



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TiO₂ NANOPARTİKÜLÜNÜN KROMOZOMLAR
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Büşra KANBOLAT

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TiO₂ NANOPARTİKÜLÜNÜN KROMOZOMLAR
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI

Büşra KANBOLAT

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
114S311 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "**TiO₂ nanopartikülünün kromozomlar üzerindeki toksik etkisinin in-vitro araştırılması**" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususun doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Büşra KANBOLAT tarafından hazırlanan

“TiO₂ nanopartikülünün kromozomlar üzerindeki toksik etkisinin in-vitro araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.01.2020

İmza

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet KAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Nanoteknoloji	2
1.2 Nanotoksikoloji	3
1.3 Genotoksisite	4
1.3.1 Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları	5
1.4 Titanyum Bazlı Nanomateryaller	7
1.4.1 Nano TiO ₂ Maruz Kalma Yolları	8
1.4.2 Nano TiO ₂ Karakterizasyonu	9
1.4.3 Kristal Yapı	10
1.4.4 Şekil, Boyut ve SpesifikYüzey Alanı	12
1.4.5 Buldukları Ortam	13
1.4.6 Modifikasyon	14
1.4.7 Risk Değerlendirmesi	14
1.4.8 Sitotoksisite	15
1.4.9 Ekotoksisite	16
1.4.10 Potansiyel Mekanizmalar	18
1.4.10.1 ROS Üretimi ve Oksidatif Stres(OS)	18
1.4.10.2 Organel Disfonksiyonu	19
1.5 Kozmetoloji ve Dermatolojide Nanopartiküller	20
1.6 Güneş Koruyucular	21
1.7 UV filtresi olarak nanopartiküller	25

1.8 Nanopartiküller ve Cilt Kanserleri	26
1.9. Hücre Kültürü	27
1.10 Tezin Amacı	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereçler	32
2.1.1. Kullanılan Maddeler	32
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	34
2.2 Mikroçekirdek Yönteminde ve CREST Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	34
2.3 TiO ₂ nanopartikülü ile ilgili ön çalışmalar	36
2.4 Hücre Kültürü	37
2.5 Mikroçekirdek Testi (Micronucleus Test, MN)	40
2.6 CREST (Anti-kinetochore staining, Anti kinetokor boyama) analizleri	44
2.7. İstatistiksel değerlendirme	50
3. BULGULAR	51
3.1 TiO ₂ nanopartikülü ile ilgili ön çalışma sonuçları	51
3.2 MN testi sonuçları	53
3.3 CREST testi sonuçları	56
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
ÖZET	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖNSÖZ

Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂-NP) günümüzde güneş koruyucu kremlerde en yaygın kullanılan UV filtrelerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar, TiO₂-NP'lerinin hücrelerde DNA hasarı oluşturabildiği ve dolayısıyla genotoksik etkili olabileceğini göstermektedir. Tezimizde, TiO₂-nanopartikülüne maruz kalınması durumunda hücre DNA'sının nasıl etkilendiği genotoksisite testlerinden mikroçekirdek testi kullanılarak insan keratinosit hücreleri (HaCaT) ile araştırılmıştır. Ayrıca, mikroçekirdeklerin karakterizasyonu için ilk kez bu tez ile CREST (antikinetochore antibodies) analizleri laboratuvarımızda kurularak uygulanmıştır. Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre TiO₂-NP'nün test edilen 5, 10 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda mikroçekirdek sayılarını artırdığı, bu artışın 5 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Mikroçekirdek testi sonuçlarına dayanarak CREST analizleri uygulandığında ise, TiO₂-NP'nün mikroçekirdek sayılarını anöjenik mekanizmalarla artırdığı görülmüştür.

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca, tez konusu seçiminden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar, her aşamada katkısını esirgemeyen, değerli yorumlarıyla beni yönlendiren, bilgi ve deneyiminden faydalanma şansı veren tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hem eğitimim sırasında hem de her başım sıkıştığında, motivasyonumu kaybedip vazgeçmeme engel olup her zaman yanımda olan canım aileme, manevi olarak her daim yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım İrem İYİGÜNDOĞDU ve Naile Merve GÜVEN'e en içten dileklerle teşekkür ederim. Bu tezi hazırlarken eczanemdeki yükümü hafifletip, aynı zamanda her türlü desteğini esirgemeyen Oğuzhan ÖZEL'e ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-NQO	4-nitroquinolin 1-oksit
Al	Alüminyum
ALS	Alkali labil bölgeler
Ag NP	Gümüş nanopartiküller
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
CA	COMET tahlil
CREST	Antikinetochore antibodies
CSK	Sitoiskelet
DAPI	4',6- diamidin-2-fenilindol-dihidroklorid
DMEM	Hücre kültürü besi yeri
DSB	Çift zincir kırıkları
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fötal calf serum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
Fe ₂ O ₃	Demir(III)oksit
Fe ₃ O ₄	Demir (II, III) oksit
HaCaT	İnsan Keratinosit Hücreleri
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

(IL)-1 β	İnterlökin
KA	Kromozom anormallikleri testi
KKD	Kardeş kromatit değişimi testi
MMC	Mitomisin
MN	Mikronükleus testi
NM	Nanometre
NP	Nanopartikül
NIOSH	<i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
OS	Oksidatif stres
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
QOL	Hastanın yaşam kalitesi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SSB	Tek zincir kırıkları
SiO ₂	Silisyum dioksit
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TiO ₂	Titanyum dioksit
TiO ₂ -NP	Titanyum dioksit nanopartikülleri
UV	Ultraviyole
UV A	Ultraviyole A
UV B	Ultraviyole B
VCR	Vinkristin

XRD

X-ışını difraksiyonu

ZnO

Çinko oksit



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.1. Nanometre boyutunu anlatan örnekler (Bozkaya, 2006)	2
Şekil 2.4.1. HaCaT hücrelerinin mikroskop altında görüntüleri	38
Şekil 2.4.2. TC 20 cihazı, kullanılan sayım lamları ve tripan mavisi	39
Şekil 2.4.3. TC20 sayım cihazında 1mL süspansiyondaki canlı hücrelerin sayısı	40
Şekil 2.5.1. Mikroçekirdek testinin prensibi	41
Şekil 2.5.2. MN testinde 5mL'lik flasklarda test kimyasallarının ve kontrollerin maruziyet aşaması	42
Şekil 2.6.1. CREST testinin prensibi	46
Şekil 2.6.2. CREST testinde 18 saatlik inkübasyon	47
Şekil 2.6.3. Lamların Tween 20-PBS çözeltisi ile yıkama aşaması	48
Şekil 2.6.4. CREST analizlerinde antibody ilavesi	48
Şekil 2.6.5. Floresan mikroskop (görüntüleme kamerası ile)	49
Şekil 3.1.1. TiO ₂ -NP'nün büyüklüğünün TEM ile ölçülmesiyle elde edilen görüntüsü	51
Şekil 3.1.2. Zeta potansiyeli sonuçları	52
Şekil 3.2.1. Floresan mikroskopta mikroçekirdek görüntüleri	53
Şekil 3.2.2. HaCaT hücrelerine uygulanan TiO ₂ ile elde edilen ortalama mikroçekirdek sayıları	55
Şekil 3.3.1. DAPI filtre ile hücrelerin görüntüsü	56
Şekil 3.3.2. CREST testinde kullanılan anöjenik (CREST+) etkili vinkristin ile mikroskop görüntüleri	57
Şekil 3.3.3. CREST testinde kullanılan klastojenik (CREST-) etkili MMC ile mikroskop görüntüleri	58

Şekil 3.3.4. Anöjenik pozitif kontrol olarak kullanılan VCR'nin HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları	59
Şekil 3.3.5. Klastojenik pozitif kontrol olarak kullanılan MMC'nin HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları	59
Şekil 3.3.6. TiO ₂ nanopartikülünün 50 µg/mL'lik konsantrasyonda HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları	60



ÇİZELGELER

Çizelge 1.9.1. Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları (Tuncer ve Demirci, 2011)	29
Çizelge 1.9.2. Hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları(Koçaklı ve ark., 2015)	30
Çizelge 3.2.1. HaCaT hücrelerine uygulanan TiO ₂ ile elde edilen çift lamda sayıma ait mikroçekirdek sayıları	54



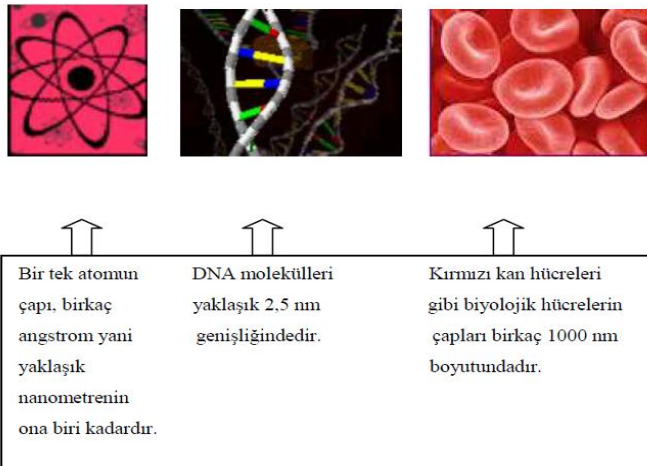
1. GİRİŞ

Yirmibirinci yüzyıla girilmesiyle birlikte stratejik bir önem kazanmış olan nanoteknoloji, birçok alanda kullanılarak yaşamımıza girmeye başlamıştır. Tekstil, gıda, kozmetik, ilaç, biyoloji, bilişim, biyoteknoloji, kimya, ve metal endüstrileri gibi birçok alanda her geçen yıl yaygınlaşmakta ve artık insan hayatının vazgeçilmezi olmaktadır. Özellikle nanopartiküller pek çok kişisel bakım ürününün içeriğinde de yer almaktadır (Deodorant, sabun, diş macunu, şampuan, saç kremi, güneş koruyucu, kırışıklık karşıtı krem, nemlendirici, fondöten, yüz pudrası, ruj, allık, göz farı, oje, parfüm, traş sonrası losyon gibi). Nanopartiküller içinde toksikolojik etkileri üzerinde en çok durulan karbonlu (karbon siyahı, karbon nanütüpleri), silikalı (silisyum dioksit) ve metal oksitli nanopartiküllerdir. Örneğin metaloksitlerden olan titanyum dioksit hem toz hali ile hem de son yıllarda nanoboyutu ile Ultraviyole (UV) ışınlarını engelleyebilme özelliği nedeniyle güneş koruyucu preparatların yapısında sıklıkla yer almaktadır. Ancak yapılan araştırmalar, titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO₂-NP) hücrelerde DNA hasarı oluşturabildiği ve dolayısıyla genotoksik etkili olabileceğini göstermektedir. Tezimizde, TiO₂-nanopartikülüne maruz kalınması durumunda hücre DNA'sının nasıl etkilendiği genotoksisite testlerinden mikroçekirdek testi kullanılarak insan keratinosit hücreleri (HaCaT) ile araştırılmıştır. Ayrıca, mikroçekirdeklerin karakterizasyonu için ilk kez bu tez ile CREST (antikinetochores antibodies) analizleri laboratuvarımızda kurularak uygulanmıştır.

1.1. Nanoteknoloji

Nanobilim, nanometre ölçütlerinde ortaya çıkan bu yeni davranışları kuantum kuramı yardımı ile anlamamızı sağlar; nanoteknoloji ise ya yeni nanoyapılar tasarlayıp sentezlemeyi ya da nanoyapılara yeni olağanüstü özellikler kazandırmayı ve bu özellikleri yeni işlevlerde kullanmayı amaçlar (Çıracı S., 2006). Nanomateryaller birçok alanda her yıl artarak kullanılmaktadır ve insan hayatında önemli bir yer almaktadır.

Nano terimi Yunanca kökenlidir ve “cüce” anlamına gelir. Kelime olarak ise; herhangi bir birimin milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre (nm) bir milimetrenin milyonda biri olan bir uzunluk birimidir ve 10^{-9} m'dir. Nanoteknoloji terimi, atom seviyesinde maddelerin işlenmesi ile daha gelişmiş materyaller ve sistemlerin elde edilmesi için kullanılır. Nanoteknoloji, boyutları 1-100 nanometre (nm) arasında değişen materyaller ile yapılan çalışmalarını ifade etmektedir. Buradaki boyut gerçekte maddenin yapı taşları ve moleküllerin büyüklüğünü temsil etmektedir. Ayrıca protein, DNA gibi biyolojik yapılar da fiziksel boyut açısından nanoteknolojinin içine girmektedir (Gök H., 2007).



Şekil 1.1.1. Nanometre boyutunu anlatan örnekler (Bozkaya, 2006)

1.2. Nanotoksikoloji

Nanotoksikoloji nanoteknolojinin önemli bir disiplini olarak gelişmektedir. Nanotoksikoloji, toksik bir biyolojik yanıtın indüksiyonu ile boyut, şekil, yüzey kimyası, yapı, bileşim gibi, fiziksel ve kimyasal özellikleri arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir önem biyolojik sistemler ile nano etkileşimler doğru soruşturulması yönünde yer alır. Nanomateryallerin fizikokimyasal özelliklerinde dönüşümün yanı sıra biyolojik doku ile daha iyi alım ve etkileşim için fırsat oluşturulabilir. Halen, biyolojik sistemlerle nanomateriyal boyut, şekil, yapı bileşimi ve toplama bağımlı etkileşimlerinin kapsamlı bir anlayış, işlenmiş nanomateriyal insanlar, hayvanlar, böcekler ve bitkilerde muhtemelen zararlı biyolojik yanıtlar üretebilir olup olmadığını tahmin edilemez. Bu nedenle, nanoteknoloji nanotoksikoloji yeni bir disiplin geliştirmiştir. Çünkü biyolojik sistemlerde nanomateryallerin işlenmesi nanotoksikolojik araştırılması mümkün öngörülemez etkiler neden olur. Nanomateriyal biyolojik membranlardan, doku ve organ inhalasyon ile erişimi mümkündür. İnsan derisi, akciğer ve mide-bağırsak ortamı ile sürekli temas halinde kalır. Cilt yaygın yabancı maddelere karşı etkili bir bariyerken, akciğerler ve gastrointestinal sistem daha duyarlıdır. Enjeksiyonlar ve implantlar ağırlıklı mühendislik malzemeleri ile sınırlı maruz kalma yolları vardır. Kendi küçük boyutu nedeniyle, nanomateryaller dolaşım ve lenfatik sistemleri içine ve sonunda vücut doku ve organlara bu giriş portallarından translokasyona uğrayabilir. Onların kompozisyon ve büyüklüğüne sorumlu bazı nanomateryaller, oksidatif stres ya da organel yaralanma hücrelere kalıcı tahribat geliştirebilir. Çok çeşitli boyutlarda nanopartiküller hücrelere girebilir ve nanopartiküllerin toksisitesi çeşitli faktörlere bağlıdır(Janrao K. Ve arkadaşları, 2014).

1.3. Genotoksisite

Genotoksisite veya genotoksik etki, genetik materyalde fiziksel ya da kimyasal maddeler nedeniyle oluşan hasarın tanımıdır. Bu hasarlar; DNA tek zincirinde meydana gelen kırıkları (SSB), DNA çift zincirinde oluşan kırıkları (DSB), DNA alkali işaretli bölgeleri (ALS) ve DNA katım ürünleri ve DNA çapraz geçişleri (Cross links) şeklinde sınıflandırılabilir. Gen üzerinde meydana gelen hasarlar tamir edilemediğinde DNA'da sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonlanabilen nükleotid değişiklikleri ve sonuç olarak rekombinasyon, doku hasarı, yaşlanma, mutasyon ve hatta kanser oluşabilmektedir (Bedir 2004).

Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların neden olabileceği genotoksik etkinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilebilmesi için pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testler; fiziksel etkenlerin ve ilaçların genotoksik etki potansiyellerini değerlendirmek için kullanılabileceği gibi, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin de genotoksik potansiyellerinin ve güvenilirlik değerlendirmesini, kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlayan testlerdir.

Genotoksik etki ve karsinojenik etki arasındaki ilişki pek çok çalışmada araştırılmıştır ve insanlar için karsinojenik etkisi olan pek çok kimyasal ve ilacın genotoksik etkisinin de olduğu bulunmuştur. Kimyasal maddelerin ve ilaçların mutajenik etkileri ile karsinojenik etki potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunun gösterilmesi, genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin ve ilaçların karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

1.3.1. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları

Genotoksisite testleri 1970'lerden bu yana kullanılan testlerdir ve günümüzde mutajen ve genotoksik etkili kimyasalların karsinojenik etki potansiyellerini değerlendirmek için pek çok genotoksisite testi geliştirilmiştir.

DNA yapısının tanımlanmasından önce bile, kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların genetik materyalle etkileşime girebildiği ve bunun da genomik dengesizlik ve kanserle ilişkili mutasyonlara yol açtığı çok açık olarak bilinmekteydi. Bunu göz önüne alarak, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA, Brezilya) gibi düzenleyici kurumlar, ilaç onaylamanın temel bir parçası olarak genotoksisite testlerine ihtiyaç duymaya başlamıştır. Bu testler, genetik mutasyonları ve / veya kromozomal sapmaları indüklemek için ilaç potansiyelini saptamak için in vitro ve in vivo deneyleri içerir. İnsan Kullanımı Amaçlı İlaçlar için Genotoksisite Testi ve Verilerin Yorumlanması ile İlgili S2 (R1) Kılavuzu, geliştirilmekte olan yeni ilaçları test etmek için FDA, EMA ve ANVISA tarafından uygulanır. Bu Kılavuz, iki batarya testi seçeneği önerir:

Seçenek 1 - bakterilerde ters mutasyon testi, ardından farelerde lenfoma TK hücrelerinde kromozomal hasarı (kromozomal sapma veya mikroçekirdek deneyi) veya genetik mutasyon testini değerlendirmek için bir in vitro sitogenetik test veya bir in vivo test (kromozomal sapma veya mikroçekirdek deneyi);

Seçenek 2 - Bakterilerde ters mutasyon testi ve iki dokuda in vivo genotoksisite değerlendirmesi: hematopoietik (mikroçekirdek deneyi) ve COMET deneyi gibi diğer in vivo testler.

Bununla birlikte, kılavuz ayrıca araştırmacı / kurum ilaç güvenliğini kanıtlayabildiğinden farklı yöntemlerin kullanılmasına da izin verir. Mevcut genotoksisite testleri arasında, COMET tahlil (CA) ve mikroçekirdek tahlil (MNA), mutajenlik özellikleri olarak kabul edilebilecek DNA kırılmalarını değerlendirmek için sağamlıkları, duyarlılıkları ve istatistiksel gleri nedeniyle tanınmaktadır. Ayrıca, řu anda yapılan araştırmalar, CA ve MNA ilişkisinin mutajenik potansiyeli değerlendirmek için en iyi testler olduğuna işaret etmektedir, çünkü her iki deney de oldukça hassas, basit ve sırasıyla kromatik ve kromozomal seviyelerde kırılmaları tespit etmeye izin vermektedir. Bununla birlikte, yayınlanan çok sayıda protokolün ve CA ve MNA'nın en son keşfi ve nerileri işlevinde, bu teknikler hakkında bir inceleme yapılması gerekmektedir(Araldi R. P. ve ark., 2015).

Genotoksisite için prokaryotik (rneđin bakteriyel) veya ökaryotik (rn., Memeli, kuş veya maya) hücrelerinde DNA hasarı veya biyolojik sonuçlarını tespit eden birçok in vitro ve in vivo test geliştirilmiştir.

En yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri;

- Ames testi (Amest test),
- Komet testi (Comet assay),
- Kromozom anormallikleri (KA, Chromosom Aberation test) testi,
- Kardeş kromatit değişimi (KKD, Sister Chromatid Exchange, SCE) testi ve
- Mikroçekirdek (MN, Micronucleus) testidir.

