

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Elvan BAKAR

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN
VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Mümin AKICI

Referans no: 10073508

EDİRNE – 2017

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Elvan BAKAR

**TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN
VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Mümin AKICI

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2015/218 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Elvan BAKAR danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Mümin AKICI tarafından tez başlığı "Titanium Dioksit Nanopartiküllerinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı/....../..... tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza

Unvanı Adı Soyadı

JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Elvan BAKAR

İmza

Unvanı Adı Soyadı

Yrd. Doç. Dr. Melek AKINCI

ÜYE

İmza

Unvanı Adı Soyadı

Yrd. Doç. Dr. Özge ÖZCAN

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren tez çalışmamda çok değerli katkıları olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Elvan BAKAR başta olmak üzere, tez çalışmasının deneysel kısımlarının TÛTAGEM’de gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı TÛTAGEM yönetimine ve Uzman Pelin TÛRKER’e teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde sağladıkları maddi destekten dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÛBAP- 2015/218) birimine ayrıca teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca maddi manevi destekleri ve sevgileriyle hep yanımda olan annem Fehime AKICI, babam Sami AKICI ve ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Murat AKICI’ya teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
NANOTOKSİKOLOJİ	3
NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ	5
TİTANYUM DİOKSİT	6
HÜCRE KÜLTÜRÜ	12
HÜCRELERDE TOKSİSİTENİN GÖSTERİLMESİ	18
GENOTOKSİSİTE	20
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU(PCR)	23
ISI ŞOK PROTEİNLERİ	22
GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
BULGULAR	33
TARTIŞMA	48
SONUÇLAR	48
ÖZET	50
SUMMARY	52
KAYNAKLAR	54
ŞEKİLLER LİSTESİ	64
ÖZGEÇMİŞ	66
EKLER	

SİMGE ve KISALTMALAR

ANOVA: Varyans Analizi

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

Au: Altın

BME: Eagle's Basal Medium

CAS: Chemical Abstracts Service

CAT: Katalaz

cDNA: Komplementer DNA (Tamamlayıcı DNA)

C₈H₆S: Benzotiofenin

CMRL: Connaught Medical Research Laboratories

CO₂: Karbondioksit

Cu: Bakır

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Deoksiribonükleik asit

EC: Enzyme Commission

EDTA: Etilen-Diamin Tetra Asetik Asit

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

FBS/FCS: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum

Fe: Demir

GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz

GMEM: Glasgow's Modification of Eagle's Medium

GSH: Glutasyon

HSP: Heat Shock Protein (Isı şok proteinleri)

KA: Kromozom Anormallikleri

KKD: Kardeş Kromatit Değişimi

LD₅₀: Median Lethal Dose (Ortalama Letal Doz)

LDH: Laktik Dehidrogenaz

MTT: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid

MN: Mikronukleus

NIOSH: The National Institute for Occupational Safety Health (Amerikan Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü)

NO: Azot oksit

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

qRT-PCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR)

RNA: Ribonükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SO₂: Kükürt dioksit

SOD: Süperoksit Dismutaz

T/G HA VSMC: Aort Muscle Cell (Aort Düz Kas Hücresi)

TiO₂: Titanyum dioksit

UV: Ultraviyole

Zn: Çinko

ZnO: Çinko Oksit

GİRİŞ ve AMAÇ

Nanoteknoloji, nanomateryallerin oluşturulması, geliştirilmesi ve canlı sistemler üzerindeki etkilerinin ortaya konulması üzerine çalışan bilim alanıdır. Günümüzde nanoteknoloji hızla büyüyen endüstriyel sektörlerden biridir. Çeşitli alanlarda, nanomalzemelerden çok sayıda ürün elde edilmektedir. Nanoteknoloji ve nanomalzemeler, sağlık, kozmetik, mühendislik gibi uygulama alanlarına farklı yenilikler sağlamaktadır.

Uzun vadede nanoteknolojinin kazanımları diğer teknolojilerle birleştirildiğinde yaygın etkiler yaratacak potansiyele sahip görünmektedir. Günümüzde nanoteknolojinin gelecekte sunacağı faydalar ile ilgili olarak önemli araştırmalar yapılmasına rağmen, muhtemel risklerinin değerlendirildiği araştırmalar kısıtlı sayıdadır (1). Bir nanometre (nm) bir milimetrenin milyarda biri ve milimetrenin milyonda birini ifade eder. Bu koşullar altında nanoteknolojinin boyutları genellikle 1-100 nm arasında değişen birbirine bağlı birkaç bin veya on binlerce atomdan oluşan temel fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapıları inceleyen bilim alanı olarak daha kapsamlı biçimde tanımlanır. Nanobilim ve nanoteknoloji, doğa ile yaşam arasındaki yakınlaşmayı ve disiplinler arası temayı temsil etmektedirler. Bununla birlikte nanoteknoloji nükleer enerji ve genetik mühendisliğinde olduğu gibi bazı etik konuları gündeme taşımaktadır (2).

Nanomalzemelerin sahip oldukları bu son derece küçük boyutlarından dolayı, sağlık alanındaki etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (3).

Ticari olarak en fazla kullanılan nanopartiküllerin başında titanyum dioksit (TiO_2) gelmektedir. Nanomalzemeler endüstride üstün özellikler taşımasına rağmen toksik etkilere yol açtığı bilinmektedir. TiO_2 parçacıkları çok çeşitli organik ve biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilecek güçlü oksitleyici ajanlardır (4).

Bu çalışmada birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanıldığı bilinen TiO₂ nanopartiküllerinin doza ve süreye bağlı olarak insan aort düz kas hücre hattı (T/G HA VSMC) üzerindeki, sitotoksik etkisinin, mitokondriyal aktivite ölçüm testiyle (MTT) ve genotoksik etkisinin ise qRT-PCR yöntemiyle değerlendirilmesi planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

NANOTOKSİKOLOJİ

Nanoteknoloji, sağladığı faydalardan dolayı bazı araştırmacılar tarafından gelecek vaad eden faydalı bir bilim alanı olarak görülürken, bazıları tarafından ise oluşturacağı olası yan etkilerden dolayı dikkatli yaklaşılması gereken bir bilim alanı olarak değerlendirilmektedir. İlk dönemlerde nanoteknolojinin sadece yararları göz önüne alınmış, böylelikle bu alandaki faaliyetler kısa sürede hızla çoğalmamıştır. Bu sürecin devamında ise nanomateryallerin canlı sistemler üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği ve bunların sonuçlarının ortaya konduğu çalışmalar hız kazanmıştır. Günümüzde nanoteknolojinin gelecekte sunacağı faydalar ile ilgili olarak önemli araştırmalar yapılırken, muhtemel risklerinin değerlendirildiği araştırmalar kısıtlı sayıdadır (1). Bu nedenden dolayı son yıllarda tüm dünyada nanoteknolojinin meydana getireceği risklerin tartışılması hızla artmaktadır. Nano boyuttaki maddelerin insan ve çevre sağlığına olan olası etkileri hakkında bilgi sunan çok sayıda rapor hazırlanmıştır (3).

Nanopartiküllerin toksisitesi tam anlamıyla ortaya konmamış olsada bazı çalışmalar toksisitenin çeşitli unsurlara bağlı olduğunu göstermiştir. Bu unsurlar; nanopartiküllerin çeşidi, yüzey kimyası (örneğin; katyonik Au nanopartiküller genellikle toksik iken aniyonikler toksik değildir.), boyutu (tek başına veya toplanmış durumlarının boyutu), biçimi, derişimi ve sentezlenmesinde kullanılan birkaç maddedir (5-9).

Nanopartiküllerin, hücrelerdeki toksik etkilerinin, benzer mekanizmalarla meydana gelebileceği düşünülmektedir. Nanopartiküllerin genel olarak, mitokondriyal işlevi, laktik dehidrogenaz (LDH) salınımını, plazma membran geçirgenliğini değiştirebileceğini, aynı

zamanda apoptoz ya da nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olabileceğini göstermiştir (10,11).

Nanomalzemelere maruz kalma ile ilgili ortaya çıkabilecek olası tehlikelere karşı alınması gereken önlemlerin ortaya konması oldukça önemlidir. Nanomalzemelerin kimyasal ve fiziksel yapılarının, yüzey alanı ve çözünürlüklerinden oluşan fizikokimyasal özelliklerinin canlı sistemler üzerindeki etkileri açık değildir. Bir çok çalışma nano boyuttaki yapıların şeklinin, boyut büyüklüğünün, biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinde önemli olduğunu ortaya koymaktadır (12).

Nanomalzemeler deri ve solunum yolu ile vücuda girmektedirler. Bu materyaller genelde nanoparçacık ve havada uçan nanoyapılı malzemeler halinde bulunmakta böylece deri ve solunum yolu ile vücuda girerek, kan dolaşımına katılıp organlara yayılarak toksik etki göstermektedirler.

ABD’de Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü (NIOSH) tarafından, deney hayvanlarında 100 nm den daha küçük olan, çözünme özelliği göstermeyen, partiküllerin daha büyük olanlara oranla, miktarları aynı olsa dahi akciğer iltihaplanması ve akciğer tümöründe artışlara neden olduğu belirtilmiştir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar nano malzemelerin moleküler yapılarının ve nanomalzemelerin yüzey özelliklerinin ve kimyasal bileşimlerinin, muhtemel toksik etkilerini ve toksisite oranlarını etkilediğini göstermiştir. Nanoölçekli aerosol malzemelere maruz kalma durumunda çalışanlarda, akciğer fonksiyonlarda bozukluklar belirtilmiştir (13).

28 Eylül 2005 düzenlenen nanoteknolojik araştırmalar için strateji planı (NIOSH) nanoteknolojik çalışmalarda olası riskleri ve bu konuda alınması gereken önlemleri ortaya koymak üzere hazırlanmıştır. Bu plan çerçevesinde yapılması gerekenler belirli başlıklar altında toplanmıştır. Bu konular; maruz kalma ve doz, zehirlilik, salgın hastalıklar ve gözetleme, risk değerlendirme, ölçüm metodları, kontroller, güvenlik, iletişim ve eğitim, öneriler ve çalışmalar başlıkları altında sınıflandırılmıştır. Planda, yakın bir gelecekte nanoteknolojide meydana gelecek risklerin çoğunluğuna nanoparçacıkların sebep olacağı belirtilmiştir (14).

