

**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**MAGNEZYUM OKSİT (MgO) VE NİKEL OKSİT (NiO)
NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN KAN DOKUSU
ÜZERİNE İN VİTRO TOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ali KALELİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dilek PANDIR**

Yozgat 2020

**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**MAGNEZYUM OKSİT (MgO) VE NİKEL OKSİT (NiO)
NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN KAN DOKUSU
ÜZERİNE İN VİTRO TOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ali KALELİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dilek PANDIR**

**Bu çalışma, Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 6601-FBE/18-217 Kodu İle Desteklenmiştir.**

Yozgat 2020

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xii
1.1. Antioksidanlar	4
1.1.2. Endojen Antioksidanlar	5
1.2. Komet Testi	6
2.1. Kimyasallar	8
2.2. Eritrositlerin Hazırlanması.....	8
2.3. Eritrositlere Uygulama	8
2.4. İnsan Lökositlerinin İzolasyonu ve Uygulama Grupları	9
2.5. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi	9
2.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	10
2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	10
2.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	10
2.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	10
2.7. Komet Testi İle DNA Hasarının Belirlenmesi	10
3.1. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi.....	12
3.2. Enzim Aktivitelerin Değerlendirilmesi.....	12
3.3. Komet Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	14
ÖZGEÇMİŞ	28

**MAGNEZYUM OKSİT (MgO) VE NİKEL OKSİT (NiO)
NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN KAN DOKUSU ÜZERİNE İN VİTRO
TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ali KALELİ

**Yozgat Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

2020; Sayfa: 28

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek PANDIR

ÖZET

Nanoteknoloji çok hızlı bir şekilde gelişmekte olan araştırma alanlarının başında gelmektedir fakat nanopartiküllerin çevreye olan zararları tam olarak belirlenememiştir. Artan sanayi ve gelişen teknolojiye bağlı olarak nanopartiküllerin doğaya salınımı artmıştır. Bu çalışmada, artan dozlarda MgO ve NiO nanopartiküllerinin (NP) insan kan dokusu üzerindeki toksik etkisi *in vitro* koşullarda antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ve DNA yapısındaki değişimler ile belirlenmiştir. Çalışma için kan hücreleri kontrol grubu (n=6) ve uygulama grubu (n=6) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin kan dokusuna 1 saatlik uygulanmasından sonra eritrositler ve lökositler elde edilmiştir. Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ve MDA miktarı kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak spektroskopik yöntem ile belirlenmiştir. Lökositler, Biocoll ayırma çözeltisi kullanılarak izole edildikten sonra Komets yöntemi ile DNA hasarı ortaya konulmuştur. Artan dozlarda eritrositlere verilen MgO ve NiO NP'lerinin kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında, MDA seviyesini arttırdığı antioksidan enzim aktivitelerini önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir. Lökositlerin DNA hasarı için; DNA

kuyruk yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti uygulama ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MgO ve NiO NP'lerinin artan dozları, DNA hasar parametrelerini istatistiksel olarak arttırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, artan dozlarda MgO ve NiO NP'lerinin insan kan dokusu üzerindeki toksik etkileri *in vitro* koşullarda spektrofotometrik ve komet testi ile ortaya konulmuştur. Yüksek dozlarda çalışılan MgO ve NiO NP'lerinin kan hücrelerinin antioksidan enzim aktivitelerini bozduğu, hücrelerin MDA seviyesini arttırdığı, DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayla nanopartiküllerin toksik etkileriyle ilgili bir alt yapı oluşturulmaya çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: MgO, NiO, nanopartikül, komet, DNA hasarı



DETERMINATION OF IN VITRO TOXIC EFFECTS OF MAGNESIUM OXIDE (MgO) AND NICKEL OXIDE (NiO) NANOPARTICLES ON HUMAN BLOOD TISSUE

Ali KALELİ

**Yozgat Bozok University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2020; Page: 28

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Dilek PANDIR

ABSTRACT

Nanotechnology is one of the most rapidly developing research areas, but the environmental hazards of nanoparticles have not been fully identified. Due to increasing industry and developing technology, the release of nanoparticles to nature has increased. In this study, the toxic effect of increasing doses of MgO and NiO nanoparticles (NP) on human blood tissue was determined by *in vitro* antioxidant enzyme activities, malondialdehyde (MDA) level, the end product of lipid peroxidation, and changes in DNA structure. Blood cells were divided into two groups as control group (n = 6) and application group (n = 6). After administration of 10, 100 and 1000 µg/mL MgO and NiO NPs to the blood tissue, erythrocytes and leukocytes were obtained. Antioxidant defense system enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities and MDA were determined from hemolysate samples by spectroscopic method in comparison with control group. Leukocytes were isolated using Biocoll separation solution and DNA damage was revealed by Comet method. It was found that given increasing doses of MgO and NiO NPs were increased MDA levels and significantly decreased antioxidant enzyme levels in erythrocytes compared to control and application groups. DNA damage in leukocytes; when DNA tail percentage, tail length and tail moment were compared with application and control group, it was determined that DNA damage parameters increased in increasing doses of MgO and NiO NPs. As a result, toxic effects of increasing doses of MgO and NiO NPs on

human blood tissue were determined by spectrophotometric and comet tests *in vitro*. It was determined that MgO and NiO NPs, which were studied at high doses, impaired the antioxidant enzyme activities of the blood cells, increased the MDA level of the cells and caused DNA damage. In this study, a substructure related to toxic effects of nanoparticles has been tried to be established.

Key words: MgO, NiO, nanoparticle, comet, DNA damage



TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Dilek PANDIR'a, tüm çalıőmam boyunca maddi ve manevi yönden desteklerini esirgemeyen aileme teőekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez alıőması Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 6601-FBE/18-217). Maddi desteklerinden dolayı Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kan dokusunda kontrol ve uygulama gruplarında DNA hasarının (\pm SD) Kuyruk % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri.....	15
--	-----------



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1.** İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin MDA seviyesine etkisi.....**12**
- Şekil 3.2.** İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/MI MgO ve NiO NP'lerinin SOD enzim aktivitesine etkisi.....**13**
- Şekil 3.3.** İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin CAT enzim aktivitesine etkisi.....**13**
- Şekil 3.4.** İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin GPx enzim aktivitesine etkisi.....**14**
- Şekil 3.5.** Artan dozlarda MgO NP'lerinin insan kan lökositlerinin DNA yapısı üzerine toksik etkilerinin komet testi ile belirlenmesi.....**16**
- Şekil 3.6.** Artan dozlarda NiO NP'lerinin insan kan lökositlerinin DNA yapısı üzerine toksik etkilerinin komet testi ile belirlenmesi.....**17**

KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
MDA	: Malondialdehit
MgO	: Magnezyum oksit
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen Fosfat
NiO	: Nikel oksit
NP	: Nanopartikül
PBMC	: Periferik Kan Nükleer Hücreleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
PBS	: Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
NaCl	: Sodyum Klorür

1.GİRİŞ

Ekolojik dengeyi olumsuz yönde etkileyen faktörler; endüstriyel atıklar, deterjanlar, yapay tarımsal gübreler, pestisitler, inorganik tuzlar, radyoaktivite ve ağır metaller olarak bilinen maddelerdir. Bu maddeler doğaya büyük zararlar vermektedirler. Ağır metallerin çoğu sanayide kullanılmakta ve oluşan atık maddeler doğaya bırakılmaktadır. Son yıllarda endüstriyel gelişmeler su kaynaklarının, denizlerin ve toprağın ağır metaller tarafından kirlendiği, bu kirlenmenin de canlılar üzerinde olumsuz etki oluşturduğu ortaya konulmuştur. Su ve beslenme ile alınan bu ağır metaller canlıların vücudunda birikerek tüm yaşamsal faaliyetlere zarar verme ve değiştirme etkisine sahiptir. Ağır metallerin birçok karsinojen etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Bu karsinojenik metallerin aynı zamanda DNA hasarına sebep olduğu görülmüştür [1].

Ağır metaller, biyolojik yapılara katılma düzeyine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan ağır metaller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yaşamsal ağır metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinlerle birlikte alınması gereken zorunlu maddelerdir. Yaşamsal olmayanlar ise çok az miktarda olsalar bile biyolojik yapıyı bozarak hastalıklara sebep olmaktadır. Buna en güzel örnek enzimlere bağlanan civanın enzim yapısını bozarak biyolojik reaksiyonları inhibe etmesi verilebilir [2].

Ağır metallerin canlılara etkisi organizma türüne göre de değişmektedir. Örneğin nikel elementi hayvanlarda iz element iken bitkilerde toksik etki gösterebilmektedir. Bu etki, ağır metallerin konsantrasyonuna göre de artış gösterebilmektedir [3].