1.4. Titanyum Bazlı Nanomateryaller

TiO₂ (titanyum dioksit) nanomateryalleri (NM) etkileyici fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle geniş uygulama alanı bulmuşlardır. Titanyum dioksit nanopartiküller yaygın olarak beyaz pigment, gıda renklendirici, güneş kremleri ve kozmetik kremler gibi birçok ürünlerde kullanılmıştır. Sonuç olarak, insanlar üzerinde nano- TiO₂ maruziyetinin olası olumsuz etkileri endişe konusu haline gelmiştir. Bu çalışmada ileri gelişme seviyesinde olan nanomateryallerin advers etkileri, potansiyel maruziyet yolları (örn. Solunum sistemi, deri absorpsiyonu ve sindirim sistemi gibi), fizikokimyasal karakterizasyonu (kristal yapı, şekil, büyüklük, zeta potansiyeli, tedavi yeri, agregasyon ve aglomerülasyon eğilimi, yüzey karakteristiği ve kaplamaları), nanotoksikolojik risk değerlendirmesi (örn. Sitotoksisite, ekotoksisite, fototoksisite, fitotoksisite) ve potansiyel yan etki mekanizmaları (örn.reaktif oksijen türlerinin üretimi, oksidatif stres ve organel disfonksiyonu) gibi araştırmaları kapsamaktadır. Amaç TiO₂ nanomateryallerinin günlük yaşamda güvenli kullanımı hakkında rehberlik etmek ve sağlık riskleri üzerinde bilimsel değerlendirmeler için olanak sağlamaktır.

Nano TiO₂ parçacıkları düşük toksisiteli kabul edilirken bu fikir IARC tarafından Grup 2B olarak sınıflandırılmasıyla değişmiştir(IARC 2010). Sıradan TiO₂ partikülleriyle karşılaştırıldığında (nano TiO₂ ve mikro büyüklükteki TiO₂ dahil) güçlü katalitik aktivitelerinden dolayı nano TiO₂ partikülleri daha özeldir. Bu birkaç yıl boyunca nano TiO₂ en yaygın olarak kullanılan nanopartikül haline gelmiştir ve büyük sanayi ölçeğinde üreilmeye başlanmıştır. Farmasötik ve kozmetik ürünlerde katkı maddesi, kemik protezini geliştirmek için kullanılan polimerik maddelerin dolgu maddesi olarak ve biyomedikal alanda iskele olarak kullanılmıştır (Zhang X. ve arkadaşları,2015).

1.4.1. Nano TiO₂ Maruz Kalma Yolları

İnsan vücuduna nano-TiO₂ partikülleri solunum sistemi, deri ve sindirim sistemi yoluyla çeşitli yollarla girdiği bulunmuştur. Nanoendüstriyel üretim sonucunda solunum sistemiyle nano-TiO₂ partikülleri kolaylıkla inhale edilebilir ve akciğer hasarına yol açabilir. Berges ve arkadaşları(2007) tesisin dolum bölgesindeki havadaki total TiO₂ konsantrasyonu 15000 ile 156000 parçacık/cm³ arasında değiştiğini ve %97'sinden fazlası 100 nm'den küçük olması gerektiğini göstermiştir. Altı Avrupa ülkesinde yapılan bir epidemiyolojik çalışma göstermiştir ki genel popülasyona göre nanomateryallere maruz kalan işçilerde daha yüksek akciğer kanseri insidansı gözlenmiştir. Sonuç olarak izin verilen maruziyet limiti ve işçilerin güvenli çalışması için gerekli tehlikeli konsantrasyon sırasıyla 15 mg/m³ ve 7500 mg/m³ olarak saptanmıştır (NIOSH 2011). Ağır nano-TiO₂'ye maruz kalan popülasyonlar için solunum yolu büyük bir maruziyet yoludur.

Nano TiO₂ partiküllerinin istenmeyen özelliklerinin tartışılmasına rağmen emilim özellikleri nedeniyle kozmetik endüstrisinde kullanımı artmaktadır. Günlük yaşamımızda kozmetik ürünler ve disperse olmuş TiO₂ nanomateryallerine deri ile maruz kalma sonucunda kümülatif maruziyet söz konusudur. Güneş kreminin %5 nanoTiO₂ içerdiği varsayılarak yetişkin ağırlık başına 8-37 kg⁻¹ olacak şekilde deriye uygulanmıştır. Wu ve ark.(2009) tarafından penetre olabilir TiO₂'ye tüysüz farelerin 60 gün boyunca maruz kalmasından sonra özellikle karaciğer ve deride lezyonlar meydana geldiğini bulmuşlardır. Buna ek olarak nano TiO₂ içeren güneş kremleri psöriatik deride sağlıklı deriye göre stratum corneumda daha geniş alana etkir çünkü hastalıklı deride korneosit organizasyonu kaybı vardır.

İçme suyu arıtma işleminde tercih edilmiş ve nano TiO₂ gıdada kullanılabilir madde olarak bulunmuştur, beslenme prosesleriyle sindirim sistemiyle absorpsiyonu

yüksektir ve diğer doku ve organlarda dağılması mümkündür. 5000 mg kg⁻¹ miktarda TiO₂ içeren tek bir oral gavaj sonrası farelerin karaciğer, dalak, böbrek, akciğer ve beyinlerinde birikme gözlenmiştir. Ayrıca nano TiO₂ çevresel koşullar, endüstriyel prosesler ve tüketici ürünleri nedeniyle ve atık su dezenfektanı olarak kullanılmaları ile ortama yayılabilirler. Doğada bulunan nano TiO₂ suya, toprağa karışır ve bunlarla ilişkili mikroorganizmaları etkileyerek medakanın yüksek derecede mortalitesine, bakteri komüniteleri kompozisyonuna ve ekolojik fonksiyonlarında alterasyona, çimlenmede değişmelere ve bitkilerde kök uzamasına yol açar. İnsanlar besin zincirinin en üstündeki canlı olduğu için bu kirlenmeler sonrası su ve yiyeceklerle beslenmesiyle sindirim sistemi aracılığıyla insanlar üzerinde olumsuz etkiler olacaktır.

Potansiyel sağlık riski açısından deri, solunum ve sindirim sistemi nano TiO₂ nin vücuda girişi için major maruziyet yollarıdır. Nanotoksikolojik açıdan değerlendirme için diğer yollar örneğin i.v enjeksiyon, i.m enjeksiyon ve implantasyon çeşitli hayvan testleri geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmıştır. Bu hayvan deneyleri insan maruziyeti için simüle ediliyor olsa da hala tartışmalar mevcuttur, bu yöntemler yukarıdaki üç yolun parçası olarak kabul edilmektedirler.

1.4.2. Nano TiO₂ Karakterizasyonu

Nanomateriyallerin hücreye penetre olabilmesi için hücre dış yüzeyinde spesifik bir reseptöre gerek yoktur ve Van der Waals bağları, elektrostatik yükler, sterik etkileşimler gibi yollarla pasif alım veya adhezif etkileşimi ile gerçekleşebilir. Nano TiO₂ maruziyetlerinden sonra sağlık riski için objektif bir değişiklik sağlayabilmek için önemli olan şeylerden biri de test örneklerinin yeterli materyal karakterizasyonun anlaşılmasıdır. Nanomateriyal maruziyetinde yeni

çalışmalar nano TiO₂'nin fizikokimyasal özelliklerinin nanomateryal maruziyeti sonrasında invitro ve invivo sonuç değişiklikleri, kristalyapısı, boyut, şekil, zeta potansiyeli, agregasyon ve agromerulasyon meyili, yüzey karakteristik ve kaplamalar açısından gibi yönlerden etkileyebilir.

TiO₂ nanoparçacık alımı karakterizasyonu bu malzemeler toksisitelerini anlamak için çok önemlidir. TiO₂ nanopartiküller yüzey modifikasyonu olmadan çözüm agregat oluşturma eğilimindedir, böylece etkinin boyutunu ve bunların neden olduğu sitotoksiteyi etkileyebilir. Bu tür agregasyon ve aglomerasyon alımı ve lokalizasyon çalışmalarında kolaylıkla gözlenmektedir. TEM kullanan pek çok çalışmada TiO₂ nanopartiküllerin hücre içine alınmış ve lizozomlar veya hücre vesikülleri içinde agregat olarak lokalize olma eğilimindedirler. Hackenberg ve arkadaşları ile Simon-Deckers ve arkadaşları tarafından nanopartikül alımı gözlenmiş; ancak, nanopartiküller sitoplazmada lokalize kalmıştır. Elektron mikroskobu [TEM ve SEM] maruz kalma üzerine hücrede morfolojik değişiklikleri gözlemek için kullanılabilir. SEM görüntüleme kullanarak, Pan ve arkadaşları TiO₂ nanopartiküllerinin agrete olabilir ve insan dermal fibroblastlarında morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. (Love S. A. ve arkadaşları,2012)

1.4.3. Kristal Yapı

X-ışını difraksiyonu (XRD), nano-TiO₂ kristal yapısının analiz edilmesi için temel bir araçtır. Nano TiO₂ için anataz, rutil ve brokit olmak üzere 3 kristal yapısı bulunmaktadır. Brokit nadir olarak bulunur ve diğer iki yapı için nano TiO₂ toksisite değerlendirmeleri yapılmaktadır. Bir çalışma anataz nano TiO₂'nin rutil nano TiO₂ akciğer epitel hücrelerinde (A549) daha fazla toksisite gösterdiğini bildirmiştir. Bunun aksine, anataz/rutil nano TiO₂ karışımı zebrafish lavraları üzerinde UV ışına

altındaki anataz kristal yapıdaki nano TiO₂partiküllerine göre daha yüksek toksisite göstermiştir. Çünkü kristal yapıdaki nano TiO₂'nin fotokatalitik özellikleri etkilenmektedir.

Hücrelerde TiO₂ kristallik etkilerini daha iyi anlamak için yapılan invitro çalışmalarda anataz kristal formu rutil forma oranla daha fazla toksik etkiye neden olduğunu ortaya koymuştur. Toksik yanıtın izahı TiO₂nanopartiküllerin hücre canlılığında doza ve zamana bağlı azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur ki MTS, MTT, hücre boyama ve hücre proliferasyonu deneyleri yer alır; anataz formu canlı hücrelerde en büyük azalmayı indükler. Buna ek olarak hücresel canlılık azalmış, TiO₂ nano-tanecikleri, özellikle de anataz formu, LDH ve IL-8 gibi enflamatuvar göstergelerin düzeylerinde artışa neden olmuş; yine, anataz nanopartiküller rutil nanopartiküllerin yaptığından daha büyük bir enflamatuvar yanıtı neden olmuştur. Schanen ve arkadaşları multipleks sitokin dizisi ile birleştiğinde salgılanan proinflamatuvar mediatörleri ölçmek için yeni bir simüle bağışıklık sistemini kullanmıştır; TiO₂nanopartiküllerin hepsinin enflamatuvar yanıtı başlatabilir ve yine anataz nanopartiküllerin diğer TiO₂ nanopartikül formlarına göre daha fazla bir proinflamatuvar sitokin salgılanmasına neden olduğu tespit edilmiştir. (Love S. A. ve arkadaşları)

Anataz kristal formu için reaktif türlerin daha büyük bir miktarda üretecek olduğu oksitleme potansiyeli daha toksik olabilir. TiO₂ nanopartiküllerin (herhangi bir kristal formu) oksitleyici potansiyelinin etkisi yaygın ROS doğrudan saptanması ve / veya glutasyon ve SOD olarak oksidatif stres göstergelerinin dolaylı ölçümü ile hücresel oksidatif stres olarak değerlendirilir. Oksidatif stres doz ve zaman-bağımlı bir artış TiO₂ nanopartiküller için gözlenmiştir; anataz formu en büyük miktarda üretir. Comet yöntemi le ölçülen TiO₂ nanoparçacık kaynaklı oksidatif stresin hipotez ürünü DNA hasarı; bununla birlikte, çok az genotoksisite ancak sadece yüksek dozlarda TiO₂ nanopartiküller maruziyet üzerine gözlenmiştir. Wu ve ark. PC12

hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli TiO_2 nanopartiküller tarafından uyarılan oksidatif stres etkileri incelenmiştir; bunlar anataz nanopartiküllerine maruz kaldıktan sonra membran potansiyelinde doza bağlı bir düşüş tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Hussain ve arkadaşları nanoparçacıklara maruz kaldıktan sonra bronşiyal epitel hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde hiçbir azalma bulunmamıştır. Buna ek olarak membran potansiyelinde bir azalma, kaspaz-3 gibi sinyal molekülleri yüksek düzeyde gözlenmiştir, anataz nanopartiküllerinde nekroza neden olduğunu göstermektedir. (Love S. A. ve arkadaşları,2012)

1.4.4. Şekil, Boyut ve SpesifikYüzey Alanı

Değişik uygulamalar için sentezlerde değişiklik yapılarak(hammadde, sıcaklık, asitlik, alkalilik vs.) çeşitli şekil(noktalar, çubuklar, kayış (belts)) , boyut ve spesifik yüzey alanına sahip nano TiO_2 hazırlanmaktadır. Nano TiO_2 yapısal komponentleri 100 nm'den küçük ve en az bir boyutludur, onların morfolojilerini gözlemlemek için TEM (Transmisyon elektron mikroskobu) ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) gereklidir. Yayınlanmış literatürde gösterildiği gibi, morfolojisindeki değişiklikler nano TiO_2 'ye maruz kaldıktan sonra, farklı yan etkiler ile sonuçlanmıştır. Örneğin, TiO_2 nanokürecikler (çap 60-200 nm) ve kısa TiO_2 nanobelts (0,8-4 mikrometre -uzunluğunda, 60-300 nm genişliğinde), uzun TiO_2 nanobelts ile karşılaştırıldığında (15-30 mikrometre uzunluğunda, 60-300 nm genişliğinde) önemli ölçüde uyarılan çeşitli dozajlarda 4 saat maruz kaldıktan sonra, alveolar makrofajlarda daha yüksek sitotoksiste gözlenmiştir.

Başka bir çalışma göstermiştir ki iğne yapılı nano TiO_2 'nin rutil ile aynı boyut ve yapıya sahip olmasına rağmen küresel nano TiO_2 'lerden daha düşük

konsantrasyonda (20-100 mikrogram/ml¹) daha fazla interlökin (IL)-1 β oluşumunu stimüle etmişlerdir.

Park ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada anataz nano TiO₂'lerin [180,2 \pm 50,8 nm and -11.15 \pm 0.46 mV fetal bovine serum (FBS)içinde]aynı çubuk şeklinde olmalarına rağmen brokit nano TiO₂partiküllerine (126,8 \pm 36,5 nm ve - 9.66 \pm 0.42 mV i FBS içinde) göre fare kalp, akciğer ve karaciğerlerinde daha fazla akümüle olduğunu göstermiştir.

Şeklin yanı sıra, boyut solunum yolu ile maruz kaldıktan sonra, nano- TiO₂ dağılımında başka bir belirleyici ana faktördür. Örneğin ratlarda 3 farklı boyuttaki (5,21,50 nm) nano TiO₂ bir doz(5 mg kg⁻¹) ile verilmiş, akciğerlere en yüksek toksik etkiyi 5 nm büyüklükteki partiküller göstermiştir. Şekil ve boyut olarak farklılık, spesifik yüzey alanı ile ilgili özellikleri değiştirmektedir ve daha büyük bir spesifik yüzey alanı, özellikle spesifik yüzey alanı bağımlı fototoksik etki için in vitro ve in vivo olarak inkübasyondan sonra yüksek yan etkilere neden olmuştur.

1.4.5. Buldukları Ortam

Bir ürünün yaşam döngüsü içerisinde asıl/saf nano TiO₂ karakterizasyonu kullanım ve atılım aşamalarında değişebilir. Risk değerlendirmesinden önce, değiştirilmemiş nanomateryaller üzerinde odaklanarak pratik bir durum üzerinde davranışını belirlemek gereklidir. Örneğin, aynı nano TiO₂ su içinde 53-311 nm, 461 nm ve 86-356 nm boyutlarında verildiğinde, PBS ve hücre kültür ortamında kültürlenmiş hücreler in vitro sitotoksisite değerlendirmesi için bir model sistem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, Prasad ve diğ. (2013)

nanomateryallerin buldukları ortamkolaylaştırılması parçacık yığılma yoluyla parçacık alımı, hücre-nano etkileşimi ve kromozomal hasarı etkilediği saptanmıştır. Hücre kültürü ortamı katkıları (örn bisfenol A) nano-TiO₂ agregasyon seviyesi ve zeta potansiyelini artırmak yoluyla nanomateryaller ile sinerjik toksisiteye yol açmıştır. Mide asit (pH <4) deiyonize su içinde pH 7 civarında test sonuçlarından farklıdır intragastrik (ig) uygulamadan sonra yiyecek cinsi nano TiO₂ zeta potansiyelini değiştirebilir.

1.4.6. Modifikasyon

Nano TiO₂'nin %3-5 oranına tekabül eden güneş ışını için bilinen bir UV emilimi vardır. Demir katkılı TiO₂ nanoçubuklar, Azot katkılı TiO₂ nanopartiküller, fosfat ile modifiye edilmiş nano TiO₂ ve polimer içeren nano TiO₂'ler gibi birçok modifikasyon için solar radyasyon kullanımı için görünür ışık aralığındaki nano TiO₂ partiküllerinin aktivitesine odaklanılmıştır. Modifiye nano TiO₂ fotokataliz ile suda çözünebilir organik kirleticileri azaltabilir, nano TiO₂ modifikasyonu güneş enerjisi altında serbest radikal oluşumunu ortadan kaldırabilir ve farklı olarak serbest radikal oluşumunu indükleyebilir.

1.4.7. Risk Değerlendirmesi

Nano TiO₂'nin hava, su, toprak ve organizmalar için kaçınılmaz varlığına dayanarak potansiyel toksisitesi hücre, doku ve hayvan seviyesinde araştırılmaktadır.(insan hücreleri, fareler, ratlar, akuatik canlılar, bakteri ve bitkilerle

ilgili tablolar verilmiştir.) nano TiO₂'ye maruziyet sonucunda sitotoksisite, fototoksisite, ekotoksisite, fitotoksisite olduğu bulunmuştur.

1.4.8. Sitotoksisite

İnsan sağlığı açısından risk değerlendirmesi sırasında, çeşitli insan hücreleri kullanılmış, maruz kalma ile ortaya çıkan advers etkiler bronşiyal epitel hücreleri, keratinositler, lenfositler, makrofajlar ve hepatositler üzerinde incelenmiştir. İnvitro nanomateryallerin risk değerlendirmesi sırasında, nano- TiO₂'nin doğrudan kültür hücreleri ile etkileşimi kullanılmıştır. Nanomateryallere maruz kalma sonucunda hücre membran bütünlüğünde, mitokondriyal aktivitede, apoptozis markerlarında ve DNA yapısında değişiklikler tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, nano TiO₂ doza ve zamana bağlı olarak ROS oluşumu, gen ekspresyonunu değiştirme, lizozomal membran destabilizasyonu ve lipid peroksidasyonu, hücre morfoloji değişimi, hücre matriks adhezyonu gibi şekillerde hücreleri öldürmüştür. Nanomateryal inkübasyonundan sonra genotoksisite dahil olmak üzere DNA hasarının indüklendiği, DNA eklentilerinin formasyonu ve hücre döngüsünün değiştiği gözlenmiştir.

