent kontrolle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P > 0,005$ ). 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,6  $\mu\text{g/ml}$  ve 3,2  $\mu\text{g/ml}$  uygulamalarında ise sırasıyla  $17,385 \pm 2,724$ ;  $19,151 \pm 2,667$ ;  $22,669 \pm 3,491$ ;  $26,879 \pm 4,317$ ;  $31,116 \pm 6,686$  ve  $36,304 \pm 8,129$  olarak belirlenmiştir. Büyüme kontrol grubu ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak kuyruk % DNA miktarında artış olduğu tespit edilmiştir ( $R^2 = 0,78$ ;  $P \leq 0,001$ ). Regresyon denklemi  $y = 4,204x + 10,576$  olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.11.** Komet testi kuyruk % DNA değerleri (Büyüme kontrole göre fark \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ )

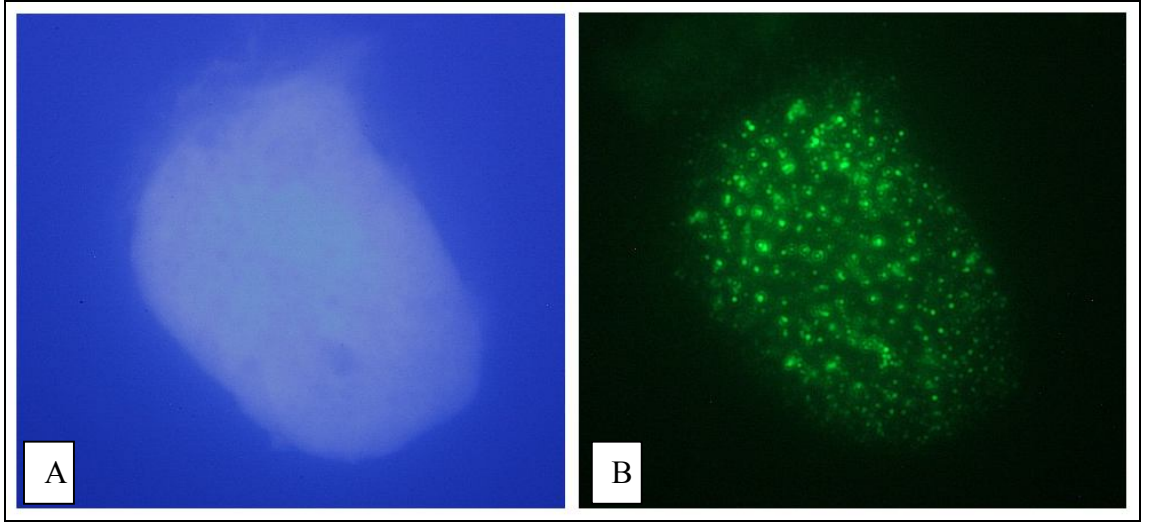
Komet testinde ölçülen olive kuyruk momentini grafiği Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Olive Kuyruk Momenti bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve doz artışı ile olive kuyruk momentini arasındaki ilişkinin  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane’s T2 testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile diğer dozları karşılaştırmak için Dunnet testi yapılmıştır. Kontrol grubunda olive kuyruk momentini değeri  $1,6 \pm 0,894$  iken solvent kontrolde  $2,00 \pm 1,224$  Pozitif kontrolde ise  $15,00 \pm 6,00$  olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu, solvent kontrolle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P > 0,005$ ). Olive kuyruk momentini  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,4 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,8 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,6 \mu\text{g/ml}$  ve  $3,2 \mu\text{g/ml}$  uygulamalarında ise sırasıyla  $5,00 \pm 2,121$ ;  $5,6 \pm 2,073$ ;  $6,2 \pm 2,588$ ;  $9,00 \pm 3,464$ ;  $10,8 \pm 3,962$  ve  $12,2 \pm 2,774$  olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile pozitif kontrol ve  $0,8 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,6 \mu\text{g/ml}$  ve  $3,2 \mu\text{g/ml}$  doz grupları arasında  $P < 0,001$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak olive kuyruk momentinde artış olduğu tespit edilmiştir ( $R^2 = 0,639$ ;  $P \leq 0,001$ ). Regresyon denklemi  $y = 1,671x + 2,186$  olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12. Komet testi olive kuyruk momentini değerleri (Büyüme kontrole göre fark \*\*\* $P < 0,001$ )

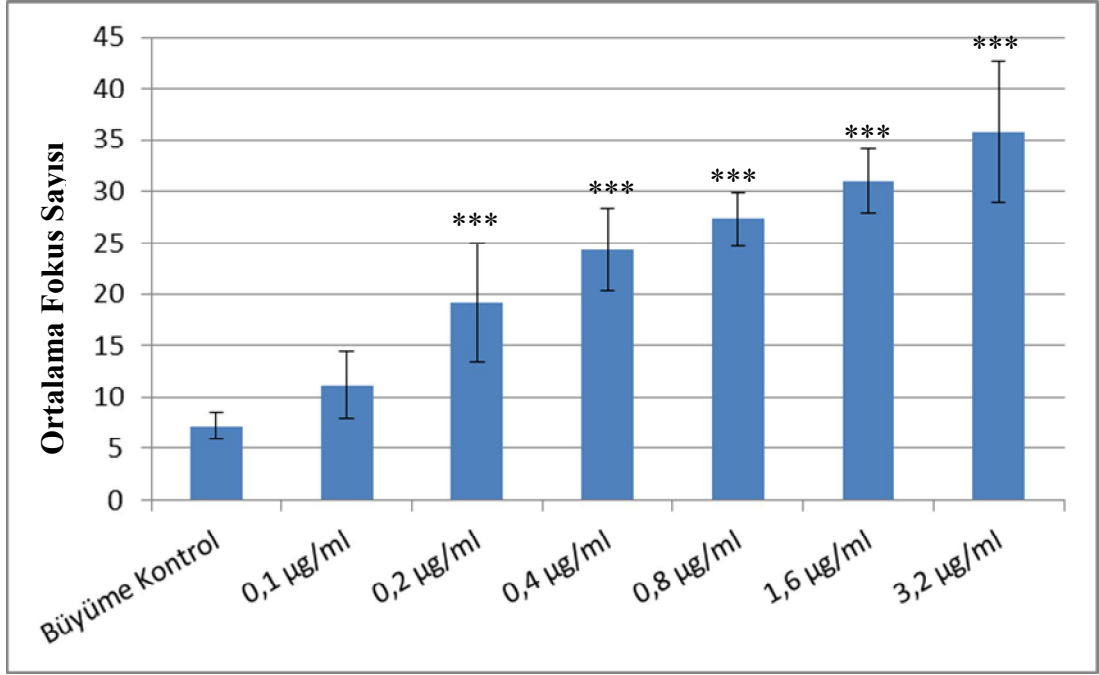
#### 4.4.3. $\gamma$ -H2AX fokus testi bulguları

Bu çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinde DNA çift zincir kırığı oluşturup oluşturmadığını tesbit etmek amacıyla  $\gamma$ -H2AX testi uygulanmıştır. Fokus sayım işlemleri “Foci Counter” adlı yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Beas-2B hücrelerine Cu-Zn alaşım nanopartikül uygulanması sonucu meydana gelen  $\gamma$ -H2AX fokusları Şekil 4.13 gösterilmiştir.



**Şekil 4.13.**  $\gamma$ -H2AX fokus oluşumları (x100) A. DAPI boyalı çekirdekler B. FITC işaretli  $\gamma$ -H2AX fokusları

$\gamma$ -H2AX testi her defasında iki tekrarlı olmak üzere üç kez yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan ortalama fokus sayıları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Kontrol grubu için ortalama fokus sayısı  $7,196 \pm 1,271$  iken Solvent Kontrol grubu için bu değer  $7,6 \pm 0,329$ ; Pozitif Kontrol grubu ise  $38,256 \pm 2,467$  'dir. Benzer şekilde Cu-Zn nanopartikül doz grupları arasında hücre başına düşen ortalama fokus sayısı doza bağlı olarak artış gözlenmektedir.  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,4 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,8 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,6 \mu\text{g/ml}$  ve  $3,2 \mu\text{g/ml}$  uygulamalarında ise sırasıyla  $11,188 \pm 3,231$ ;  $19,218 \pm 5,824$ ;  $24,392 \pm 3,946$ ;  $27,356 \pm 2,581$ ;  $31,003 \pm 3,152$  ve  $35,8 \pm 6,883$  olarak belirlenmiştir. Şekil 4.14'te her doz grubu için hücre başına ortalama fokus grafiği verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Her doz grubu için hücre başına düşen ortalama  $\gamma$ -H2AX fokus sayısı (Büyüme kontrole göre fark \*\*\*P<0,001)