Nanomateryallerin biyolojik etkisinin belirlenmesi araştırmaları, nanoyapılı tüketici ürünlerinin denenmesi ile giderek çoğalmıştır (15). Hücre içinde veya dışında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ürünleri nanoyapılı malzemelerin toksisitesinin değerlendirilmesinde ele alınan temel faktörlerin başında gelmektedir (16). Süperoksit, hidroksil radikalleri ve ROS insan vücudunda sürekli üretilmektedir. Düşük düzeydeki ROS hücre sel sinyalizasyonun düzenlenmesinde ve normal hücre çoğalmasında etkin rol oynar. Ancak ROS üretiminin

çoğalması hücrel yaşlanmanın patojenezinde önemli role sahiptir. Oksidatif stres, DNA, protein ve lipidler gibi farklı hücrel yapılara hasar vererek karsinogeneze sebep olabilir. Oksidatif stres, kanser oluşumuna katkıda bulunan genomik kararsızlığa sebep olan DNA hasarını tetikler. Oksidatif stres çok çeşitli mekanizmalar ile meydana gelir. Mitokondriyal solunum, enflamasyon ve yabancı bileşiklerin metabolizması gibi mekanizmalar oksidatif stres oluşumunda etkin rol üstlenirler. Hücre içinde veya dışında nanopartiküllerin dağılma özellikleri farklı yollarla hücreyi hasara uğratmaktadır (17,18). Ek olarak, nanoyapılı malzemelerin yüzey elektroniği ve farklı fonksiyonel grupları, nanopartiküller ile onları çevreleyen yapılar arasında etkileşiminin düzeyini belirler (19,20). Hücrel hasarın derecesinin belirlenmesinde nanopartiküllerin boyutları oldukça önemlidir. Bu partiküller boyutlarından dolayı rahatlıkla hücre membranından geçerek hücre içinde hasara sebep olmaktadır (21). Bununla birlikte hücrel etkinliklerinde nanopartiküllerin şekilleride önem arz etmektedir. Küresel olmayan nanopartiküllerin küresel olanlara göre farklı biyolojik etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (22).

NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK ETKİLERİ

Nanopartiküllerin genotoksitesisi ve sitotoksitesisi üzerine yapılan araştırmalarda nanopartikülün büyüklüğüne, türüne ve çalışmalarda kullanılan metodlara bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Nanopartikül büyüklüğündeki çok ufak değişikliklerin dahi sitotoksitesiyi değiştirebileceği Pan ve ark. (8) tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar, L929, Hela ve melanom hücrelerini 12 saat süreyle farklı boyutlardaki altın (Au) nanopartikülleri ile muamele etmiş ve sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak 15 nm Au partikülünün toksik olmadığını; 1,4 nm Au partikülünün nekrozla hücre ölümüne; 1,2 nm Au partikülünün ise apoptoz ile programlı hücre ölümüne sebep olduğunu açıklamışlardır.

Hussain ve ark. (23), farklı büyüklükte birçok farklı nanopartikülün BRL 3A sıçan akciğer hücrelerindeki toksik etkisini, hücre proliferasyonunu MTT testi ve ROS oluşması ile ilişkilendirmişlerdir. Brayner ve ark. (24), bakteriler üzerine yaptıkları bir araştırmada, çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin toksik etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte ZnO nanopartiküllerinin fare nöroblastom hücre hatlarında anormal morfolojiye sebep olduğunu, insan endotel hücrelerinde klastojenik etkisinin olduğunu, insan epidermal hücrelerinde ise konsantrasyona bağlı olarak DNA yapısında hasara yol açtığını farklı çalışmalarla ortaya konmuştur (10,25,26).

Deri fibroblast ve insan akciğer epitel hücre hatları üzerinde ve sıçanlarda in vivo olarak yapılan araştırmalarda anataz formdaki TiO_2 'nin 100 $\mu g/mL$ üzerindeki

konsantrasyonlarında sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiş ayrıca solunum sistemi üzerine toksik etkileri olduğu ortaya konmuştur (27).

Nano boyutta kullanılan TiO_2 partiküllerinin pulmoner fibrozis ve sıçanlarda akciğer tümörleri meydana getirdiği bildirilmiştir. Wang ve ark. tarafından insan lenfosit kültürlerinde yapılan çalışmada 100 nm'den küçük TiO_2 partiküllerinin 0.25, 65, 130 $\mu g/mL$ dozlarında 6, 24, 48 saat inkubasyon sürelerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Hücre ölümlerinde, uygulama dozunun ve uygulama süresinin önemli olduğu ve hücre ölümlerinde artışa yol açtığı belirtilmiştir. Genotoksik olarak 65 $\mu g/ml$ dozda DNA hasarında kontrole oranla arttığı COMET testi ile belirlenmiştir. Ayrıca mikronukleus (MN) oluşumunda mutasyon frekansında artışın meydana geldiği ifade edilmiştir (4).

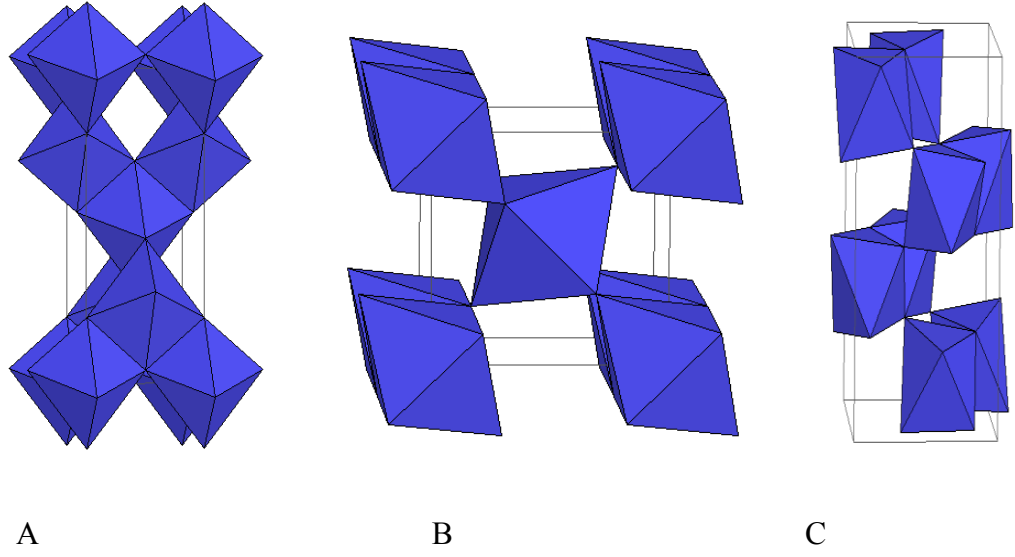
TiO_2 partiküllerinin genotoksik ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada kardeş kromatit değişimi (SCEs) ve MN metodları kullanılarak toksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Her iki yöntemle de doza bağlı olarak genotoksik etkide artış saptanmış ve TiO_2 'in oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir (28).

William F. ve Awadhesh J. (29) tarafından yapılan bir başka çalışmada 11.8-38.5 nm boyutlarındaki TiO_2 nanopartiküllerinin balıklar üzerindeki toksik etkilerini araştırılmıştır. Çalışılan dozlarda genotoksik etki bulunamazken, lizozomal canlılık testi üzerinden sitotoksik etki değerlendirilmiş ve 50 $\mu g/mL$ doz ve üstünde sitotoksik etkinin olduğu ifade edilmiştir.

TİTANYUM DİOKSİT

Titanyum, oksit şeklinde dünya kabuğunda bol miktarda vardır. Plaj kumlarında, kayalarda “İlmenit” $FeO \cdot TiO_2 = FeTiO_3$ ve daha az oranda bulunan rutil TiO_2 mineralleri vardır. Asıl kaynağı Avustralya'daki plaj kumlarıdır. Kırmızı, kahverengi ve sarı renkli olabilen tetragonal kristallerdir (30).

TiO_2 , beyaz toz şeklinde, kokusuz ve yanıcı olmayan bir maddedir. Rutil, anataz ve brokit olmak üzere üç çeşit yapısı bulunmaktadır. Hepsi oktahedral TiO_6 yapısındadır. Anataz, rutil ve brukitin kristal yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir. (31,32).



Şekil 1. Titanyum dioksitin A-Anataz, B-Rutil, C-Brokit kristal yapısı.

Tablo 1. TiO₂' nin temel fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül ağırlığı	79.866 g/mol
Yoğunluk	3.78 g/cm ³ (Anataz) 4.23 g/cm ³ (Rutil)
Erime noktası	1843 °C
Kaynama noktası	2972 °C
Kristal yapısı	Tetragonal(anataz ve rutil) Ortorombik(brokit)
Kırılma indisi	2.488(Anataz) 2.609(Rutil) 2.583(Brokit)
pH	3-7.5(% 5' lik dispersiyonunun)
Enerji boşluğu	3.05 eV(rutil)
Renk indeksi numarası	CI 77891
Gıda katkı maddesi kodu	E 171
CAS numarası	13463-67-7
EC numarası	236-675-5

g: Gram; **cm³:** Santimetreküp; **°C:** Derece Celsius; **eV:** Elektron volt; **CAS:** Chemical Abstracts Service; **EC:** Enzyme Commission.

TiO₂ nanopartikülü birçok malzemede katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Saydamlaştırıcı özelliğinden dolayı boya ve vernik yapımında, mürekkep imalatında, kağıt endüstrisinde, plastik ürünlerde, gıda ve ilaç sanayinde, güneş kremleri ve çeşitli kozmetik ürünlerde kullanılır (Tablo 3).

Nanoölçekteki TiO₂ molekülleri mor ötesi (UV) ışınlar (dalga boyu 180-340 nm arasındaki ışınım) maruz kaldığı zaman reaktif hale dönüşür. TiO₂ moleküllerine mor ötesi ışınlar çarptığı zaman katalitik bir reaksiyon başlamakta, nano TiO₂ molekülleri foto bozunumu hızlandırmakta ve bu reaksiyonla kirlilik yaratan azot oksitler gibi moleküller kaybolmaktadır. Fotokatalik özelliği nedeniyle nano titanyum dioksit kullanımının avantajı günümüzde artmaktadır. Örneğin, binaların dış cephelerinde kullanılan nano TiO₂ katkılı boyalar, yüzeylere bakteri ve kirin yapışmasını engellemekte ve kirin yağmurla kolayca yıkanıp uzaklaşmasını sağlamaktadır. TiO₂ fotokatalitik özellikte bir madde olması nedeniyle fotokimyasal hidrojen ve kendi kendini temizleyen camlarda tercih edilmektedir. TiO₂ nanoparçacıkları çevre teknolojilerinde; atık suların ve yeraltı sularının işlenmesinde, benzotiofenin (C₈H₆S) dizel yakıtlardan arındırılmasında ve azot oksit (NO), kükürt dioksit (SO₂) gibi hava kirleticilerinin yok edilmesinde başarılı olarak kullanılmaktadır (33-35).