In vitro testler nanomateryallerin advers etkileri açısından önemli bir rol oynarlar, *in vivo* toksisite için başlangıç oluşturup, mekanistik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılırlar. Bununla birlikte, doğal muadili ile karşılaştırıldığında mikroçevrelerde yapılan invitro testler yanlış sitotoksisite sonuçlarına yol açabilir bu nedenle insan vücudunu daha iyi taklit etmek için invivo çeşitli hayvan testleri (fare, rat vb) kullanılmıştır.

Hayvan deneyleri sırasında, fare ve ratlara, inhalasyon, intraperitoneal(i.p) uygulama, intragastrik (i.g.) uygulama ve intratrakeal insitilasyon(damlatma) gibi yollarla nanomateryaller verilebilir. Nano TiO₂ uygulamalarında ve sonrasında biyolojik dağılım ile akciğer, beyin, karaciğer, kalp ve böbrek gibi çeşitli organ ve dokularla etkileşime girer. Major olarak etkilenen organ akciğerlerdir. Akciğerdeki hasarlı bölgeler arasında hücre hasarı, alveolar makrofaj ve mikrovasküler disfonksiyon, nötrofil infiltrasyon, akciğer inflamasyonu, trombozis, alveolar septal kalınlaşma vb. görülmüştür. Beyinde nano TiO₂farelerde nörotransmitter sistemin ve eser elementlerin homeostazını bozarak boyutsal tanıma ve hafıza davranışlarını bozmuş ve beyin gelişimi, nöronal apoptozis, oksidatif stres ve uzun süre mazuriyet sonucu inflamasyon ile ilişkili gen ekspresyonunda değişimleri indüklemiştir. İ.g. uygulamadan sonra nano TiO₂ karaciğerde birikir ve fokal hepatosit apoptozuna ve hepatik disfonksiyona yol açar, histopatolojik değişiklikler yani sinuzoid alan kaybı, hidropik dejenerasyon, yağ değişikliği ve inflamasyon gözlenir. Nano TiO₂'nin böbreklerde birikiminden sonra saccus lymphaticus, proteinik sıvılar ve renal tubullerde dilatasyon, renal glomeruluslarda şişme gözlenmiştir. Daha önemlisi, i.g. uygulamalarda reproduktif sistemde dağılabilir, inflamasyon/foliküler artesia tarafından sitokin ekspresyonunun indüklenmesi aracılığıyla yumurtalık yaralanmasına ve fertilitate redüksiyonuna neden olur. Maruz kalan dişi yavrularda sinirsel davranış değişikliklerine yol açtığı gözlenmiştir.

1.4.9. Ekotoksosite

Nano TiO₂'nin gıda ürünleri ve atıksu dezenfektanı gibi tüketici ürünleri ve endüstriyel işlemlerde kullanımı ile ekotoksitenin indüklenmesine neden olabilir. Nano TiO₂'nin su içerisinde yayılmasıyla birlikte, akuatik canlılar üzerinde çeşitli defektler görüldü örneğin medakanın motalitesi yüksek oranda artmış, zebrafish solungaçları üzerindeki ribozom yapısı gen ekspresyonları ile değişmiş, şiddetli gelişme gerilikleri gözlenmiştir ve *Daphnia manga*'da üreme defektleri gözlenmiş,

UV radyasyondan sonra sucul canlılar üzerinde fitotoksisite ve çevresel nörotoksikoloji gözlenmiştir. Hidrofit için nano- TiO₂ fotosentez-ilişkili genlerin fonksiyonlarını etkilemiş ve UV ışınlarına yoluyla ROS düzeyleri artmıştır.

İlaveten, nano TiO₂ (örneğin kurşun vb.) başka metallere de etkileşime girebilir ve onların biyoyararlanımını ve akuatik çevredeki toksisiteyi modifiye edebilir. Nano TiO₂ ağır metal iyonları(örn. Zn⁺²) ile sinerjistik etki göstererek fotosentez kapasitesi ve alglerin yaşam süreleri üzerinde fitotoksisitesi artar. Zebrafish larvası üzerinde kurşunun tek başına maruziyetine göre, nano TiO₂ kompleksierildiğinde biyokonsantrasyon ve toksisite özellikle nöronal sistemde gen ekspresyonuna ve tiroid endokrin sistem bozulmasına yol açar.

Nano TiO₂ topraktaki bakteri ve karasal bitkileri de etkilemektedir. Topraktaki bakteri komünitelerinde, nano TiO₂ maruziyetinden sonra mikrobiyal biyokütle ve biyoçeşitlilik azalmıştır ve ekosistemdeki fonksiyon ve kompozisyonlarını değiştirebilir. Toprakta yetişen karasal bitkiler büyüdükçe metabolik sistemler, yaprak ve meyve sapları, tohum ve fide çimlenme, kök uzaması gibi durumlarda nano TiO₂ absorblayabilir. Toprak içine göre suda daha toksik olan bitkiler, toprağın ve çeşitli bileşenlerinin etkisini engellemek için nanotoksosite değerlendirmesinde tercih edilmiştir.

Besin zincirinde insanların üst sıralara göz önüne alındığında, ekolojik çevre insanlar için gereklidir. Su ve topraktaki nano- TiO₂ maruziyeti tarafından uyarılan bir sonuç olarak ekotoksisite insanlar ve çevre arasındaki etkileşiminden sonra sitotoksositeye çevrilmektedir.

1.4.10. Potansiyel Mekanizmalar

În vitro doğrudan nano TiO₂ hücreleri etkileyerek ROS oluşumu, mitokondriyal disfonksiyon, DNA hasarı, hücre ölümü gibi advers olayları indükleyebilir.

În vivo nano TiO₂ farklı dokulara (akciğer, karaciğer, dalak, böbrek gibi) penetre olabilir ve dağılım, metabolizma ve eliminasyon sonrasında normal hücre fonksiyonlarını etkiler.

1.4.10.1. ROS (Reaktif oksijen) Üretimi ve Oksidatif Stres(OS)

ROS üretimi nanomateryal maruziyeti sonrasında ortaya çıkan yaygın bir toksik mekanizma olarak kabul edilmektedir. Nano TiO₂dahil olmak üzere çeşitli nanomateryallerin hücre üzerine ROS üretiminin advers etkileri rapor edilmiştir. ROS birikimi biyolojik antioksidan savunma yanıtlarını (oksidan / antioksidan dengesi) bozabilir. Artmış ROS seviyesi nedeniyle GSH, dopamin (DA), dihidroksifenilasetik asit (DOPAC) ve homovanillik asitin(HVA) doza bağımlı olarak tükenmesi gerçekleşebilir. Nanomalzemeler maruziyeti tarafından oluşan ROS hızla biyolojik hedeflere (örneğin bronşiyal epitel hücreleri) zarar verebilir ve sitozolik kaspaz-3 ve kromatin yoğunlaşmasını harekete geçirerek apoptotik süreci tetikleyebilir.

Reaktif oksijen üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengesizlik, hücrelerde oksidatif stresi indükler. OS modelinde, ROS üretimi altında üç artan hücre cevabı antioksidan savunma, proinflamatuvar etkiler ve sitotoksosite kötüleşmiştir.

Yayınlanmış literatüre göre, faz II enzim oluşturucularındaki antioksidan yanıt elemanı homeostatik redoks denge yolunu düzenleyebilir. Sonra mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), AP-1 ve nükleer faktör kapa-6 sinyal zinciri sitokin ve kemokin ekspresyonunu aktive edebilir. Transkripsiyon faktörü NF-kB ve oksidana dayalı inflamatuvar sinyal seviyesinin artışı, akciğerler nano- TiO₂ ye maruz kaldığı zaman hücrel inflamatuvar cevabı indükleyebilir. Nano TiO₂transkripsiyonal ve post-transkripsiyonal yollardan IL-8 mRNA seviyelerinin yükselmesini indükleyebilir. En sonunda, mitokondriyal düzensizlik toksik OS`yi yönetir ve sitotoksik hücre ölümünü aktive eder. Kültür hücrelerinin nanomateryaller maruziyeti OS ile ilişkili genlerin(katalaz ve tiyoredoksin redüktaz gibi) aktivitesini indükler ve hücre apoptozu kaspaz-8/Bid ve mitokondriyal sinyal yolağının aktivasyonu ile tetiklenmiştir.

1.4.10.2. Organel Disfonksiyonu

Nanomateryaller(NM) çok fazla biyolojik molekülle benzer boyut ve yapıya sahiptir, bu da NM`lerin hücelere, organellere ve fonksiyonel biyomoleküler yapılara girmesini sağlar ve biyolojik sistemlerle etkileşmesini sağlar. En önemlisi, intraselüler NM`ler gözlenebilen toksisiteye sahip olabilirler çünkü hücre membranına bağlı değildir ve makromolekülle direk etkileşime girerler. Örneğin, proteinlerin NM yüzeyine adsorbsiyonu protein konformasyonunu değiştirebilir.

Sonuç olarak, proteinin abnormal davranışı bazı sinyal yollarını kısıtlayabilir bu da hücre ölümüne sebep olabilir.

Mitokondri hücrelere enerji sağlayarak yaşamlarını sağlar. Nano TiO₂ maruziyetinden sonra mitokondri membran geçirgenliği yüksek oranda değişir, bu da sitozole mitokondriden sitokrom C salınmasına neden olabilir. Mitokondriyal düzensizlik (mitokondri membran potansiyeli ve mitokondriyal hasar gibi) hücre ölümüne neden olur.

Sitoiskelet(CSK), yapısal proteinlerden oluşan sıkı bir ağıdır ve intraselüler taşıma ve hücresel division(bölünme) önemlidir. Bir invitro çalışma NM'lerin, CSK bütünlüğünü bozmasıyla hücre yaşamını etkileyebileceğini göstermiştir. Hücre penetrasyonu esnasında NM'ler kaveolin, endositoz ve adhesif etkileşimlerle sitoiskeletsel ağın normal fonksiyonunu bozabilirler.

1.5. Kozmetoloji ve Dermatolojide Nanopartiküller

Dünya çapındaki bilim merkezlerinde yürütülen nanoteknoloji araştırmalarının hızla gelişmesi nedeniyle, NP'ler gittikçe artan bir katkı maddesi veya daha önce kullanılan terapötik maddelere bir alternatif haline geliyor. Nanoteknoloji alanında Amerika ve Avrupa ülkeleri AR-GE çalışmaları ile ön sıralardadır. 2012 yılında nanoteknoloji kullanan kozmetikler için küresel pazarın yaklaşık 155,8 milyon dolara ulaşacağı öngörülmektedir. Biyoloji ve tıp gibi sağlık alanları ve nanoelektronik, nanomalzemeler gibi teknolojik alanlardan nanoteknolojinin çok hızlı gelişim göstermiştir. Endüstri tarafından üretilen ana NP'ler, AgNP'ler, Al₂O₃NP'ler, γ -Fe₂O₃NP'ler, Fe₃O₄NP'ler, SiO₂NP'ler,

TiO₂NP'ler ve ZnONP'lerdir. Küresel olarak, yukarıda belirtilen NP çeşitlerinin üretimi yılda birkaç ton oldu. NP içeren ürünlerin popülerliği en iyi satış istatistikleri ile gösterilmektedir. Nanopartiküller kozmetik ürünlerin içerisinde 2006 yılındayalnızca % 5 oranında bulunmaktaydı. Bu tarihten itibaren günümüze kadar nanopartikül içeren kozmetik ürünlerinin satışlarından elde edilen gelir çok çarpıcı bir şekilde artmıştır. Ürün dağılımı için yapılan anket sonuçlarına göre, kozmetik ürünlerinin TiO₂NP'lerin yaklaşık% 70-80'ini, ZnONP'lerin% 70'ini ve AgNP'lerin% 20'sini içerdiğini gösterilmiştir.

Nanoteknoloji, aynı zamanda cilt bakımı ve güzellik alanında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Nano ölçekli yapıların benzersiz özelliklerinden birinin, yani yüksek yüzey alanından hacim oranına sahip olmasının, ultraviyole ışığını bloke etme kabiliyetine katkıda bulunduğu bulunmuştur. Fonksiyonelleştirilmiş nano boyutunda materyallerin ilaç ve sağlık sektörü alanında(cilt kanseri, melanomagibi hastalıkların hedef tedavisinde) kullanılır. Ayrıca, kozmetikte sabunlar,kremler, şampuanlar, deodorantlar, renkli kozmetikler gibi kozmetoloji ve dermatolojideki artan pazarlama rekabeti nedeniyle, şirketler, örneğin nanopartiküller gibi yeni içeriklerle ürünleri farklılaştırmaktadırlar.

1.6. Güneş Koruyucular

Güneş kremleri, cildi güneş ışınlarının maruz kalma üzerindeki zararlı etkilerinden korumak için yaygın olarak kullanılır. Çinko oksit (ZnO) ve titanyum dioksit (TiO₂), cildi güneş hasarlarından koruyan, onaylanmış en etkili mineral bazlı bileşendir. Bu mineraller cilt üzerinde materyalist bir bariyer oluşturur, UVA ve UVB ışınlarının derinin derinden aşağıya nüfuz etmesini engelleyerek güneş ışınlarını yansıtır ve daha az tahriş edicidir. Geleneksel güneş koruyucularının ana dezavantajı, uygulandığında cilt üzerinde beyaz kireçli bir tabaka bırakmasıdır.

Nanoparçacıklar tam olarak burada devreye girmektedir. Geliştirilmiş güneşten koruyucular nanoteknolojinin yenilikçi kullanımlarından sadece bir tanesidir. ZnO veya TiO₂ nanoparçacıklarını kullanan güneşten koruyucu ürünler şeffaf, daha az yağlı ve daha az kokulu olup estetik çekiciliği arttırmıştır.

Titanyum dioksit (TiO₂) ve çinko oksit (ZnO) nanoparçacıkları (NP) içeren güneşten koruyucu maddeler, UVB-hasarlı ciltte yer almaları konusunda çok az şey bilinmesine rağmen, ultraviyole B (UVB) hasarına karşı etkili engellerdir (Monteiro-Riviere, N. A. ve ark., 2011).

Deri kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde, yılda 1 milyondan fazla vakanın solar ultraviyole (UV) radyasyonu ile ilişkili bazal hücre ve skuamöz hücreli karsinomlar tanısı konduğu en sık görülen kanser türüdür (American Cancer Society, 2009; Armstrong ve Krickler, 1993). Melanom cilt kanseri insidansı önemli ölçüde artmaktadır ve 25 ila 29 yaş arasındaki en yaygın kanserdir (National Cancer Institute, 2006). Cilt kanseri, güneş yanığı, fotoyaşlanma ve cilt kırışıklıklarını önlemek için güneş koruyucu kullanılması önerilir. Geleneksel güneş koruyucuları, sürekli tekrar uygulama gerektiren ve cilt tahrişine neden olabilecek kimyasalları içerir. Çinko oksit (ZnO) losyonları daha uzun süreli tahriş edici olmayan geniş spektrumlu fiziksel güneş kremi sağlar. Bununla birlikte, büyük ZnO partikülleri, kozmetik olarak çekici olmayan beyaz bir bariyere neden olur. Günümüzde, etkili geniş spektrumlu fiziksel güneş kremi sağlamak için güneşten koruyuculara 100 nm'den az nanoscale titanyum dioksit (TiO₂) ve mikronize ZnO nanoparçacıkları (NP) dahil edilmiştir (Monteiro-Riviere, N. A. ve ark., 2011).

Borm ve diğ. (2006), cilt bakım ürünlerinde kullanılmak üzere küresel TiO₂ ve ZnO üretiminin 2003 ve 2004 yıllarında 1000 ton olduğunu tahmin etmektedir. İVillage tarafından yapılan 2007 tarihli bir ankete katılanların% 11'inin her gün bir

tür güneş kremi kullandığı,% 59'unun ise ara sıra güneş koruyucu kullandığı tespit edildi. (Cilt Kanseri Vakfı, 2007). Bu verilerin ekstrapolasyonu, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 33 milyon insanın günde bir güneş koruyucu ürünü kullandığını ve 177 milyon kişinin ara sıra güneş koruyucu kullandığını gösteriyor. Bu yaygın kullanım ve güneşten koruyucularda TiO₂ veya ZnO NP maruziyeti potansiyeli ile ilgili endişeler, canlı keratinositlerle temas etmek için stratum corneum (SC) cilt bariyeri boyunca olası penetrasyonlarına odaklanmıştır. Genellikle güneş kremleri, suya batırılmış cilde veya SC'nin bütünlüğünün bozulabileceği ciddi yanmış cilde uygulanır. Avrupa Birliği (AB) Kozmetik ve Gıda Dışı Ürünler Bilimsel Komitesi (SCCNFP, 2000), NP'nin in vitro veya in vivo cilt penetrasyonu kanıtı bulamayan TiO₂ güvenliği hakkında fikir verdi. Bununla birlikte, 2007 yılında AB Tüketici Ürünleri Bilim Komitesi tarafından yayınlanan kozmetik ürünlerdeki nanomalzemelerin güvenliği, nanolaşmış TiO₂ güvenlik değerlendirmesinin anormal cilt koşullarını ve mekanik etkilerin cilt penetrasyonu üzerindeki olası etkisini dikkate alması gerektiğini belirtti (SCCP, 2007). . ZnO hakkında daha önceki bir görüş, mikronize ZnO'nun perkütan absorpsiyonu konusunda güvenilir veri bulunmadığını tespit etti (SCCNFP, 2003). (Monteiro-Riviere, N. A. ve ark., 2011)

Deri kanserinin görülme sıklığı ve prevalansı arttıkça, dermatologlar hastalarına güneş koruyucuları daha sık tavsiye etmektedir. Bununla birlikte, güneşten koruyucuların çoğunda titanyum dioksit ve çinko oksit nano-tanecikli partiküllerin güvenliği hükümetlerden ve kamuoyundan inceleme altına alınmıştır (Newman, M. D. ve ark.,2009).

Nanoteknoloji, 100 nm'nin altındaki materyallerin kontrolünü inceleyen hızla gelişen bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji, cilt bakımı ve kişisel hijyen dahil olmak üzere birçok yaşam ve tıp alanında uygulanabilir. Metallerin ve metal oksitlerin nanoparçacıkları (NP'ler) dermatolojide ve kozmetikte, özellikle bakteriyel ve fungal enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde, güneşin potansiyel toksik etkilerine karşı korunma amaçlı ve onarımın hızlandırılmasıyla lekelerin görünümünü azaltan

ürünlerde son zamanlardasıklıkla kullanılmaktadır.. NP'ler ayrıca cilt bakımı ve dermatolojik tedavilerde hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için kullanılabilir. Nanodermatoloji ve nanokosmetoloji sayesinde etkin, güvenli, hızlı ürün formülasyonları sunar. Bu sayede günümüze kadar kullanılan ürünlerin istenmeyen etkilerini minimuma indirir. Nanopartiküllerin bazı özellikleri (partikülün küçük olması ile büyük yüzey alanı ve biyolojik bariyerlere nüfuz etme özelliği) sayesinde; sistemik dozu büyük ölçüde azaltılabilir, böylece potansiyel istenmeyen etkiler ve toksisite de azalır.

Hastanın yaşam kalitesini (QOL) azaltan en hızlı büyüyen problemlerden biri cilt hastalıklarıdır. Sorunun ölçeğinin koroner arter hastalığı, astım veya diyabet ile karşılaştırılabilir olduğu belirtilmektedir. QOL, sıklıkla uzun süreli tedavi gerektiren görünür cilt lezyonlarından kaynaklanır ve tedaviden sonra sık sık izler kalmasına neden olur. Bu nedenle, dermoaktif maddeler üzerinde önemli araştırmalar yapılmakta olup, etkili, güvenli ve yüksek hızlı preparatlar aranmaktadır ve nanoteknoloji tarafından nano ölçekte üretilen NP'ler bu preparatları formüle etmek için iyi adaylar olabilir.