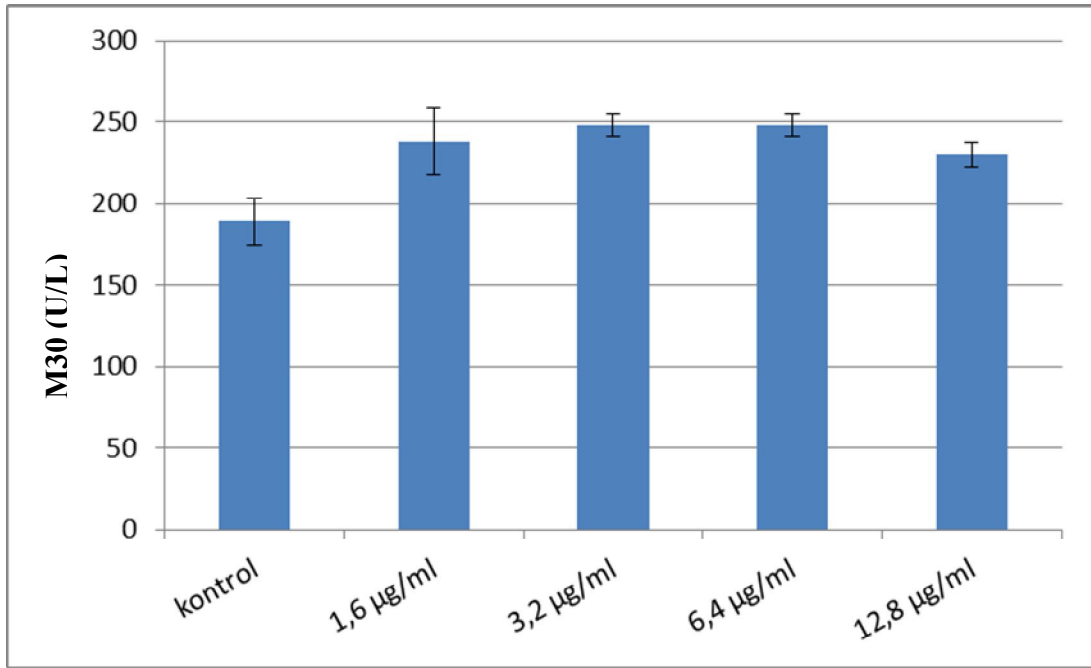
$\gamma$ -H2AX testi sonuçlarına göre belirlenen fokus sayıları bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve doz artışı ile fokus sayıları arasındaki ilişkinin P<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane's T2 testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile diğer dozları karşılaştırmak için Dunnett testi yapılmıştır. Dunnett testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile Solvent Kontrol ve 0,1 µg/ml doz grupları arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Ancak kontrol grubu ile Pozitif Kontrol grubu ve 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,6 µg/ml ve 3,2 µg/ml doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,001). Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak fokus sayısında artış olduğu tespit edilmiştir ( $R^2=0,850$ ;  $P \leq 0,001$ ). Regresyon denklemi  $y=4,771x+7,996$  olarak bulunmuştur.

#### 4.4.4. M30 testi ve M65 testi bulguları

Bu çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin neden olduğu hücre ölüm yolunu belirlemek amacıyla BEAS-2B hücreleri 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml; 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml Cu-Zn alaşım nanopartikül konsantrasyonlarına 24 saat süresince maruz



birakılmıştır. Apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarını belirlemek amacıyla M30 testi ve M65 testi protokolü uygulanmıştır. M30 testi sonucunda ölçülen absorbans verileri değerlendirilerek standart eğri grafikleri hazırlanmıştır. Herbir doz için, standart eğri grafiğinden elde edilen formül kullanılarak M30 miktarları U/L cinsinden hesaplanmıştır. Farklı zamanlarda üç kez ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilen M30 testi sonuçlarından elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hata değerleri aşağıda belirtilmiştir (Şekil 4.15).

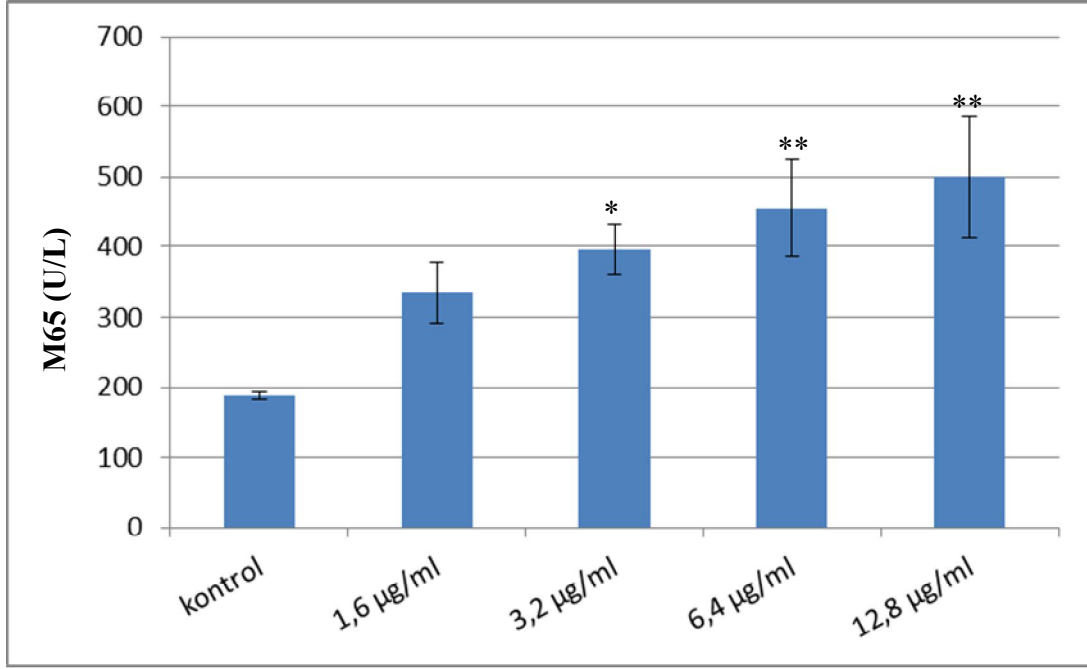


**Şekil 4.15.** Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M30 değerleri

Kontrol grubu için M30 (U/L) ve standart hata değeri  $188,95 \pm 20,51$  iken bu değerler pozitif kontrol grubunda  $442,05 \pm 28,55$  olarak belirlenmiştir.  $1,6 \mu\text{g/ml}$ ;  $3,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $6,4 \mu\text{g/ml}$  ve  $12,8 \mu\text{g/ml}$  doz gruplarında ise sırasıyla  $238,13 \pm 20,51$ ;  $248,29 \pm 6,78$ ;  $247,88 \pm 6,88$  ve  $229,65 \pm 7,47$  olarak ölçülmüştür. Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin doz artışına bağlı olarak M30 değerleri, kontrol grubuna göre  $P < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $P > 0,05$ ).

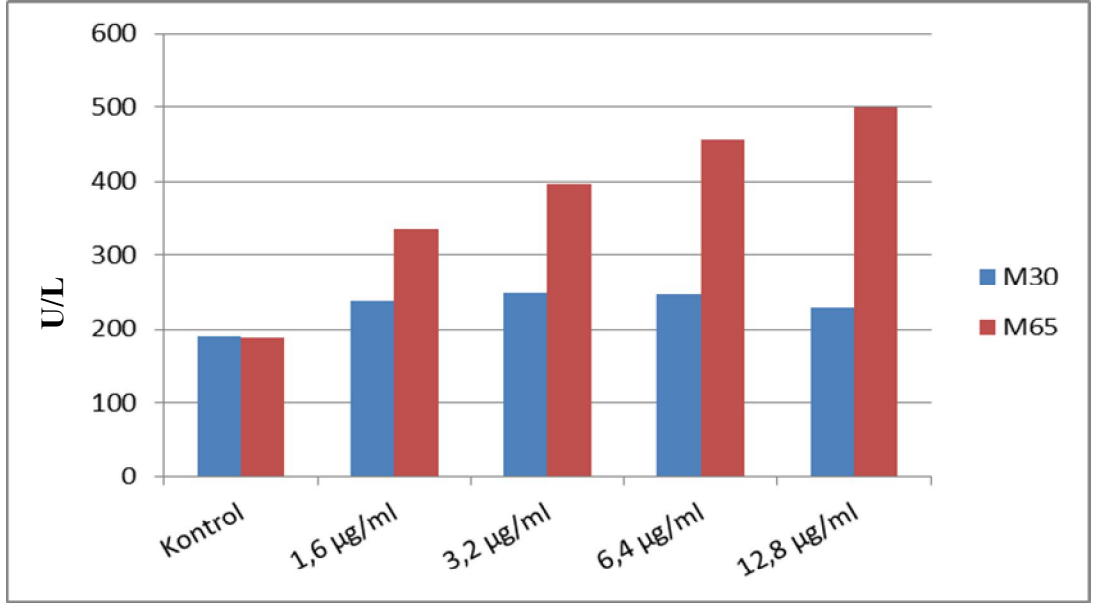
Nekroz yoluyla ölen hücrelerin miktarının belirlenmesi için  $1,6 \mu\text{g/ml}$ ;  $3,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $6,4 \mu\text{g/ml}$  ve  $12,8 \mu\text{g/ml}$  Cu-Zn alaşım nanopartikül konsantrasyonlarına 24 saat süresince maruz bırakılan Beas-2B hücrelerine M65 test protokolü uygulanmış ve nekrotik ölüm

oranları belirlenmiştir. M65 testi sonucunda ölçülen absorbands verileri değerlendirilerek standart eğri grafikleri hazırlanmıştır. Herbir doz için, standart eğri grafiğinden elde edilen formül kullanılarak M65 miktarları U/L cinsinden hesaplanmıştır. Farklı zamanlarda üç kez ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilen M65 testi sonuçlarından elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hata değerleri aşağıda belirtilmiştir (Şekil 4.16).