Güneş kremleri, hemen hemen her tüketicinin kullandığı ürünler arasındadır. Güneş kremleri içerisindeki ZnO ve TiO₂ inorganik nanopartikülleri deride beyaz görüntülere sebep olurlar. Yüzey alanı olarak geniş olan bu partiküller görünür ışığın çoğunu dağıtırlar. Partikül alanının küçük olması görünür ışığın saçılımının daha az olması anlamına gelmektedir. Bu sebeple, aynı içerikteki nano formda ilave edildiğinde, daha az ışık yayılmış olur ve güneş kremleri daha şeffaf görünüm kazanarak nanopartiküllerin şimdilerde güneş kremlerinin gerekli içeriği olduğu anlamına gelmektedir (26). ZnO ve TiO₂ özellikle pigment maddesi olarak endüstriyel ve ticari uygulamalarda çok geniş bir alanda yaygın olarak kullanılan iki kimyasal bileşiktir. Fiziksel özelliklerine göre, iki bileşik de UV radyasyonunu önlemek için güneş kremlerinde yoğun oranda kullanılmaktadır (36). Nano boyuttaki ZnO ve TiO₂ normal boyuttaki güneş kremlerine kıyasla benzer düzeyde UV radyasyonundan koruma özelliğine sahip olduğu ispat edilmiştir (37). Fakat, nano boyutta tercih edilmesinin sebebi normal boyuttaki partiküllere kıyasla nanopartiküllerin daha fazla transparan özelliğe sahip olmasıdır.

Güneş kremi içerikleri kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana özellikleri temel alınarak değerlendirilir. Kimyasal güneş kremi içerikleri güneşin yaydığı morötesi ışınlarını absorplama sırasında güneş ışınlarına maruz kaldıklarında yapılarında meydana gelen kimyasal reaksiyon ile morötesi ışınlarını absorplarlar. Ancak bu durum deri üzerinde bazı problemlere neden olmaktadır. Absorplama mekanizması kimyasal reaksiyonlar neticesinde

olduğu için morötesi ışık altında oluşan bu reaksiyonlar deride kızarıklık, kaşıntı, yara gibi problemler yaratmaktadır. Fiziksel güneş kremi içeriklerinin en bilinen örnekleri ZnO ve TiO₂' dir. Böyle inorganik yapılar kimyasal reaksiyonlar gerçekleşmeden morötesi ışınlarını absorplayarak ya da saçarak koruma yapmaktadırlar.

Çinko oksit optik özellikleri açısından güneşin yaydığı UVA ve UVB ışınlarını absorpladığı için bu alanda kullanılabilecek en iyi malzemelerden biridir. TiO₂, ZnO' dan sonra bu alanda tercih edilen ikinci bileşiktir. TiO₂ nanopartiküllerinin farklı endüstriyel alanlardaki uygulamaları Tablo 2' de gösterilmektedir.

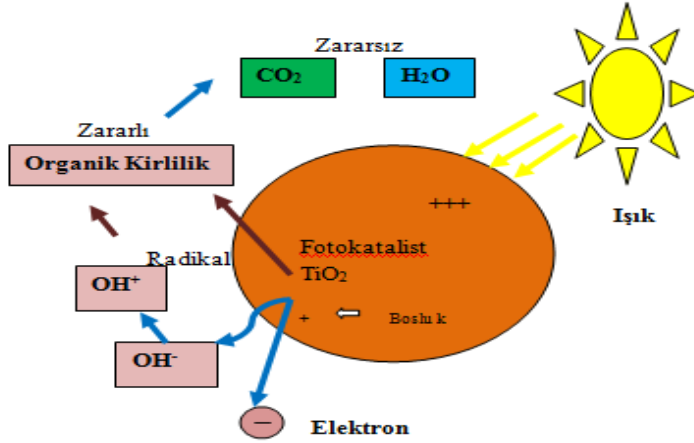
Tablo 2. TiO₂' in uygulama alanları

Uygulama Alanı	Spesifik Kullanımları
Boya	Anataz kristali beyaz boya, vernik, mürekkep imalatında kullanılır.
Gıda	Rutil kristali şekerleme, sakız, kabartma tozu, beyaz leblebi, soslar, süt ürünleri, unlu mamüller, meyve suyu ve toz içecekler imalatında kullanılır.
Seramik	Mineli seramik üretiminde rutil kristali kullanılır.
Kağıt	Kağıt imalatında opaklaştırıcı olarak kullanılır.
Cam	Cam imalatında opaklaştırıcı olarak ve cam elyaf üretiminde rutil kristali tercih edilmektedir.
İlaç	Renk verici katkı maddesi ve kaplama maddesi olarak kullanılır.
Plastik	Saydamlaştırıcı olarak kullanılır.
Kozmetik	Güneş kremi ve losyonlarda, diş macunlarında UVA ve UVB ışınlarını önleme, beyazlaştırıcı, yağlayıcı ve kalınlaştırıcı olarak kullanılmaktadır.
Tekstil	Kendi kendini temizleyen kumaş üretiminde kullanılır.
Diş hekimliği	Bazı kök kanalı dolgusu ve pulpa kaplama maddeleri içinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.
Kaplama	Sırlar ve emayelerde kullanılmaktadır.

TiO₂'in Fotokatalitik Etkisi

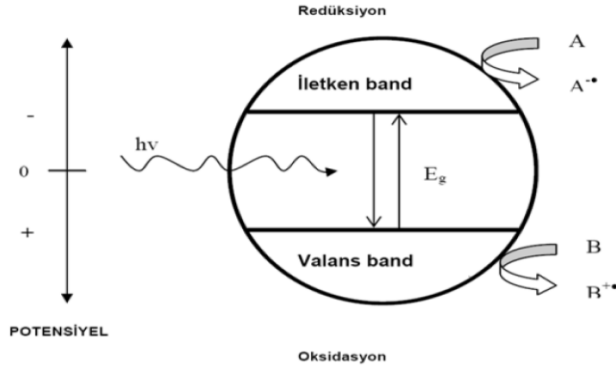
Fotokatalizör, katı bir maddenin, ışık etkisi ile aktif hale geçerek reaksiyon meydana getirmesi ve reaksiyon boyunca varlığını korumasıdır. Uygun fotokatalizör; görünür ışık veya UV ışık ile etki göstermeli, yüksek fotokatalitik aktivite, düşük tane büyüklüğü, yüksek yüzey alanı ve kararlık gibi özelliklere sahip olmakla birlikte toksik etki göstermemelidir. Kristal yapıya sahip yarı-iletken bir madde olan TiO₂'in, anataz ve rutil yapıları fotokatalitik özellik taşır (38,39).

TiO₂, klorofilin fotosentez yeteneğine benzer biçimde, fotokatalitik özellik gösterir (40). Şekil 2'de görüldüğü gibi TiO₂ güneş ışığından absorpladığı UV ışınlarını veya evlerde kullanılan floresan ışıkla etkileşerek bir organik maddeyi karbon dioksit ve suya dönüştürür (41).



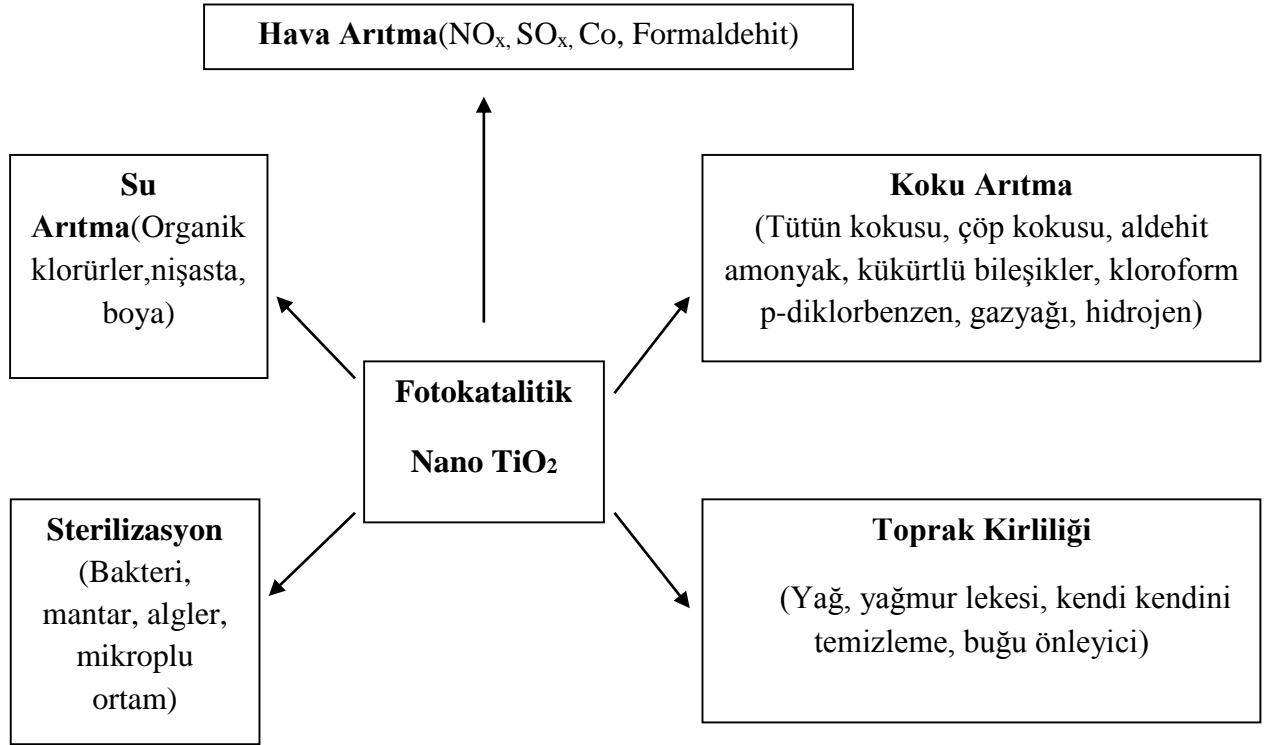
Şekil 2. TiO₂'in fotokatalitik etkisi (42)

Işıklı bir ortamda, TiO₂' in değerlik bandındaki elektron uyarılır. Bu aşırı enerji yüklü elektron, TiO₂' in iletkenlik bandına geçerek negatif elektron (e-) ve pozitif boşluk (h+) çiftini meydana getirir (Şekil 3). Bu aşama, bir yarı iletken özelliğidir ve burada foto uyarılma olmaktadır. Değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasındaki enerji farkına bant boşluğu denir ve bir foto uyarılma için gerekli ışığın dalga boyu 388 nm'dir.