Nanopartiküllerin yüksek yüzey alanı / hacim oranı ve biyolojik bariyer ve hücre membranları yoluyla kolayca nüfuz etme özelliklerine sahip olmaları, dermatoloji ve dermo-kozmetoloji gibi birçok sağlık alanında uygulama oranlarını arttırmıştır. Gerçekten de, NP'ler dermal ilaç dağıtım sistemlerinde, kremlerde, yara izlerinin görünmesini azaltabilecek koruyucu maddeler, cilt onarımı sürecini hızlandırarak, güneş kremlerinin yanı sıra dermatolojik hastalıkların ve çeşitli dermatolojik preparatların veya dermo kozmetik ürünlerin teşhisinde görüntüleme tekniklerini hızlandırabilir . Nanopartikül içeren ürünlerin kullanımının artması, insan derisi hücrelerinin maruziyetini arttırmıştır. NP'lerin cilt bakımında artan uygulamaları, Nanoteknoloji Derneği'nin nanoteknolojinin bilimsel ve tıbbi yönlerinin cilt sağlığı ve bozukluklarına daha iyi anlaşılmasını ve bilgi aktarılmasını sağlamak için 2010 yılında Nanodermatoloji Derneği'nin kurulmasına yol açmıştır.

Çeşitli NP'ler arasında, metal NP'ler ve bunların oksitleri, geniş biyolojik aktivite yelpazesi ve eşsiz fizikokimyasal özellikler nedeniyle, dermatolojik hastalıkların tanı ve tedavisinde ve kozmetiklerde büyük ilgi görmüştür.

1.7. UV Filtresi Olarak Nanopartiküller

Cildin görünümünü ve sağlığını etkileyen en yaygın etkenlerden biri UV radyasyonudur. Güneş ışığına maruz kalmanın etkileri, kızarıklık ve güneş yanığı (vücudun doğal savunması) görünümü, cilt kanseri oluşumu gibi daha tehlikeli etkilere yol açabilir. Ayrıca ışığa aşırı duyarlılığın neden olduğu hastalıklar artan oranda ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle UV etkilerinden koruyan ürünler cilt hastalıklarının önlenmesinde büyük yer almaktadırlar. Cildi korumak için formülasyonlardaki ana bileşen UV filtreleridir. UV filtreleri için en önemli malzemelerden biri TiO₂NP'lerdir. Bu nanopartiküller, UV ışınımının varlığında yüksek bir stabilite ve 365 nm dalga boyunda (UVA ışınımına karşılık gelen uzunluk) ışınım emme kabiliyeti ile karakterize edilir. TiO₂NP'lerin ayrıca 200 ila 400 nm arasındaki radyasyonu emdiği görülmüştür. Ek olarak, bu NP'lerin preparasyona (krema, losyon vb.) Eklenmesinin hem UVA (320-400 nm) hem de UVB'ye (280- 320 nm) karşı koruyucu özelliklerini genişleteceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, TiO₂NP'ler cildi tahriş etmez ve bazı antialerjik özellikler gösterir. Üstelik, bu NP'ler, TiO₂NP'ler tipik olarak stratum korneumda birikirken, cilt içine nüfuz etmez. Çinko oksitlerde güneş koruyucu kremlerde filtreler olarak kullanılabilir. TiO₂NP'lere benzer şekilde, ZnO'nun NP'leri, UVA olan 380 nm'ye kadar dalga boyuna sahip güneş ışınımını emer. Tercih edilmelerinin sebebi, yüksek dayanıklılık ve cilt üzerinde beyaz izler bırakmamasından kaynaklanmaktadır. Hem TiO₂NP hem de ZnONP'ler ayrıca cildi fiziksel özelliklerinden korurlar. Deride zararlı radyasyonu yansıtan bir mikroayna görevi gören aglomeralar oluştururlar. (Niska K. Ve ark,2018)

1.8. Nanopartiküller ve Cilt Kanserleri

Deri kanseri, en ölümcül malign hastalık şekli olmamasına rağmen, Amerika ve diğer ülkelerdeki Kafkas ırkında en yaygın görülen malign neoplazmı temsil eder. Örneğin Polonya'da yapılan bir çalışmada kanser vakalarının % 8 ila 10 aralığında cilt kanseri olduğu ve bu sayının daha da artacağı düşünülmektedir. Bazal hücreli karsinom; tüm cilt kanserleri içerisinde dörtte üçlük bir oran ile en fazla rastlanan malign tümördür. Bununla birlikte, en yüksek ölüm sayısı esas olarak skuamöz hücreli karsinom ve malign melanomdur. Deri kanseri oluşumundan sorumlu en önemli risk faktörü, güçlü ultraviyole radyasyona ve güneş yanığına maruz kalmaktır. Bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli cilt kanseri için baskın risk faktörüdür. İyonlaştırıcı radyasyon ve arsenik, pestisitler, herbisitler veya aromatik hidrokarbonlar gibi bazı kimyasal maddeler de normal hücrelerin kötü huylu hücrelere dönüşümüne neden olabilir.

Bu tür bir dönüşümün moleküler mekanizması / mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamıştır. Melanom durumunda, melanositin displastik hücrelere aşamalı dönüşümünün kanser hücrelerinin görünümüyle sonuçlandığı varsayılmıştır. UV radyasyonu ayrıca insan derisi hücrelerinde DNA'nın oksidatif hasarını indükleyebilir ve melanom ve melanom dışı cilt kanserinin patogeneğinde önemli bir rol oynayabilir. Bu nedenle, cilt kanseri gelişimine karşı korunmak için mikromirror görevi görecek ve cildi hem UVA hem de UVB radyasyonuna karşı koruyacak etkili kimyasal veya fiziksel filtreler için sürekli bir araştırma vardır. Metal ve metal oksitler ZnONP'ler ve TiO₂NP'ler gibi NP'ler cilt koruyucu olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, bu NP'ler cilt üzerinde bazı toksik etkiler de gösterebilir. Örneğin, metal NP'lerin UV radyasyonu ile etkileşimleri, bu NP'lerin fototoksik ve fotoalerjik etkilerini artırabilir. ZnONP'lerin ve TiO₂NP'lerin, cildin foto kanserojenitesi ve yaşlanmasında önemli rol oynayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına katkıda bulunabileceği bulunmuştur. NP'lerin indüklediği ROS oluşumuna temel olarak üç faktör neden olur: NP'lerin reaktif yüzeyindeki pro-

oksidan fonksiyonel gruplar, geçiş metali NP'nin geçişi nedeniyle NP yüzeyinde aktif redoks döngüsü ve partikül hücre etkileşimleri. UV radyasyonu üzerine, nanoyapılı ZnO / TiO₂ elektron uyarma ile sonuçlanan fotosekslenir. Ortaya çıkan eksitonlar veya elektron deliği çiftleri, bir radikal oluşturmak üzere yüzeye bağlı moleküllerle (anlık oksijen veya su için) reaksiyona girebilir. Örneğin, fotosekslenmiş ZnONP'ler, hidroksil radikalini (OH) ve daha az miktarda süperoksit anyonunu (O⁻) ve ayrıca tekli oksijeni (1O₂) üretebilirler. TiO₂ NP'ler, O⁻, OH ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi ROS oluşturabilen elektron deliği çiftleri oluşturur. Ek olarak, NP'ler mitokondriyal solunum zincirinin bozulması ve NADPH benzeri enzim sistemlerinin aktivasyonu ile hücre içi ROS oluşumunu indükleyebilir. Sonuç olarak, NP'lerin ürettiği oksidatif stres, DNA bölünmesine neden olur, lipid peroksidasyonunu indükler ve endojen DNA eklentileri (8-OHdG) üretir. Bu nedenle, NP radyasyonun varlığında NP'lerin cilt hücreleri üzerindeki etkilerini netleştirmek için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

1.9. Hücre Kültürü

Hücre kültürü ile çalışmalar, ilk olarak Harrison tarafından 1907 yılında hayvan hücreleri kullanılarak, canlı vücudunun dışında inceleyebilmek amacıyla bulunmuştur. Organizmanın dışında hücrelerin kültürünün yapılabilmesi, vücudun normal homeostazisi ile oluşabilecek sistemik değişikliklere yol açabilmesi ve bu değişikliklerin araştırmalar üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerinden bağımsız olarak, hücreyi inceleme imkanı yaratmıştır (Koçaklı ve ark., 2015).

Harrison'dan sonra da hücre kültürü ile çalışmalar farklı araştırmacı grupları tarafından geliştirilerek uygulanmıştır. Earle ve arkadaşları, 1943 yılında farelerde tümör hücrelerini izole ederek çalışmalar yapmışlardır. Leonard Hayflick ise 1961 yılında hücrelerin, kültür ortamında sınırlı yaşam süresine sahip olduklarını göstermiştir (Koçaklı ve ark., 2015). Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı

dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşamalarının ve çoğalmalarının sağlanmasıdır (Tuncer ve Demirci, 2011).

Bu amaçla insan, maymun, fare, sıçan ve tavşan gibi çeşitli canlıların; böbrek, karaciğer, akciğer, amniyon zarları gibi dokuları önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Ayrılan bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon çözeltileri, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besi yeri sıvılarda süspansiyon hazırlanılarak steril tüp veya uygun kaplara koyulur. Bu hücre süspansiyonu 37 °C'de bekletildiğinde hücreler, buldukları kabın yüzeyine tutunarak çoğalırlar. Çoğalma sonucunda oluşan bu yapıya *hücre kültürü* adı verilir (Haboken; John Wiley ve Sons.,2015; Candan Ç., 2006).

Hücre kültürü çalışmalarında genellikle iki tip hücre kullanılır. Bu hücreler, *primer hücreler* ve *devamlı hücre hatlarıdır*. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan alınan hücrelerin 1 günden daha uzun süre çoğaltılmasıyla elde edilir. Fibroblast hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri primer hücre kültürüne örnektir. Devamlı hücre hatları ise sınırsız üreyebilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir. Laboratuvar çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblast hücreleri (L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleridir (HeLa) (Tuncer ve Demirci,2011). Ayrıca insan ve hayvan pulpa hücreleri, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatları da kullanılmaktadır (Schmalz G ve Bindslev D.A., 2009; Haboken, John Wiley ve Sons, 2005; Helgason C.D. ve Miller C.L., 2005).

Aşağıdaki tabloda primer hücre kültürü ile devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.9.1. Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları (Tuncer ve Demirci, 2011)

	<u>AVANTAJ</u>	<u>DEZAVANTAJ</u>
PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ	<ul style="list-style-type: none">• Süresiz çoğalabilme özelliğine sahiptir.• Başka kültürlere ekilip çoğaltılabilir.	<ul style="list-style-type: none">• İnsandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması zordur.• Stabil fenotipe sahip değildir.
DEVAMLI HÜCRE HATTI	<ul style="list-style-type: none">• Kolaylıkla çoğaltılabilirler.• Daha stabil bir fenotipe sahiptir.	<ul style="list-style-type: none">• İn vivo özelliklerinin tümünü koruyamazlar.

Birçok araştırmaya olanak sağlayan hücre kültürünün, çeşitli avantajları ile birlikte dezavantajları da mevcuttur (Koçaklı ve ark., 2015). Aşağıdaki tabloda hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.9.2. Hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları (Koçaklı ve ark., 2015)

<u>AVANTAJ</u>	<u>DEZAVANTAJ</u>
<ul style="list-style-type: none">• Fizikokimyasal koşulların kültür ortamında kontrolünün sağlanabilmesi (Sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂, CO₂ yoğunluğu...)• Fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesi• Özel bir hücre tipi üzerinde çalışılmasına olanak sağlaması• Pasajlama işlemi ile istenilen asıl homejen hücrenin elde edilebilmesi• Başka araştırmalarda ve tekrarlı deneylerde kullanmak üzere, hücrelerin uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmesi	<ul style="list-style-type: none">• Kültür çalışmalarında kontaminasyon riskinin bulunması• Kültür ortamında mantar ve bakteri bulunması• Uzun süre pasajlama işlemi durumunda hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve• heterojenite oranlarında artış meydana gelmesi• Uygun steril koşulların sağlanmasındaki zorluklar

Tez çalışmamızda, insan cilt hücre hattı olarak HaCaT hücresi kullanılmıştır.

1.10. Tezin Amacı

Günlük yaşantımızda her gün maruz kaldığımız ve güvenli olarak düşündüğümüz her kimyasal maddenin aslında yüksek dozlarda toksik olabileceği, toksikoloji biliminin her zaman göz önünde bulundurduğu en temel prensiptir. Bu noktadan hareketle, tehlikeli kimyasal maddelerin sınıflanması ve etiketlenmesi esnasında, özellikle kimyasal maddelerin oluşturabileceği toksik etkiler değerlendirilirken, insanların iş yerlerinde veya günlük yaşam koşulları içinde maruz kaldıkları maksimum konsantrasyonların belirlenmesi ve özellikle bu konsantrasyonların toksik etki oluşturup oluşturmadığının bilinmesi büyük önem kazanmıştır.

Tezimizde insan sağlıklı cilt hücresi olan HaCaT hücreleri güneş preparatlarında sıklıkla kullanılan metal oksitli nanopartiküllerden TiO₂ nanopartikülü ile maruz bırakıldıktan sonra kromozomlarda meydana gelebilecek değişikliklerin gözlenmesi amaçlanmıştır. Bu basamaktaki amacımız, güneş koruyucu preparatlarda sıklıkla kullanılan nanopartiküllerden olan TiO₂-NP'nin insan cildinde neden olabileceği hasarı invitro şartlarda taklit edip değerlendirmektir.

Kromozomal hasar, laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan mikroçekirdek testi ile değerlendirilmiştir. Kromozomal hasarın karakterizasyonu için ise laboratuvarımızda CREST testi uygulamaları ilk olarak bu proje ile gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında uyguladığımız MN frekanslarının araştırıldığı sitogenetik yöntem oldukça sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu testten elde edilen sonuçlar ile sağlık riskleri (kanser gibi) arasında bugüne kadar bir ilişki kurulamamış olmasına rağmen, maruz kalınan kimyasal maddenin genetik materyali etkileyebildiğini

göstermeleri açısından biyoizleme çalışmalarında oldukça sık olarak kullanılmaktadır.

Mikronükleus testi mitoz sırasında bölünen hücrenin çekirdeğinden hasar sonucu kopan kromozom parçalarının veya ayrılan tam kromozomların görülmesine dayanan, genotoksik etkinin araştırılmasında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Pahalı olmaması, hızlı sonuç alınması, güçlü bir istatistiksel sonuç elde edilmesi (mikroskopta 1000 hücre değerlendirildiği için) açısından oldukça avantajlı bir yöntemdir. CREST analizleri ise ülkemizde henüz yaygın olmayan bir yöntemdir; bu yöntem MN testleriyle birlikte, oluşan mikroçekirdeklerin klastojenik/anojenik mekanizmasının ayırımına olanak verir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Maddeler

- Fötal Calf Serum (Sigma, ABD)
- L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin (Sigma, ABD)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Glasiyal asetik asit (Merck, Almanya)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)(Sigma, ABD)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Biological Industries, İsrail)
- Akridin orange (Sigma, ABD)
- Titanium IV oxide, dispersion (Sigma, ABD)
- 1.Antibody: Pozitif kontrol sentromer serumu (Davis, ABD)
- 2. Antibody: FITC konjuge IG (Santa Cruz, ABD)
- Tween 20 (Sigma, ABD)
- .Fluor Preserver reagent (Calbiochem, ABD)
- Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail)
- DAPI : 4',6- diamidin-2-fenilindol-dihidroklorid (Sigma, ABD)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

- Karbondioksitli 37°C inkübatör (Heal Force HF240, Çin)
- Santrifuj cihazı (Hettich Rotina 90, Almanya)
- pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
- İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600,Avusturya)
- Fluoresan Mikroskop (Leica 1000, Almanya)
- Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
- Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C), (Scancool, Almanya)
- Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
- Buz makinası (Hoshizaki ,Avrupa)
- Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
- Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)

2.2. Mikroçerdek Yönteminde ve CREST Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Besi yeri ortamı: 500 ml DMEM üzerine 50 ml (%10) FBS ve 5 ml (%1)

penisilin/streptomisin eklendi, +4 °C' de saklandı.

Hipotonik potasyum klorür (KCl) çözeltisi: 1.397 g potasyum klorür 250 ml suda çözüldü.

Sabitleme çözeltilisi (Carnoy's Fiksatif): 300 ml metanol 100 ml glasiyel asetik asit (3:1 oranında) karıştırıldı. Taze olarak hazırlanarak -20 °C 'ye gelmesi sağlandı.

Akridin orange çözeltilisi (0.2 mg/ml) : 5 ml akridinorange(1mg/ml), 7 ml 0.3 M KH₂PO₄, 7 ml 0.3 M Na₂HPO₄*2H₂, 80 ml distile su ile çözümlenerek hazırlanarak 1:2 oranında suyla seyreltildi. +4 derecede karanlıkta Al folyo ile sarılarak saklandı.

Stop medyum: Tripsinin çalışmasını nötralize etmek amacıyla %60 DMEM, %40 FCS karıştırılarak hazırlandı.

Boyama çözeltilisi: 1 mg/ml DAPI + 0.1 mg/ml propidyum iyodür, 3:1 oranında karıştırılarak kullanılır.

Tween-PBS Çözeltilisi: 5 mL Tween 20 üzerine 95 mL PBS ilave edilerek hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

1. Antibody (sentromer serumu):1:50 oranında PBS/0.2% Tween 20 ile seyreltilerek hazırlandı.

2. Antibody(FITC-conjuge IgG): 1:100 oranında PBS/%0.5 Tween 20 çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlandı.

KCl çözeltilisi:%4'lük çözeltilisi hazırlandı, +4 °C' de saklandı.

Boyama çözeltisi: 1 mg/ml DAPI + 0.1 mg/ml propidyum iyodür, 3:1 oranında karıştırılarak kullanılır.

2. 3. TiO₂ nanopartikülü ile ilgili ön çalışmalar

Kullanmış olduğumuz TiO₂-NP'nün etiket bilgisi şu şekildedir;

- Titanium IV oxide, mixture of rutile and anatase, <100 nm particle size, dispersion (Sigma Aldrich)

Partikül büyüklüğü ölçümleri Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır. TiO₂ nanopartikülünün test edilecek maksimum konsantrasyonu olan 100 µg/mL'de zeta potansiyeli ve dağılımı Zeta Sizer kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, Bilkent Üniversitesi UNAM (Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi)'nde yapılmıştır.

2.4. Hücre Kültürü

Öncelikle sıvı azotta saklanan hücreler çıkarılmıştır.

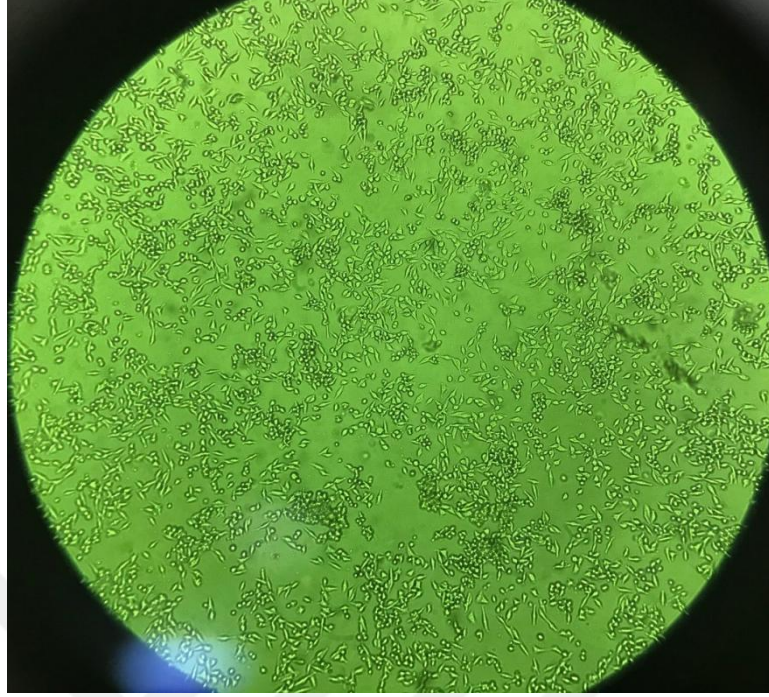
HaCaT hücrelerinin çoğaltılması:

- Sıvı azottan çıkarılan hücrelerin 37 °C’de hızlıca çözünmesi sağlandı.