Dünya sağlık örgütü verilerine göre çeşitli türdeki hayvan ve bitkiler için önemli bir eser element olan nikelin eksikliğinde ne gibi belirtiler görüldüğüyle ilgili net bilgiler bulunmamaktadır. Nikelin biyolojik yarılanma süresi 17-53 saat olup nikelin vücuttan atılması idrar yolu ile olmaktadır. Ayrıca ter ve salya yolu ile de atılımı gerçekleşmektedir [4].

Havada bulunan nikel bileşiklerinin solunumuyla alınması ile ilgili olarak trake tahrişi, immünolojik değişim, alveollerde makrofaj artışı, immunité baskısında azalma gibi belirtiler meydana gelebilmektedir [5]. Tütün ürünleri kullanıldığı zaman günlük alınan nikel miktarının üzerinde nikelin akciğerden emilimi gerçekleşmektedir [6].

Deri ile vücuda alınması sonucu deride alerjik reaksiyonlar görülebilmektedir. Yapılan çalışmalarda kanser hastalarında serum nikel artışı gözlenmiştir. Emilen nikel ilk olarak kana geçer. İnsan vücut sıvılarında kanda, idrarda, dokularda, böbrekte, akciğerde çeşitli miktarlarda nikel birikimi görülmektedir. Çeşitli hastalıklar ve stres durumunda biriken nikel metabolizmayı etkilemektedir [6].

Canlıları etkileyen önemli metallere biri olan hafifliğiyle dikkat çeken magnezyum ise vücudumuz için önemli minerallerden biridir. 1840 yılında İtalya'da Vesivius bölgesinde bir demir oksit minarelinde tespit edilmiştir. Canlılarda yapılan çeşitli araştırmalarda ise magnezyumun kan plazmasındaki yoğunluğu yüksek oranda kalsiyum, fosfat, sodyum ve potasyum ile ilişkili olduğu görülmüştür. Plazmada bulunan magnezyumun büyük çoğunluğu serbest ve difüze kompleks biçiminde geri kalan bölümü ise proteinlere bağlı yapıdadır [7].

Köpek serebral kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada, düşük hücre dışı serbest kalsiyum artışına ve bununla ilişkili olarak önlenemez hasara neden olmaktadır [8]. magnezyum kan pıhtılaşma fonksiyonunu da etkilemektedir [9, 10]. magnezyum eksikliği; oksidatif strese, yaşlanmaya ve yaşlanmaya bağlı patojenik faktörlere sebep olduğu saptanmıştır [11].

magnezyum kasların gevşemesinde ve sinir sisteminde etkili olduğu için anti-stres minerali olarak kabul edilir. Bu nedenle, C vitamini, kalsiyum, fosfor, sodyum ve potasyumun vücutta daha etkili olması için gereklidir. Damarların esnekliğini ve genişliğini artırarak kan basıncını azaltır bununla birlikte kalp krizini önleyici etki gösterebilmektedir.

Nanoteknoloji, günümüzde hızlı gelişen bilim dalı olarak dikkat çekmektedir. Nanopartiküller, farklı morfolojik özelliklere sahip çubuk, küp prizma, iğne şeklinde olan yaklaşık 1-100 nm boyuntunda kolloidal yapılardır. Yapısal özelliklerinin yanında hem ekonomik hem de az atık oluşturduklarından dolayı, kişisel ihtiyaçlarımızdan, uzun ömürlü tüketim malzemelerine kadar birçok üründe kullanılmaktadır [12].

Nanopartiküller, sergiledikleri eşsiz özelliklerden ve ihtiyaca göre değiştirilebilen atom dizilimlerinden dolayı hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan kullanılmaya son derece elverişli maddeler olup günümüz üretim teknolojilerinin doğal bir parçası

olmuştur [13]. Partiküllerin, nano boyuttaki sergiledikleri fiziksel ve kimyasal özellikleri, büyük boyutlardaki özelliklerinden farklıdır. Bu durum, nano boyutlu partiküllerin makro boyutlu partiküller ile aynı atomlardan oluşmalarına karşın, farklı oluşum geometrisine sahip oluşlarından ileri gelmektedir [14].

Nanopartiküller sahip olduğu özelliklerden dolayı biyoteknoloji ve tıp alanında kanser teşhis ve tedavisinde, gen tedavisinde, hedefli ilaç salımında, biyosensör üretiminde, kozmetik ürünlerinde, çevre ve enerji alanında, ulaşım, gıda güvenliğinde etkin olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller, tıp alanında hastalıkların teşhisini kolaylaştıran yapıya sahip olmasından dolayı biyopsi ve cerrahi müdahaleler gibi tanı yöntemlerinde daha basit düzeyde uygulama olanağı sağlamaktadır. Hastalıkların erken tanısı ve teşhisinde görüntüleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Diğer bir özellikleri ise mikropartiküllere göre yüzey alanı/hacim oranının çok yüksek olmasından dolayı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda daha fazla tercih edilir hale gelmiştir [15].

Metal nanopartiküller tüketim ürünlerinde, endüstriyel ürünlerde özellikle tıp alanında kolay sentezlenebilmelerinden dolayı büyük ölçüde kullanılmaktadır [16]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkisi ortaya konulmuştur. Birçok çalışmada, nanopartikül konsantrasyonu artışına bağlı olarak DNA hasarı artışı da tespit edilmiştir [16-18]. Hallock ve ark. (2009) tarafından yapılan bir derlemede de nanopartiküllerden kaynaklanan toksik etkilerin, nanopartikülün temel materyaline, yani hangi atomlardan oluştuğuna, nanopartikülün büyüklüğüne, herhangi bir kaplama malzemesiyle kaplanıp kaplanmadığına bağlı olduğu belirtilmiştir [19]. Küçük boyutlu yapıları nedeniyle hücreye ve çekirdeğe girebilen metal nanopartiküller serbest radikal oluşumuna ve DNA'ya bağlanarak genetik hasara neden olduğu belirlenmiştir [16, 20-22].

Magnezyum oksit, optik, elektronik, besin sanayisinde, ilaç yapımında en fazla kullanılan kimyasal bileşiktir [23]. Büyük yüzey alanı sayesinde toksik kimyasalların uzaklaştırılmasında adsorban olarak faydalanılmaktadır. Magnezyum oksit nanopartikülleri kimyasal savaş ajanlarının giderilmesinde, atık su işlemede, toksik atıkların giderilmesinde, katalizör ve kataliz destekleyici olarak kullanılmaktadır [24].

Ayrıca metal oksitlerde bulunan reaktif nanokristaller toksinlerde yok edici adsorbans olarak çok etkilidir. Bu reaktifler hava ve suyun arındırılmasında kimyasal savaş ajanlarının etkisiz hale getirilmesi gibi birçok sistemde kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta toksinlerin yakılmasında da avantaj sağlamaktadır [25].

Koper ve ark. (2002) hava kirliliğine neden olan biyolojik ve kimyasal etmenlerin etkisiz hale getirilmesinde metal oksit nanopartüküllerinin aktivitesini araştırmışlardır [26]. Magnezyum nanokristali, kalsiyum oksit ve çinko oksitten daha etkili bir biçimde hidrojen adsorpsiyonunu gerçekleştirdiği görülmüş ve bu sistem ekonomik olarak uygulanmaya geçirilmiştir [27].

Stark ve ark. (1996) çeşitli metal oksitlerle yaptıkları deneylerde sentezledikleri MgO nanokristalinin elde edilen bulgularda kimyasal ve fiziksel adsorpsiyonu etkili bir şekilde gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir [28].

Ham madde olarak nikel alaşımların üretiminde kullanılan nikel çoğunlukla nikel oksit olarak kullanılmakta olup, non-sitokiyometrik olduğunda siyah renkli bir bileşik, sitokiyometrik özellikte olduğu zaman ise yeşil renklidir. Nikel oksit; metal sektöründe, seramikte frit porselen sırlamada ve alaşımlı çelik üretiminde kullanılmaktadır. Nikel metali normal şartlar altında hava ile reaksiyona girmez. Nikel ve oksijen yüksek sıcaklıklarda reaksiyona girerek nikel (II) oksiti meydana getirir [29].

1.1. Antioksidanlar

Canlılarda meydana gelen patolojik durumlarda ve tümör oluşumunda meydana gelen serbest radikaller ile bunları etkisiz hale getiren antioksidanlar arasında bir denge vardır. Bu dengenin serbest radikaller lehine değişmesi oksidatif stresi meydana getirir [30]. Serbest radikaller, hücrelerde oksijenin eksik indirgenmesi sonucu oluşan, DNA'da bulunan nükleik asit ve bazların değişimine, DNA'da kırıkların meydana gelmesine, kanser oluşumuna, hücre yaşlanmasına ve ölümüne sebep olan maddelerdir [31].