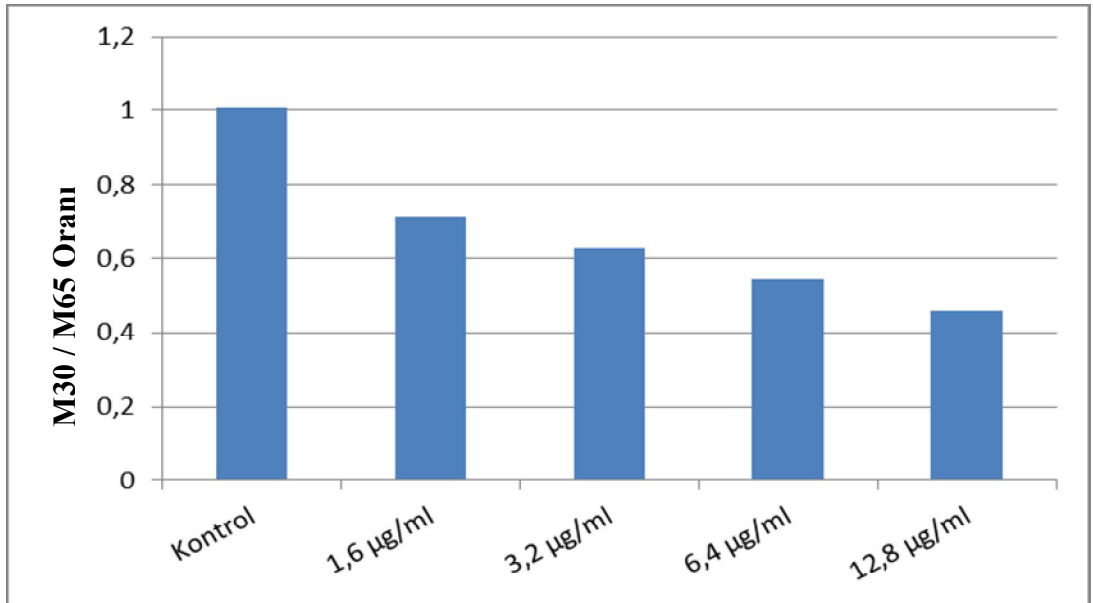
**Şekil 4.16.** Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M65 değerleri (Büyüme kontrole göre fark \*P<0,05, \*\*P<0,01)

Kontrol grubu için M65 (U/L) ve standart hata değeri  $187,59 \pm 4,99$  iken bu değer pozitif kontrol grubunda  $368,73 \pm 22,47$  olarak belirlenmiştir. 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml; 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml doz gruplarında ise sırasıyla  $334,79 \pm 43,93$ ;  $396,5 \pm 35,07$ ;  $455,44 \pm 70,12$  ve  $499,6 \pm 86,63$  olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu 1,6 µg/ml doz grupları arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Ancak kontrol grubu 3,2 µg/ml doz grubu arasında P<0,05 düzeyinde, 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml doz grupları arasında ise P<0,01 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Regresyon analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak nekroz yoluyla ölen hücre sayısında artış olduğu tespit edilmiştir ( $R^2 = 0,936$ ;  $P \leq 0,05$ ). Regresyon denklemi  $y = 74,467x + 151,38$  olarak bulunmuştur. M30 ve M65 testlerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.17.** Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen M30 ve M65 değerlerinin karşılaştırılması

Yüksek M30/M65 oranı hücrelerin apoptoz yoluyla, düşük M30/M65 oranı ise hücrelerin ağırlıklı olarak nekroz yoluyla öldüğünü göstermektedir (Linder ve ark. 2010). Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin doz artışına bağılı olarak neden olduğı ölüm yolağını belirlemek için M30 apoptoz ve M65 nekroz testlerinden elde edilen verilerden M30/M65 oranı belirlenmiştir (Şekil 4.18).

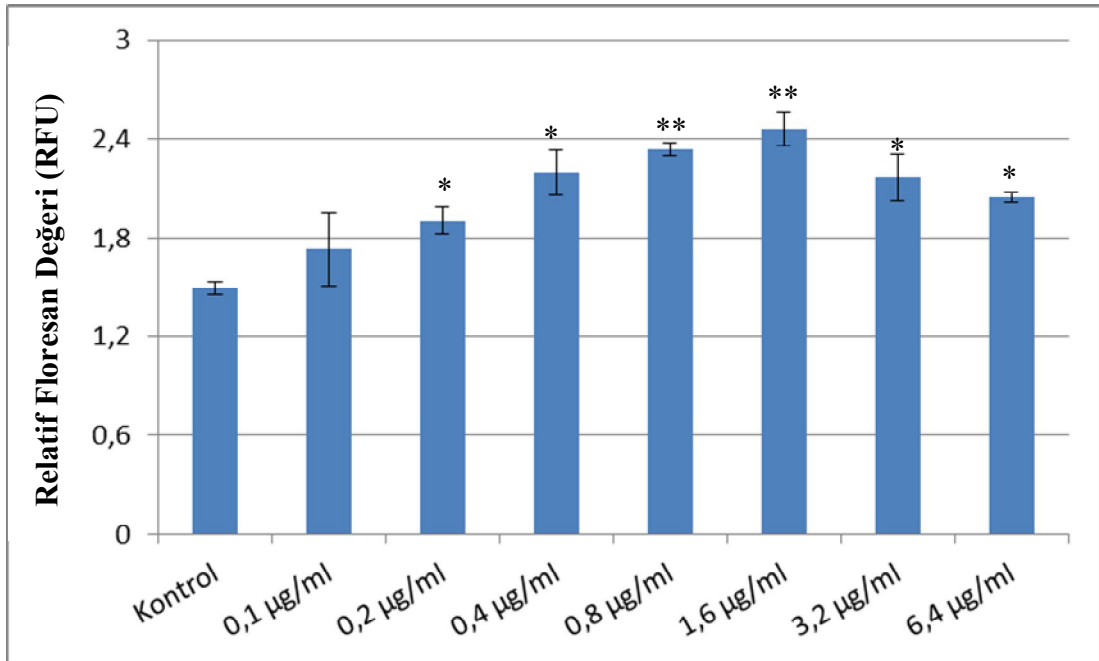


**Şekil 4.18.** M30 apoptoz / M65 nekroz oranı

Apoptoz ve nekroz testlerinin sonuçları karşılaştırıldığında kontrol grubunda hücrelerin % 50,2'si apoptoz yoluyla ölüyor, % 49,8'i nekroz yoluyla öldüğü tesbit edilmiştir. 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml; 6,4 µg/ml ve 12,8 µg/ml doz gruplarında ise apoptoz yoluyla ölen hücrelerin yüzdesi sırasıyla 41,56; 38,51; 35,24 ve 31,49 iken nekroz yoluyla ölen hücreleri yüzdesi ise sırasıyla 58,44; 61,49; 64,76 ve 68,51 olduğu belirlenmiştir.

#### 4.3.5 ROS testi bulguları

Bu çalışmada kullanılan Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin, ROS oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla BEAS-2B hücreleri 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml ve 6,4 µg/ml Cu-Zn alaşım nanopartikül konsantrasyonlarına 3 saat süresince maruz bırakılmış ve ROS testi protokolü uygulanmıştır. Ros testi farklı zamanlarda iki tekrarlı olarak iki defa gerçekleştirilmiştir. Deneyle sonucunda elde edilen verilerden ortalama ROS miktarları ve standart sapma değerleri belirlenmiştir ( Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Farklı dozlarda Cu-Zn nanopartikül uygulaması sonucu elde edilen ROS değerleri (Büyüme kontrole göre fark \*P<0,05, \*\*P<0,01)

Kontrol grubu için ROS değeri  $1,496 \pm 0,035$  iken bu değer  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,4 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,8 \mu\text{g/ml}$ ;  $1,6 \mu\text{g/ml}$ ;  $3,2 \mu\text{g/ml}$  ve  $6,4 \mu\text{g/ml}$  doz gruplarında sırasıyla  $1,73 \pm 0,22$ ;  $1,905 \pm 0,08$ ;  $2,194 \pm 0,14$ ;  $2,333 \pm 0,04$ ;  $2,461 \pm 0,09$ ;  $2,163 \pm 0,14$  ve  $2,045 \pm 0,03$  olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu ile  $0,1 \mu\text{g/ml}$  doz grupları arasında  $P < 0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ( $P > 0,05$ ). Ancak kontrol grubu ile  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,4 \mu\text{g/ml}$ ;  $3,2 \mu\text{g/ml}$  ve  $6,4 \mu\text{g/ml}$  doz grupları arasında  $P < 0,05$ , kontrol grubu ile  $0,8 \mu\text{g/ml}$  ve  $1,6 \mu\text{g/ml}$  doz grupları arasında ise  $P < 0,01$  düzeyinde anlamlı bir farklılık göstermiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nanoteknoloji, yeni özelliklere sahip ürünlerin oluşturulması için nanoboyutta materyallerin elde edilerek üretilmesini içeren bir teknolojidir. Nanomateryallerin kendine özgü benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu veya olumsuz etkileri tam olarak bilinmemektedir. Araştırmalar, partiküllerin, boyutu, şekli, yüzey alanı, kimyasal özellikleri ve çözünebilirlik derecelerini içeren fizyokimyasal özelliklerinin biyolojik sistemlerde etkili olduklarını belirtmektedir. Son yıllarda nanoteknolojinin meydana getirebileceği zararlar ve dolayısı ile riskler tüm dünyada gittikçe artan bir şekilde tartışılmaya başlanmıştır. Önceleri sadece avantajları göz önünde bulundurulurken nanoteknoloji uygulamalarının hızla yayılması üzerine risk ve risk değerlendirme kavramları ortaya çıkmaya başlanmıştır. Nanoteknolojinin geniş bir uygulama alanına sahip olmasından dolayı, nanomateryallere maruz kalma ile ilgili ortaya çıkabilecek olası risklere karşı geliştirilebilecek önlemlerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Nanoteknoloji alanındaki yatırımlar hızlı bir şekilde artmaktadır. Oysa üretilen nanopartiküllerin toksisitesi hakkında yapılan araştırmalar yetersizdir (Atlı-Şekeroğlu 2013). Nanopartikül etkilerinin değerlendirilmesinde in vivo ve in vitro yöntemler kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin in vitro toksisitesinin belirlenmesinde hücre kültürü çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Hücre kültürü; canlıdan izole edilen doku parçalarının yapay olarak hazırlanan uygun besiyerlerinde çoğaltılması esasına dayanır (Joris ve ark. 2013).

Nanopartiküller hücre içine girebilmekte ve hücre içindeki yapılarla etkileşime geçebilmektedir. Buna göre, herhangi bir nanopartikülün hücreye alımı, ilgili partikülün fizikokimyasal yapısı, boyutu, şekli ve yüzey yüküne bağlıdır (Xia ve ark. 2006). Günümüzde nanopartiküllerin hücre içine alınmasını etkileyen önemli fiziksel parametrelerden biri partikül büyüklüğü olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte hücre zarının negatif yüklü olması nedeniyle katyonik partiküllerin nötral ve anyonik partiküllere göre daha etkin bir şekilde hücre içerisine girebildiği bildirilmektedir. Nitekim Panariti ve ark. (2012) tarafından nanopartiküllerin hücre içerisine alımını etkileyen partikül büyüklüğü ve yüzey yükü gibi özelliklerin değerlendirildiği bir

çalışmada, küçük partiküllerin büyük partiküllere, pozitif yüklü partiküllerin de negatif yüklü partiküllere göre daha hızlı bir şekilde hücre içine alındığı gösterilmiştir.