- Hood (Laminar Air Flow) altında 15 ml’lik steril santrifüj tüpünde 10 ml (37 °C) DMEM medyum içerisine aktarıldı. 1300 rpm’de, oda sıc. 5 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz pastör pipeti yardımıyla steril koşullarda vakumla atıldıktan sonra alt fazdaki hücrelerin üzerine 10 ml DMEM medyum ilave edildi. Hücreler medyum içerisine pipetle çek-bırak yöntemi kullanılarak homojen olarak dağıtıldı. Hücrelerin hepsi alınıp 25 cm²’lik flaskla inkübatöre kaldırıldı (37°C, % 5 CO₂). Azottan çıkan hücrelerin ürememe, çoğalmama olasılığına karşı pasajlama işlemini birkaç kez tekrarladıktan sonra hücrelerin düzenli çoğalıp çoğalmadığına bakıldı.

3 günde bir hücreler tripsinlenerek yeni besiyeri ortamına ilave edilerek pasajlanmıştır. Hücrelerin düzenli üredikleri kontrol edildikten sonra, analizler yapılmıştır (analizler sırasında da bu pasaj işlemi tüm analizler bitene kadar devam ettirilmiştir).



Şekil 2.4.1. HaCaT hücrelerinin mikroskop altında görüntüleri

HaCaT hücrelerinin pasaj işlemi:

- Flasktaki DMEM medyum aspire edildi.
- 2 ml steril PBS (37°C) ile yıkandıktan sonra, PBS aspire edildi
- 2 ml tripsin (37°C) konulduktan sonra ve 37°C’de 6-8 dakika bekletildi
- 2 ml STOP medyum ilave edildi ve hafifçe çalkalandı (tripsinin çalışmasını durdurmak için).
- Bu 4 ml’lik hücre suspansiyonu pastör pipet ile 15ml’lik tüpe aktarıldı.
- 1000rpm oda sıc. 6-7 dak santrifüj edildi
- Tüpün dibinde görünen pellete dokunmadan üst fazı pastör pipet ile atıldı.
- Pelletin üzerine bir miktar (yaklaşık 2 ml) DMEM medyum ilave edildi.

- Pastör pipet ile çek-bırak şeklinde karıştırıldı ve hücre sayımı yapıldı.
- Yeni pasaj için 5ml DMEM medyum içerisinde 300.000 hücre olacak şekilde flaska konuldu.

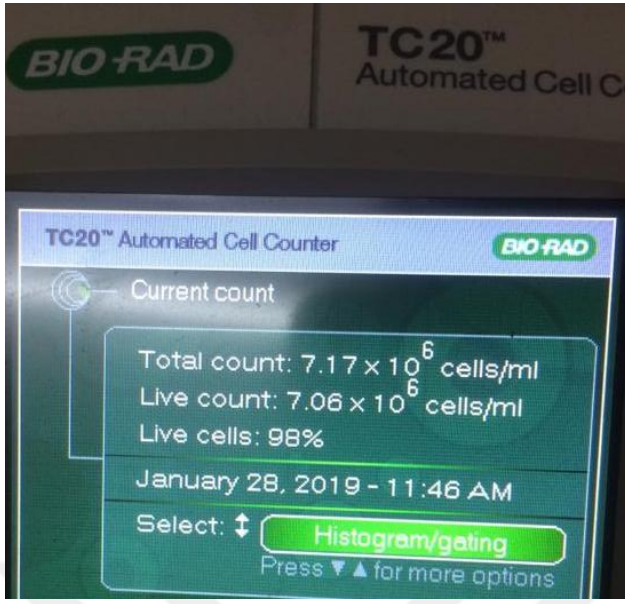
Hücrelerin sayılması:

Tezimizde kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya atılım yöntemi kullanılarak belirlendi.



Şekil 2.4.2. TC 20 cihazı, kullanılan sayım lamaları ve tripan mavisi

Bu yöntemde; hücre süspansiyonu %0.4'lük tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, sayım lamı üzerine yüklenerek TC-20 cihazı ile hücre sayımı yapıldı.



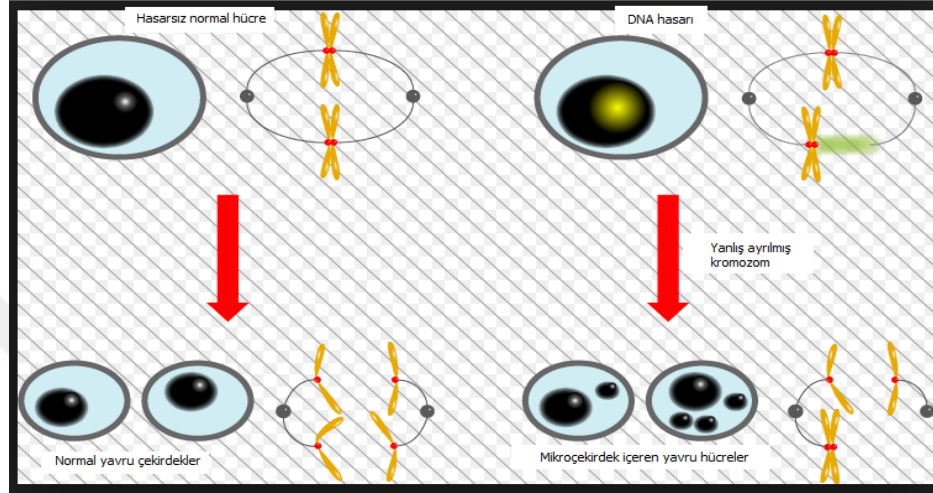
Şekil 2.4.3. TC20 sayım cihazında 1mL süspansiyondaki canlı hücrelerin sayısı

2.5. Mikroçekirdek Testi (Micronucleus Test, MN)

Mitoz bölünmenin anafaz evresinde sentrik kromozomlar kutuplara çekilirken, genotoksik hasar sonucu oluşan asentrik kromozomlar veya kromozom parçaları kutuplara çekilemeyerek geride kalırlar. Bu kromozomlar hücre bölünmesi sonunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar. Bu yapılara *mikroçekirdek* denir. MN, genotoksik maddelere maruz kalan popülasyonlarda moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarlarda yaygın olarak kullanılan önemli bir in vivo ve in vitro biyobelirteçtir.

Howell-Jolly cisimleri olarak da bilinen mikroçekirdek (MN) terimi, 1951 yılında anafazın geç evrelerinde ana çekirdekten atılan asentrik fragmanlarla ilgili olarak tanıtılmıştır. MN'ler iki mekanizma yoluyla oluşturulabilir: kromozomal kopmalar (klastogenez) veya mitotik aparatın bozulması (aneugenezis). Bu nedenle,

anti-kinetokor antikoru kullanılarak, belirli bir ilacın klastogenez veya aneugenezis yoluyla MN oluşumunu indüklediğini doğrulamak mümkündür. MN'lerde kinetokorun bulunmaması klastojenik etkiyi gösterirken, bunun varlığı, anojenik etkiyi gösterir(Araldi R.P. ve ark., 2015).



Şekil 2.5.1. Mikroçekirdek testinin prensibi

Mikroçekirdekli hücrelerin sıklığındaki artış, indüklenmiş kromozom hasarının bir göstergesidir (Chen, N., ve ark., 2014). Mikroçekirdek ya çekirdek kromozom fragmanlarından ya da hücre bölünmesi sırasında ek çekirdeklere dahil edilmeyen bütün kromozomlardan / kromatidlerden kaynaklanır. Bu nedenle, mikroçekirdek deneyi, hem klastojenleri hem de kromozomların düzenli olarak mitoz dağılımını etkileyen ajanları tespit edebilir. Bununla birlikte, tahlil, test edilmiş bir bileşik tarafından indüklenen nükleer bozukluğun niteliğini karakterize edilememiştir. Kromozom kırılmasından kaynaklanan mikroçekirdekler ile farklı ajanlar tarafından indüklenen mikroçekirdeğin DNA içeriğini ölçerek iş fonksiyon bozukluğundan kaynaklananlar arasında ayırım yapmak için birçok girişimde bulunulmuştur (Degrassi, F. ve Tanzarella,C., 1988).

Mikroçekirdek testinin uygulanışı:

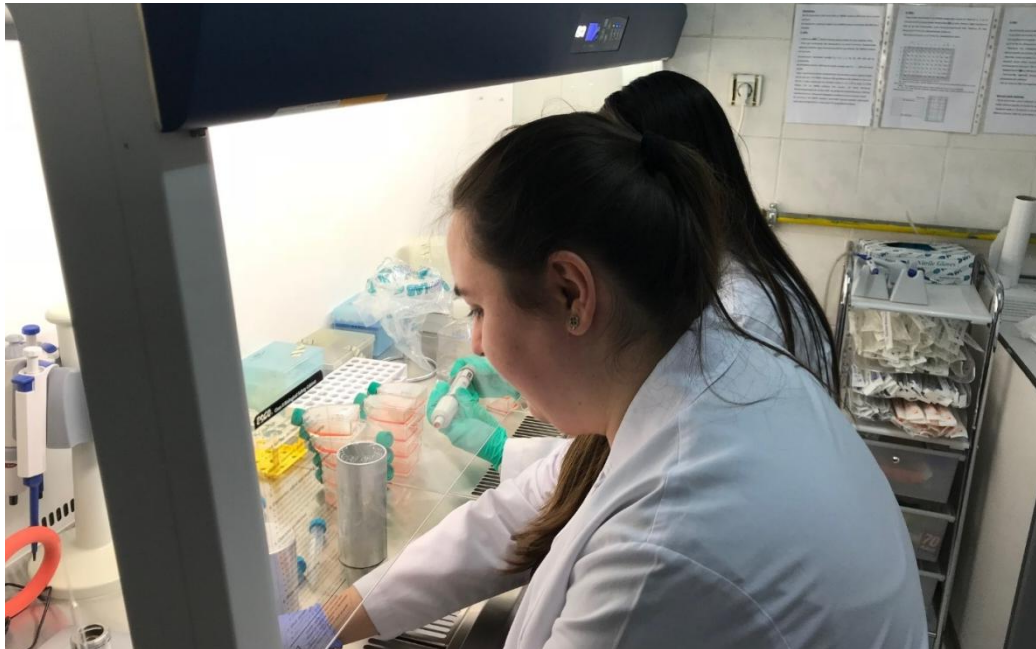
1. HaCaT hücrelerine TiO₂ uygulanması:

TiO₂ nanopartikülünün 5, 10, 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları hazırlanarak HaCaT hücrelerine uygulanmıştır.

2. HaCaT hücrelerine pozitif kontrollerin uygulaması:

MMC (mitomisin, klastojenik ajan), VCR (Vincristin, anojenik ajan) ve 4-NQO (4-nitroquinolin 1-oksit, klastojenik ajan) uygulaması yapılmıştır.

HaCaT hücreleri 1 milyon/5ml flasklara ekim yapılarak MN testi yürütülmüştür.



Şekil 2.5.2. MN testinde 5mL'lik flasklarda test kimyasallarının ve kontrollerin maruziyet aşaması

Flasklar 37°C'lik inkübatöre koyularak 24 saat beklendi. 24. saatte flasklar inkübatörden alındı ve laminar air flow altında her bir tüpe uygun konsantrasyonda test kimyasal maddeleri ve pozitif kontroller eklendi. Kimyasal madde maruziyetinden 24 saat sonra flasklar inkübatörden alındı ve pasajlama aşamasındaki gibi tripsinlenerek test tüplerine alındı. Daha önceden hazırlanan ve çalışmadan en az bir saat önce +4°C'de bekletilip soğutulan % 0.4 KCl çözeltisi tüplerin hacmi 5 ml'ye gelecek şekilde damla damla ilave edildi. Tüpler bu şekilde 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Fiksasyon:

Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika sanrifüj edildi. Pastör pipet ile süpernatant atıldı ve tüpler elle karıştırıldı. Çalışmadan bir saat önce taze olarak hazırlanıp buzdolabında bekletilip soğutulan fiksatif çözeltisi vorteksleme esnasında pastör pipetle toplam hacim 5 ml olana kadar ilave edildi. Tüpler bu şekilde oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika sanrifüj edildi. Fiksasyon işlemi 2 kez daha tekrarlandı. En son santrifüjden sonra pastör pipet ile süpernatant atıldı ve tüpler karıştırıldı. Daha önceden temiz ve yumuşak bir bezle silinen lamalar üzerine hücreler damlatıldı. 100 °C'lik ısıtıcı üzerine tutularak kurutuldu.

Boyama ve Mikroskopta İnceleme:

Lamalar üzerine Akridin Orange Çözeltisinden damlatıldı ve lamel kapatılarak fluoresan mikroskopta incelendi. Her bir konsantrasyon için hazırlanmış olan 2 adet lamda 1000'er hücre içerisindeki mikroçekirdek sayıları kaydedildi.

2.6. CREST (Anti-kinetochore staining, Anti kinetokor boyama) analizleri

Mikroçekirdek testi (MN testi), genotoksik maddelerin etkilerini in vitro veya in vivo olarak doğru bir şekilde değerlendirebilen nispeten basit bir sitogenetik testtir (Caria, H.,1995), yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü hızlı ve kolaydır. Mikroçekirdekler (MN), lojistik kromozom fragmanları ve/veya tamamen gecikmeli kromozomlardan oluşabilir. Bu nedenle, mikroçekirdek deneyi, potansiyel olarak iş bozukluklarının yanı sıra klastojenleri de tespit edebilir. Bununla birlikte, geleneksel analiz iki olay arasında ayırım yapamaz. Kromozom kırılması ile üretilen MN'nin iş arızasından kaynaklanınlardan ayırt edilmesi için çeşitli laboratuvarlar başarılı bir şekilde in vitro immünofloresan antikinetokor antikorları kullanarak bir metodu başarıyla uygulamıştır. Antikinetokor antikorları Moroi ve arkadaşları tarafından 1980 yılında belirli bir skleroderma pigmentosum formunda (CREST varyantı) olan hastaların serumunda keşfedilmiştir(Miller, B. M., 1990).

Mikroçekirdek ya çekirdek kromozom fragmanlarından ya da hücre bölünmesi sırasında ek çekirdeklere dahil edilmeyen bütün kromozomlardan / kromatidlerden kaynaklanır. Bu nedenle, mikroçekirdek deneyi, hem klastojenleri hem de kromozomların düzenli olarak mitoz dağılımını etkileyen ajanları tespit edebilir. Bununla birlikte, tahlil, test edilmiş bir bileşik tarafından indüklenen nükleer bozukluğun niteliğini karakterize edemez.

Kromozom kırığından türeyen ve spindle malfonksiyonundan türeyen mikroçekirdekler arasında ayırım yapabilmek için değişik ajanlarla indükleyerek mikroçekirdeğin boyutunun veya DNA içeriğinin ölçülmesi yoluyla birçok çabada bulunulmuştur.Son zamanlarda skleroderma hastalarından (CREST varyantı) gelen serumun antikinetokor antikorları içerdiği keşfi, dolaylı immünofloresan

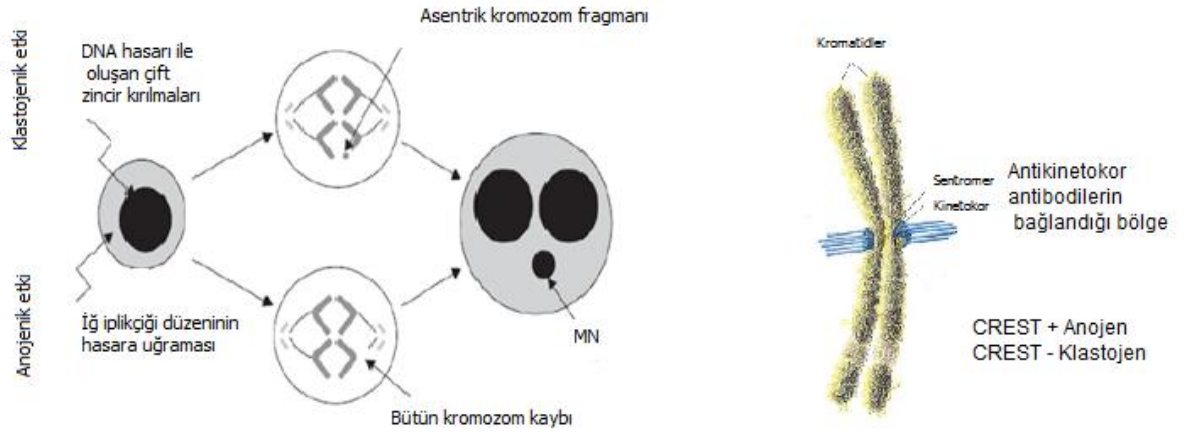
boyamasıyla hem metafaz hem de interfaz hücrelerinde kinetokorları görselleştirmeyi mümkün kılmıştır.

Hücre kültürlerinde veya insan lenfositlerinde mikroçekirdeğin indüksiyonu, kromozomların mitozda düzenli dağılımını etkileyebilecek hem klastojenleri hem de ajanları tespit etmek için kullanılabilir. Sentromerler ve mitotik iğ arasındaki etkileşim, sentromer ilişkili bir protein olan kinetokor ile ilgilidir. Anöploidi indükleyici ajanlar için bir test sistemi olarak bir antikinetokor antikoru ile işaretlenmiş mikroçekirdeği, birkaç araştırmacı tarafından önerilmektedir ve bir kinetokor pozitif mikroçekirdeğin tüm bir kromozom içerdiği varsayımına dayanmaktadır (Caria, H. ve ark.,1995). Anti-kinetochore (CREST) antikorları ile ek boyama, mikroçekirdeğin bütün kromozomları veya asentrik fragmanları içerip içermediğini belirlemeye yarar (Di Virgilio, A. L. ve ark.,2004). MN'ler iki mekanizma yoluyla oluşturulabilir: kromozomal kopmalar (klastogenez) veya mitotik aparatın bozulması (aneugenezis). Bu nedenle, anti-kinetokor antikoru kullanılarak, belirli bir ilacın klastogenez veya aneugenezis yoluyla MN oluşumunu indüklediğini doğrulamak mümkündür. MN'lerde kinetokorun bulunmaması klastojenik etkiyi gösterirken, bunun varlığı anöjenik etkiyi göstermektedir (Miller, B. M., ve Adler, I. D., 1990).

Kimyasalların mutajenitesini belirlemek için İngiltere Sağlık Bakanlığı Mutajenlik Kılavuzları Komitesi'nde (Gıda, Tüketici Ürünleri ve Çevrede Kimyasalların Mutajenite Komitesi, 2000) önerilen bir test prosedürüdür (Dhawan, A. ve ark.,2003).

CREST analizinin prensibi:

Mikroçekirdek yöntemiyle tespit edilen kromozom hasarlarının antikinetokor antibodiler kullanılarak karakterizasyonuna olanak veren analizlerdir. Kinetokor + sonuç veren ajanların anöjenik, kinetokor – sonuç veren ajanların ise klastojenik etkili oldukları belirlenir. Anöjenik ve klastojenik etkilerin birbirlerinden ayrımı ilk kez Russo vd. (1992) ve Renzi vd. (1996) tarafından CREST analizleri ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6.1. CREST testinin prensibi

CREST analizlerinin uygulanışı:

Pozitif kontrol olarak anöjenik etkili vinkristin (8,3 nM) ve mitomisin (0,5 µg/mL) kullanılmıştır.