Antioksidanlar hücredeki serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirerek hücrelerin zarar görmesini engelleyen kimyasal maddelerdir [32]. Antioksidanların, serbest radikalleri etkileyerek tümör oluşumunu, yaşlanmayı, toksik ajanların sebep olduğu doku hasarına karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir [33, 34].

Hücrelerde oksidatif hasarı engelleyen antioksidanlar endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki çeşittir [35].

1.1.1. Eksojen Antioksidanlar

Trolox-c, folik asit, anestezikler, mannitol, barbitüratlar, demir şelatörleri, bütillenmiş hidroksi toluen bazılarıdır.

1.1.2. Endojen Antioksidanlar

Enzim yapısında olan antioksidanlar; Süperoksitdismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon-S-Transferazlar (GST), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz endojen antioksidanlar içinde yer almaktadır.

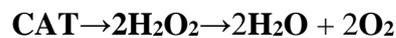
Enzim olmayan endojen antioksidanlar içersinde; melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin yer almaktadır.

Antioksidan enzimlerden en önemlisi süperoksit dismutaz (SOD) ilk defa oksijenli solunum yapan canlılarda tespit edilmiştir. Bu enzim süperoksitin, hidrojen peroksit'e dönüşümünü sağlar. Hidrojen peroksitte daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi ile etkisiz hale gelmesi sağlanır. Aynı zamanda hücre bölünmesi sırasında süperoksit düzeyinin kontrolünü sağlamada rol almaktadır [36].



CAT ise enzim kararlılığını sağlayan önemli bir hemoproteindir. Bu enzim sitokrom içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde bulunmaktadır. Hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene ayıran önemli bir enzimdir. Karaciğerde, miyokard, çizgili kaslarda ve eritrositlerde enzim aktivitesi yüksektir. CAT, peroksizomlarda bulunduğu gibi endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğun olarak bulunmaktadır [37].

Yapılan deneylerde oksidatif strese karşı önemli bir görev aldığı görülmüştür. Hücrelerin oksidanlara ve ilaçlara karşı duyarlılığının artırılması hücredeki CAT'a bağlı olduğu saptanmıştır [38].



GPx enzimi ise antioksidanların en etkin olanıdır. Hücrede oluşan hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılmasında etkin antioksidan enzimdir. Alt birimleri selenyum içerdiğinden hücre hasarına karşı koruyan önemli bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir [39].

Bu enzim ilk defa memeli eritrositlerinde tespit edilmiştir. Özellikle akciğerde ve memeli eritrositlerinde etkili bir enzimdir [39].

GPx, hücre yapısını, fonksiyonunu ve lipitleri peroksidasyondan koruyan önemli bir enzimdir [40].

GPx, lipit peroksidasyonu ile oluşan hidroperoksitleri parçalayıp radikal oluşumunu ve oksidasyonunu durdurmakta ve kandaki eritrositleri hemoglobin oksidasyonuna karşı savunmaktadır. Bununla birlikte yüksek oranda hidrojen peroksit varlığında glutatyonun okside glutatyona oksidasyonunu sağlar ayrıca hidrojen peroksitte suya dönüştürülüp detoksifiye olması sağlanır [41].

1.2. Komet Testi

DNA hasarının düzeyini ölçmede en çok kullanılan metotlardan biri komettir. Bu yöntem alkali ortamda farklı molekül ağırlığına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerin elektriksel alanda farklı şekillerde göçüne dayanır [42].

Hasarsız DNA'lar elektroforez de yürütölmelerinde kuyruk oluşumu gözlenmez fakat hasarlı DNA'lar farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alan farklı hızda hareket ederek kuyruk şeklinde bir yapı oluştururlar [43-45].

Komet testi *in vitro* ve *in vivo* antioksidan çalışmalarda çoğunlukla tercih edilen bir yöntemdir. Bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar DNA'nın oksidatif hasarını önlediği belirlenmiştir [46]. Genotoksik etkisi tam olarak tespit edilememiş bazı deney kimyasallarının toksik etkisi bu yöntemle belirlenmektedir. Komet testin önemli avantajlarından biri çok az bir hücre örneğiyle DNA kırıklarının tespit edilmesidir. Kısa sürede yapılabilmesi ve kullanılan kimyasalların ucuz olması açısından da önemli avantajlar sunar [47].

DNA'sı zarar görmüş hücreler bölündüğünde mutant hücreler oluştururlar. Kimyasalların bazıları DNA alt birimleri ile bağlanıp özel bileşik oluşumuna neden

olabilirler. Bu bileşikler DNA tamir mekanizması aracılığıyla uzaklaştırılabilirler. Bazı bileşikler ise kalıcı olarak DNA'ya bağlanır ve hücre bölündüğünde yanlış translokasyonla mutant hücre oluşumuna sebep olabilirler. İnsanlarda kanserojen etkiye sahip metal bileşikler Uluslar Arası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından riskleri belirlenmiştir. Kansere neden olaylar ile somatik hücrelerde mutasyona neden olan olaylar arasında bağ olduğu bilinmektedir. Karsinojen olan maddelerin birçoğunun mutajen, mutajen olan maddelerinde birçoğunun da kanserojen etki gösterdiği tespit edilmiştir [48, 49].

Bu çalışmada; 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin insan eritrositlerinde ve lökositlerinde sebep olabileceği sitotoksik etkileri spektrofotometre ve floresan mikroskobu ile araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında MgO ve NiO NP'lerinin uygulanması sonucunda insan kan hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının belirlenmesi, antioksidan enzim sistemlerinde (SOD, CAT ve GPx) ve MDA'da meydana gelen değişikliklerin ortaya konulması hem insan sağlığı açısından hem de bu konuda bundan sonraki yapılacak çalışmalara katkı sunması bakımından oldukça önem taşımaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

MgO ve NiO NP'leri Sigma-Aldrich (Germany)'ten temin edilmiş olup komet testi ve biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddeler Merck'ten temin edilmiştir.

2.2. Eritrositlerin Hazırlanması

Bu çalışmada sigara ve alkol kullanmayan, çalıştığı ortamda da herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmayan, sağlıklı altı bireyden heparinli tüplere 10 ml kan örneği alınmıştır. Çalışma için gerekli izinler YBÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun (18. toplantı sayısı ve 2017-KAEK-189-2019.09.25-09 nolu kararı ile) onayı ile çalışmalar yapılmıştır.

Heparinleşmiş olan tam kan 3000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Lökositler ve plazma uzaklaştırılmış, eritrositler fizyolojik tuz çözeltisi (% 0.9'luk NaCl) ile 3 defa yıkanıp sonra aynı çözelti ile %50 (v/v) oranda hücre süspansiyonları PBS ile hazırlanmıştır.

2.3. Eritrositlere Uygulama

Eritrositler uygulama grubu (n=6) ve kontrol grubu (n=6) olarak iki gruba ayrılmıştır.

Uygulama grubu da kendi içerisinde dört gruba ayrılmıştır ve kimyasallarda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bunlar;

1.Grup: 10 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin uygulandığı grup (n=6),

2.Grup: 100 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin uygulandığı grup (n=6),

3.Grup: 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin uygulandığı grup (n=6),

Maddeler eritrositlere eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Eritrositler çalışma saatine kadar -20 °C'de bekletilip soğuk deiyonize su ile dört kat sulandırılarak hemolizati elde edilmiştir.

Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri, malondialdehit (MDA) miktarı, kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak spektroskopik (Shimadzu 1800, UV/VIS Spektrofotometre, Kyoto, Japan) yöntemi ile belirlenmiştir.

2.4. İnsan Lökositlerinin İzolasyonu ve Uygulama Grupları

Sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı altı gönüllü erkek bireyden alınan (yaşları 25–30) periferik kanlar, heparinli tüplere testin yapılmasından önce alınmıştır. Lökositler, Biocoll (Source BioScience, Nottingham, U.K.) ayırma çözeltisi ile izole edilmiştir [50]. Hücrelerin canlılığı, Pool-Zobel ve ark. (1992) tripan mavisi boyama tekniğiyle belirlenmiştir [51]. Hücre canlılığı yaklaşık olarak % 98 olarak tespit edilmiştir.

Lökositler, aşağıda verilen şekliyle kontrol ve deney grupları olarak gruplandırıldı:

- Kontrol grubu; lökosit hemolizati 50 µl, PBS 1.050 µl
- MgO ve NiO NP'lü uygulama grubu; lökosit hemolizati 50 µl, MgO ve NiO NP (10, 100, 1000 µg/mL) ve PBS 1.000 µl.