Şekil 3. Fotokatalizlenme mekanizması: A-İndirgenebilir ve B-Oksitlenebilir maddeler (43)

TiO₂' in aynı zamanda, antibakteriyel özellik gösterebilir, buharlaşan organik bileşikler parçalayarak koku giderici (tütün kokusu, benzin kokusu, sigara dumanı gibi) özelliğe sahiptir (Şekil 4). Bunların yanısıra, kirlenen dış cepheler TiO₂' in anti statik, süper oksidan ve hidrofilik özellikleri sayesinde hava şartlarının yardımı ile kendi kendini temizleyebilme özelliği gösterir (44-51).



Şekil 4. Fotokatalitik nano TiO₂' in uygulama alanları

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücrelerin uygun bir besi ortamında in vitro olarak çoğaltılması hücre kültürü olarak tanımlanır. Belirli bir takım maddelerin etkisini incelemek, hücreler tarafından üretilen ve yaşam ortamlarına salınan çeşitli maddelerin etkilerini araştırmak amacıyla belirli bir hücre serisinden üretilen hücrelerle yapılan çalışmalar, in vitro çalışmalar olarak tanımlanır. Günümüzde in vitro çalışmalar oldukça gelişmiş ve beraberinde biyoteknolojinin gelişmesine de katkı sağlamıştır (52).

Hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, proteomik, genomik ve kimya mühendisliğini içeren farklı disiplinlerle hizmet eden hücre kültürü teknolojisi, araştırmacılara in vitro ortamda hücre ve doku davranışlarını araştırma imkanı sağlamaktadır (53,54).

Genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisinin yaygınlaşması hücre kültüründe birçok ürünün üretilmesini elverişli kılmıştır. Çeşitli hücre serilerinde birçok vektör, doğal ve modifiye insan proteinlerinin üretiminde kullanılır. Hücre mekanizması mühendisliği protein ürünlerinin stabilitesinde, etkinliğinde ve biyolojik aktivitesinde modifikasyona olanak verir. Hücre kültürü teknolojisindeki gelişmeler doku mühendisliğine ulaşan yolu açmıştır (55).

Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

İlaçların metabolize olmasında rol oynayan enzim sistemlerinin ve enzim aktivitesini etkileyebilecek unsurların belirlenmesi, ilaç metabolizması sonucunda ortaya çıkan metabolitlerin toksik etkilerinin araştırılması, ilacın metabolik yıkılma süresinin ve birbirleri ile etkileşim derecesinin tespit edilmesi ile birlikte ilaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık etkenlerinin incelenmesi alanlarında hücre kültürü teknolojilerinden yararlanılmaktadır(56).

Toksisite Araştırmalarındaki Hücre Kültürünün Önemi

Hücre kültürü çalışmaları; kimyasal maddelerin muhtemel toksik etkilerinin in vitro ortamda deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde incelenmesine olanak sağlama, toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılması konusunda imkan sunma, deney hayvanların kullanımını azaltarak gereksiz deney hayvanı kullanımını engelleme ve türler arası farklılığı ortadan kaldırma gibi konularda avantajlar sağlamaktadır. Bununla birlikte hücre kültürü çalışmaları, hücrelerin in vitro ortamdaki yaşam sürelerinin kısa oluşu, yaşamaları için bazı kofaktörlere gereksinim duymaları, enzim stabilitelelerinin sınırlı oluşu,

çok faktörlü ilaç metabolizması çalışmaları için uygun olmamaları (tek sistemli olmaları) açısından beraberlerinde bazı dezavantajlarında getirmektedir (57).

Başlıca Hücre Kültür Tipleri

Bu hücre kültürleri çok farklı kaynaklardan elde edilebilir. Hücre kültürleri elde edilmiş biçimleri ve pasajlama sayıları dikkate alındığında üç şekilde incelenir (58).

a) Primer hücre kültürü: Tripsin kullanılması ile dokulardan izole edilen hücrelerin in vitro ortamlarda çoğaltılmaları ile oluşturulan kültürlerdir. Genel olarak bu kültürler birkaç pasajdan sonra çoğalma yeteneklerini kaybederler.

b) Sekonder hücre kültürü: Diploid hücrelerden elde edilen sekonder hücre kültürü hücreleri en fazla 50 kez pasajlanabilirler ve normal kromozom sayısına sahip hücrelerden oluşur.

c) Sürekli hücre kültürü: Sonsuz üreme yeteneğine sahip bu hücreler genel olarak habis tümörlerden elde edilirler ve sonsuz pasajlanabilme özelliği gösterirler. Bu hücreler in vitro ortamda değişikliğe uğrarlar ve kromozom sayıları değişiklik gösterir.

T/G HA VSMC (Aort Düz Kas Hücresi)

Düz kas hücreleri, kan damarlarının histolojik tabakalarından birisi olan Tunika media tabakasını oluşturan önemli hücrelerdir. Bu hücreler mezenkimal hücrelerin diferansiyasyonu ile meydana gelirler. Endotel hücrelerinden salgılanan mediatörler diferansiyasyonun gerçekleşmesinde rol oynar. Anjiyogenezde, vasküler düz kas hücreleri, mezenkimal hücrelerin diferansiyasyonu ile ya da mevcut vasküler düz kas hücrelerinin çoğalması sonucu meydana gelebilmektedir.

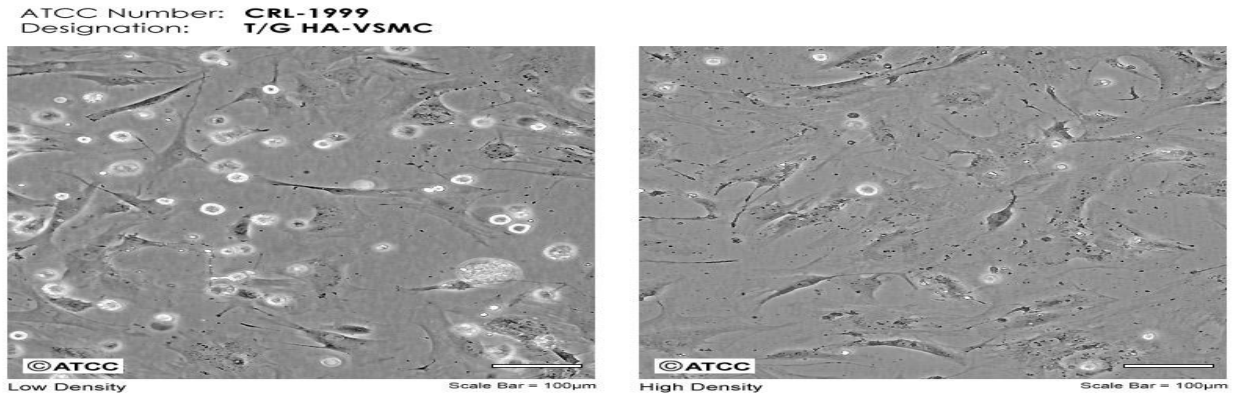
Vasküler düz kas hücrelerinin, canlı organizmalarda gözlenen iki fenotipi bulunmaktadır.

1. Kasılabilme özelliği gösteren vasküler düz kas hücreleri
2. Sentetik tip vasküler düz kas hücreleri

Yetişkin vasküler düz kas hücreleri, kasılabilme özelliği gösterirler ve sitoplazmalarının %75'ni kasılıp gevşeme yeteneğine sahip proteinler oluşturur. Ancak bu hücreler kültüre edildiklerinde sentetik tipteki hücrelere dönüşebilmektedirler. Sentetik tipteki hücreler embriyonal gelişim sürecinde genç damarlarda bulunmaktadır. Bu hücreler

sitoplazmalarında çok sayıda endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı bulundurlar. Ancak aktin ve miyozin gibi kasılıp gevşeme yeteneğine sahip proteinleri az bulundurlar. Aynı zamanda bu hücreler yoğun olarak kollajen ve elastik lifleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Vasküler düz kas hücrelerinin kasılıp gevşeme yeteneklerini kaybederek sentetik tipe değişimleri arteriogeneizde önem taşımaktadır (59).

T/G HA VSMC hücreleri insandan (*Homo sapiens*) elde edilmiş normal aort beyaz kas hücreleridirler (Şekil 5). Fibroblast görünümünde olan bu hücreler yapışkandırlar. 46, XX karyotipine sahiptir. Normal insan genotipine sahip bu hücrelerin % 0.8'inde poliploidi gözlemlenmektedir. Herhangi bir kromozom değişimleri yoktur ve iki X kromozomu da normaldir (60,61).



Şekil 5. T/G HA VSMC hücre hattı (60, 61, 62)

Hücre Kültürü Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gereken Konular

Hücre kültürlerinde çalışılan ortamların mikroorganizmalardan arındırılması (asepsi) oldukça önemlidir. Asepsinin sağlanması ve hücre hattının içeriğinin muhafaza edilmesi için dikkat edilmesi gereken bazı kurallar mevcuttur (63).

Bu kurallar şu şekilde sıralanabilir:

1. Çalışılacak hücre hattının içeriği çalışma öncesinde mutlaka doğrulanmalıdır.
2. Subkültür öncesinde ve sonrasında hücrelerin yapısını standart fotoğraflar kullanılarak değerlendirilmelidir.
3. Her hücre hattı için, ayrı bir vasat tercih edilmelidir.
4. Hücre kültür flaskları, vasatları ve besi ortamlarının muhafaza edildiği şişeler her bir hücre hattı için özel olmalıdır.