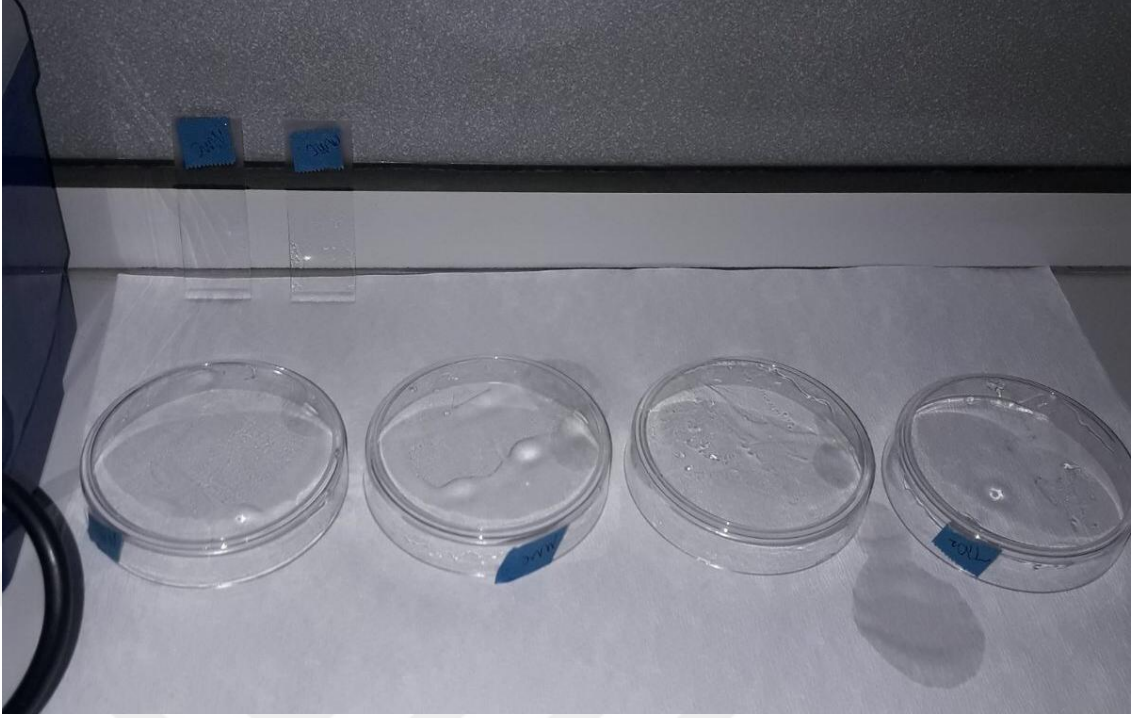
Bu yöntemde hücreler flask yerine önceden sterilize edilmiş lamlar üzerine petri içerisinde uygulandı. Bu amaçla lamlar çalışmadan önce silinip Al folyoya

sararak veya bir beherin içerisine dizilip zeri Al ile kaplanıp otoklavlanarak sterilize edildi.



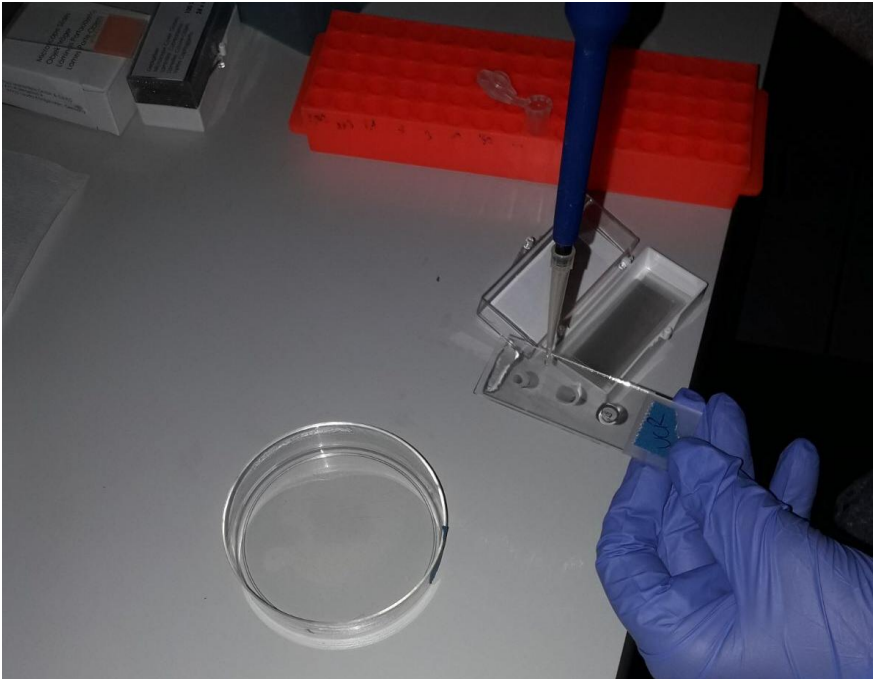
Şekil 2.6.2. CREST testinde 18 saatlik inkübasyon

Test edilecek kimyasallarla 18 saat (1 gece) inkübe edildikten sonra (at 37°C’de ve 5% CO₂ ile), lamalar 2 dak. PBS ile yıkandı, sonra 0.075 M KCl ile 15 dak. 37°Cde inkube edildi. Hücrelerin fiksasyonu için lamalar 30 dak. -20°C metanolde bekletildi. Fiksasyondan sonra lamalar 5 dak. 0.1% Tween 20 içeren PBS çözeltisine daldırıldı.



Şekil 2.6.3. Lamların Tween 20-PBS çözeltisi ile yıkama aşaması

Daha sonra lamların üzerine 50 mL 1. Antibody ilave edilerek 24 saat (37°C) bekletildi. 24 saatlik beklemenin sonunda lamlar 2 kez ile yıkandı.



Şekil 2.6.4. CREST analizlerinde antibody ilavesi

2. Antibody ilave edilerek 1 saat bekletildi. Son olarak lamlar PBS/% 0.1 Tween 20 çözeltisi ile 2 kez yıkandı ve 100 mL boya çözeltisi (DAPI) ile boyandı. Lamlar tekrar su ile yıkanıp kurutulduktan sonra 2-3 damla FluorPreserver lamel üzerine damlatılarak lamın üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılır. Karanlıkta saklanmalıdır.

Boyama ve Mikroskopta İnceleme:

Lamlar Leica floresan mikroskop kullanılarak 400x veya 1,000x büyütme ile değerlendirildi. Floresan filtreleri eksitasyon DAPI için 340–380 nm, emisyon 425-590 nm olacak şekilde ayarlandı. CREST serumu ve FITC-işaretli antibodiler ile boyanmış hücreler de öncelikle lam üzerindeki mikroçekerdeki hücreler belirlendi (DAPI filtre ile), sonra filtre değiştirilerek eksitasyon 490 nm, emisyon 525 nm olacak şekilde (FITC filtre) ayarlanarak mikroçekerdek görüntüsü saptandı. Her bir lam için 100 mikroçekerdek sayıldı.



Şekil 2.6.5. Floresan mikroskop (görüntüleme kamerası ile)

Sayılan mikroçekirdekler “CREST pozitif” veya “CREST negatif” şeklinde değerlendirildi. CREST pozitif yanıt (filtre değiştirildiğinde mikroçekirdek hala var ise), oluşan mikroçekirdeğin bir veya daha fazla bütün kromozomdan oluştuğu anlamına gelmektedir, bu da anöjenik etkiyi gösterir. CREST negatif (filtre değiştirildiğinde FITC filtre ile mikroçekirdek görünmüyor ise) yanıt ise klastojenik etkiyi gösterir.

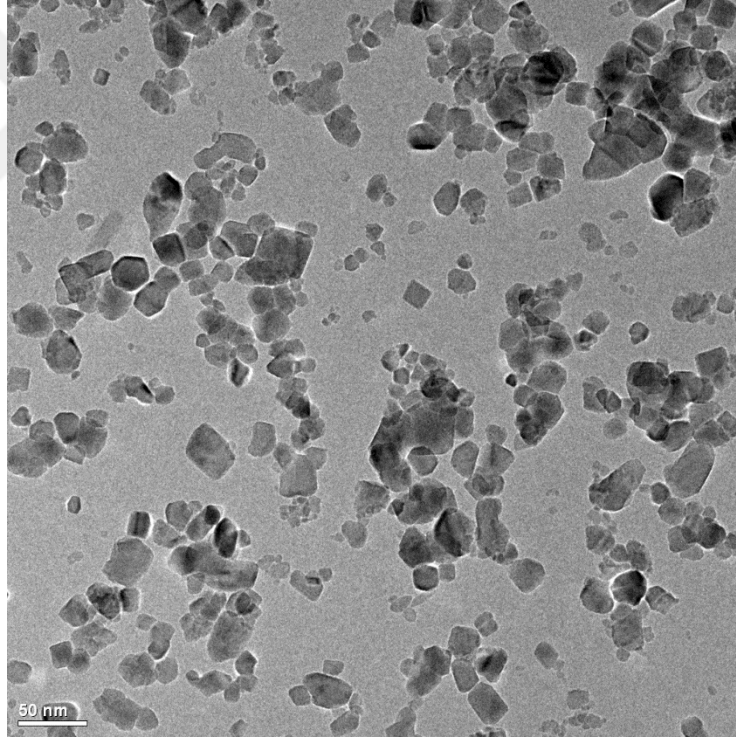
2.7. İstatistiksel değerlendirme

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar “SPSS version 22.0” kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır. Mikroçekirdek testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir numune için çift sayılan 1000 hücrenin mikroçekirdek sayıları student-t test yöntemi kullanılarak kontrol ve pozitif kontroller ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

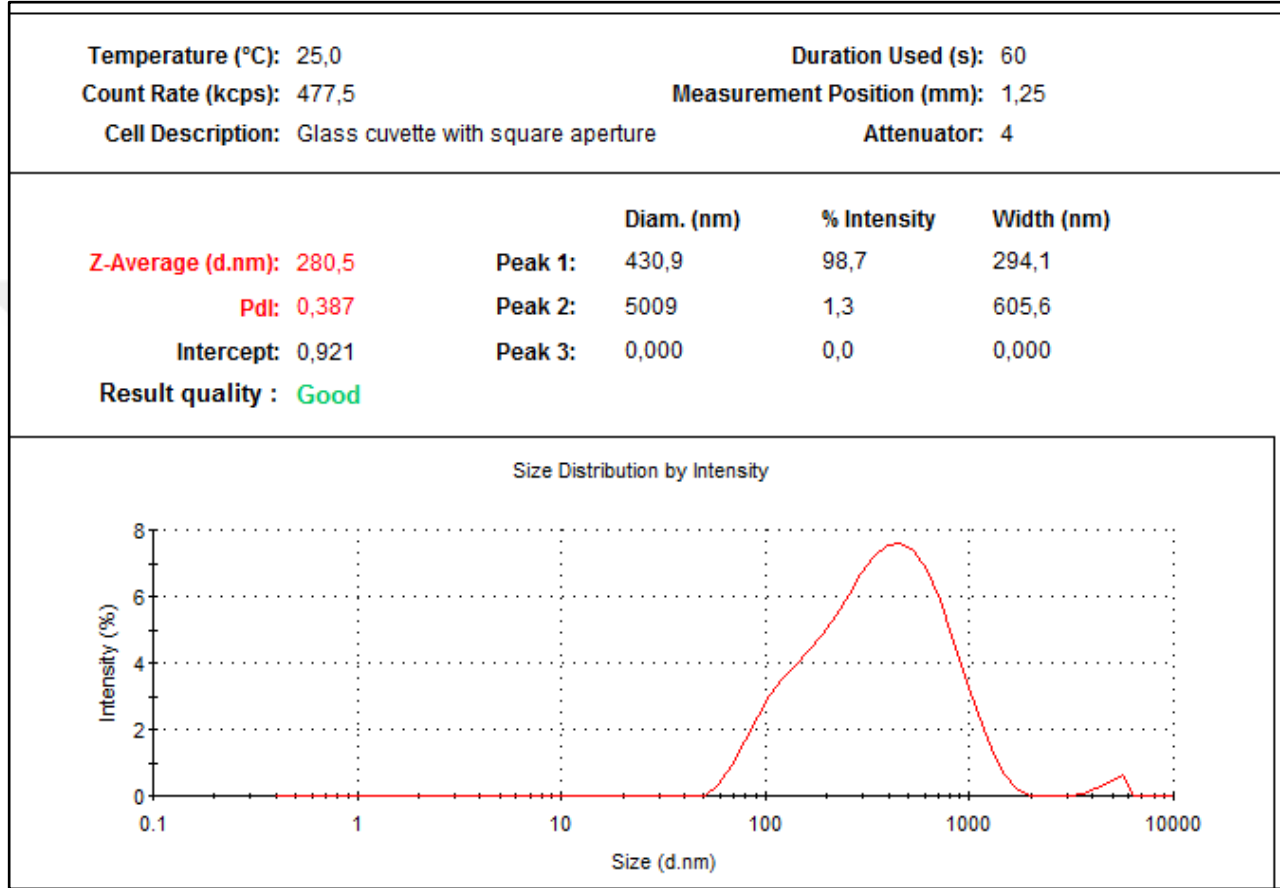
3.1. TiO₂ nanopartikülü ile ilgili ön çalışma sonuçları

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)'den elde edilen veriler ile nanopartikül dispersiyonunun stok çözeltisinin partikül büyüklük dağılımının (Şekil 3.1.1'de) uygun olduğu görülmüştür.



Şekil 3.1.1. TiO₂-NP'nün büyüklüğünün TEM ile ölçülmesiyle elde edilen görüntüsü

TiO₂ nanopartikülünün stok çözeltisi olan 100 µg/mL’de DMEM içerisinde zeta potansiyeli ve dağılımı Zeta Potential Sizer kullanılarak yapılmış ve elde edilen sonuç Şekil 3.1.2’de verilmiştir.

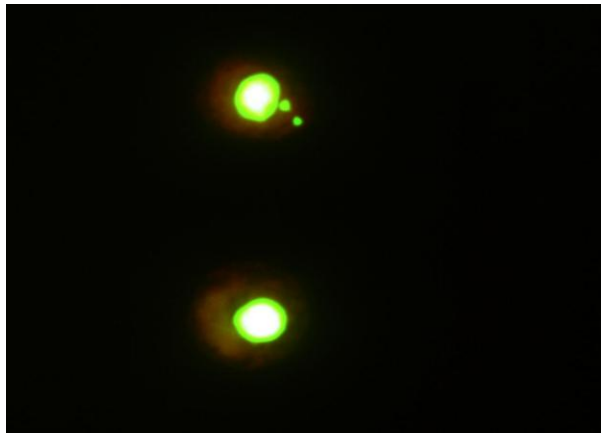
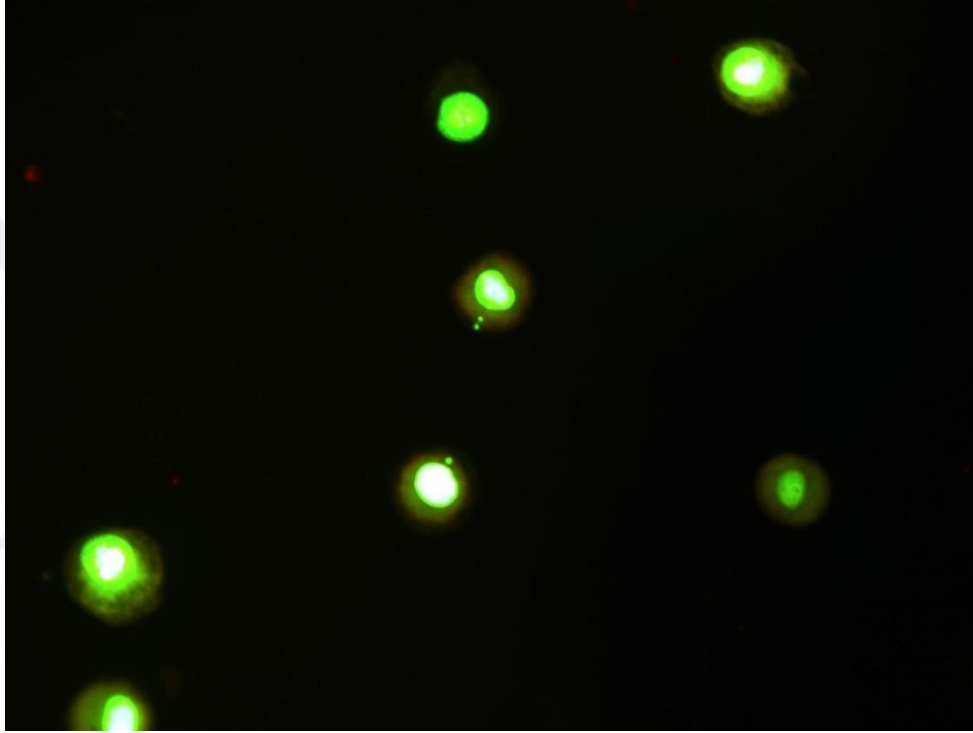


Şekil 3.1.2. Zeta potansiyeli sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre TiO₂ stok çözeltisindeki partikül büyüklük ve dağılımlarının uygun oldukları görüldükten sonra tezimizdeki deneylere geçilmiştir.

3.2. MN testi sonuçları

Mikroçekirdek testi ile elde edilen mikroskop görüntüleri ve sayım sonuçları aşağıda sunulmuştur.



Şekil 3.2.1. Floresan mikroskopta mikroçekirdek görüntüleri

HaCaT hücrelerine, TiO₂ nanopartikülünün stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonunda elde edilen mikroçekirdek sonuçları aşağıdaki Çizelge 3.2.1'de gösterilmiştir.

Mikroçekirdek testinde pozitif kontrol olarak 8,33 nM VCR ve 0,5 µg/mL MMC kullanılmıştır.