2.5. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

MDA, TBA ile aerobik şartlarda 90°C'de inkübasyon sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrede bu kompleksin absorbansı 532 nm dalga boyunda okunur. Ohkawa ve ark. (1979) göre hesaplamalar ve analizler yapılmıştır [52]. Deney tüplerine, % 15'lik TCA içinde % 0.375'lik hazırlanmış olan TBA dan 2 ml alınmış ve 1 ml homojenat (300µL + 700µL distile su) üzerine konulmuştur. Vortekslelendikten sonra, tüpün ağzı kapatılıp 30 dakika boyunca 95 °C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan sonra tüpler, buz içerisine konulmuş ve 15 dakika bekletildikten sonra, buz içerisinden çıkartılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. 10 dakika, 4000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiş ve kör tüpüne karşı spektrofotometrede 532 nm'de absorbansları okunmuştur. Sabit sayı, $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, kullanılarak lipid peroksidasyonun ürünü olan MDA miktarı hesaplanmıştır.

2.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivite tayini için Marklund ve Marklund'un metodu kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini için 1000 rpm'de, 4 °C'de, 10 dk süpernatantlar santrifüj edilmiştir. İlk olarak içinde Tris-EDTA tamponu bulunan küvetlere farklı hacimlerde süpernatant eklenmiş ve üzerine enzim kaynağı ilave edilmiştir. Daha sonra bu elde edilen karışımlara pyrogallol eklenmiş ve 440 nm spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucunda kan hücreleri için U/mg Hb olarak aktivite olarak belirlenmiştir [53].

2.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivite, Aebi yöntemi ile tayin edilmiştir. Katalaz enzim aktivitesinin tayini için süpernatantlar 4°C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. İlk olarak CAT'ı peroksizomlardan açığa çıkarmak için süpernatant üzerine Triton X-100 eklenmiştir. Daha sonrada H₂O₂ eklenerek ve 240 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Yapılan hesaplamalardan sonra ise enzim aktivitesi kan hücreleri için U/mg Hb birimiyle verilmiştir [54].

2.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GPx enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için Paglia ve Valentine'nin metodu uygulanmıştır. 20 dakika boyunca süpernatantlar 4 °C'de 16.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu metot, 340 nm'de GR'nin nikotinamid-adenin-dinükleotid hidrojen fosfat'ı (NADPH) oksitlemesi sonucu oluşan absorbans ölçülme prensibine dayanmaktadır. NADPH'in Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına neden olur. GPx aktivitesinin tayininde de dolaylı olarak kullanılmıştır. Elde edilen bu karışımın üzerine H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatılıp 3 dakika boyunca 340 nm'de oluşan absorbans değerleri okunmuştur. Enzim aktivite sonuçları kan hücreleri için U/mg Hb olarak verilmiştir [55].

2.7. Komet Testi İle DNA Hasarının Belirlenmesi

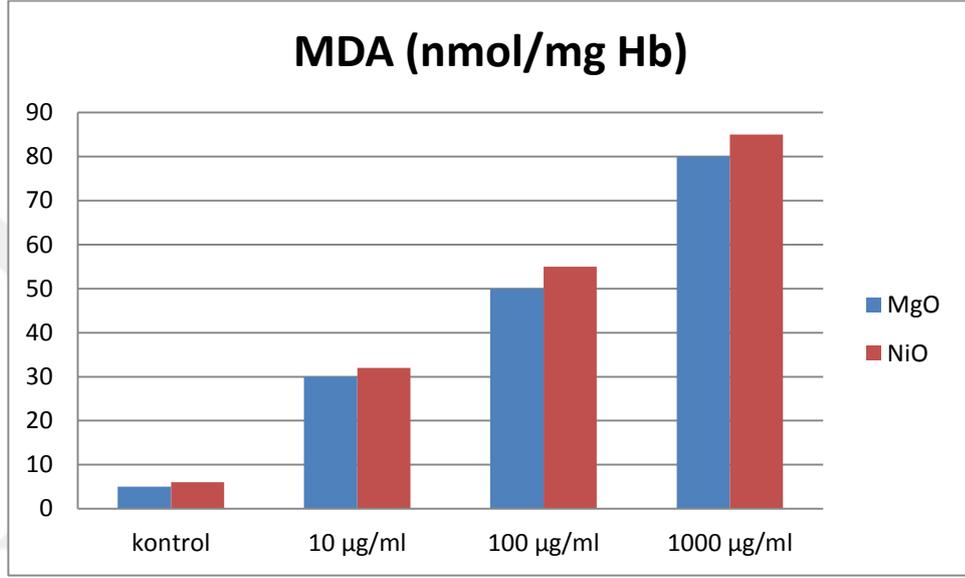
%1'lik yüksek erime noktasına sahip agar mikrodalga fırın içerisinde ısıtılarak sıvı hale getirilmiştir. Sıvı agara batırılmış rodajlı lamalar, oda sıcaklığında bir gün

kurumaya bırakılmıştır. Heparinli, vakumlu ve steril tüplere alınan kan numunesinden; içinde 1000 µL RPMI-1640 besiyeri bulunan ependrof tüpler içerisine 15 µL eklenmiştir. 2000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek elde edilen pellet üzerine % 0.65'lik agarozdan 80 µL eklenerek pipetleme yapılmıştır. Elde edilen bu karışımdan 75 µL alınarak bir gün önceden hazırlanmış olan lamalar üzerine dökülüp ve üzeri kapatılarak 30 dakika +4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Preparatlar 90 dakika çözündürme solüsyonunda bekletilmiş daha sonra 40 dakika dilue elektroforez içerisine bırakılmış ve 200 Volt'ta 4 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminin bitmesi ile 5'er dakika 3 kez dH₂O'da bekletilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar üzerine 80 µL etidyum bromür eklenerek mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi

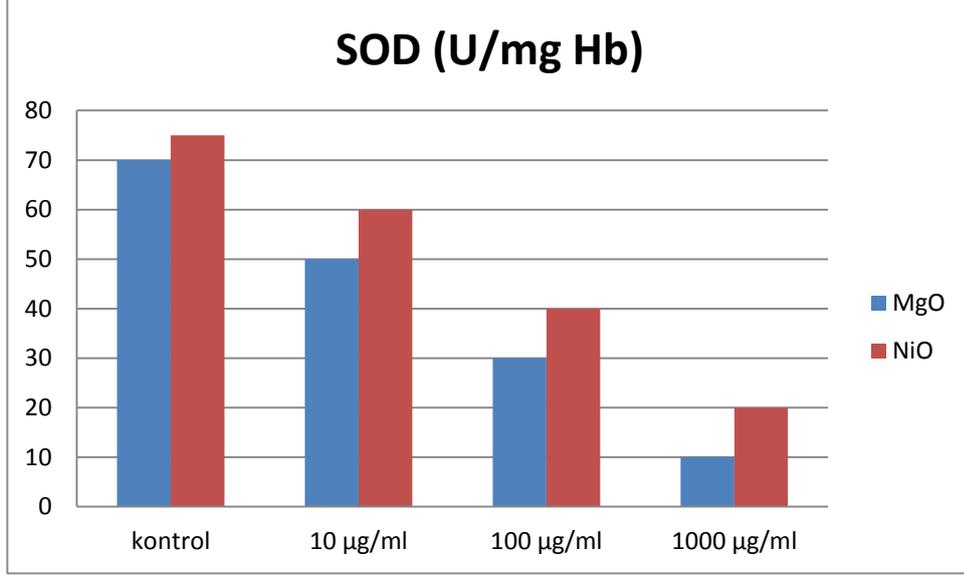
İnsan kan dokusuna *in vitro* koşullarda 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'leri verilmiş olup eritrositlerin MDA düzeyleri spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1'de verilmiştir. Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında MDA miktarındaki artış anlamlı bulunmuştur.