Nanopartikülün hücreye alımı ve hücre içinde serbest hareket etmesi ise bu partikülleri sitoplazma proteinleri ve organellere doğrudan bağlanması yoluyla oldukça tehlikeli hale getirmektedir. Ayrıca nanopartiküller organel ya da DNA'ya zarar vererek en sonunda hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Buzea 2007).

Bu tez çalışmasında Cu-Zn nanopartiküllerinin BEAS-2B akciğer epitel hücrelerine alındığı TEM analiz yöntemiyle gösterilmiştir. Bununla birlikte hücre içerisine alınan Cu-Zn'nin sitoplazmada konumlandığı ancak çekirdek içerisine giremediği de tespit edilmiştir. Sitoplazma içerisine giren nanopartiküller hücresel proteinlerle veya mitoz bölünme süresinde doğrudan DNA ile etkileşerek hasara neden olabilmektedir (Sing ve ark. 2009).

Günümüzde *in vitro* XTT ve klonojenik testler sitotoksisite; MN, komet ve  $\gamma$ -H2AX testleri ise genotoksisite düzeyinde hasarın tespitine yönelik uygulanan kullanışlı yöntemlerdir (Singh ve ark. 2009). XTT yönteminde, canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolium halkası, hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur (Berridge ve ark. 2005). Böylece renk yoğunluğuna dayalı olarak canlı hücre sayısı hakkında veri elde edilmektedir.

Bir hücrenin geniş bir koloni ya da klon oluşturacak şekilde üreme kabiliyetini koruması ve süresiz olarak proliferasyonla üreyen hücrelerin klonojenik hücre; DNA ve protein sentezleme özelliğini koruyan, az sayıda mitoz geçiren fakat proliferasyon olup koloni oluşturamayan hücrelerin ise ölü hücreler olarak tanımlandığı klonojenik test, nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde kullanılabilir (Kim ve ark. 2010). Sonuç olarak, XTT ve klonojenik testler özellikle geliştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel kaynaklı ajanların neden olduğu sitotoksik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

MN testi, sitogenetik hasarın tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre incelenmesi ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlamasıyla yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu metot sadece bölünme özelliği gösterebilen hücrelerde kullanılabilir. Kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi açısından MN metodu oldukça kullanışlıdır (Gonzalez ve ark. 2011). Komet yönteminde kullanılan ajanların DNA'da oluşturdukları tek ve çift zincir kırıkları, yüksek alkali çözelti içerisinde hızlı bir şekilde DNA kırıklarına dönüşen alkalilenebilecek noktalara etkileri, oldukça hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (McArt ve ark. 2009). Böylece belirlenen DNA kırıklarının tespiti, uygulanan nanopartiküllerin genetik yapı üzerindeki olumsuz etkilerini açıklamada tamamlayıcı bilgiler sunmaktadır. DNA çift iplik kırıkları onarılmadıkları takdirde kromozom aberasyonlarına, genomik istikrarsızlığa veya hücre ölümüne neden olabilen en zararlı DNA lezyonlarıdır. Çift iplik kırıklarının oluşumu  $\gamma$ -H2AX üreten histon H2AX varyantının fosforilasyonu da dâhil olmak üzere birçok faktörü tetikler (Podhorecka ve ark. 2010). Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX ( $\gamma$ H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle  $\gamma$ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Yuan ve ark. 2010). Sonuç olarak; MN, komet,  $\gamma$ -H2AX testleri, çeşitli ajanların hücre üzerindeki etkilerinin saptanmasında güvenilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Böylece ilgili ajanların gelecekteki olası etkilerini yorumlamada ve kullanımlarının yönetilmesinde hayati önem taşıyacaktır.

Yapılan literatür araştırmalarına göre Cu ve Zn metalleri hakkında sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlendiği çalışmalar mevcut iken, Cu-Zn alaşımını konu alan herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Nanopartiküllerin aynı bileşime sahip mikromoleküllerden daha toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle metal iyonlarının hücrede toksisiteyi indüklediği ve maruz kalınan çevresel özelliklerin nanopartiküllerin durumunu etkilemesi yoluyla toksik etkiyi kuvvetlendirdiği bildirilmiştir (Chang ve ark. 2012). Bakır nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarda, farklı hücre hatları üzerinde doz artışına



bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı düşünülmektedir. Ahamed ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada CuO nanopartiküllerin insan akciğer adenokarsinom epitel hücreleri üzerinde 10, 25 ve 50 µg/ml dozlarda uygulandığında canlılığın sırasıyla % 75, 66 ve 48 olduğu gösterilmiştir. Lanone ve ark. (2009)'nin yaptıkları araştırmada, benzer çapa sahip 24 farklı nanopartikülün A549 ve THP-1 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri MTT ve NRU test yöntemleriyle belirlenmiştir. Çalışmada uygulanan nanopartiküller arasında IC50 (µg/ml) değerleri karşılaştırıldığında bakırın 6,46 ve çinko oksit 4,05 değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Buna göre bakır ve çinko temelli nanopartiküllerin en yüksek seviyede toksisiteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Fahmy ve Cormier (2009)'in yaptıkları diğer bir çalışmada CuO, SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin HEP-2 üzerindeki sitotoksik etkileri Alamar blue testi ile araştırılmıştır. Buna göre SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 80 µg/cm<sup>2</sup> dozda nontoksik iken CuO'nun uygulandığı hücrelerde canlılığın % 60'a kadar azaldığı ve buna bağlı olarak da CuO'nun yüksek derecede toksik olduğu rapor edilmiştir. DNA hasarı ve oksidatif stres oluşumuna göre farklı metal oksit (CuO, TiO<sub>2</sub>, ZnO, CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve karbon nanopartiküllerinin insan akciğer epitel hücreleri (A549) üzerinde tripan blue yöntemine göre toksik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları CuO nanopartiküllerin diğer metal ve karbon partiküllerine göre daha yüksek etkide hasara neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, demir oksit nanopartiküllerin (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) toksisitesi çok düşük düzeyde iken CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> formun etkili bir şekilde DNA hasarını indüklediği ortaya konulmuştur (Karlsson ve ark. 2008).

Çinko oksit (ZnO) ve seryum oksit (CeO<sub>2</sub>) nanopartiküllerin RAW 264.7 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde toksisite mekanizmalarının karşılaştırıldığı çalışmada ROS oluşumu, inflamasyon uyarılması ve hücre ölümü yoluyla her iki hücre türünde de toksisiteyi önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (Xia ve ark. 2008). Huang ve ark. (2010b)'nin yaptıkları çalışmada ZnO nanopartiküllerin BEAS-2B hücre hattı üzerindeki konsantrasyon ve zamana bağlı sitotoksikite, oksidatif stres, hücre içi homeostaz ve gen ekspresyon özellikleri araştırılmıştır. Buna göre ZnO'nun 5-6 µg/ml konsantrasyonunda toksik olduğu, 6-10 µg/ml konsantrasyonunda ise hücre canlılığında hızlı bir düşüşün gözleendiği rapor edilmiştir. ZnO nanopartikülün insan karaciğer hücreleri (HepG2) üzerindeki etkisini açıklayan çalışmada MTT, NRU ve LDH testleri

yoluyla sitotoksisite belirlenmiş ve IC50 değeri 14.5 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Sharma ve ark. 2012).

Bu tez çalışmasında insan akciğer epitel hücre hattında (BEAS-2B) sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için XTT ve klonojenik test yöntemleri denenmiş ve Cu-Zn alaşım nanopartikülleri 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Buna göre çalışmada XTT testi IC50 değeri 4.55 µg/ml; klonojenik testi IC50 değeri 4.66 µg/ml şeklinde bulunmuştur. Elde edilen veriler önceki çalışmalarla kıyaslandığında Cu-Zn nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerdeki IC50 değeri, Cu ve Zn türevli nanopartiküllerin kullanıldığı hücrelere göre az miktarda düşük değerde bulunmuştur. Bu da BEAS-2B hücre hattında, Cu-Zn nanopartiküllerinin tekli Cu ve Zn tabanlı metal oksit partiküllerine göre daha sitotoksik etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte XTT ve klonojenik test sonuçlarına göre elde edilen IC50 değerleri birbirine uyumlu olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya konulmuştur. Bu da sitotoksik aktiviteyi belirlemek amacıyla gerçekleştirilen XTT ve klonojenik test sonuçlarının birbirine paralellik gösterdiğini açıklamaktadır.