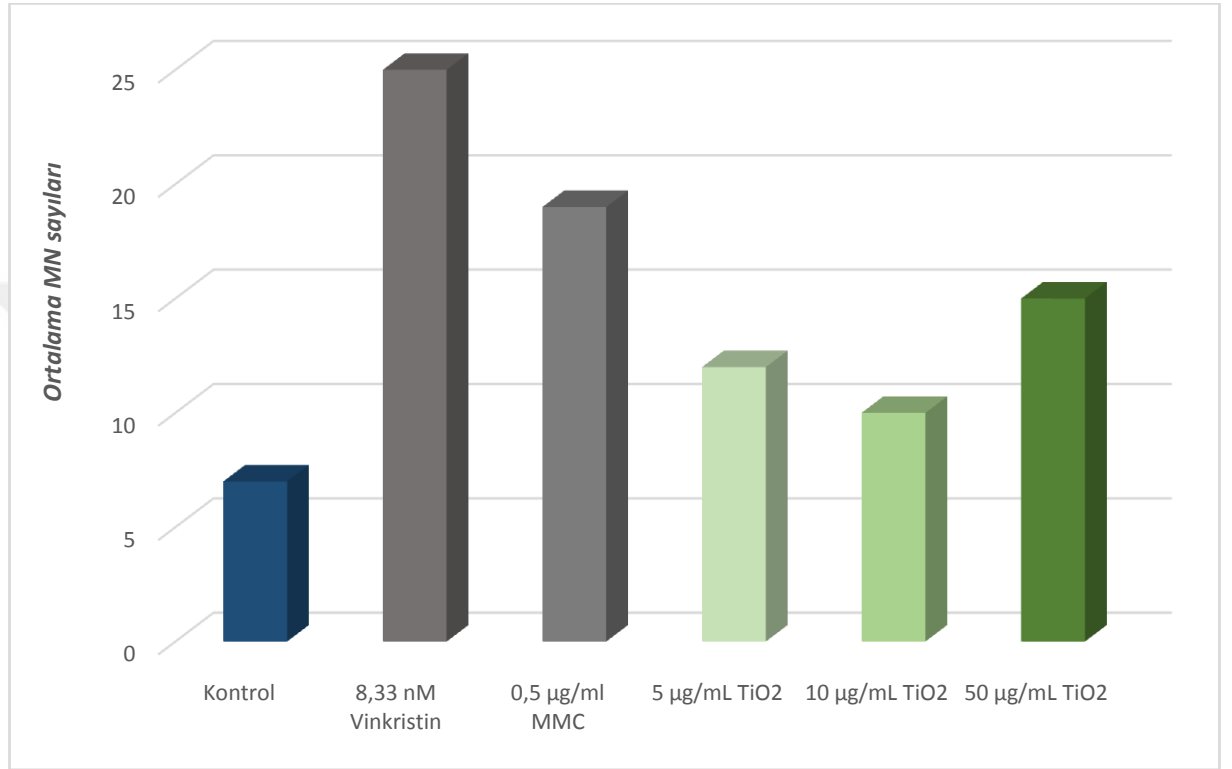
Her bir test kimyasalı ve kontroller için çift lam sayılmış, her lamda 1000 hücre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2.1. HaCaT hücrelerine uygulanan TiO₂ ile elde edilen çift lamda sayıma ait mikroçekirdek sayıları

	<i>Mikroçekirdek sayısı</i>		
	<i>1. sayım</i>	<i>2. sayım</i>	<i>Ortalama</i>
Kontrol	5	9	7
8,33 nM Vinkristin	22	27	25*
0,5 µg/ml MMC	23	15	19*
5 µg/mL TiO₂	13	10	12*
10 µg/mL TiO₂	11	8	10
50 µg/mL TiO₂	16	15	15*

* student-ttest, p<0.05

Mikroçekirdek testinden elde ettiğimiz sonuçlara göre TiO_2 nanopartikülü test ettiğimiz her 3 konsantrasyonda mikroçekirdek sayılarını artırmaktadır. 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarda bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.2.2. HaCaT hücrelerine uygulanan TiO_2 ile elde edilen ortalama mikroçekirdek sayıları

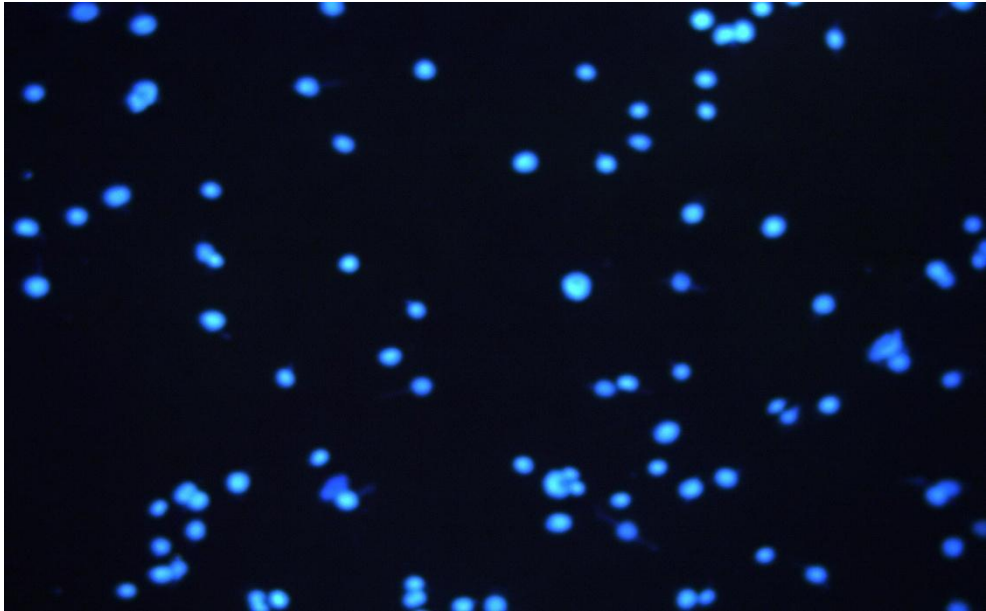
Mikroçekirdek sonuçlarımıza göre, TiO_2 NP'lerinin test edilen konsantrasyonlarda HaCaT hücrelerinde kromozal hasara neden olduğu söylenebilir. Bu hasarın klastojenik mekanizma ile veya anöjenik mekanizma ile oluştuğu iseçalışmamızın devamında uygulanan CREST analizleri ile araştırılmıştır.

3.3. CREST testi sonuçları

CREST testi mikroçekirdek sayısını indükleyen ajanın anojenik veya klastojenik olduğunu göstermek amacıyla uygulanan ve ancak artmış mikroçekirdeklerin karakterizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. TiO_2 nanopartikülünün $5 \mu\text{g/mL}$ ve $50 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarında HaCaT hücrelerine maruziyeti ile anlamlı olarak mikroçekirdek sayılarını artırması nedeniyle, bu artışın klastojenik ve/veya anöjenik olup olmadığını CREST analizi yapılarak gösterilmiştir.

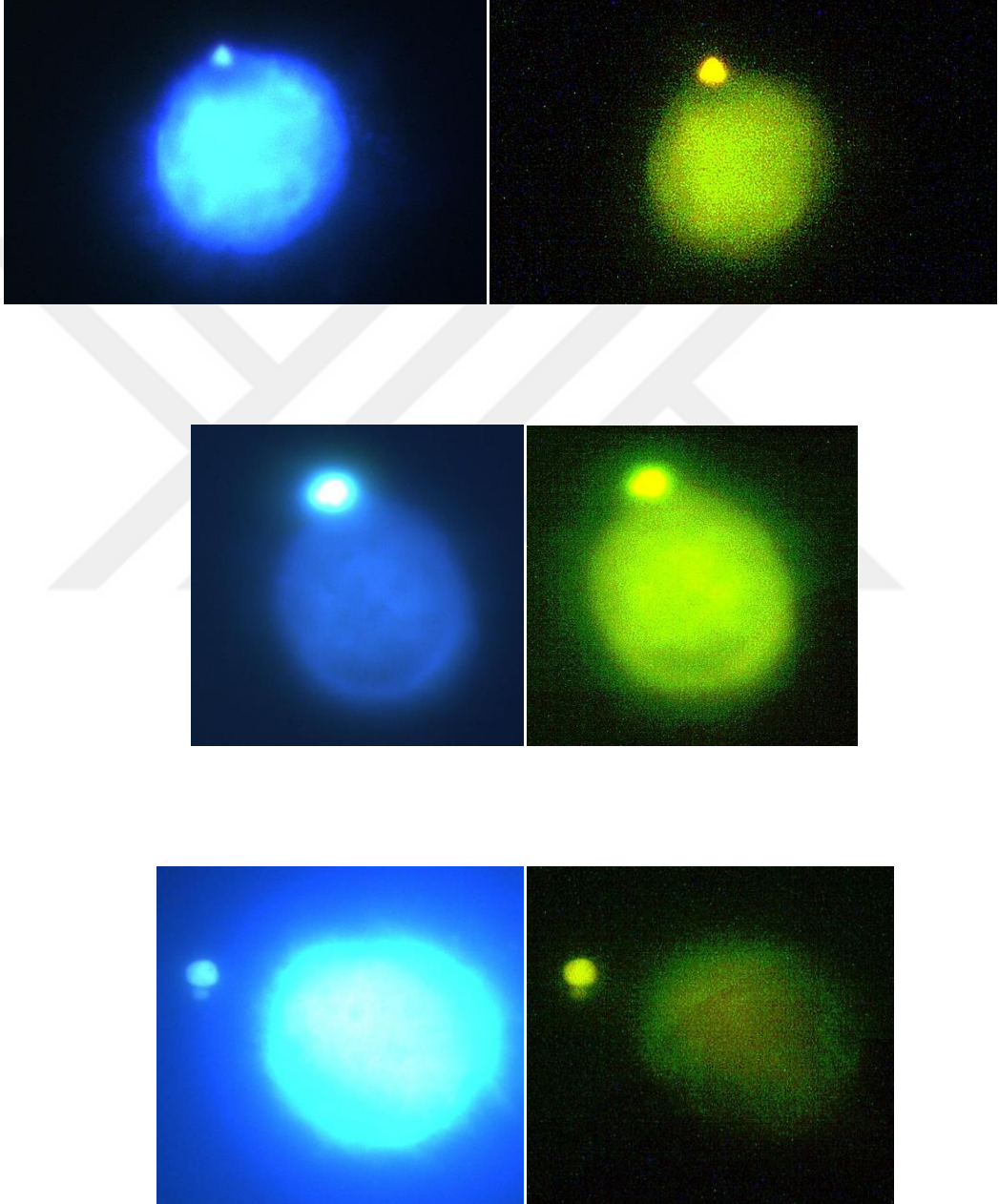
CREST testi laboratuvarımızda ilk kez bu tez ile öncelikle pozitif kontrol olarak kullanılan vinkristin ve mitomisin için uygulanarak kurulmuştur.

Laboratuvarımızda bulunan mikroskop ile DAPI ve FITC filtreler ve görüntüleme kamerasıyla elde ettiğimiz sonuçlar incelenmiş ve görüntüleri alınmıştır.



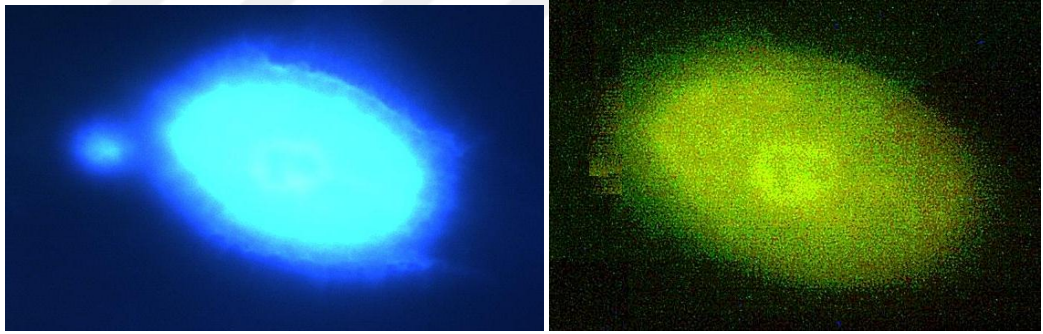
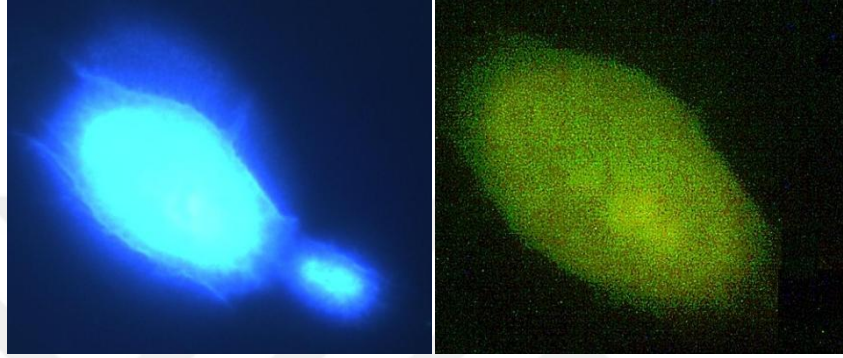
Şekil 3.3.1. DAPI filtre ile hücrelerin görüntüsü.

DAPI filtre ile hücresler gözlemlendikten sonra sadece mikroçekirdek içeren toplam 100 hücre sayılmıştır. CREST testi ile pozitif kontrol olarak kullanılan anöjenik etkili vinkristin (8,3 nM) ve mitomisin ile elde edilen mikroskop görüntüleri ve sayım sonuçları aşağıda sunulmuştur.



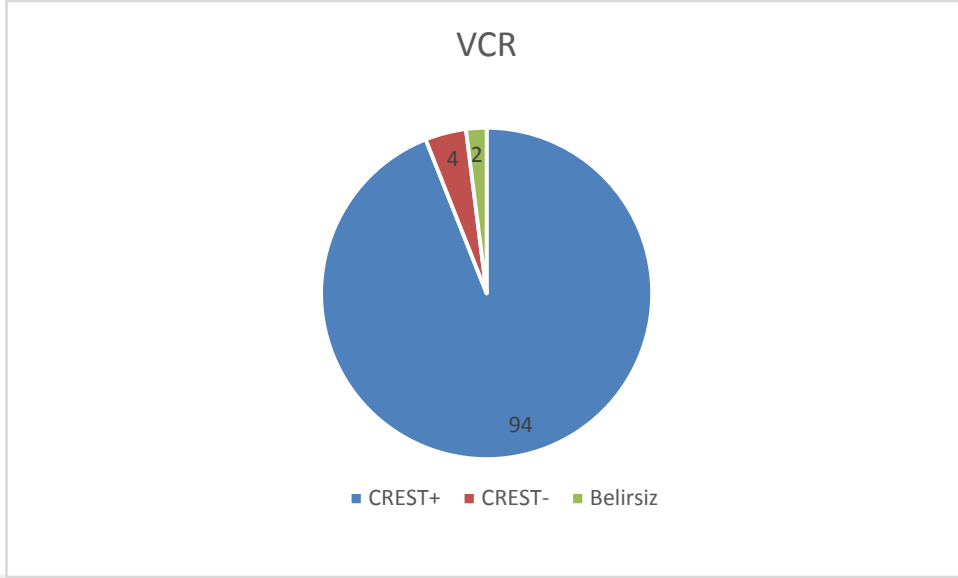
Şekil 3.3.2. CREST testinde kullanılan anöjenik (CREST+) etkili vinkristin ile mikroskop görüntüleri.

Şekil 3.3.2’de vinkristin ile elde edilen CREST analiz sonuçlarında, sol tarafta gösterilen mavi çekirdek ve mikroçekirdekler DAPI filtre ile görüntüledikten sonra FITC filtreye geçirilerek sağdaki görüntüler elde edilmiştir.

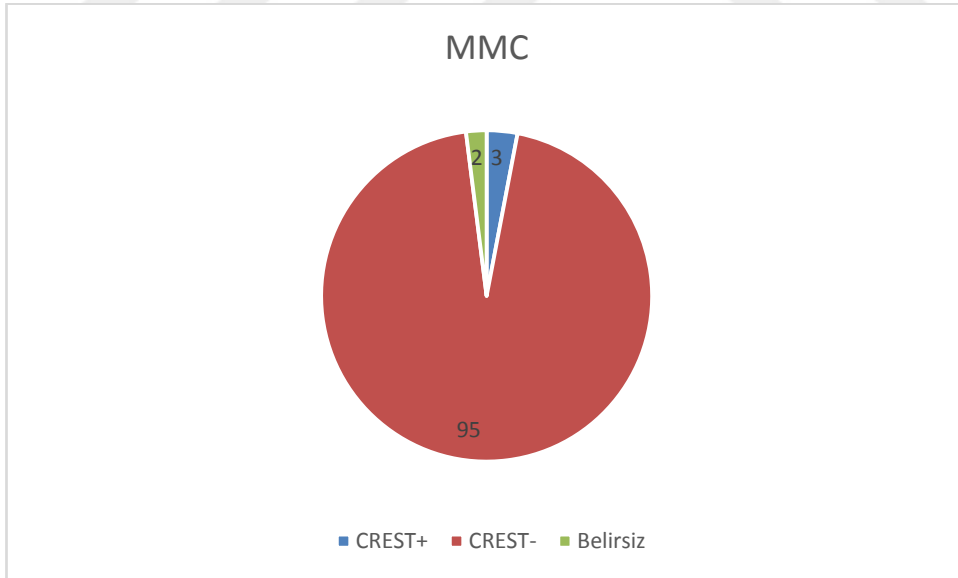


Şekil 3.3.3. CREST testinde kullanılan klastojenik (CREST-) etkili MMC ile mikroskop görüntüleri.

Şekil 3.3.3’de MMC ile elde edilen CREST analiz sonuçlarında, sol tarafta gösterilen mavi çekirdek ve mikroçekirdekler DAPI filtre ile görüntüledikten sonra FITC filtreye geçirilerek (mikroçekirdek görünmemekte) sağdaki görüntüler elde edilmiştir.



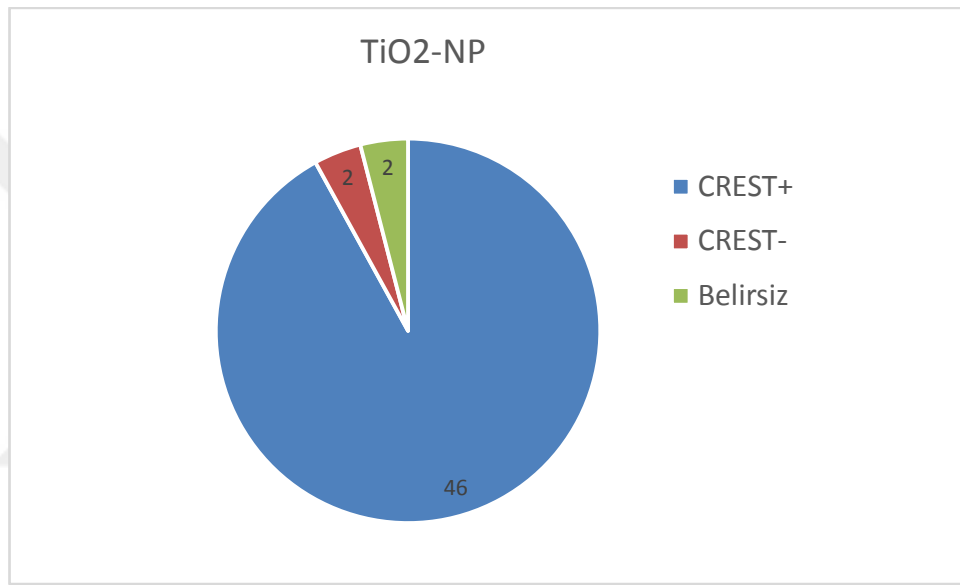
Şekil 3.3.4. Anöjenik pozitif kontrol olarak kullanılan VCR'nin HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları



Şekil 3.3.5. Klastojenik pozitif kontrol olarak kullanılan MMC'nin HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları

Anöjenik pozitif kontrol olarak kullanılan VCR ve klastojenik pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile elde edilen sonuçlar (Şekil 3.3.4 ve 3.3.5), CREST analizlerinin laboratuvarımızda başarıyla uygulanabildiğini göstermiştir.

Daha sonra CREST analizleri, TiO_2 nanopartikülünün $50 \mu g/mL$ 'lik konsantrasyonda HaCaT hücrelerine uygulanmıştır. Elde edilen CREST görüntüleri, TiO_2 nanopartikülünün CREST+(anojenik etki) etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.3.6. TiO_2 nanopartikülünün $50 \mu g/mL$ 'lik konsantrasyonda HaCaT hücrelerine uygulanması ile elde edilen CREST sonuçları

CREST analizleri sonuçlarımız, TiO_2 nanopartikülünün kromozomlarda anojenik etki ile mikroçekirdek sayılarını, kromozom sayısını değiştirerek artırdığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda özellikle kozmetik alanında ve güneş preparatlarında nanopartiküllerin yaygın kullanılması nedeniyle, nanopartiküllerin toksisitesinin araştırılması önemli bir konu haline gelmiştir. Güneş koruyucu krem ve losyonlarda kullanılan TiO₂-NP'lerinin insan deri hücrelerinde kromozomlarda neden olabileceği hasarın gösterilmesi önemli ve gereklidir.