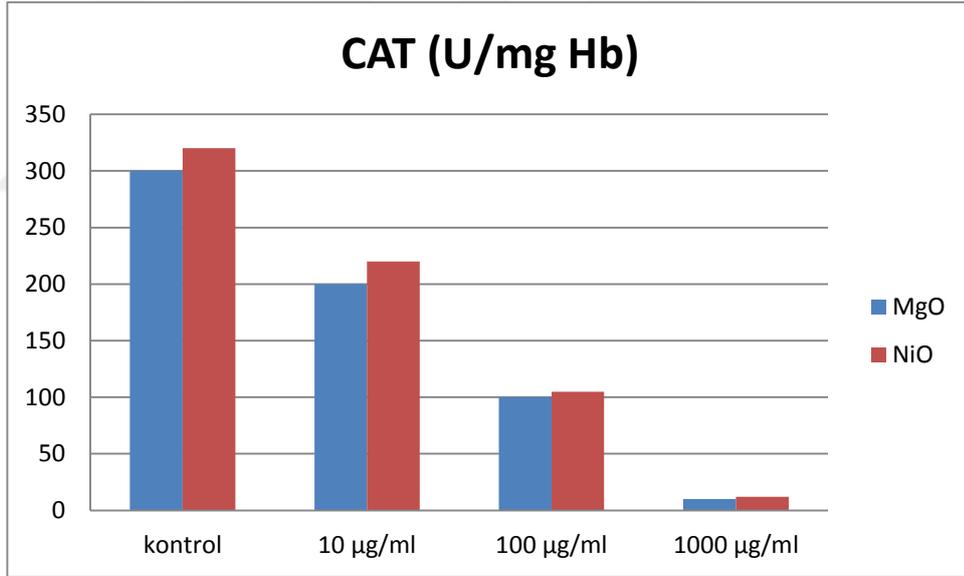
Şekil 3.1. İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin MDA seviyesine etkisi.

3.2. Enzim Aktivitelerin Değerlendirilmesi

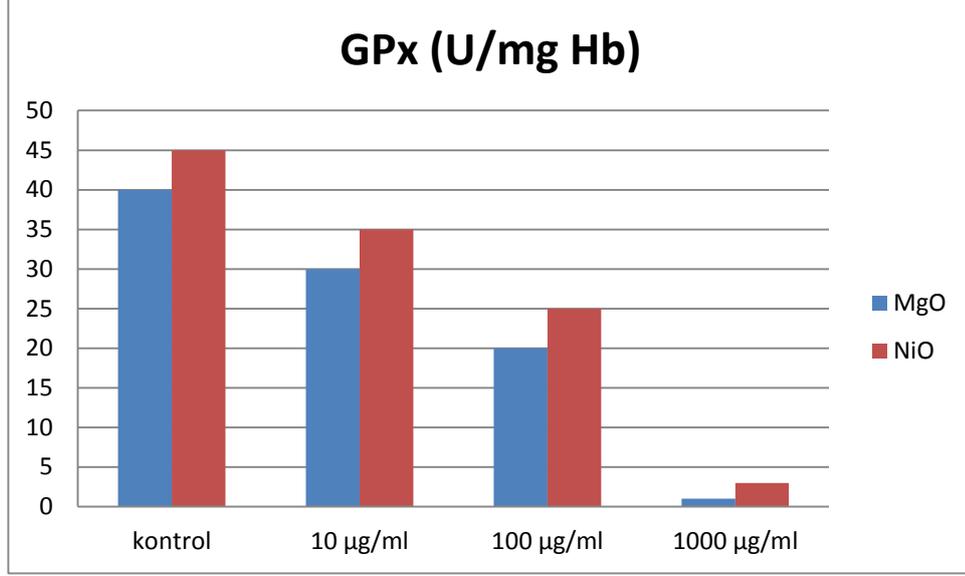
İnsan kan dokusuna *in vitro* koşullarda 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'leri verilmiş olup eritrositlerin SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2-3.4'de verilmiştir. Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalma anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.2. İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin SOD enzim aktivitesine etkisi.



Şekil 3.3. İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin CAT enzim aktivitesine etkisi.



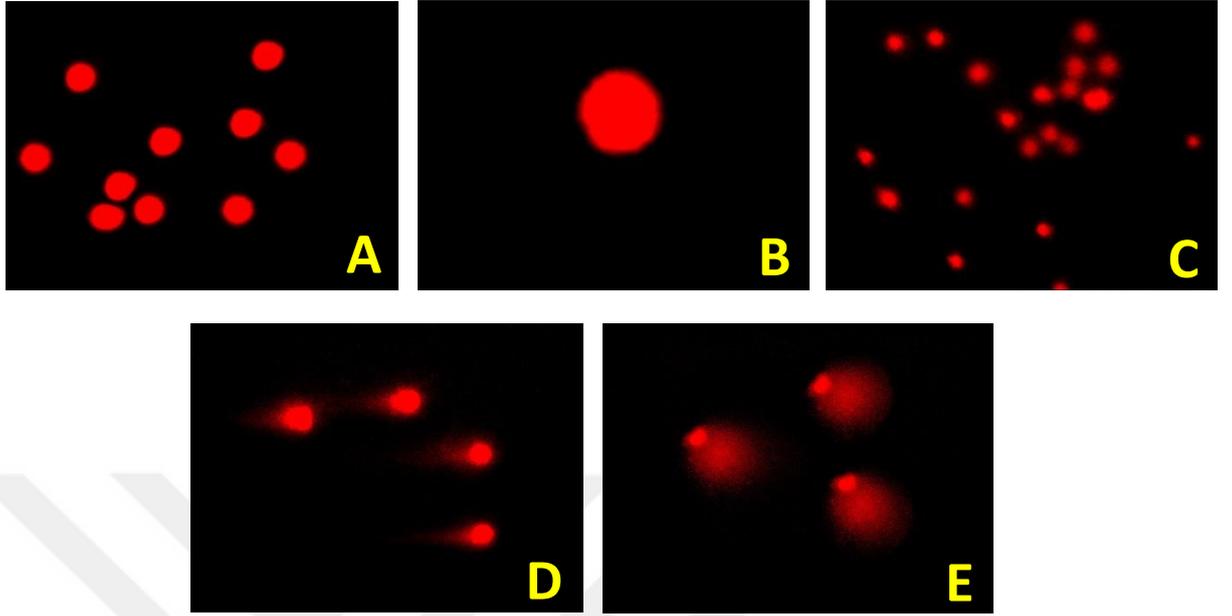
Şekil 3.4. İnsan eritrositlerine uygulanan 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'lerinin GPx enzim aktivitesine etkisi.

3.3. Komet Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

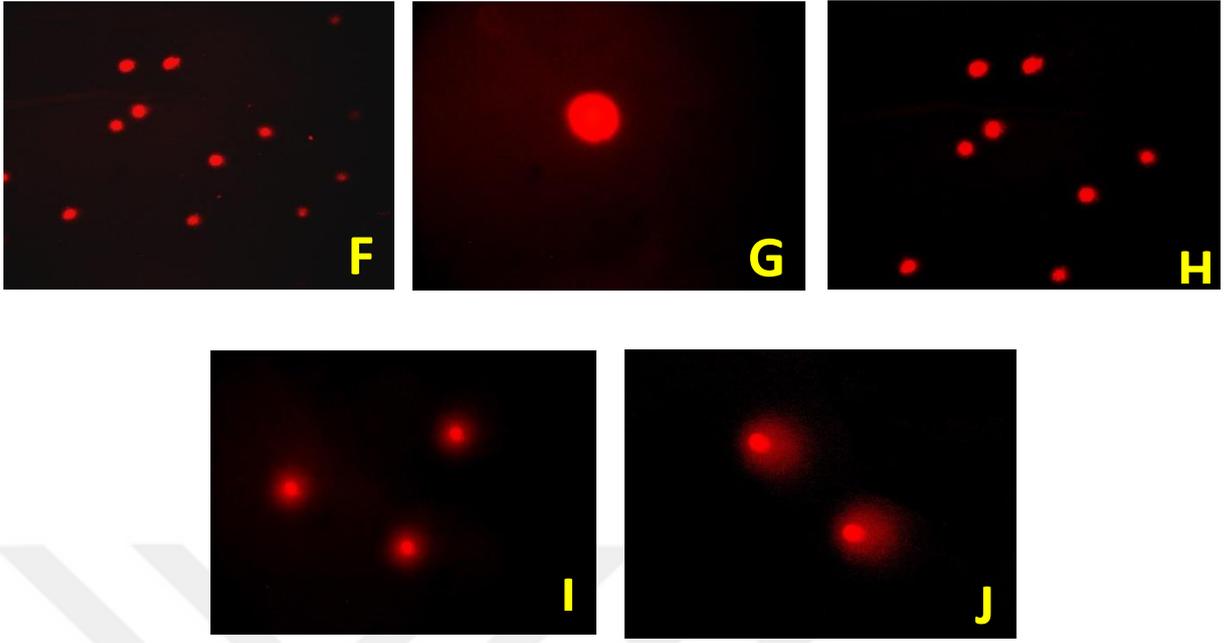
Komet testi insan kan hücrelerinden lökositlere ait DNA yapısında görülen değişimleri belirlemek için DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yüzdesi ve kuyruk momenti parametrelerini içermektedir. Lökositlere *in vitro* koşullarda 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'leri verilmiş olup lökositlerin floresan mikroskopta DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yüzdesi ve kuyruk momenti ölçülerek Tablo 3.1.'de ve Şekil 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında DNA kuyruk yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti anlamlı olarak artmıştır.