Hücre döngüsü sırasında ortaya çıkan ve çekirdeğe dâhil olmayan kromozom veya kromozom fragmanlarından oluşan mikronukleuslar (MN); çeşitli ajanların oluşturduğu DNA hasarını ölçebilen bir testtir. Ayrıca kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Çekirdek oluşumundaki düzensizliklerin uygulanan ajanın çeşidine, dozuna, zamana ve hücre tipine göre değiştiği bilinmektedir. Valdiglesias ve ark. (2013) ZnO nanopartiküllerinin insan SHSY5Y nöral hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada ZnO nanopartiküllerin hücre içerisine girmediği ancak ortamda bulunması sebebiyle dahi canlılığı azaltması, MN oluşumu, H2AX fosforilasyonu ve DNA hasarı oluşturmak suretiyle doza ve zamana bağlı olarak toksisiteyi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca farklı şekillere sahip CuO nanopartiküllerin RAW 264.7 (makrofaj) hücre hattı üzerinde

toksik etkilerin araştırıldığı çalışmada doza bağlı olarak iki çekirdekli hücrelerin MN frekansında artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum komet yönteminin kullanılmasıyla DNA hasarındaki artışla ilişkili olarak açıklanmıştır (Bucchianico ve ark. 2013). Gümüş ve ark. (2013) tarafından ZnO nanopartiküllerin insan lenfosit hücrelerinde kromozom aberasyonu ve mikronukleus testini uygulanmış ve çalışma sonucunda 10 ve 15 µg/ml konsantrasyonlarda mikronukleus frekansının arttığı; 24 saatlik uygulamada mitotik indeksin azalmasına bağlı olarak, mitoz bölünmeyi inhibe ettiği ancak çekirdek bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında MN frekansı kontrol grubunda  $4,5 \pm 1,048$  iken  $0,1 \mu\text{g/ml}$  -  $3,2 \mu\text{g/ml}$  doz uygulamalarında ise sırasıyla  $7,83 \pm 1,72$ - $26,33 \pm 1,211$  olarak belirlenmiştir. Bu veriler ışığında doz artışına paralel olarak MN frekansında artış olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte uygulanan dozlarda çekirdek bölünme indeksinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. MN testinin sitotoksikite testleri sonucunda belirlenen genotoksik dozlar kullanılarak yapılmış olması nedeniyle çekirdek bölünme indeksinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmadığı düşünülmektedir. Buna göre elde edilen sonuçlar ZnO ve CuO nanopartiküller kullanılarak daha önce yapılan çalışmalara benzerlik göstermektedir.

Komet test yöntemi (tek hücre jel elektroforez) kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan güvenilirliği yüksek ve uygulaması kolay bir yöntemdir. Yöntem, oksidatif stres, toksik ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını doğru, hassas, hızlı, ucuz ve az bir örnek hacmi kullanarak ölçen bir uygulama olup, tüm canlı hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajları dikkate alınarak, son yıllarda komet testi farklı insan hücre hatları üzerine uygulanan nanopartiküllerin etki seviyelerini belirlemek amacıyla da sıkça kullanılmaktadır.

Toksik maddeler doza bağlı olarak hücrede DNA parçalarının oluşmasına yol açabilir ve DNA parçaları baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılır. Kuyruk kısmındaki DNA

yüzdesi % DNA olarak ifade edilmektedir. Ayrıca kuyruk uzunluğu ve Olive Kuyruk Momenti kullanılan parametreler arasındadır (Collins ve ark. 2008). Komet kuyruklarını değerlendirmek için görsel puanlama veya bilgisayarlı görüntü analizi kullanılmaktadır. Elde edilen veriler ise uygulanan çevresel ajanın aktivitesini yorumlamada önemli ipuçları sunmaktadır.

Genotoksik etkilere sahip olan fiziksel veya kimyasal maddelerin hedef organizma üzerinde belirli bir periyot ve konsantrasyonda DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı belirlenebilmektedir. Metal oksit nanopartikül ve karbon nanotüplerin toksisite ve DNA hasarı açısından tripan blue boyama, komet testi ve ROS testi uygulanarak karşılaştırıldığı çalışmada, A549 hücrelerine 4 saat 2, 40 ve 80 µg/ml dozlarda farklı nanopartiküller verilmiş ve CuO 80 µg/ml dozda kuyruk % DNA değeri 41 olarak bulunmuştur. Bu değer ise karşılaştırılan diğer nanopartiküllere göre en fazla DNA hasarı oluşturduğunu göstermiştir (Karlsson ve ark. 2008). Nanopartiküllerin yüzey büyüklüğü genotoksisite düzeyini etkileyen faktörlerden biridir. Midander ve ark. (2009)'na göre mikrometre boyutlu CuO ve Cu partikülleri, nanopartiküllerine kıyasla daha düşük genotoksik etki göstermiştir. Ayrıca komet testi ile Cu'nun CuO'ya göre daha toksik olduğu bildirilmiştir. Cu nanopartikülleri ile yapılan benzer bir çalışmada; 40, 60 ve 80 nm boyutundaki partiküllerin DRG nöronları üzerindeki toksik etkisi araştırılmış ve sonuç olarak 40 ile 60 nm boyutundaki partiküllerin daha toksik etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Buna göre toksik etkinin boyuta bağlı olduğu vurgulanmıştır (Prabhu ve ark. 2010).

Sharma ve ark. (2009) tarafından insan epitel hücre hattı (A431) üzerinde ZnO nanopartiküllerin genotoksik seviyelerinin belirlenmesine yönelik çalışmada konsantrasyona ve doza maruz kalma süresine bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada Olive Kuyruk Momenti (OTM) kontrol grubunda  $1.37 \pm 0.12$  iken  $0.8 \mu\text{l/ml}$  dozda  $2.13 \pm 0.12$  olarak bulunmuştur. OTM'deki bu artış ise DNA hasar potansiyeline bir kanıt olarak gösterilmiştir. Gerloff ve ark. (2009) Caco-2 hücrelerine 4 saat süre ile  $20 \mu\text{g/cm}^2$  dozda ZnO, TiO<sub>2</sub>, MgO ve SiO<sub>2</sub> partikülleri uygulayarak DNA hasarı potansiyelini komet analizi ile kıyaslamışlardır. Çalışma sonunda ZnO kuyruk % DNA değerinin (% 16) diğer partiküllerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. İnsan

lenfosit hücrelerine ZnO nanopartiküllerin uygulandığı ve DNA hasarının belirlendiği bir çalışmada Olive kuyruk momentinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca ZnO nanopartiküllerin mitokondri membran potansiyelini azaltarak oksidatif stresi attırdığı rapor edilmiştir (Musarrat ve ark. 2009). Reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmasının yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, bazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi hasarlara yol açtığı bilinmektedir (Gümüş 2010).

Yapılan bu tez çalışmasında komet testi bulguları kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Kuyruk uzunluğu, büyüme kontrol grubunda  $8,2 \mu\text{m} \pm 1,923$  iken  $0,1 \mu\text{g/ml} - 3,2 \mu\text{g/ml}$  arasındaki doz uygulamalarında  $18,6 \pm 5,941 - 37,2 \pm 8,613$  arasında bulunmuştur. Kuyruk % DNA değeri, büyüme kontrol grubunda  $8,79 \pm 2,03$  iken  $0,1 \mu\text{g/ml} - 3,2 \mu\text{g/ml}$  arasındaki doz uygulamalarında sırasıyla  $17,385 \pm 2,724 - 36,304 \pm 8,129$  olarak kaydedilmiştir. Olive Kuyruk Momenti değeri ise kontrol grubunda  $1,6 \pm 0,894$  iken  $0,1 \mu\text{g/ml} - 3,2 \mu\text{g/ml}$  arasındaki doz uygulamalarında  $5 \pm 2,121 - 12,2 \pm 2,774$  olarak bulunmuştur. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde doz artışına bağlı olarak DNA hasarında da bir artışın olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen bu pozitif ilişki ise daha önce Cu, CuO, Zn ve ZnO nanopartiküller ile yapılan çalışmalarda kaydedilen sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

H2AX, DNA hasarına yanıt yollarında görev alan ilk proteinlerden birisidir. DNA çift zincir kırıklarına yanıtta H2AX, korunmuş olan C-terminal kuyruk bölgesindeki serin 139 pozisyonundan, PI-3 (Phosphoinositol-3) kinaz ailesi üyeleri olan ATM, ATR ve DNA-PK'ler tarafından hızla fosforillenir. ATM ve DNA-PK'ler genellikle iyonize radyasyon sonrası H2AX'nin fosforilasyonunda fonksiyonel görev üstlenirken, ATR ise replikasyon çatalını yavaşlatan ya da duraklatan DNA hasarına yanıtta daha önemli bir görev üstlenmektedir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX ( $\gamma$ -H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle  $\gamma$ -H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır DNA hasar tespitini sağlayan diğer test

veya uygulamalarla kıyaslandığında; tek bir hücre düzeyinde genomun bütünlüğündeki çok küçük değişiklikleri saptayabildiği için  $\gamma$ -H2AX testi, daha avantajlıdır. Bu test, genomu etkileyebilecek radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateriyaller, pestisitler ve çevresel kirleticiler gibi sitotoksik ve genotoksik olabilecek her türlü kimyasal ajanın DNA hasarı ve tamiri üzerindeki etkilerinin tespiti ve risk tayininin yapılabilmesi için moleküler düzeyde kullanılacak hassas bir yöntemdir (Şekeroğlu 2013).

Kobalt (Co) ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin A549 epitel hücreleri üzerindeki genetik hasarın tespiti ve ROS oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada TiO<sub>2</sub>'in ROS oluşumunu indüklediği ancak Co'nun ROS'u artırdığı görülmüştür. A549 epitel hücrelerinde Co'nun neden olduğu DNA hasarının komet kuyruğundaki uzunluk ve kuyruk % DNA değerlerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu artan değerler doza ve zamana bağlı olarak fosforillenmiş H2AX'de de paralellik göstermiştir (Wan ve ark. 2012). Toyooka ve ark. (2012) iki farklı boyuta sahip TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada küçük boyutlu partiküllerin daha fazla  $\gamma$ -H2AX fokusu oluşturduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında Cu-Zn alaşım nanopartiküllerin,  $\gamma$ -H2AX fokuslarının oluşumundaki rolü araştırılmıştır.  $\gamma$ -H2AX testi sonuçlarına göre belirlenen fokus sayıları değerlendirilmiştir. Buna göre, kontrol grubu için ortalama fokus sayısı  $7,196 \pm 1,271$  iken  $0,1 \mu\text{g/ml}$  -  $3,2 \mu\text{g/ml}$  arasındaki doz uygulamalarında ise  $11,188 \pm 3,231$  -  $35,8 \pm 6,883$  olarak bulunmuştur. Bu sonuç ise Cu-Zn nanopartikül doz grupları arasında hücre başına düşen ortalama fokus sayısının doza bağlı olarak artış gösterdiğini kaydetmiştir.