5. Kullanılan pipetler tek hullanımlık olmalıdır. Hücre içeren bir flaska sokulan pipet bir daha kullanılmamalıdır. Her zaman tıkaçlı pipetler tercih edilmelidir.
6. Hücre hatlarında mikoplazma kontaminasyonun olup olmadığı mutlaka kontrol edilmelidir.

Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri

Kültüre alınan hücreler steril bir ortama ve bazı besin öğelerine ihtiyaç duyarlar. Her şeyden önce kültür ortamı, pH ve sıcaklık açısından kararlı olmalıdır.

Tampon sistemleri: Besi ortamı bileşenleri, hücreler açısından sağlıklı büyüme ortamının sağlanması için önemlidir. Hücrenin osmotik basıncının düzenlenmesinde rol oynayan sodyum, kalsiyum ve potasyum iyonlarının tampon sistemleri içindeki varlıkları ve konsantrasyonları önem taşımaktadır. Bu iyonlarla birlikte besi ortamlarında, inorganik tuzlar, aminoasitler, karbonhidratlar, vitaminler, peptitler, proteinler, yağ asitleri, lipitler ve serumlar yer almaktadır.

Kültür ortamının pH'sı oldukça önemlidir. Bir çok hücrenin en iyi gelişim gösterdiği pH aralığı 7,2 - 7,4'dir. Üreme ortamlarındaki uygun pH sınırlarını dengede tutmak amacı ile en sık olarak iki ayrı sistem kullanılmaktadır. Bu sistemler;

1. Doğal tampon sistemi olan CO₂ gazı CO₃ / HCO₃ tampon sistemi
2. HEPES(4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethansulfonik asid) adı verilen özel bir kimyasal tampon ile sağlanır.

Doğal bikarbonat (HCO₃) - CO₂ tampon sistemleri CO₂ inkübatöründe %5 - 10'luk CO₂ atmosfer ile birlikte kullanılır. CO₃ - CO₂ hücreler için toksik etki yaratmaz. HEPES ise, çok yüksek tampon kapasitesine sahip olmasına rağmen 7,2 - 7,4 pH aralığındadır ve yüksek konsantrasyonları toksik etki gösterebilir. Bu tampon sisteminde, ayrıca gaz atmosfere ihtiyaç yoktur (55).

Temel besiyeri bileşenleri: Günümüzde hayvan hücrelerinin kültürü için çok sayıda formülasyon bulunmaktadır. Hangi formülasyonun kullanılacağı kültürü yapılacak olan hücreler ile ilişkili olarak değişebilmektedir. Bu besiyerinin içerikleri karbonhidrat, aminoasitler, tuzlar, vitaminler, hormonlar ve büyüme unsurlarını gibi kompleks karışımlardan oluşmaktadır.

Besiyeri, plazma ve embriyonik ekstraktlar gibi çeşitli biyolojik sıvılarda hayvan hücrelerinin büyütülmesine dayanmaktadır. Kimyasal olarak içeriği bilinmeyen besiyerlerinin

kullanılması çeşitli ve duyarlı kontaminasyonlar bakımından dezavantajlara sebep olduğundan, bu durum kimyasal içeriği belli olan kültür besiyerlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Hücre çoğalması için gerekli olan esansiyel bileşiklerin bulunması besiyeri çalışmalarında alternatif gelişmelere yol açmıştır. Günümüzde Eagle'ın temel besiyeri (Eagle's basal medium – BME) BME'nin, modifiye edilmesiyle üretilmiş olan, EMEM, (64), Glasgow'un Eagle'dan modifiye besiyeri (Glasgow's modification of Eagle's medium-GMEM), Joklik'in Eagle'den modifiye besiyeri (Joklik's modified of Eagle's medium), kültür süspansiyonu için gerekli büyüme besiyeridir (65). Alpha'nın Eagle'den modifiye besiyeri, melez fare - hamster hücrelerinin ribozomunda çalışmak amacıyla kullanılan besiyerleri arasındadır (66). Bunların dışında, McCoy'un 5A besiyeri, besiyeri 199'dan aminoasit ve vitamin karışımı ile BME'den temel alınarak üretilmiştir. Bu besiyeri McCoy ve arkadaşları tarafından formüle edilmiş (67) ve sonra Hsu ve Kellogg (68) ile Iwakata ve Grace (69) tarafından modifiye edilerek kullanıma sunulmuşlardır. Sonraki modifikasyonlarda L-alanin yerine D-alanin tercih edilerek McCoy'un besiyeri klonlanmış hücrelerin standart besiyeri olarak kullanılmaya başlanmıştır (67, 70).

Serum içermeyen formülasyonların kullanımı için çok sayıda kompleks besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri arasında Bigger's besiyeri (71), Connaught Medical Research Laboratories- (CMRL) 1066 besiyeri (72) bulunmaktadır. Ayrıca eRDF, RPMI 1640: DMEM: F12 (2 : 1 : 1) karışımıdır. Hücre kültüründe farklı tür hücrelerin birleşmesiyle meydana gelen melez hücre klonlarını desteklemek için bulunmuş serum olmayan formülasyondur (73).

Standart besiyeri formülasyonları hem sıvı hem de toz olarak ticari üreticilerden satın alınabilir. Sıvı formları x1 ya da x10 konsantrasyonlarda satışa sunulmaktadır ve ihtiyaç duyulan sonraki seyretme steril saf su ile yapılır. Alternatif olarak özellikle fazla miktarda besiyeri yerine ihtiyaç duyulduğunda toz besiyeri kullanılabilir. Bu durumda toz besiyeri saf suda çözülmeli ve 0,22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilmelidir. Steril sodyumbikarbonat, antibiyotikler ve glutamin çoğu zaman besiyerinin sterilizasyonundan sonra eklenir. Antibiyotikler hücre kültürlerinde ortaya çıkabilecek olan kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla kullanılmaktadırlar (55). Besiyeri ortamlarına ilave edilen antibiyotiklerin konsantrasyonları amaca yönelik olarak değişiklik göstermektedir. Gram pozitif bakterilerin gelişimini engellemek amacıyla 100 IU/ml Penisilin, gram negatif bakterilerin gelişimini engellemek amacıyla 50 µg/ml Streptomycin kullanılmaktadır. Ayrıca 25 µg/ml Amphotericin-B antifungal olarak ilave edilmektedir.

Hücre kültürü ortamına ilave edilen karbonhidratlar genelde glukoz ve galaktoz olmakla beraber besi ortamında maltoz ve fruktoz da kullanılabilir. Karbonhidratlar besi ortamında 1 g/L ve daha karmaşık besi ortamında ise 4,5 g/L konsantrasyonda kullanılabilir.

Hücre kültür ortamında bulunan bir diğer bileşen de bir serin proteaz tipi enzim olan tripsindir. Hücre pasajlamalarında kullanılan tripsin, lizin ve arjinin aminoasitleri arasındaki peptit bağını kırar. Hücre kültürlerinde kullanılan serum tripsin inhibitörlerine sahiptir. Bu yüzden hücreler tripsine maruz bırakılmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg bulundurmeyen fosfat tampon tuzu (PBS) ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır (74).

Kültür ortamında büyüyen hücreler açısından serum oldukça önemlidir. Kültür besiyerine % 5 - 10 konsantrasyonda serum ilave edilene kadar büyümenin gerçekleşmediği görülmüştür. Serumun niteliği hücrelerin gelişimi açısından oldukça önemlidir.

Hücre büyümesi için en sık olarak fetal sığır serumu kullanılmaktadır. Fetal sığır serumu embriyonik büyüme faktörü içermesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir (55). Hücre kültür ortamında ki serum aynı zamanda çok önemli bir vitamin kaynağıdır. Vitaminler besi ortamının zenginleştirilmesinde kullanılırlar. Bazı besi ortamları, A ve E vitaminlerine ihtiyaç duyabilirler. B grubu vitaminler, hücre gelişiminde büyük önem arz etmektedir.

Ayrıca serum, protein ve lipitler gibi besi değerlerini içerebilir. En yaygın kullanılan protein ve peptitler; albumin, transferrin, fibronektin ve fetuindir. Bunlar besi ortamına serum ile ilave edilirler. Ancak serum bulundurmeyen ortamlarda protein ve lipitlerin mutlaka yer alması gerekir. Hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılan aminoasitler Tablo 3' de gösterilmiştir. Özelleşmiş hücreler kolesterol ve steroidlere ihtiyaç duyabilirler. Besi ortamı içinde, çinko, bakır, selenyum ve trikarboksilik asit gibi eser elementler bulunabilir (75).

Tablo 3. Memeli hücre sistemleri için temel ve temel olmayan amino asitler

<i>Temel Amino Asitler</i>		<i>Temel Olmayan Amino Asitler</i>	
<i>Nötr</i>	Metiyonin Fenilalanin Triptofan Valin Glutamin İzolösin Lösin	<i>Nötr</i>	Glisin Prolin Serin Tirozin Alanin Asparajin Sistin
		<i>Asidik</i>	Aspartik Asit Glutamik Asit
<i>Bazık</i>	Lizin	<i>Bazık</i>	Histidin Arjinin

HÜCRELERDE TOKSİSİTENİN GÖSTERİLMESİ

Sitotoksosite Testleri

Hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için metodlar arasında en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Bu metodlar ile birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilmektedir. Sitotoksosite deneyleri farklı parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını tespit eden çalışmalardır (76). Sitotoksosite, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının değerlendirilmesinde önemli bir faktördür. Sitotoksitenin karsinogenesis ve inflasyonun da içinde bulunduğu patolojik proseslerde etkin bir şekilde görev aldığı varsayılmaktadır. Sitotoksosite serbest radikaller, iritanlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir. Sitotoksosite testleri, toksik olduğu varsayılan maddelerin, belli kültürler kullanılarak, hücre büyümesi ve hücre hasarı üzerindeki etkileri göz önüne alınarak değerlendirmenin yapılmasına olanak veren testlerdir . Bu test sistemleri; hücre hasarın belirlenmesi, hücre büyümesinin gözlemlenmesi ve hücre metabolizmasının değerlendirilmesi açısından sonuçlar sunmaktadır. İn vitro testler; sitotoksositeyi, metabolik veya diğer hücre fonksiyonlarını ve genotoksositeyi değerlendirmede fayda sağlarlar bu anlamda üç grup altında toplanırlar (77).