Tablo 3.1. Kan dokusunda kontrol ve uygulama gruplarında DNA hasarının (\pm SD) Kuyruk % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri

Komet Parametreleri	Kuyruk DNA%	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk momenti
Gruplar	Ortalama\pmSD	Ortalama\pmSD	Ortalama\pmSD
MgO NP			
Kontrol	21.58 \pm 1.87 ^a	14 \pm 0.25 ^a	3.02 \pm 0.04 ^a
10 μ g/mL	44.82 \pm 3.12 ^b	31 \pm 0.12 ^b	13.89 \pm 0.03 ^b
100 μ g/mL	75.80 \pm 7.25 ^c	97.41 \pm 12.35 ^c	73.83 \pm 0.89 ^c
1000 μ g/mL	90.78 \pm 12.25 ^d	125 \pm 19.42 ^d	113.47 \pm 2.37 ^d
NiO NP			
Kontrol	14.52 \pm 0.66 ^a	6.54 \pm 0.87 ^a	0.94 \pm 0.05 ^a
10 μ g/mL	36.40 \pm 1.55 ^b	26.03 \pm 2.45 ^b	9.47 \pm 0.03 ^b
100 μ g/mL	63.90 \pm 4.85 ^c	81.06 \pm 5.40 ^c	51.79 \pm 0.26 ^c
1000 μ g/mL	99.86 \pm 12.20 ^d	131.42 \pm 24.21 ^d	131.23 \pm 2.95 ^d



Şekil 3.5. Artan dozlarda MgO NP'lerinin insan kan lökositlerinin DNA yapısı üzerine toksik etkilerinin komet testi ile belirlenmesi. (A-B) Kontrol grup; (C) 10 µg/mL MgO NP uygulanan grup; (D) 100 µg/mL MgO NP uygulanan grup; (E) 1000 µg/mL MgO NP uygulanan grup.



Şekil 3.6. Artan dozlarda NiO NP'lerinin insan kan lökositlerinin DNA yapısı üzerine toksik etkilerinin komet testi ile belirlenmesi. (F-G) Kontrol grup; (H) 10 µg/mL NiO NP uygulanan grup; (I) 100 µg/MI NiO NP uygulanan grup; (J) 1000 µg/mL NiO NP uygulanan grup.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nanopartiküller insan kan hücrelerini farklı şekillerde etkileyebilmektedir. En yaygın olarak görülen etki hemoliz (eritrosit membranının yırtılması) ve serbest radikallerin oluşmasıdır. Ayrıca eritroz veya eritrosit apoptozisine de yol açabilmektedirler [56]. İnsan ve hayvan eritrositlerini etkileyen diğer etkiler arasında morfolojik değişimler, oksidatif stresin indüklenmesi ve enzimatik aktivitelerin değiştirilmesi sayılabilir. Bu çalışmada, insan kan dokusuna *in vitro* koşullarda 10, 100 ve 1000 µg/mL MgO ve NiO NP'leri verilmiş olup eritrositlerin antioksidan enzim aktiviteleri, MDA düzeyleri ve lökositlerin DNA yapısına etkileri kontrol ve uygulama grupları karşılaştırılarak istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

Nanopartiküller, insan vücuduna girdikten sonra savunma sistemi bu nanoparçacıkların çoğunu yabancı ajanlar olarak kabul etmekte olup, bazı durumlarda bir immün veya enflamatuar yanıtı aktive edebilmektedirler. Periferik kan nükleer hücreleri (PBMC'ler) içinde % 70-90 oranında yuvarlak çekirdekli lenfositler ve % 10-30 oranında monositler periferik kandan kolayca çıkan bağışıklık sisteminin önemli hücreleridirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarla PBMC'lerin özellikle lenfositlerin NP sitotoksitesisi durumunda bağışıklık sisteminin farklı NP'lerin varlığına nasıl tepki gösterdiği belirlenmiştir [57].

Gerçekleştirilen çalışmalarda nanopartiküllerin bazılarının toksik özellikte olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin Gubbins ve ark. (2011) gümüş nanopartiküllerinin (Ag NP) çok az dozlarda dahi toksik etkisinin olduğunu ve çevremiz için potansiyel risk oluşturabileceğini ortaya koymuştur [58].

Pinherio ve ark. (2013) gerçekleştirdiği bir çalışmada ise titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO₂ NP) su mercimeği (*Lemna minör*) ve su piresideki (*Daphnia magna*) olası etkilerini araştırmışlar ve sonucunda TiO₂ NP'ye maruz kalan bu organizmaların populasyon düzeyini ve fizyolojisini değiştirerek sucul ekosistemde risk oluşturabileceği ifade edilmiştir [59].

Başka bir nanopartikülle yapılan çalışmada Juhel ve ark. (2011) tarafından *L. minor* üzerinde gerçekleştirilen çalışmada farklı neticeler ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında Alüminyum nanopartiküllerinin (Al NP) *L. minor*'daki biyokütle birikimini büyük oranda arttırdığını bulmuşlardır [60].

Martinez-Rodriguez ve ark. (2019) NP toksisitelerini değerlendirmek için farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 200 µg/mL) nikel ve çinko NP'leri ile *in vitro* çalışmalar yapmışlardır. NP'lerin toksisitesi, insanlarda kırmızı kan hücre hemolizini, toplam hücre protein içeriği, katalaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitesini test ederek değerlendirilmişlerdir. Sonuç olarak nikel-çinko NP'lerinin hemolize yol açtığını ve bu NP'lerinin glutatyon-S-transferaz aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinde canlılık testlerinde farklı NP'lerle yapılan *in vitro* çalışmalarda canlılık gözlemlenmemiştir [61].

Yapılan başka bir çalışmada, Ran ve ark. (2015) eritrositlerin intihar ölümünün yeni bir prediktif ve prognostik parametre olarak kullanımı ve Fe₃O₄-NP'lerin dolaşımdaki hücresel membran yapısı ve kanın reoloji özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, her ne kadar histopatoloji, hematoloji ve serum biyokimya endekslerinde *in vivo* olarak kayda değer bir değişiklik gözlenmese de, Fe₃O₄-NP'ler, eritrosit deformasyon indeksi, eritrosit sertliği indeksi, kırmızı kan hücresi biriktirme indeksi dahil olmak üzere hemoreoloji endekslerini önemli ölçüde etkilemiştir. Oksidatif stresin neden olduğu kalsiyum akışı, Fe₃O₄-MNP'lerin eritrositlerin enzim aktivitesinde kritik bir rol oynamıştır. Fe₃O₄-MNP'lerin eritrositlere ve kanın akış özelliklerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir [62].

Song ve ark. (2009) semptomatik bulgular ile hastaneye başvuran bir grup işçinin, nanopartikül maruziyeti ile ilişkisini incelemişlerdir. Yedi kadın işçi (18-47 yaş), 5-13 ay boyunca nanopartiküllere maruz kalmış, hepsi nefes darlığı ve plevral efüzyon belirtileri göstermiştir. İmmünolojik testler, bakteriyoloji, viroloji ve tümör belirteçleri, bronkoskopi, internal torakoskopi ve video yardımcı torasik cerrahi incelemeleri yapılmıştır. Hastaların akciğer dokusunun patolojik incelemesinde spesifik olmayan pulmoner inflamasyon, pulmoner fibroz ve plevranın yabancı cisim granülomları belirlenmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak, nanopartiküllerin, sitoplazmada ve pulmoner epitel ve mezotel hücrelerinin karyoplazmasında yer aldığı, ancak göğüs sıvısında da bulunduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile koruyucu önlemler alınmadan bazı nanopartiküllere uzun süre maruz kalmanın, insan akciğerlerinde ciddi hasar ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir [63].

NP'ler hücre içine girebilmek için birçok yolu kullanırlar ve bunlardan başlıcaları endositoz ya da kohezyondur. Hücre içine girdiklerinde toksik etki göstermeye başlarlar. NP'lerin hücrede verdiği zararların mekanizması tam olarak bilinmemekte olup hücre zarının oksidasyonu, parçalanması, hücredeki enerji üretiminin azalması, reaktif oksijen yapılarının çoğalması, zararlı maddelerin salınması başlıca etkileridir [5-7, 64]. Hücre zar yapısında görülen en büyük toksik etki zar proteinlerinin ve lipidlerin oksidasyonudur. Bu oksidasyonda lipid peroksidasyonu bilimsel çalışmalarda önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. MDA miktarı toksik maddenin hücreye verdiği hasarın belirteci olarak kullanılmaktadır [65]. Bu çalışmada, MgO ve NiO NP'leri artan dozlarda kullanılmış ve eritrositlerde MDA miktarı belirlenmiştir. NP'lerin uygulama dozları arttıkça eritrositlerin MDA miktarlarında istatistiksel olarak artış görülmüştür.