Tezimizde bu etkilerin değerlendirilmesi için kullanmış olduğumuz yöntemlerden mikroçekirdek testi rutin olarak kullanılan bir testtir. Bu test ile elde ettiğimiz sonuçların kromozom sayısını veya yapısını değiştirerek yani diğer bir deyişle anojenik/klastojenik etkili olduğunun gösterildiği CREST analizleri ise laboratuvarımıza ilk kez bu tez ile kurulmuş ve başarı ile uygulanmıştır.

Mikroçekirdek testinden elde ettiğimiz sonuçlara göre, TiO₂ nanopartikülü test ettiğimiz her 3 konsantrasyonda mikroçekirdek sayılarını artırmaktadır. 15 µg/mL ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonlarda bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlarla TiO₂ NP'lerinin test edilen konsantrasyonlarda HaCaT hücrelerinde kromozal hasara neden olduğu söylenebilir. Bu hasarın klastojenik mekanizma ile veya anöjenik mekanizma ile oluştuğu ise çalışmamızın devamında uygulanan CREST analizleri ile araştırılmıştır.

İlk olarak bu tez çalışması ile laboratuvarımıza kurmuş olduğumuz CREST testi; ileride yapılacak yüksek lisans ve doktora öğrencilerinin tezlerinde, bilimsel araştırmalarımızda ve projelerimizde mikroçekirdek testi çalışmalarımızla birlikte yürütülecek özellikte olup, sonuçlarımızın anlamlılığını artıracak ve çalışmalarımızın

bilimsel yönünü güçlendirecektir. Yani CREST testinin kurulmuş olması sayesinde mikroçekirdek sıklığını arttıran bir kimyasal maddenin bu etkiyi anöjenik mekanizma ile mi yoksa klastojenik mekanizma ile mi gerçekleştirdiği anlaşılabilir.

Abrusci ve arkadaşları(2013) tarafından TiO_2 'nin küresel şekil ve anataz kristal formu kullanılarak insan embriyonik böbrek hücrelerinde yapılan çalışmada 10–1000 $\mu g/mL$ konsantrasyonda, 1 saat – 3 hafta maruziyet sonucunda 1000 $\mu g/mL$ 'de yumuşak agar içinde DNA hasarı, hücre transformasyonu ve hücre yerine sabitlenmeden bağımsız büyüme gözlenmiştir. Archana ve arkadaşları(2013) tarafından TiO_2 'nin küresel şekil ve anataz kristal formu kullanılarak insan Caco-2_{BBE1} hücrelerinde yapılan çalışmada 0.35–35 $\mu g/mL$ konsantrasyonda ,24 saat maruziyet sonucunda gıda sınıfı nano- TiO_2 maruziyeti Caco-2_{BBE1} hücre sistemi mikrovilluslarında kayıplara yol açmıştır. Ghosh ve arkadaşları(2013) tarafından TiO_2 'nin küresel şekil ve anataz/rutil kristal formu kullanılarak insan eritrosit ve lenfositlerde yapılan çalışmalarda 25–500 $\mu g/mL$ konsantrasyonda, 3 saat maruziyet sonucunda mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde azalma, DNA hasarı ve lenfositlerde apoptoza yol açmış; eritrositlerde hemoliz ve hemoglobin ile etkileşim gözlenmiştir. Drevet ve arkadaşları (2012) tarafından TiO_2 'nin küresel şekil ve anataz/rutil kristal formu kullanılarak akciğer fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmada 25–400 $\mu g/mL$ konsantrasyonda 24 - 48 saat maruziyet sonucu hücre içi ROS oluşumu, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, hücre döngüsü ilerlemesinde değişiklikler, TNF ve CYP1A gen değiştirme gözlenmiştir. Vyas ve arkadaşları(2011)) tarafından TiO_2 'nin anataz kristal formu kullanılarak dermal fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmada 1–100 $\mu g/mL$ konsantrasyonda 24 saat maruz kalma sonucunda H2AX, ATM ve Chk2 fosforilasyonunu artışına yol açar, DNA sentezi ve replikon başlatma frekansı inhibe eder. Falck ve arkadaşları (2009) tarafından TiO_2 'nin anataz(küresel) ve rutil(iğne) kristal formu kullanılarak bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) ile yapılan çalışmada 1–100 $\mu g/cm^2$ konsantrasyonda 24, 48, 72 saat maruz kalma sonucunda DNA hasarı ve mikroçekirdeklar artmıştır. Hussain ve arkadaşları(2010) tarafından TiO_2 'nin anataz(küresel) kristal formu kullanılarak bronşiyal epitel hücrelerinde yapılan 10–40

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ konsantrasyonda 0.5, 1, 2, 4, 24 saat maruz kalma sonucunda lipid peroksidasyonu, lizozomal membran destabilizasyon ve hücre ölümü gözlenmiştir. Morishige ve arkadaşları (2010) tarafından TiO_2 'nin anataz (küresel) kristal formu kullanılarak makrofaj benzeri gibi insan THP-1 hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada 20–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 24 saat maruz kalma sonucunda daha küçük anataz ve daha büyük rutil $\text{IL-1}\beta$ üretimini yüksek oranda provoke eder ve iğne gibi nanomateryaller aynı büyüklükteki küresel şekilde olanlara göre daha yüksek toksisite göstermiştir. Kocbek ve arkadaşları (2010) tarafından TiO_2 'nin küresel ve iğne gibi formu kullanılarak insan keratinositlerinde yapılan çalışmalarda 0.5–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 3 ay maruziyet sonucunda hücre döngüsünde değişiklikler ve apoptotik hücre artmasına neden olmuştur. Fujita ve arkadaşları (2009) tarafından TiO_2 'nin anataz (granular) kristal formu kullanılarak keratinosit HaCaT hücreleri kullanarak yapılan çalışmada 47.0–60.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 24 saat maruziyet sonucunda hücre-matriks yapışmasını etkileyebilir. Ghosh ve arkadaşları (2010) tarafından TiO_2 'nin küresel formu kullanılarak lenfositlerde yapılan çalışmalarda 0.25–2 mM konsantrasyonlarda 3, 6, 24 saat maruz kalma sonucunda genotoksikite ve sitotoksikite gözlenmiştir. Ema ve arkadaşları ile Yamashita ve arkadaşları tarafından farelerde plasenta, fetus karaciğeri ve beyinde TiO_2 -NP'nin santral sinir sistemi gelişimi ile ilgili gen ekspresyonunu etkilediği ve yavrularda vücut ağırlığı, sperm hareketliliği gibi parametrelerde azalmaya neden oldukları gösterilmise TiO_2 -NP'nin insan spermalarında genotoksik etkiyi artırdığı, fare testis leydig hücrelerinde gen ekspresyonu, çoğalmasını ve canlılığını etkileyerek sitotoksik etkiyeden olduğu bulunmuştur. Long ve arkadaşları tarafından farelerin mikrogliaları üzerinde yapılan çalışmalarda TiO_2 oksidatif stres oluşturarak beyne hasar vermekte olduğunu göstermiştir (Long T. C ve arkadaşları, 2006). Yuzuki Nakagawa ve arkadaşlarının (1997) TiO_2 -NP ile yaptıkları çalışmada ise TiO_2 nanopartikülünün UV ışınları olmadan genotoksik etkisinin zayıf olduğu, UV/vis ışık ışınlama uygulandığında ise SCE ve CA testleri ile genotoksik etkiyi artırdığını gösterilmiştir.

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler nitelikte olup, TiO₂ nanopartiküllerinin mikroçekirdek sayılarını artırdığını göstermektedir. Mikroçekirdek sayılarındaki artışın hangi yolla olduğu, yani anöjenik mekanizmalarla artırdığının gösterilmesi ise ilk kez bu tez çalışması ile gerçekleştirilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanoteknoloji, elektronik, mühendislik, kozmetik, gıda ve ilaç sektörü gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır ve her gün bu alanlara bir yenisi eklenmektedir. Nanoteknoloji, hem araştırma hem de işletme için mükemmel fırsatlar sunan, yirmi birinci yüzyılın kilit teknolojilerini temsil eder. Nanoteknolojinin hızlı yayılması ve ticarileşmesi, büyük teknik ve ekonomik yeniliklere yol açarken, aynı zamanda tüketicilerin sağlık ve güvenliğine yönelik ortaya çıkan risklerin de sorgulanması gerekmektedir. Bu nedenle, nanoteknolojiye dayanan kozmesötik ürünler, tüketicilerin ve çevre sağlığına tam olarak saygı gösterecek şekilde tasarlanmalı ve satılmalıdır.

Nanopartiküller pek çok kişisel bakım ürününün içeriğinde de yer almaktadır (Deodorant, sabun, dişmacunu, şampuan, saç kremi, güneş koruyucu, kırışıklık karşıtı krem, nemlendirici, fondoten, yüz pudrası, ruj, allık, göz farı, oje, parfüm, traş sonrası losyon gibi). Nanopartiküller içinde toksikolojik etkileri üzerinde en çok durulan karbonlu (karbon siyahı, karbon nanütüpleri), silikalı (silisyum dioksit) ve metal oksitli nanopartiküllerdir. Örneğin metaloksitlerden olan titanyum dioksit hem toz hali ile hem de son yıllarda nanoboyutu ile UV ışınlarını engelleyebilme özelliği nedeniyle güneş koruyucu preparatların yapısında sıklıkla yer almaktadır. Yaygın kullanımı nedeniyle hem üreticiler hem tüketiciler için gerek özellikle deri yolu ile toksisite gösterebilmektedir. Nanopartikül üretiminin ve kullanımının artmasına bağlı olarak, nanopartiküllerin toksikolojik analizlerinin yapılarak risk değerlendirmesinin yapılması gerekli ve önemli hale gelmiştir. Ancak genel olarak nanopartiküllerin güvenlik çalışmalarında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Büyüklükleri, yapıları, yüzey alanları, formları ve şekilleri nedeni ile insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri de değişmektedir. Son yıllarda önemi gittikçe artan nanopartiküllerin güvenliği ile ilgili çalışmalar az sayıda olmaları sebebiyle toksisite profilleri tam olarak çıkarılamamıştır. Partikül büyüklüklerinin çok küçük olması, teknolojik açıdan bir

avantaj sağlamasına rağmen, bu partiküller deri ve akciğerlere kolaylıkla geçebilme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri nedeni ile nanopartiküllerin insan sağlığı üzerine olan toksik etkilerinin araştırılması çok gerekli bir alan (nanotoksikoloji) haline gelmiştir. Bu nedenle nanopartiküllerin toksikolojik değerlendirilmelerinin yapılabilmesi için çok yönlü ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa Birliğinde nanopartiküllerin kozmetik ve diğer alanlarda kullanımları ile ilgili yasal düzenlemeler eksiktir. Bu eksiklik risk değerlendirme çalışmalarına yansımaktadır.

Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO_2 -NP) günümüzde güneş koruyucu kremlerde en yaygın kullanılan UV filtrelerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar, TiO_2 -NP'lerinin hücrelerde DNA hasarı oluşturabildiği ve dolayısıyla genotoksik etkili olabileceğini göstermektedir. Tezimizde TiO_2 -NP'üne maruz kalınması durumunda hücre kromozomlarının nasıl etkilendiği genotoksisite testleri ile insan keratinosit hücreleri kullanılarak araştırılmıştır.

Tezimizde genotoksisite için mikroçekirdek testi uygulanmış ve mikroçekirdeklerin karakterizasyonu için ilk kez bu tez çalışması ile CREST analizleri laboratuvarımızda kurularak uygulanmıştır. MN yöntemi, mitoz bölünme sırasında bölünmekte olan hücrenin çekirdeğinden kopan tam kromozomun veya parçalarının görülmesinisağlayan, genetik hasarın belirlenmesinde oldukça hassas bir yöntemdir. Pahalı olmaması, hızlı sonuç alınması, güçlü bir istatistiksel sonuç elde edilmesi (mikroskopta 1000 hücre değerlendirildiği için) açısından oldukça avantajlı bir yöntemdir. CREST analizleri ise ülkemizde henüz yaygın olmayan bir yöntemdir; bu yöntem MN testleriyle birlikte, oluşan mikroçekirdeklerin klastojenik/anojenik mekanizmasının ayırımına olanak verir. CREST analizinin kurulmuş olması sonuçlarımızın anlamlılığını artıracak ve çalışmalarımızın bilimsel yönünü güçlendirecektir.

Elde etmiş olduğumuz sonuçlar güneş kremlerinde yer alan TiO₂ nanopartiküllerinin cilt hücrelerinde klastojenik etki oluşturabileceğini göstermektedir. Çalışmaların tekrarlanması ve farklı testlerle desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca UV radyasyonun indirekt veya direkt mekanizmalarla insanlarda DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Güneşe maruziyet genellikle güneş koruyucu kremlerle birlikte gerçekleştiği için; kozmetiklerde, özellikle güneş koruyucu ürünlerde yer alan titanyum dioksit nanopartiküllerinin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin incelenmesi de gerekli ve önemlidir.



ÖZET

TiO₂ Nanopartikülünün Kromozomlar Üzerindeki Toksik Etkisinin İn-vitro Araştırılması

Güneşe maruziyet genellikle güneş koruyucu kremlerle birlikte gerçekleştiği için; kozmetiklerde, özellikle güneş koruyucu ürünlerde yer alan titanyum dioksit nanopartiküllerinin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin incelenmesi de gerekli ve önemlidir.

Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂-NP) günümüzde güneş koruyucu kremlerde en yaygın kullanılan UV filtrelerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar, TiO₂-NP'lerinin hücrelerde DNA hasarı oluşturabildiği ve dolayısıyla genotoksik etkili olabileceğini göstermektedir.

Tezimizde TiO₂-NP'üne maruz kalınması durumunda hücre kromozomlarının nasıl etkilendiği Mikroçekirdek ve CREST (antikinetochore antibodies) testleri ile insan keratinosit hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Mikroçekirdeklerin karakterizasyonu için kullandığımız CREST analizleri ilk kez bu proje ile laboratuvarımızda kurularak uygulanmıştır.

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre TiO₂-NP'nün test edilen 5, 10 ve 50 µg/mL konsantrasyonlardamikroçekirdek sayılarını artırdığı, bu artışın 5 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

Mikroçekirdek testi sonuçlarına dayanarak CREST analizleri uygulandığında ise, TiO₂-NP'nün mikroçekirdek sayılarını anöjenik mekanizmalarla artırdığı görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: CREST analizi, mikroçekirdek testi, titanyum dioksit.

SUMMARY

In-vitro Investigation of Toxic Effect of TiO₂ Nanoparticle on Chromosomes

Since sun exposure usually occurs with sunscreen creams; It is also necessary and important to investigate the effects of titanium dioxide nanoparticles on human health in cosmetics, especially sunscreen products.

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP's) are now one of the most widely used UV filters in sunscreen creams. However, research has shown that TiO₂-NPs can cause DNA damage in cells and thus can be genotoxic.

In our thesis, the chromosomal effect of TiO₂-NP was investigated by micronucleus test and CREST (antinetochore antibodies) test in human keratinocyte cells. The CREST analysis, which we use for the characterization of micronuclei, was established and applied in our laboratory for the first time with this thesis.

According to the results obtained from our thesis, TiO₂-NP increased the number of micronuclei at 5, 10 and 50 µg /mL concentrations and this increase was statistically significant at 5 and 50 µg /mL concentrations.

When the CREST analysis was performed based on the results of the micronucleus test, it was observed that TiO₂-NP increased the number of micronuclei by aneugenic mechanisms.

Keywords: CREST analysis, micronucleus test, titanium dioxide.

KAYNAKLAR

- ARALDI RP, DE MELO TC, MENDES TB, DE SÁ JÚNIOR PL, NOZIMA BHN, ITO ET, DE CARVALHO RF, DE SOUZA EB & DE CASSIA STOCCO R (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **72**:74-82.
- CARIA H, CHAVECA T, LAIRES A & RUEFF J (1995). Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **343**(2-3): 85-94.
- CHEN T, YAN J & LI Y (2014). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of food and drug analysis*, **22**(1): 95-104.
- DEGRASSI F & TANZARELLA C (1988). Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, **203**(5): 339-345.
- DHAWAN A, KAYANI MA, PARRY JM, PARRY E, & ANDERSON D (2003). Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis*, **18**(6): 487-490.
- DÍ VIRGILIO AL, IWAMI K, WÄTJEN W, KAHL R & DEGEN GH (2004). Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology letters*, **151**(1): 151-162.
- GÖK H (2007). Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Uzmanlarının Nanoteknolojiden Beklentileri. *Turkish Journal of Physical Medicine & Rehabilitation/Turkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 53.

LONG TC, SALEH N, TILTON RD, LOWRY GV & VERONESI B (2006). Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environmental Science & Technology*, **40**(14): 4346-4352.

LOVE SA, MAURER-JONES MA, THOMPSON JW, LIN YS & HAYNES CL(2012). Assessing nanoparticle toxicity. *Annual review of analytical chemistry*, **5**:181-205.

MILLER BM & ADLER ID (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo. *Mutagenesis*, **5**(4): 411-415.

MONTEIRO-RIVIÈRE NA, WIENCH K, LANDSIEDEL R, SCHULTE S, INMAN AO & RIVIÈRE JE (2011). Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences*, **123**(1):264-280.

NAKAGAWA Y, WAKURI S, SAKAMOTO K & TANAKA N (1997). The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **394**(1): 125-132.

NEWMAN MD, STOTLAND M & ELLIS JI (2009). The safety of nanosized particles in titanium dioxide-and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **61**(4): 685-692.

NISKA K, ZIELINSKA E, RADOMSKI MW & INKIELEWICZ-STEPNIAK I (2018). Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-biological interactions*, **295**:38-51.

NORPPA H, LUOMAHAARA S, HEIKANEN H, ROTH S, SORSA M, RENZI L, & LINDHOLM C (1993). Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environmental health perspectives*, **101**(suppl 3): s139-143.

PARK HO, YU M, KANG SK, YANG SI & KİM YJ (2011). Comparison of cellular effects of titanium dioxide nanoparticles with different photocatalytic potential in human keratinocyte, HaCaT cells. *Molecular & Cellular Toxicology*, **7**(1): 67-75.

ÇIRACI S(2006). Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM): Nanobilim Ve Nanoteknolojide Türkiye'nin Bir Mükemmeliyet Merkezi. *BİLİM ve TEKNİK-Yeni Ufuklara*,2-4.

SHA B, GAO W, CUI X, WANG L & XU F (2015). The potential health challenges of TiO₂ nanomaterials. *Journal of Applied Toxicology*, **35**(10):1086-1101.

XUE C, WU J, LAN F, LIU W, YANG X, ZENG F & XU H (2010). Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **10**(12): 8500-8507.

ZHANG X, LI W & YANG Z (2015). Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of toxicology*, **89**(12): 2207-2217.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Büşra
Soyadı: Kanbolat
Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara / 20.05.1993
Uyruğu: T.C
Medeni Durumu: Bekar
İletişim Adresi: Abidinpaşa Mah. Okul Sok. No: 17/8
Mamak/ANKARA
E- posta: busrakanbolat@hotmail.com
Telefon: 0 554 656 29 45
Yabancı Dil: İngilizce

II. Eğitimi

2016- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı-
Yüksek Lisans
2016-2011: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi-
Lisans
2011-2007: Yavuz Sultan Selim Anadolu Lisesi

III. İş Tecrübesi

2013-1 aylık: Ankara- Öz-Özlem Eczanesi(Staj)
2014-2 aylık: Ankara- Öz-Özlem Eczanesi(Staj)
2015-1 aylık: Ankara- Öz-Özlem Eczanesi(Staj)
2016-2 aylık: A.Ü. Tıp Fak. İbn-i Sina Hastanesi(Staj)
2017-6 aylık: Ankara- Öz-Özlem Eczanesi
2018- Büşra Kanbolat Eczanesi