İN vitro sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi sağlayan göstergelerdir.

parametrelerinin ölçülmesine dayanır. Nötral Kırmızı (Neutral Red - NR) ve MTT deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının ölçülmesinde çoğunlukla kullanılan metodlardır (78).

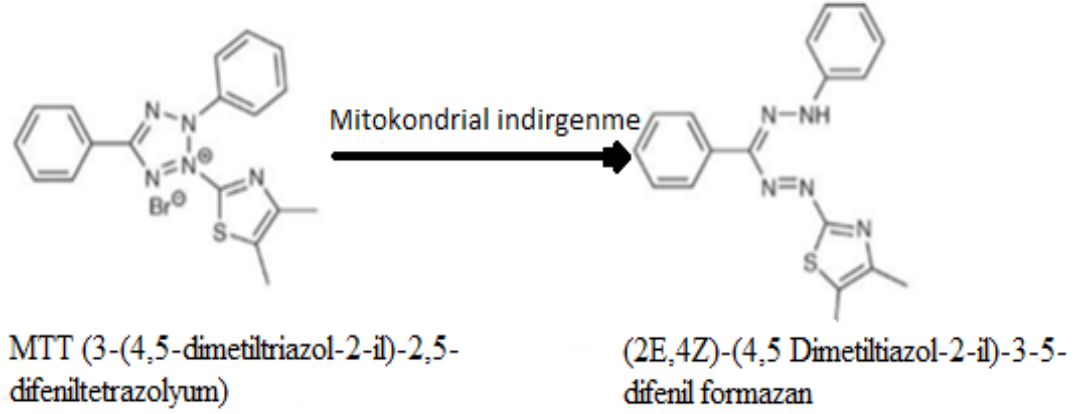
Sitotoksitenin in vitro testler ile değerlendirilmesindeki en önemli noktalardan birisi toksisite testleri için kullanılan hayvanları dışarıda bırakmasıdır. Bunun yanı sıra hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının tespit edilebilmesidir. Tüm bunların sonucunda yeni ürünlerin toksisitesinin in vitro metodlarla üretimin erken evrelerinde tespit edilebilmesi harcanan paradan ve zamandan tasarruf sağlamaktadır (76). Ancak in vitro testlerin başlıca dezavantajları, organizmanın dışında gerçekleştirildikleri için, vücutta biyolojik yanıtı oluşturan birçok etkileşimin mevcut olmamasıdır (79).

Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi: Nötral kırmızı testi kalorimetrik bir metottur. Bu metodun esası nötral kırmızısının (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) lizozomlarda biriken, anyonik yapılara tutunmasına dayanır. Nötral kırmızısının anyonik yapılara olan ilgisi katyonik özellikte olması ile açıklanır (80,81,82). Hücre yüzeyindeki veya hassas lizozom membranının bozulması sonucu, boyanın alımını ve bağlanmasını azaltır. Böylece canlı, hasarlı veya ölü hücreler birbirinden ayrılır (83,84). Nötral kırmızı boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında yoğun olarak toplanmaktadır (85).

Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi: MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) testi, hücre kültüründe indirekt olarak hücre büyümesi ve hücre ölümünü belirlemek amacıyla kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. MTT, mitokondrilerde gerçekleşen reaksiyon ile koyu mor renkli, suda çözünmeyen formazan ürününe indirgenen sarı renkli bir boyadır (86). MTT testi, diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında, maliyet açısından uygun olması tekrarlanabilir olması ve kolay bir yöntem olması bakımından üstünlükleri nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir (87,88,89).

Bu metod ile canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenazın MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi prensibine dayanmaktadır. Meydana gelen reaksiyon fragil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Oluşan koyu mor renkli formazan tuzunun yoğunluğuna bağlı kolorimetrik olarak ölçülen değer, canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak değerlendirilir (90). Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler boya ile mor renkte boyanmakta, canlılığını yitirmiş, fonksiyon gerçekleştiremeyen mitokondrilere sahip hücreler ise boyanmamaktadır.

Genel olarak yöntem öncelikle hücrelerin MTT boyası ile inkübe edilmeleri, inkübasyon süresi sonunda oluşan çökeltme reaksiyon ürününün çözünür hale gelmesi ve bu ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Şekil 6. MTT' nin formazana dönüşümü (91)

GENOTOKSİSİTE

Genotoksisite, kimyasal, fiziksel veya biyolojik maddelerin genetik materyalde yol açtığı hasardır (92). Bir çok kimyasal ajan ve besin maddesi direk yada indirek olarak DNA üzerinde genotoksik etkiye yol açmaktadır (93). Genotoksisite, DNA yapısında gözlenen DNA kırıkları, nokta mutasyonlar, kromozom yapısı ve sayısı hasarlarının tanımlanması için kullanılan bir ifadedir. Genotoksik etki ise, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu esnasında genotoksik maddelerin, bu olayları kontrol eden enzimlerin aktiviteleri üzerine etki ederek DNA hasarı ya da DNA'nın işleyişinde değişimlere yol açmasını ifade eder (94).

Genotoksisite testleri 1970' lerden günümüze kadar gelişerek farklılaşmıştır. Günümüzde mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik etkilerini ölçebilmek amacıyla geliştirilmiş çok sayıda genotoksisite testi bulunmaktadır. Bu testler arasında;

1. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi,
2. Ames testi,
3. Kromozom anormallikleri (KA) testi,
4. Comet testi,
5. Mikronükleus (MN) testi
6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yer almaktadır.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

1985 yılında Erlich, Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilen PCR özel bir DNA dizisini çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Günümüzde genotoksisitenin gen düzeyinde değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR'ın mevcut bileşenleri; amplifiye edilecek kalıp DNA, bu kalıp DNA'nın komplementeri (cDNA) dizisi olacak biçimde seçilmiş ve genelde 20 bazlık sentetik oligonükleotid primerleri ve Taq DNA polimerazdır. Kofaktör olarak Mg^{+2} iyonu kullanılmaktadır. Reaksiyonda kullanılan dATP, dGTP, dTTP, dCTP 2'den ibaret olan dNTPler Taq DNA polimerazın substratını oluştururlar. Yeni sentezlenen DNA zincirinin uzaması primerler ile başlatılan ve Taq polimeraz tarafından dNTP'lerin eklenmesiyle sağlanır. Hedef DNA'nın çoğaltılması genelde 20-40 PCR döngüsüyle gerçekleşir. Her bir döngü farklı sıcaklıkları birbirinden farklı olan 3 aşamadan oluşur. Bunlar kalıp olarak kullanılan çift zincirli DNA dizisinin açıldığı ve tek zincir halini aldığı denatürasyon, 50-60°C arasında meydana gelen tek zincirli kalıp DNA'nın primerlerle birleşme safhasıdır. DNA polimeraz enziminin maksimum aktivite gösterdiği 72°C de meydana gelen uzama safhasıdır. Böylece ortamda bulunan Taq polimeraz tek sarmal primerle başlar ve ortamdaki dNTP'lerin harcanmasıyla zincirin uzamasını katalizler bu 3 aşamanın 20-40 döngü olarak tekrarlanmasıyla süreç devam eder.

PCR' ın Uygulama Alanları

PCR uygulaması DNA klonlanmasından daha az zahmetli ve kısa sürmesi nedeniyle tercih edilen bir uygulamadır. PCR klinik alanda kullanımlarına ek farklı disiplinler tarafından yaygın kullanıma sahiptir (95). Bunlar özetlendiğinde;

1. Hemofili gibi kalıtsal hastalıkların teşhisinde yaygın olarak PCR uygulamalarından yararlanılmaktadır. Hasta genlerindeki bozukluklar ve taşıyıcılar bu sayede belirlenir.
2. Kanser araştırmalarında mutasyonlar PCR teknolojisiyle aydınlatılabilir.
3. Adli tıp araştırmalarında; suçlu kişilerin belirlenmesinde ya da babalık testinde kullanılmaktadır.
4. Biyoteknolojik olarak rekombinant proteinlerin ve rekombinant aşuların üretilmesinde tercih edilir.

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); retro virüslerden elde edilen revers transkriptaz enziminin kullanılmasıyla izolasyonu yapılan RNA moleküllerinden cDNA'nın sentezlenmesi ve bu cDNA üzerinden gen ekspresyon analizlerinin yapılmasına olanak veren hassas ve sık kullanılan bir yöntemdir (96).

Farklı dokulardan başarılı RNA izolasyonu, RT-PCR ve Real Time PCR tekniklerde doğru sonuçların alınmasında sonuçların doğru değerlendirilmesi açısından önemlidir (97).

RT-PCR sonuçlarının sağlıklı olabilmesi için uygun primerlerin ve tamponun seçilmesi, döngü sayısının doğru belirlenmesi, yüksek saflıkta izolasyonun yapılması ve kalıpların doğru hazırlanması önemlidir (98).

ISI ŞOK PROTEİNLERİ

Isı şok proteinleri ilk kez *Drosophila melanogaster*'ın tükürük bezi kromozomlarında Ritossa ve ark. (99) tarafından 1962 yılında tanımlanmıştır. 1974 yılında da Tissieres ve ark. (100) tarafından "Isı şoku ile artan gen ürünü" olarak ifade edilmiştir. Isı şok proteinleri ailesinin üyeleri, evrimsel süreç içerisinde hem prokaryotlarda hemde ökaryotlarda oldukça iyi korunmuşlardır. Hücre içerisinde strese bağlı olarak devamlı olarak sentezlenmektedirler (101). Isı şok proteinleri, molekül ağırlıklarına göre bazı alt gruplara ayrılırlar. Bu grupların içinde en iyi tanınanları HSP60 ve HSP70 proteinleridir. Bu grubun üyeleri farklı özellikleri açısından birbirlerine benzemektedir ve temel görevleri proteinlerin endoplazmik retikulum matriksinde doğru katlanmalarını sağlamaktır (102). Isı şok proteinleri hücrede, büyüme, farklılaşma, bölünme, hücre ölümü de dahil olmak üzere bir çok metabolik olayda rol oynamaktadır. Isı şok proteinlerinin en önemli fonksiyonlarından birisi immün cevabın oluşmasındaki etkileridir. Gelişen bir enfeksiyona karşı antijen olarak görev yaparlar (103). Aynı zamanda, ısı şok proteinlerin diğer proteinlerle etkileşerek onların fonksiyon ve yapılarını değiştirebilme özelliği taşırlar. HSP60 ve HSP70 ailelerinin bireyleri, hücre içi polipeptidlerin katlanmalarında, açılmalarında ve taşınmalarında , oliogomerik protein komplekslerin toplanmasında, birleşme ve ayrılmalarında da rol alırlar. Bu sayede proteinlerin sitoplazmik proteinlerin mitokondri, kloroplast veya endoplazmik retikuluma taşınarak organellerin içinde doğru katlanmalarını sağlarlar (104).