Oksidatif hasarı oluşturan kimyasallara karşı aktif hale geçen en yaygın antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx'tir [66]. Bu enzimler, hücresel savunma sisteminin ilk hattını oluşturmakta olup çeşitli nedenlerle aktiviteleri hücre içinde artıp azalabilmektedir. SOD, süperoksit radikale karşı bir enzimdir ve dismutasyonu sağlayarak CAT tarafından kullanılacak olan H₂O₂'ye katalize eder [67]. Bu nedenle, SOD ve CAT oksidatif stres ve toksisiteyi belirlemek için deneysel çalışmalarda oldukça çok kullanılan parametrelerdir. Bu çalışmada, MgO ve NiO NP'lerin SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerine olası etkileri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Hücre içindeki antioksidan enzim aktiviteleri NP'lerin miktarı arttıkça enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Bu azalma, kontrol ve uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup en yüksek dozun verildiği grupta MgO ve NiO'in enzimlerin yapısını bozarak aktivitelerini düşürmektedirler.

Komet yöntemi son yıllarda, radyasyon ve çevresel toksinler gibi ajanların neden olduğu DNA hasarına ilişkin araştırmalarda kullanılmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, *in vitro* koşullarda insan kan hücrelerinin MgO ve NiO NP'lerine karşı maruz kaldığı genotoksik etki komet yöntemiyle belirlenmiştir. Bu hızlı ve hassas yöntemde, hasarlı bir hücre, baş ve kuyruk bölgelerinden oluşarak kuyruklu yıldızın şeklini alır. Kuyruk uzunluğu ve yoğunluğu, DNA'daki tek veya çift ipliklerin bozulma oranlarına göre değişimler göstermektedir. Aynı zamanda, kuyruktaki DNA yüzdesi ve uzunluğu hasarlı DNA'nın nicel verilerini sağlamaktadır [68].

Altın nano-parçacıklarının (Au NP'ler) tıp, biyoteknoloji veya gıda sektörü gibi farklı alanlarda artan kullanımı nedeniyle, insanlarda maruz kalma önemli ölçüde artmış ve toksisite değerlendirmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu nedenle Avalos ve ark. (2018) *Drosophila*'daki *in vivo* mutajenik ve rekombinojenik aktivite (SMART Testi) ile *in vitro* komet yöntemi kullanılarak 30, 50 ve 90 nm Au NP'lerin potansiyel genotoksik etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, uygulanan gruplarda 30, 50 ve 90 nm (1-10 mg/ml) Au NP'lerin 24 saatlik uygulamadan sonra DNA iplik kopmalarını arttırdığını göstermiştir [69]. Ema ve ark. (2012) çalışmalarında Fulleren C₆₀ NP'ünün genotoksitesi üzerine yaptıkları çalışmada, C₆₀ NP verilen sıçanların akciğer hücrelerini kullanarak, komet yöntemiyle *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. C₆₀ NP'lerin genotoksik etkiye sahip olduğu komet analizi ile belirlenmiştir [70]. Bu çalışmamızda, MgO ve NiO NP'lerinin *in vitro* koşullarda hücrel DNA'ya artan dozlarda etkisini artırarak zarar verdiği tespit edilmiştir. Bu etki, DNA kuyruk uzunluğunda 1000 µg/mL NP'deki etki ile 10 µg/mL NP'deki etkisi karşılaştırdığımızda yaklaşık üç katına ulaştığı belirlenmiştir.

Nanopartiküllerin iç ve dış ortam hava kirliliğinin sebep olduğu, bronşit, nefes darlığı, astım, kanser gibi hastalıkları yapabilme potansiyeli olduğu bilinmektedir. Nanopartiküllerin zararları ile ilgili yapılan ilk gözlemlerde, solunum, kalp damar sistemi ve kan pıhtılaşma sistemini etkilediği, bu yolla da her sistemde etkisini gösterdiği belirlenmiştir. Hatta deneysel hayvan çalışmalarında akciğer üzerindeki zarda kanser yaptığı belirlenmiştir. Beyin, kalp ve akciğerlerin kendi damarlarında ciddi hasarlar oluşturduğu, akciğer amfizemi, bronşit gibi hastalıklara da neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Pek çok hastalıkta değişimler görülmesi örnek olarak kanser yaşının düşmesi ve agresif yapıda ilerlemesi, kalp krizi yaşının giderek düşmesi, normalde ileri yaşlarda görülen beyne pıhtı atma olayının artık genç nesillerde de görülmesinin nedenleri arasında nanopartiküllerin de olabileceği düşünülmeye başlanmıştır. Bu sebeple konuyla ilgili daha çok bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [71]. Bu çalışmayla da kullanılan nanopartiküllerin hücrel antioksidan savunma sistemine ve DNA'ya zarar verdiği *in vitro* koşullarda ortaya konulmuş olup diğer bilimsel çalışmalara alt yapı oluşturulmaya çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hu, H., Exposure to metals *Occup, Environ. Med.* 27(4) 983- 996, 2000.
2. Dökmeci, İ., Dökmeci, A.H., Toksikoloji Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.
3. Kahvecioğlu, Ö., ve ark., Metallerin Çevresel Etkileri-I, *Metalurji*, 136.Sayı, 2009.
4. Doğan, M., Sağlıklı Yaşamın Kimyası, *Popüler Bilim Dergisi*, 32-34, 2002.
5. Fort, D.J., ve ark., Phase III Interlaboratory Study of FETAX, Interlaboratory Validation of an Exogenous Metabolic Activation System for Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), *Drug Chem. Toxicol.*, 21(1), 1-14, 1998.
6. Home Personalisation Discussions Search Site Map, Exposure standart cadmium and compounds. Contact HISTORY home OHS Information Databases Exposure Standart 2002; 1-6.
7. Cari, A.B., Ashwood E. Tietz textbook of Clinical Chemistry, 1034-1036,1408-1410,1441-1442, 1999.
8. Altura, B.T., ve ark., Low Levels of Serum Ionized Magnesium are Found in Patients Early After Stroke Which Result in Rapid Elevation in Cytosolic Free Calcium and Spasm in Cerebral Vascular Muscle Cells, *Neurosci. Lett.*, 230, 37-40, 1997.
9. Altura, B.T., ve ark., Magnesium Dietary Intake Modulates Blood Lipid Levels and Atherogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1840-44, 1990.
10. Rayssiguer, Y., Role of Magnesium and Potassium in Pathogenesis of Arteriosclerosis, *Magnesium*, 3(4-6), 226-238, 1984.
11. Manuel, Y., ve ark., Magnesium Status and Parameters of The Oxidant-Antioxidant Balance in Patients With Chronic Fatigue, Effects of Supplementation With Magnesium, *J. Am. Coll. Nutr.*, 19, 374-82, 2000.
12. Lam, CW., ve ark. Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation, *Toxicol. Sciences*, 77(1), 126-134, 2004.
13. Kökdemir, E., Nanopartiküllerin Evsel Arıtma Çamurlarının Anaerobik Parçalanabilirliği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2013.

14. Erkoç, Ş., Nanobilim ve Nanoteknoloji, ODTÜ Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 2011.
15. Kavaz, D., Nanoteknoloji, Nanobülten, 13, 12-19, 2011.
16. Xie, H., ve ark., Genotoxicity of Metal Nanoparticles, Rev. Environ. Health., 26 (4), 251-68, 2011.
17. Revell, PA., The Biological Effects of Nanoparticles, Nanotechnol. Percept., 2, 283–298, 2006.
18. Gonzalez, L., Adaptations of The in Vitro MN Assay For The Genotoxicity Assessment of Nanomaterials, Mutagenesis, 26 (1), 185–91, 2011.
19. Hallock, MF., ve ark., Potential Risks of Nanomaterials and How to Safely Handle Materials of Uncertain Toxicity, J. Chem. Health Saf., 16(1), 16-23, 2009.
20. Syed, S., ve ark., Immune Response Tonanomaterials, Implications for Medicine and Literature Review, Curr. Allergy Asthm. Rep., 13(1), 50-57, 2013.
21. Gonzalez, L., ve ark. Genotoxicity of Engineered Nanomaterials, a Critical Review, Nanotoxicol., 2 (4), 252-273, 2008.
22. Donaldson, K., ve ark., Possiblegenotoxic Mechanisms of Nanoparticles, Criteria for Improved Test Strategies, Nanotoxicol., 4(4): 414-420, 2010.
23. Khairallah, F., ve ark., Synthesis, Characterization andReactivity Study of Nanoscale Magnesium Oxide, Journal of Molecular Catalysis A, Chemical, 274, 137–147, 2007.
24. Klabunde K. J., ve ark., A Study on Adsorption of Surfactant Molecules on Magnesium Oxide Nanocrystals Prepared byan Aerogel Route, Langmuir, 18, 5309-5313, 2002.
25. Koper, O.B., ve ark., Alkaline-Earth Oxide Nanoparticles Obtained by Aerogel Methods, Characterization and Rational for Unexpectedly High Surface Chemical Reactivities, Chem. Material., 9(11), 2468-2480, 1997.
26. Koper O., ve ark., Nanoparticles for the Destructive Sorption of Biological and Chemical Contaminants, United States Patent, Patent No: 6057488, 2000.
27. Douglas, E., ve ark., Method for Removing H₂S and CO₂ from Above Ground Hydrocarbon Streams, United States Patent, Patent No: 6447577, 2002.