Mikronükleus, komet ve  $\gamma$ -H2AX testlerinden elde edilen sonuçlar; Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin DNA kırıklarına, yapısal ya da sayısal kromozom anormalliklerine neden olduğu ve DNA hasarına yol açtığını göstermektedir. Böylece, nanopartiküllerin ya doğrudan DNA'ya bağlanarak ya da DNA'ya bağlı proteinlerle etkileşime geçerek replikasyon, transkripsiyon ve translasyon olaylarını önleyebilecekleri, diğer hücrel

proteinlere bağlanarak hücre bölünmesi sürecini etkileyebilecekleri, oksidatif strese ve sonuçta hücre hasara yol açabilecekleri düşünülmektedir.

ROS'lar DNA, protein ve lipitler gibi hücre makromoleküllerle zararlı bir şekilde etkileşime girerek homeostazi bozabilen son derece reaktif moleküllerdir. Tek ve çift iplikteki DNA kırılmaları, 8-hidroksideoksi-guanozin (8-OHdG) katım oluşumu ve benzeri baz modifikasyonları, DNA çapraz bağlanmaları gibi ROS ile indüklenmiş DNA hasarları tamir edilemez ise karsinogenezin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilir (Singh ve ark. 2009).

Birçok *in vitro* çalışma, nanopartiküle maruz bırakılan hücrelerde toksisitenin başladığını gösteren ROS seviyesinde önemli artışların olduğunu ortaya koymuştur. Nitekim Ahamed ve ark. (2011), A549 akciğer epitel hücrelerini nikel-ferrit nanopartikülüne maruz bırakmış ve partiküllerin hücre içerisine girmesiyle hücrede ROS oluşumunun arttığını göstermişlerdir.

Hücelere uygulanan nanopartiküllerin doz artışına paralel olarak hücre içi ROS miktarında da önemli bir artışın olduğu saptanmaktadır. Fahmy ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada HEP-2 hücreleri artan dozlarda SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve CuO nanopartiküllerine maruz bırakılmış ve doz arttıkça ROS miktarının da arttığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmada CuO nanopartiküllerinin oksidatif stres aracılığıyla hücre ölümünü kuvvetli bir şekilde indüklediği tesbit edilmiştir.

TiO<sub>2</sub>, Ag, Al, Zn ve Ni gibi bazı metal nanopartiküllerin A549 insan epitel hücrelerinde ROS oluşumuna neden olma bakımından karşılaştırıldığı bir çalışmada, Zn'nin diğerlerine göre daha etkin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Park ve ark. 2007).

Bu tez çalışmasında Cu-Zn nanopartiküllerinin doz artışına bağlı olarak hücre içi ROS artışına neden olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu için ROS değeri 1,496±0,04 iken bu değer 0,1 µg/ml - 1,6 µg/ml doz grupları arasında; 1,73±0,22 - 2,461±0,1 olarak ölçülmüştür. 3,2 µg/ml ve 6,4 µg/ml doz gruplarında sırasıyla; 2,163±0,14 ve 2,045±0,03 olarak ölçülmüştür. Yüksek dozlarda, ROS seviyesinin düşmesinin hücre

canlılığının azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen XTT ve Klonojenik test sonuçlarına göre belirlenen IC50 dozundan yüksek konsantrasyonlarda bile üretilen ROS miktarı ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. Elde edilen bu sonuç ise önceki çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

ROS'lar yüksek kimyasal reaktiviteleri sayesinde DNA, proteinler, karbonhidratlar ve yağlar ile reaksiyona girebilmeleri nedeniyle apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olurlar (Schrand ve ark. 2010, Arora ve ark. 2012). Hampton ve Orrenius (1997) jurkat T lenfositlere farklı dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulayarak yaptıkları çalışmada, şiddetli oksidatif stresin hücrelerde nekroza, orta derecede ise apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir.

Jeng ve Swanson (2006) metal oksit nanopartiküllerinin özellikle de ZnO'nun Neuro-2A fare nöroblastoma hücrelerinde en temel toksisite kaynağını ROS üretimi olarak açıklamışlardır. Bu çalışmada, ZnO'nun doza bağlı artışının apoptotik ya da nekrotik yollarla hücreyi ölüme götürdüğü gösterilmiştir. Özellikle nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarında hücrenin apoptoz, yüksek konsantrasyonlarında ise nekroz yoluna girdiği gösterilmiştir. Aynı şekilde (Beyersmann 2002) hücre içi Zn konsantrasyonunun artmasının apoptozu tetikleyebileceği, yüksek konsantrasyonlarda ise hücreleri baskın şekilde nekroza yönlendireceği bildirilmiştir.

TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin anataz ve rutil olmak üzere iki farklı formunun kullanıldığı bir çalışmada, anataz uygulanan hücrelerin nekroza, rutil uygulanan hücrelerin ise apoptoza neden olduğu saptanmıştır (Braydich-Stolle ve ark. 2009). Böylece toksisite kaynaklı hücre ölüm mekanizmasının tercih edilmesinde nanopartikül konsantrasyonunun etkisi kadar partikül şeklinin de önemli olabileceği savunulmuştur. Ada ve ark. (2010) HeLa hücreleri üzerine NiO nanopartikülünün olası etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada NiO'nun doz ve zaman artışına bağlı olarak apoptoz ve nekroz oranında da artışlar olduğunu saptamışlardır. Özellikle de uygulama zamanının 2-16 saat artışıyla toplam apoptotik hücre artışında da % 20'ye kadar artışın olduğu gösterilmiştir.



Bu tez çalışmasında Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin Beas-2B akciğer epitel hücrelerinde indüklediği ölüm yolları, M30 apoptoz ve M65 nekroz testleri sonuçlarına göre belirlenmiştir. M30 testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile doz grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Oysa M65 testi sonuçlarına göre kontrol grubunda M65 (U/L) değeri  $187,59 \pm 4,99$  iken bu değer  $12,8 \mu\text{g/ml}$ 'de  $499,6 \pm 86,63$ 'e yükselmiş ve doz artışına bağlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir.

M30 ve M65 test sonuçları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda hücrelerin % 50,18'i apoptoz yoluyla ölürken, % 49,82 nekroz yoluyla ölmüşlerdir.  $1,6 \mu\text{g/ml}$ - $12,8 \mu\text{g/ml}$  arasındaki doz uygulamalarında apoptoz yoluyla ölen hücrelerin yüzdesi 41,56-31,49 arasında iken, nekroz yoluyla ölen hücrelerin yüzdesinin ise 58,44- 68,51 arasında olduğu belirlenmiştir. Buna göre, Cu-Zn nanopartiküllerinin düşük dozlarda apoptoz, yüksek dozlarda ise nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olması bakımından farklı nanopartiküller kullanılarak yapılan önceki çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri in vitro yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışmada, alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B akciğer epitel hücreleri içerisine girdiği, sitoplazmada konumlandığı ve doz artışına bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik hasarın artmasına neden olduğu saptanmıştır. Buna göre yakın gelecekte Cu-Zn alaşım nanopartiküllerinin kullanımında meydana gelecek artışa paralel olarak olası etkilerinin de net olarak ortaya konulması, çevre ve sağlık açısından ciddi sorunların önüne geçilmesinde ve korunma stratejilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ada, K., Turk, M., Oguztuzun, S., Kilic, M., Demirel, M., Tandogan, N., Ersayar, E., Latif, O. 2010.** Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells. *Folia Histochem Cytobiol.*, 48(4):524-529.
- 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.
- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Siddiqui, M.A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, 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.
- 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.
- Altun, Z.S., Akhisaroğlu, S.T., Batu, J., Ateş, H., Giray, H., Koçtürk, S. 2010.** Discrimination Effectiveness of CK18 on Cell Death Modes in Colon Cancer Cells. *Turk. J. Biochem.*, 35 (1):20–28.
- Anonim, 2007.** U.S. Environmental Protection Agency Nanotechnology White Paper. U.S. EPA., yayın no: 100/B-07/001, Washington DC.
- Anonim, 2008.** Opinion on the scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnologies. European Commission, 2007. Brüksel.
- Anonim, 2009a.** Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances. European Commission, 2009. Brüksel.
- Anonim, 2009b.** OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence). Cell Biolabs, Inc., San Diego.
- Anonim, 2010a.** Cell Proliferation Assay XTT. Applications No:12. Darmstadt, Almanya, <http://www.applichem.com/literatur/supportmore/nr-4-zellproliferations-testkit-xtt/>-(Erişim tarihi. 28.10.2013).
- Anonim, 2010b.** Validated Biomarker Assays Specific for Epithelial Cell Death. [http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/minicatalog/zz-f0410-1014\\_m30\\_np\\_final.pdf](http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/minicatalog/zz-f0410-1014_m30_np_final.pdf)-(Erişim tarihi:01.11.2013).

**Anonim, 2011.** EU, Commission Recommendation of 18 October 2011 on the Definition of Nanomaterial (Text with Eea Relevance). 2011/696/EU. [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/%20LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EN:PDF-\(Erişim Tarih:08.09.2013\).](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/%20LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EN:PDF-(Erişim Tarih:08.09.2013).)

**Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. 2012.** Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258:151–165.

**Asharani, P.V., Mun, G.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.*, 3:279–290.

**Atlı-Şekeroğlu Z. 2013.** Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 70(1): 33-42.

**Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., Wiesner, M. R. 2009.** Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.*, 4: 634-41.

**Berne, B. J., Pecora, R. 1975.** Dynamic Light Scattering. John Wiley, New York.

**Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. 2005.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127–152.

**Beyersmann, D. 2002.** Homeostasis and Cellular Functions of Zinc. *Materials Science and Engineering Technology*. 33 (12): 764–769.

**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.

**Braydich-Stolle, L.K., Schaeublin, N.M., Murdock, R.C., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J.J., Hussain, S.M. 2009.** Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub> nanotoxicity. *J. Nanopart. Res.*, 11:1361–1374.

**Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., Holguin, Hong, F.Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., Peters, A., Siscovick, D. S., Smith, C., Whitsel, L. and Kaufman, J.D. 2010.** Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.*, 121:2331-2378.

**Browne, M. 2009.** Imaging and image analysis in the comet assay. The Comet Assay in Toxicology, Ed.: Dhawan, A., ve Anderson, D., Cambridge, UK., pp. 390-423.

**Buchianico, S.D., Fabbri, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E., Migliore, L. 2013.** Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis*, 1-13.

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

**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.

**Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. 2010.** Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications, *Trends Biotechnol.*, 28(11):580-588.

**Chang, Y.N., M. Zhang, Xia, L., Zhang, J., Xing, G. 2012.** The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 5:2850-2871.

**Cimini, D., Degrassi, F. 2005.** Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol.*, 15:442–451.

**Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Blev-Zacheo, T., D’Alessio, M., Zambonin, P.G., Traversa, E. 2005.** Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem. Mater.*, 17:5255–5262.

**Cohen, J.J. 1993.** Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *CHEST*, 103: 99-101.

**Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R. 2008.** The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143–151.

**Colvin, V. L. 2003.** The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nat. Biotechnol.*, 21(10): 1166–1170.

**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.

**Çıracı, S. 2005.** Metrenin Milyarda Birinde Bilim ve Teknoloji. *Bilim ve Teknik Yeni Ufuklara*, 8:6-10.

**Demirel, S., Zamani, A. 2002.** MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3): 123-127.

**Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009.** Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.*, 25(1):5-32.

**Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010.** Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi İle DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(2): 77- 89.

- 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.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., Borm, P.J.A. 2004.** Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.*, 61:727-728.
- Dormandy, T.L. 1983.** An approach to free radicals. *Lancet.*, 322: 1010-1013.
- Dusinska, M., Collins, A.R. 2008.** The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions, *Mutagenesis*, 23:191-205.
- Fahmy, B., Cormier, S.A. 2009.** Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol. In Vitro*, 23:1365–1371.
- Ferin, J., Oberdörster G, Penney, D.P., Soderholm, S.C., Gelein, R., Piper, H.C. 1990.** Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. *J Aerosol Sci.*, 21:381–384.
- Ferrando, R., Jellinek, J., Johnston, R. L. 2008.** Nanoalloys: From Theory to Applications of Alloy Clusters and Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 108(3):845-910.
- Franken, N.A.P, Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree C. 2006.** Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.*, 1(5):2315-2319.
- Fubini, B., Ghiazza, M. Fenoglio, I. 2010.** Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity, *Nanotoxicology*, 4: 347-363.
- Gerengi, H. 2008.** Tafel Polarizasyon (TP), Lineer Polarizasyon (LP), Harmonik Analiz (HA) ve Dinamik Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (DEIS) Yöntemleriyle Düşük Karbon Çeliği (AISI 1026), Piriç-MM55 ve Nikalium-118 Alaşımlarının Yapay Deniz Suyunda Korozyon Davranışları ve Piriç Alaşımlarına Benzotriazol'un İnhibitor Etkisinin Araştırılması. *Doktora Tezi*, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Eskisehir.
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F. 2009.** Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology*, 3 (4): 355-364.
- Gomez, C.C., Moreira, L.M., Santos, V.J., Ramos, A.S., Lyon, J.P., Soares, C.P., Santos, F.V. 2011.** Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1): 116-121.
- Gonzalez, L., Lison, D., Kirsch-Volders, M. 2008.** Genotoxicity of engineered nanomaterials: A Critical Review. *Nanotoxicology*, 2(4): 252-273.

**Gonzalez, L., Sanderson, B.J.S., Kirsch-Volders, M. 2011.** Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 26 (1):185-191.

**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.

**Gümüş, D. 2010.** ZnO Nanomateryalinin İnsan Lenfositlerinde İn Vitro Genotoksik Etkileri.(Y. Lisans Tezi), Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

**Gümüş, D., Berber, A. A., Ada, K., Aksoy, H. 2013.** In vitro genotoxic effects of ZnO nanomaterials in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*. DOI: 10.1007/s10616-013 9575-1. Online ISSN: 1573-0778.

**Hägg, M., Bivén, K., Ueno, T., Rydlander, L., Björklund, P., Wiman, K.G., Shoshan, M., Linder, S. 2002.** A Novel High-Through-Put Assay for Screening of Pro-Apoptotic Drugs. *Investigational New Drugs*, 20 (3): 253-259.

**Hahn, A., Fuhlrott, J., Los, A., Barcikowski, S. 2012.** Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J. Nanopart Res.*,14(686):1-10.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989.** Free radicals in biology and medicine. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres; 125.

**Hampton, M.B., Orrenius, S. 1997.** Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 414:552-556.

**Han, Z.J., Levchenko, I., Kumar, S., Yajadda, M.M.A., Yick, S., Seo, D.H., Martin, P.J., Peel, S., Kuncic, Z., Ostrikov, K. 2011.** Plasma nanofabrication and nanomaterials safety. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 44(17): 174019-174026.

**Huang Y.W., C.H., Wu, Aronstam, R.S. 2010a.** Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from *in vitro* Studies. *Materials*, 3:4842-4859.

**Huang, C.C., Aronstam, R.S., Chen, D.R., Huang, Y.W. 2010b.** Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. in vitro*, 24:45-55.

**Hunter, R.J. 1981.** Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications. Academic Press, London. 17-21.

**Ibanez, I.L., Bracalente, C., Molinari, B.L., Palmieri, M.A., Policastro, L., Kreiner, A.J., Burlón, A., Valda, A., Navalesi, D., Davidson, J., Davidson, M., Vázquez, M., Ozafrán, M., Durán, H. 2009.** Induction and Rejoining of DNA Double Strand Breaks Assessed by H2AX Phosphorylation in Melanoma Cells

Irradiated with Proton and Lithium Beams. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 74(4):1226-1235.

**Ismail, I.H., Hendzel, M.J. 2008.** Review: The  $\gamma$ -H2A.X: Is It Just a Surrogate Marker of Double-Strand Breaks or Much More? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 73 – 82.

**Israels, L.G., Israels, E.D. 1999.** Apoptosis. *The Oncologist*, 4:332-339.

**Jeng, H., Swanson, J. 2006.** Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health: Part A*, 41:2699-2711.

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

**Joris, F., Manshian, B.B., Peynshaert, K., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., Soenen, S.J. 2013.** Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the *in vitro*–*in vivo* gap. *Chem. Soc. Rev.*, 42: 8339-8359.

**Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L. 2008.** Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol.*, 21(9):1726-1732.

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

**Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972.** Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257.

**Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1994.** Apoptosis: Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*, 73(8): 2013-2026.

**Kim, Y.J., Choi, H.S., Song, M.K., Youk, D.Y., Kim, J.H., Ryu, J.C. 2009.** Genotoxicity of Aluminum Oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Nanoparticle in Mammalian Cell Lines. *Mol. Cell. Toxicol.*, 5(2): 172-178.

**Kim, I.S., Baek, M., Choi, S.J. 2010.** Comparative Cytotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles to Human Lung Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 10: 3453–3458.

**Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. 2008.**  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36 (17):5678–5694.

**Klien, k., Godnić-cvar, j. 2012.** Genotoxicity of metal nanoparticles: Focus on *in vivo* studies. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 63:133-145.

**Kramer, G., Erdal, H., Mertens, H.J., Nap, M., Mauermann, J., Steiner, G., Marberger, M., Biven, K., Shoshan, M.C., Linder, S. 2004.** Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Research*, 64: 1751–1756.

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

**Kumari, M., Khan, S.S., Pkarashi, S., Mukerjee, A. 2011.** Chandrasekaran, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater.*, 190: 613-621.

**Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schnekenburger, J., Wiench, K., Wohlleben, W. 2010.** Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Advanced Materials*, 22:2601-2627.

**Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., Hoet, P. 2009.** Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre Toxicol.*, 6:1-14.

**Leers, M.P.G., Kölgen, W. Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C.S., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999.** Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of Pathology*, 187(5): 567–572.

**Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A. 2003.** Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Environ. Health. Persp.*, 111(4): 455-460.

**Linder, S., Olofsson, H.M., Herrmann, R., Ulukaya, E. 2010.** Utilization of cytokeratin-based biomarkers for pharmacodynamic studies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(3):353-359.

**Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A. 2010.**  $\gamma$ -H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9(4): 662-669

**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.

**Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. 2013.** Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2013/942916:15.

**Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006.** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515–1531.



- Maynard, A.D., Aitken, R.J. 2007.** Assessing Exposure to Airborne Nanomaterials: Current Abilities and Future Requirements. *Nanotoxicology*, 1(1): 26-41.
- McArt, D.G., McKerr, G., Howard, C.V., Saetzler, K., Wasson, G.R. 2009.** Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions*, 37(4):914-917.
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H.L., Elihn, K., Möller, L., Leygraf, C., Wallinder, I.O. 2009.** Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small* 5(3):389-399.
- Mondello, C., Scovassi, A.I. 2011.** Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell Biochem*, 50: 307–323.
- Moschini, E., Gualtieri, M., Gallinotti, D., Pezzolato, E., Fascio, U., Camatini, M., Mantecca, P. 2010.** Metal oxide nanoparticles induce cytotoxic effects on human lung epithelial cells A549. *Chemical engineering transactions*, 22:29-35.
- Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. 2005.** Clonogenic Cell Survival Assay. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays Edited by: R.D. Blumenthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Musarrat, J., Saquib, Q., Azam, A., Naqvi, H. A. S. 2009.** Zinc Oxide Nanoparticles-Induced DNA Damage in Human Lymphocytes. *Int. J. of Nanoparticles*, 2 (1-6): 402-415.
- Muslimovic, A., Johansson, P., Hammarsten, O. 2012.** Measurement of H2AX Phosphorylation as a Marker of Ionizing Radiation Induced Cell Damage: Current Topics in Ionizing Radiation Research, Editor: Nenoï, M. ISBN: 978-953-51-0196-3, InTech, DOI: 10.5772/33257. Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-ionizing-radiation-research>
- Nanji, A.A., Hiller-Sturmhöfel, S. 1997.** Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World*, 21:325-330.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006.** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311:622–627.
- Niwa, Y., Iwai, N. 2006.** Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water soluble fullerenes using micronucleus test. *Environmental Health Perspective*, 11:292-297.
- Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein J, Wade P, Corson N. 1990.** Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J Aerosol Sci.*,21:384–387.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere,**

**N., Warheit, D., Yang, H. 2005a.** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.*, 2:8–43.

**Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. 2005b.** 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.

**Ostling, O., Johanson, K.J. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-98.

**Ostrovsky, S., Kazimirsky, G., Gedanken, A., Brodie, C. 2009.** Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells. *Nano Res.*, 2:882–890.

**Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E., Case, C. 2007.** The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 28:2946–2958.

**Panariti, A., Misericocchi, G., Rivolta, I. 2012.** The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*, 5: 87-100.

**Park, S, Lee, Y.K., Jung, M., Kim, K.H., Chung, N., Ahn, E.K., Lim, Y., Lee, K.H. 2007.** Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol.*, 19(1):59-65.

**Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K. 2008.** Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.*, 180:222–229.

**Pettibone, J.M., Elzey, S., Grassian, V.H. 2008.** An Integrated Approach toward Understanding the Environmental Fate, Transport, Toxicity and Health Hazards of Nanomaterials: Nanoscience and Nanotechnology, Editör: Grassian, V. H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp: 43-68.

**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.

**Piperakis, S.M. 2009.** Comet assay: A brief history. *Cell Biol. Toxicol.*, 25:1–3.

**Prabhu, B.F., Ali, M.S., Murdock, R.C., Hussain, S.M., Srivatsan, M. 2010.** Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology*, 4(2): 150–160.

- Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jeyasubramanian, K., Manivannan, G. 2011.** Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: NBM*, 7:184–192.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., Bozko, P. 2010.** H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 1-9.
- 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. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 9615-9626.
- Powers, K., Brown, S., Krishna, V., Wasdo, S., Moudgil, B., Roberts, S. 2006.** Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol. Sci.* 90(2): 296–303.
- Rawson, P.S. 1984.** Ceramics. University of Pennsylvania Press. ISBN 0-8122-1156-1
- Risom, L., Moller, P., Loft, S. 2005.** Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution, *Mutat Res*, 592, 119-37.
- 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. *Journal of Immunological Methods*. 142 (2): 257–265.
- Rydberg, B., Johanson, K.J. 1978.** Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds): DNA repair mechanisms. New York: Academic Press, pp 465–468.
- Sahu, D., Kannan, G.M. Vijayaraghavan, R., Anand, T., Khanum, F. 2013.** Nanosized Zinc Oxide Induces Toxicity in Human Lung Cells. *ISRN Toxicology*, Article ID 316075, pages:8.
- Schins, R.P., Knaapen, A.M. 2007.** Genotoxicity of poorly soluble particles, *Inhal. Toxicol*, 19: 189-98.
- Schlesinger, R.B., Kunzli, N., Hidy, G.M., Gotschi, T., Jerrett, M. 2006.** The health relevance of ambient particulate matter characteristics: coherence of toxicological and epidemiological inferences, *Inhal. Toxicol.*, 18, 95-125.
- Schrand, A. M., Rahman M. F., Hussain, S. M., Schlager, J., Smith, D. A., Syed, A. F. 2010.** Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (5): 544–568.

- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. 1988.** Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res.*, 48:4827-4833.
- Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A. 2009.** DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, 185: 211–218.
- Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A. 2012.** Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17:852–870.
- Shinde, S. K., Grampurohit, N.D., Gaikwad, D.D., Jadhav, S.L., Gadhawe, M.V., Shelke, P.K. 2012.** Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pac J Trop Dis.*, 2(4): 331-334.
- 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.
- Shukla, R.K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A.K., Singh, S., Dhawan, A. 2013.** TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*, 7(1):48–60.
- Simakov, S., Tsur, Y. 2006.** Surface stabilization of nano-sized titanium dioxide: improving the colloidal stability and the sintering morphology. *J. Nanoparticle Res.*, 9:403–417.
- 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.
- Singh, N., Mansian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J. 2009.** Nanogenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30:3894-3914.
- Smart, D.J., Halicka, H.D., Schmuck, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Williams, G.M. 2008.** Assessment of DNA double-strand breaks and gamma H2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutation Research*, 641:43-47.
- 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.
- Stone, V., Johnston, H. Schins, R.P. 2009.** Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations, *Crit Rev Toxicol.*, 39,613-26.

**Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z. 2011.** Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 68(4): 241-252.

**Şekeroğlu, Z.A. 2013.** gamma-H2AX testi ve önemi. *Toksikoloji bülteni*, 37:3-4.

**Teeguarden, J.G., Hinderliter, P.M., Orr, G., Thrall, B.D., Pounds, J.G. 2007.** Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments. *Toxicological Sciences*, 95(2):300-312.

**Thess A., Lee, R., Nikolaev, P., Dai, D., Petit, P., Robert, J. 1996.** Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science*, 273:483-487.

**Thompson, C. B. 1995.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.

**Toyooka, T., Amano, T., Ibuki, Y. 2012.** Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Environmental Mutagenesis*. 742( 1-2): 84-91.

**Tripathi, A., Saravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N.C., Selvamurugan, N. 2012.** Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 50(1):294-299.

**Tsaousi, A., Jones, E., Case, C.P. 2010.** The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res.*, 697: 1-9.

**Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi, [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis\\_ders\\_notu.pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf) -(09/09/2013).

**Urso, M.L., Clarkson, M.P. 2003.** Oxidative stres, exercise, and antioxidant supplemetation. *Toxicology*, 189: 41-54.

**Valdiglesias, V., Costa, C., Kiliç, G., Costa, S., Pásaro, E., Laffon, B., Teixeira, J.P. 2013.** Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment International*, 55:92-100.

**Vaux, D.L., Flavell, R.A. 2000.** Apoptosis genes and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 12: 719-724.

**Wan, R., Mo, Y., Feng, L., Chien, S., Tollerud, D. J., Zhang, Q. 2012.** DNA Damage Caused by Metal Nanoparticles: Involvement of Oxidative Stress and Activation of ATM. *Chem. Res. Toxicol.*, 25 (7):1402-1411.

**Wang, C., Youle, R.J. 2009.** The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, 43: 95-118.

- Williams, D. N., Ehrman, S. H., Holoman, T. R. P. 2006.** Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. *J. Nanobiotechnology.*, 4(3):1-8.
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., Fu, S. 2005.** Chitosan Nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.*, 295: 235–245.
- Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., Nel, A.E. 2006.** Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles to Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.*, 6(8):1794-1807.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liang, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J.I., Nel, A.E. 2008.** Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano.*, 2(10): 2121-2134.
- Xia, T., Li, N., Nel, A.E. 2009.** Potential health impact of nanoparticles. *Annu. Rev. Public Health*, 30:137–150.
- Yah, C. S., 2013.** The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomed Res.*, 24 (3): 400-413.
- Young, I.S., Woodside, J.V. 2001.** Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 54: 176-186.
- Yuan, J., Adamski, R., Chen, J. 2010.** Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Lett.*, 584: 3717-3724.
- Zelazna, K., Rudnicka, K., Tejs, S. 2011.** In vitro micronucleus test assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Biotechnology*, 7(2):70-80.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümit KUMBIÇAK  
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırşehir / 19.09.1978  
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kırşehir Mehmet Akif Ersoy Lisesi /1992-1995  
Lisans : Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Biyoloji  
Öğretmenliği / 1996-2000  
Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta  
öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı / 2001-2004

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : MEB / 2000-Halen

İletişim (e-posta) : umut4002@gmail.com

Yayımları :

### Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI, SSCI Expanded)

**Kumbıçak, Z., Ergene, S., Karataş, A., Kumbıçak, Ü. 2011.** Cytogenetic studies on five species of spiders from Turkey (Araneae: Gnaphosidae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 39(3): 490-494.

**Kumbıçak, Z., Karataş, A., Kumbıçak, Ü., Seyyar, O. 2013.** Karyological data and meiosis of *Drassyllus praeficus* (L. Koch, 1866) (Gnaphosidae) and *Thanatus imbecillus* (L. Koch, 1878) (Philodromidae) from Turkey. *Turk. J. Zool.*,37: 200-204.

### Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

**Kumbıçak, Ü., Atılboz, N. G., Salman, S. 2006.** İlköğretim Okullarındaki Fen Bilgisi Dersinde Yer Alan Biyoloji Konularının Öğretiminde Karşılaşılan Sorunlar (Yozgat İli Örneği). *Milli Eğitim dergisi*, 172: 211-224.

**Kumbıçak, Z., Kumbıçak, Ü., Ergene, S. 2011.** *Pisaura consocia* (O.P.-Cambridge, 1872) ve *Dolomedes plantarius* (Clerck, 1757) (Araneae: Pisauridae) türlerine ait karyolojik analiz. *Tünav Bilim Dergisi*, 4(3):206-213.

### Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

**Doğan, A., Kumbıçak, Z. Kumbıçak Ü. 2009.** Haplojin ve Entelejin Örümceklerde Sitogenetik Bilgilerin Karşılaştırılması. 16. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 1-4 Temmuz 2009, Niğde Üniversitesi, Niğde.

**Kumbıçak, Z., Ergene, S., Saygıdeğer, S., Kumbıçak, Ü., Seyyar, O., Doğan, A., Çetin, H. 2010.** *Drassodes lapidosus* (Walckenaer 1802) ve *Tibellus oblongus* (Walckenaer 1802) (Ordo:Araneae) Türlerinin Karyotip ve Eşey Kromozomu

Sistemlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

**Kumbıçak, Z., Ergene, S., Saygıdeğer, S., Karataş, A., Kumbıçak, Ü. 2010.**  
*Alopecosa pulverulenta* (Clerck 1757) (Araneae, Lycosidae) Türüne ait Kromozomların Mayoz Bölünme Sırasındaki Davranışlarının Araştırılması. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.