HSP70 Proteinin Hücredeki Görevleri

HSP70 ailesinin hücredeki görevleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Proteinlerin hücre içinde taşınmasına
2. Sitozol, endoplazmik retikulum, mitokondrideki proteinlerin katlanmasına
3. Kararsız proteinlerin yıkımına
4. Protein komplekslerinin çözünmesine
5. Protein agregasyonunun engellenmesine
6. Bozuk katlı proteinlerin yeniden katlanmasına
7. Programlı hücre ölümüne (apoptosis) yardımcı olurlar (105).

HSP70 Proteininin Yapısı

Hsp70 proteini, proteinlerin üç boyutlu yapılarını kazanmaları ve bu yapıların korumalarını sağlar. Bu proteinler sentezlenmiş proteinlerin doğru konfigürasyonu kazanmalarında ve bu yapılarını korumada, agregasyonun önlenmesinde görev yaparak hücreyi stresten korurlar. Isı şok proteinleri stres faktörlerine yanıt olarak prokaryotik ve ökaryotik canlılarda üretilir. Bu protein translyasyon, membranlar arasında protein taşıma ve kltrin parçalanması gibi hücrel görevlerine ilaveten üçüncül yapılarına kısmi olarak erişmiş proteinlere bağlanıp agregasyonu önleyerek hücreleri stresten korur. Tüm bu farklı fonksiyonlar substratın proteine bağlanma ve salınmasına bağlı olarak düzenlenmiştir. HSP70'ler; 44 kDa'lık ATPaz domain, 18 kD'lık substrat bağlanma domain ve 10 kDa'lık C-terminali olmak üzere üç domainden oluşur (105).

1. N- ucu ATPaz domaini: Bu bölge ATP'ye bağlanarak, ADP'ye hidrolize olmasını ve ATP'den ADP'ye dönüşüm, yapısal değişim için gerekli enerjiyi sağlamaktadır.

2. Substrat bağlanma domaini: Nötral ve hidrofobik aminoasit rezidülerine yüksek afinite gösteren bu alan aracılığıyla peptidlerle etkileşim kurulması gerçekleştirilmektedir.

3. C- ucu domaini: Bu bölge substrat bağlanma alanı oluşturmaktadır. HSP70 proteinine ATP bağlı olduğunda C-ucu domaini açık olmakta, peptidler hızla proteine bağlanmakta ve ayrılmakta iken, ADP bağlı olduğunda C- ucu domaini kapalı durumda olup peptidler substrat bağlanma alanına sıkıca tutturulmaktadır (105).

Antioksidan Savunma Sistemi

ROS oluşumunu engellemek, bunlara bağlı oluşan hasarın önlenmesini ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemleri “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/ peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir. Antioksidanların rolleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak sayılabilir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ya da ROS'u süpürerek hücreyi lipid peroksidasyonunun toksik etkilerine karşı korurlar (106,107).

Normal fizyolojik koşullarda reaktif türlerin oluşumu farklı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenirken, ROS'un fazla üretilmesi oksidatif stresle sonuçlanır; oksidatif stres, lipidler ve membranlar, proteinler ve DNA da dahil olmak üzere hücre yapılarında hasarın önemli aracısıdır (108).

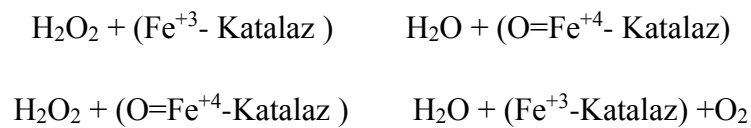
Glutasyon (GSH): Glutasyon, düşük molekül ağırlığa sahip, çözünebilir önemli bir antioksidandır. Glutamik asit, sistein, ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH, karaciğerde yoğun olarak sentezlenmektedir. Hücre metabolizmasında ve hücre yapısının korunmasında rol oynayan esansiyel bir bileşiktir. Glutasyon hücreyi oksidatif hasara ve serbest radikallere karşı korur ve sonuç olarak serbest radikallerin toksik etkilerini azaltır. Hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde fonksiyon yapar (108). Tüm bunların yanında Glutasyon peroksidaz (GPx), (EC 1.11.1.9) ile birlikte enzimatik olarak da faaliyet gösterir. Ayrıca bir çok enzimin kofaktörüdür. Glutasyon, hücrelerde DNA ve protein sentezinde, aminoasitlerin taşınmasında, E ve C vitaminleri gibi önemli antioksidanların aktif formlarının korunmasında rol oynar (109,110).

Katalaz: (CAT, E.C.1.11.1.6): H₂O₂'nin varlığını 1811'de Thenard tarafından kanıtlamış ve canlı dokularda H₂O₂ dönüşümünün özel bir madde tarafından yapıldığını belirtmiştir. 1863'te Schönbein tarafından bu maddenin bir enzim olduğu ifade edilmiştir(111). CAT, antioksidatif potansiyel etkisinden dolayı üzerinde yoğun olarak çalışılan bir enzimdir. (112).

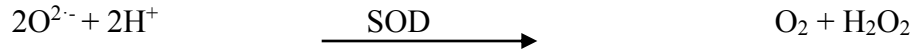
CAT, hemen hemen tüm aerobik hücrelerin peroksizomlarında bulunan ve hücreleri hidrojen peroksitin toksik etkilerinden koruyan bir enzimdir. Bu koruyuculuğunu, hidrojen peroksiti moleküler hiçbir serbest radikal oluşturmaksızın oksijene ve suya parçalayarak sağlar.



CAT tetramerik bir yapıya sahiptir. Her bir monomer, aktivite için gerekli olan prostetik grup olarak; merkezinde demir iyonu bulunan protoporfirin halkası biçiminde bir Hem grubuna sahiptir. CAT monomerlerinin her birinde bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) molekülü, katalazı H₂O₂'nin oksitleyici etkisinden korur. Katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Katalaz katalitik aktivitesini, iki aşamadan gerçekleştirmektedir(106,113,114).



Süperoksit dismutaz: (SOD, EC 1.15.1.1) : Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen katalitik aktivitesi son derece yüksek olan oksidatif strese karşı hücreleri korumada ve DNA hasarını engellemede etkili antioksidan bir enzimdir. Başlıca fonksiyonu, dokularda ve hücrelerde oluşan ROS'nin zararlı etkilerini yok etmektir. SOD enzimi, çok önemli bir süperoksit süpürücüsüdür ve reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturur. (115).

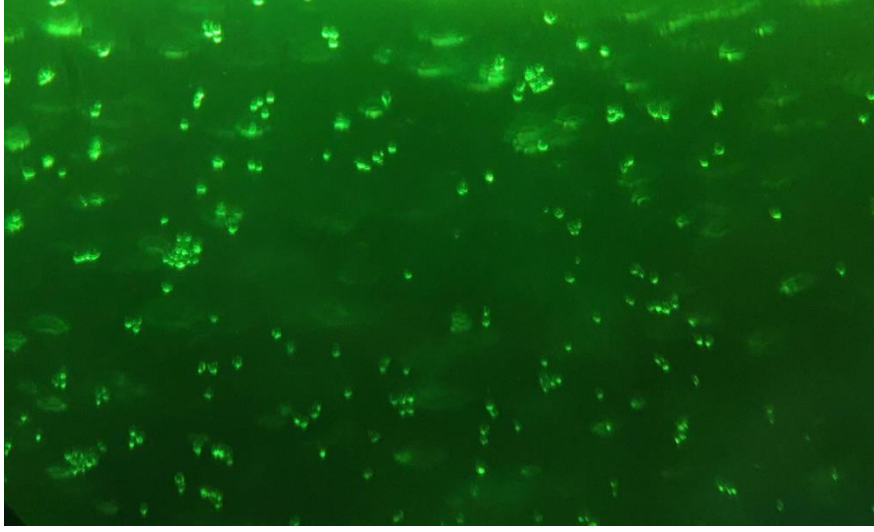


Canlı dokularda artan oksijen tüketimi, SOD aktivitesinde artmaların sonucu olarak belirtilir, yani SOD aktivitesi; yüksek oksijen kullanımı olan dokularda daha yüksektir. Bu savunma mekanizması hayati önem arz etmektedir, çünkü oksijen konsantrasyonları arttığında enzimatik reaksiyonlardan gelen oksijen tüketen serbest radikallerin üretimi artar. ROS metabolizması ile SOD aktivitesi arasındaki etkileşim, peroksit radikallerinin çeşitli sınıflarının detoksifikasyonunda büyük bir rol oynar. SOD'un sahip olduğu metal iyonlarına göre memelilerde üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar, ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve çekirdeklerinde bulunan dimerik Cu ve Zn içeren Cu-ZnSOD (SOD1), ekstraselular etki gösteren prokaryotik ve ökaryotik organizmaların mitokondrilerinde bulunan Mn-SOD (SOD2) ve SOD'un sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunan ve Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD (SOD3) dür. Tüm SOD'un tüm izomerleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Genel olarak hücrelerde en yoğun olarak bulunan SOD1'dir. (106,116,117,118).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARI

Deneylerde kullanılan T/G HA VSMC (Aort Muscle cell) hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınmış, sağlıklı hücre hattı olarak 2. pasajları -150 °C'de muhafaza edilmiş olan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM) hücre koleksiyonundan temin edildi. T/G HA VSMC Hücre kültürü uygulamaya göre 75 cm² flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin üreme ortamı için, 200 mL DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium), 200 mL HAM'S F12, 200 mL EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), % 2-10 FBS (Fetal Bovin Serum), % 1 L-glutamine, % 1 Penicilin Streptomycin içeren kültür medyumunu kullanıldı. Kullanılan hücreler ZEISS (Observer.Z1) mikroskopta görüntülendi (Şekil 8).