28. Stark, J.V., ve ark., Nanoscale Metal Oxide Particles/Clusters as Chemical Reagents. Adsorption of Hydrogen Halides, Nitric Oxide, and Sulfur Trioxide on MagnesiumOxide of Acid Gases (Sulfur Dioxide and Carbon Dioxide) and Pressure Dependence, *Chem. Material.*, 8 (8), 1904–1912, 1996.
29. Lascelles, K., ve ark., Nickel Compounds. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, NY, USA., 2005.
30. Öğüt, S., Doğal Antioksidanların Önemi, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11(1), 25 – 30, 2014,
31. Moldovan, L., ve ark., Oxygen Free Radicals And Redox Biology Of Organelles, *Histochem. Cell Biol.*, 122, 395–412, 2004.
32. Gök, V., ve ark., Dogal Antioksidanların Biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2-4 Ekim, Ankara, 2003.
33. Baser, K.H.C., Fonksiyonel Gıdalar Ve Nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskisehir, 29-31 Mayıs 2002.
34. Halliwell, B., ve ark., Free Radicals Antioxidants and Human Disease: Where are We Now? *J. La. Cli. Med.* 119(6), 598-620, 1992.
35. Halliwell, B., Antioxidant characterization. Methodology and Mechanism, *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1341-1348, 1995.
36. Fridovich, I., Superoxide Radical, An Endogenous Toxicant, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23: 239-257, 1983.
37. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fیزیopatolojik Etkileri, Mimosza Yayınları, Konya, 1. Baskı, 17, 1995.
38. Van Klaveren, R.J., Role of Reactive Oxygen Species in Occupational Andenvironmental Obstructive Pulmonary Diseases, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 5, 118-128, 1999.
39. Cheeseman KH., ve ark., An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Br. Med. Bull.*, 49 (3): 481-93, 1993.
40. Frei, B., Reactive Oxgen Species and Antioxidant Vitamins, Mechanisms of Action.,*The American Journal of Medicine*, 26, 5-12, 1994.
41. Yu, B.P., Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol. Rev.*, 74(1), 139-162, 1994.
42. Singh, N.P., ve ark., Single cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay), its Importance in Human biology, *Mutat. Res.* 37, 123, 1990.

43. Ostling, O., ve ark., Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 123, 291–298, 1984.
44. Singh, N.P., ve ark., A Simple technique For Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual cells, *Exp., Cell Res.*, 175, 184-191, 1988.
45. Horoz, M., ve ark., Assessment of Peripheral DNA Damage by Alkaline Comet Assay in Maintenance Hemodialysis Subjectswith Hepatitis C Infection Mutation, *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596 (1-2), 137-142, 2006.
46. Wu, T.C., VitaminE and Vitamin C Supplementation in Patients Withchronic Obstructive Pulmonary Disease, *Int J Vitam Nutr Res* ,77(4), 272-279, 2007.
47. McKelvey-Martin, V.J., ve ark., The Single Cell Elelectrophoresis Assay (comet assay), a European Review, *Mutat. Res.* 288(1), 47-63, 1993.
48. Güven, K., *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji. I. Baskı*, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Basımevi, 1999.
49. Ames, B., ve ark., Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens With the Salmonella/Mammalian-microsome Mutagenicity test, *Mutation Res*, 31, 347-364, 1975.
50. Yılmaz, S., ve ark., DNA Damage in Human Lymphocytes Exposed to Four Food Additives in Vitro, *Toxicol. Indus. Health*, 30, 926-37, 2014.
51. Pool-Zobel, B.,Systemic Genotoxic Effect of Tobacco-Related Nitrosamines Following Oral and Inhalation Administration to Sprague-Dawley rats, *The Clin. Inves*, 70, 299–306, 1992.
52. Ohkawa, H., ve ark., Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358, 1979.
53. Marklund, S., ve ark., Involvement of The Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474, 1974.
54. Aebi, H., Catalase in Vitro, *Method. Enzymol.*, 105, 121-126, 1984.
55. Paglia, D.E., ve ark., Studies on The Quantative and Qualitative Characterization of Glutathione Peroxidase, *J. Lab. Med.*, 70, 158-165, 1987.
56. Buzea, C., ve ark., Nanomaterials and Nanoparticles, Sources and Toxicity, *Biointerphases*, 2 (4), 17-71, 2007.

57. Suri, S.S., ve ark., Nanotechnology-based Drug Delivery Systems, *J. Occup. Med. and Toxicol.*, 2, 16, 2007.
58. Gubbins, E.J., ve ark., Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ. Pollut.* 159(6), 1551-1559, 2011.
59. Pinheiro, T., ve ark., Nuclear microscopy as a tool in TiO₂ nanoparticles bioaccumulation studies in aquatic species. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 306, 117-120, 2013.
60. Juhel, G., ve ark., Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. *Aquatic Toxicol.* 105(3-4), 328-336, 2011.
61. Martinez-Rodriguez, N.L., ve ark., In Vitro Toxicity Assessment of Zinc and Nickel Ferrite Nanoparticles in Human Erythrocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cell, *Toxicol. in Vitro*, 55, 54-61, 2019.
62. Ran, Q., ve ark., Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes, *Nature*, 5:16209, 2015
63. Song, X.R., ve ark., Reversion of Multidrug Resistance by Co-Encapsulation of Vincristine and Verapamil in PLGA Nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37: 300-305, 2009.
64. Pandır, D., Assesment of the Genotoxic Effect of The Diazinon on Root Cells of *Allium cepa* (L.). *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 61, e-18160390, 2018.
65. Pandır, D., Furan-induced Oxidative Stress and DNA Damage in Diabetic and Non-Diabetic Rats' Blood and Protective Effect of Lycopene. *Curr. Nut. Food Sci.*, 14(4), 358-368, 2018.
66. Apaydın, FG., ve ark., Subacute Effects of Low Dose Lead Nitrate and Mercury Chloride Exposure on Kidney of Rats. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 41, 219-224, 2016.
67. Kasperczyk, A., ve ark., Gene Expression and Activity of Antioxidant Enzymes in The Blood Cells of Workers Who Were Occupationally Exposed to Lead, *Toxicol.*, 301, 79-84, 2012.
68. Koç, K., ve ark., All Aspect of Toxic Effect of Brilliant Blue and Sunset Yellow in *Allium cepa* Roots, *Cytotech.* 70, 449-463, 2018.

- 69.** Avalos, A., ve ark., In Vitro and In Vivo Genotoxicity Assessment of Gold Nanoparticles of Different Sizes by Comet and SMART Assays, Food Chem. Toxicol., 120, 81-88, 2018.
- 70.** Ema, M., ve ark., Genotoxicity Evaluation of Fullerene C60 Nanoparticles in a Comet Assay Using Lung Cells of Intratracheally Instilled Rats, Regul.Toxicol. Pharm., 62, 419-424, 2012
- 71.** Çilingir, B.M., Hava Kirliliği ve Akciğer-Air pollution and lung. J. Contemp. Med., 6, 131-137, 1994.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Yozgat'ta doğan Ali KALELİ, öğrenimini sırasıyla Ergenekon İlk Öğretim Okulu ve Ege Lisesi'nde tamamladı. Üniversite öğrenimini 2007 yılında kazandığı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2012 yılında bitirdi. 2014 yılında Erzurum'un Hınıs ilçesi Meslek Lisesinde ve 2017 yılından itibaren ise Yozgat Mimar Sinan Meslek Lisesinde Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaktadır. Aynı yıl Yozgat Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

İLETİŞİM :

e-posta : alikaleli66@gmail.com