Şekil 7. T/G HA VSMC hücre hattının mikroskobik görüntüsü (x100)

HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI ve PASAJLANMASI

Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının kültüre alınması ve pasajlanması işlemlerinin tümü steril kültür odasında ve laminar kabin (Safe Fast Elite (EN 12469 2000)) içerisinde gerçekleştirildi. Hücreler temin edildikten sonra %5 yeni doğan sığır serumu (FBS) 100 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin ve %1 L-glutamin içeren EMEM: DMEM: HAMS F12 besin ortamı flasklara ekilerek 37°C de %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve alınmıştır. Hücrelerin yapışması ve diğer özellikleri OLYMPUS marka invert mikroskop ile belirli aralıklarda kontrol edilmiştir. Sağlıklı olarak çoğalan ve flask tabanına yapışan hücreler, üçer gün ara ile pasajlanmıştır.

Pasajlama işleminin gerçekleştirilmesi esnasında flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırılmış içerisine 37°C sıcaklıktaki tripsin-EDTA ilave edilerek, hücrelerin flask tabanından kalkması için 5 dk. beklenmiştir. Hücrelerin mikroskop tabanından kalkıp kalmadıkları mikroskop ile kontrol edildikten sonra tabandan ayrılan hücre ve tripsin karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 2500g'de 2.5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonunda süpernatant uzaklaştırılarak dipte kalan hücreler besiyeri ile karıştırıldıktan sonra yeni flasklara ekilmiştir.

DENEY GRUPLARI ve TiO₂ KONSANTRASYONLARI

Çalışmada partikül çapları 50-100 nm olan TiO₂ nanopartikülleri kullanıldı. Çalışma, iki kontrol ve on deney grubu olmak üzere toplam on iki grup olacak şekilde gerçekleştirildi. 500 µg/mL'lik TiO₂ ana stok dozu hazırlandı ve bu ana stokdan seri sulandırma yapılarak 0,390 µM, 0,781 µM, 1,562 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM ve

200 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan TiO₂ nanopartikül çözeltileri hücre kültüründeki T/G HA VSMC hücrelerine 24 ve 48 saat süre ile uygulandı.

MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid) YÖNTEMİ İLE HÜCRE HATLARINA UYGULANACAK MADDE KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

MTT, canlı hücrelerin mitokondri enzimleri tarafından indirgenen sarı renkli MTT maddesi mor renkli suda çözünmeyen kristallere dönüştürmesi esasına dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Oluşan kristallerin üzerine DMSO'nun eklenmesi ile 492 nm'de absorbans ölçülerek, belirlenen absorbanslara göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin % 50'sinin canlı kaldığı doz değerleri hesaplanmaktadır.

MTT Testi Protokolü

İki adet 96'lı plakalara her bir kuyucuğa 180 µL olacak şekilde T/G HA VSMC hücre ekimi yapıldı. Plakalar ekimi yapılan hücreler 24 saat süreyle 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki hücreler üzerine belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan TiO₂ nanopartikülleri içeren çözeltiden 20 µL eklendi.

24 ve 48 saatlik uygulama süresi sonunda, her bir kuyucuğa 5 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış olan MTT çözeltilisinden 20 µL eklendi. 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 2-4 saat süresince inkübasyona bırakıldı. İki saatlik sürenin sonunda, kuyucuklarda bulunan hücreler üzerindeki medyum plaka, ters çevirilerek uzaklaştırıldı. Plakanın her bir kuyucuğa 200 µL DMSO ilave edildi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik yoğunlukları mikropłaka okuyucu cihazda 492 nm dalga boyunda okundu. Belirlenen absorbans değerlerine göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin % 50'sinin canlı kaldığı doz (LD₅₀) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Örnek absorbans değeri}}{\text{Kontrol absorbans değeri}} * 100$$

RNA İZOLASYONU

Gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak T/G HA VSMC hücreleri 3x10⁶ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. MTT testi sonucuna göre belirlenmiş olan TiO₂ nanopartikülleri kontrol grubu hariç tüm kuyucuklara

uygulandı. Uygulama sonucu elde edilen hücrelerden toplam RNA izolasyonu RNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir.

1. İnkübasyon süresinin sonunda hücre kültürü plaklarının üzerindeki sıvı uzaklaştırılarak kit içerisinde hazır olarak bulunan %1 merkaptotanol içeren 500 µL lizis tamponu ilave edilmiş ve hücreler ependorf tüplere alınmıştır.

2. Örneklerden 400 µL alınarak üzerlerine 400 µL %70'lik etanol ilave edilerek vortekslenmiştir.

3. Karışım, kitte bulunan kolonlu tüplere aktararak 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.

4. Kolon üzerine yıkama tamponu 1'den 700 µL ilave edilerek 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı yine uzaklaştırılmıştır.

5. Kolon üzerine 500 µL yıkama tamponu 2'den ilave edilerek 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.

6. Kolon kurutma amacı ile boş olarak 12.000 g'de 1-2 dk santrifüj edilmiş, alttaki tüp atılarak yeni bir kapaklı tüp konulmuştur.

7. Kolonun tam ortasına 60 µL RNaz içermeyen su pipetlenmiş ve 2 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 dakika 12.000 g'de santrifüj edilmiştir.

8. Elde edilen RNA örneklerinden, 2 µL alınarak Nanodrop cihazı üzerine pipetlenip 260-280 nm'de okunmuş, miktar ve saflık değerleri belirlenmiştir.

TAMAMLAYICI DEOKSİRİBO NÜKLEİK ASİT (cDNA) SENTEZİ

cDNA sentezi, izole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti kullanılarak ve PCR şartları Basamak 1: 25°C, 10 dk; Basamak 2: 37 °C, 120 dk; Basamak 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlandı (Tablo 4). Sentezlenen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Tablo 4. cDNA sentez protokolü

Madde	Hacim
Total RNA	10
10 X RT tampon	2 µL
25 X dNTP mix (100mM)	0.8 µL
10 X Random Primer	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
Nukleaz free su	4.2 µL
Son hacim	20 µL

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Tablo 5. Kullanılan hücre hattının /kimyasal maddenin adı, markası ve katalog numaraları

Kullanılan Hücre Hattının/ Kimyasal Maddenin Adı	Kullanılan Hücre Hattının/ Kimyasal Maddenin Markası	Kullanılan Hücre Hattının/ Kimyasal Maddenin Katalog Numarası
T/G HA VSMC Aort Muscle Cell	ATCC	CRL-1999™
TiO ₂	Sigma	791326
MTT	Biomatik	A3338-5G
Etanol	Merck	603-002-00-5
DMSO	Merck	67-68-5
Ham's F-12	Multicell	318-010-CL
EMEM	Multicell	320-026-CL
DMEM	Multicell	319-020-CL
Tripsin-EDTA	Multicell	352-542-EL
L-Glutamin	Multicell	609-065-EL
FBS	Multicell	FBS-HI-IIA
Penicilin- Streptomisin	Multicell	450-201-ZL
High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kit	Thermo Fisher Scientific	4368814
RNA PureLink® RNA Mini Kit	Life Sciences	12183018A

KULLANILAN CİHAZLAR

Tablo 6. Kullanılan cihazların adı ve markası

Kullanılan Cihazların Adı	Kullanılan Cihazların Markası
Laminar Kabin	Safe Fast Elite (EN 12469 2000)
Etüv (%5 CO ₂)	Panasonic
Santrifüj	Hermle
Mikro plaka spektrofotometre	Multiskan go-Thermo Fisher Scientific
Gradient PCR	Applied Biosystems Veriti 96 Well
qRT-PCR	Applied Biosystems Quant studio 6 Flex
Nanodrop	NaNoQ Optizen

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

SOD, CAT, GSH antioksidan enzimlerinin, HSP70 ısı şok proteininin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonları düzeyleri 384 kuyucuklu mikropilaka okuyabilen Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve Endojen gen olarak GAPDH kullanılmıştır. qRT-PCR yönteminde, gen ekspresyon çalışmalarında “RNA izolasyonu” bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA’lar kullanılmıştır.

Sentezlenmiş olan cDNA’lar RT-PCR’da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak, primerler ile RT-PCR’da PCR program: 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95°C 15 s) ve annealing, uzama (60°C ‘de 1 dakika) ile çoğaltıldı. qRT-PCR karışımı; cDNA, SYBR Green ve ilgili genleri içermektedir. SYBR Green boyası cDNA ve genlere bağlanarak reaksiyonun başlamasında rol oynamaktadır.

Çoğaltma işlemi esnasında elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ekspresyonların belirlenmesinde kullanıldı ve $\Delta\Delta Ct$ metodu ile hesaplandı. Çalışmamızda kullanılan primerlerin baz dizileri Tablo 7 de gösterilmiştir. qRT-PCR reaksiyonu karışımının içeriği, 384 kuyucuklu plakanın her bir kuyusu için 6 μ l SYBR Green Master Mix, 2 μ l cDNA ve 2 μ l RNaz free su ve primer forward 0,5 μ l, reverse 0,5 μ l olacak şekilde plakalara pipetlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 7. qRT-PCR’ da kullanılan genler ve sekansları

Primer İsmi	Baz Dizisi
SOD	F: GTTCGGTGACAACACCAATG R: GGAGTCGGTGATGTTGACCT
CAT	F: TACGAGCAGGCCAAGAAGTT R: ACCTTGTACGGGCAGTTCAC
GSH	F: TGGGACCAGCAAGTAAAACC R: TCGCGAATG TAGAACTCGTG
HSP70	F: CGAGETCGACGCATTGTTTG R: GAGTGGATCCGCCGACGAGTA
GAPDH	F: TTGGTATCGTGGAAGGACTCA R: TGTCATCATATTTGGCAGGTTT

Tablo 8. qRT-PCR karışım içeriği

384’ lü plakamın her bir kuyusu için	
Sybr Green Master Mix	6 µL
cDNA	2 µL
RNaz free su	2 µL
F Primer	0.5 µL
R Primer	0.5 µL
Son hacim	11 µL

VERİLERİN İSTATİKSEL OLARAK ANALİZİ

Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ▲▲Ct metodu ayrıca kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak GAPDH gen ekspresyonu kullanılmıştır. Kontrol ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p<0.0001$) ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında SPSS 20 (üniversite lisanslı), XLSTAT ve PAUP demo version istatistik paket programları kullanılmıştır.

BULGULAR

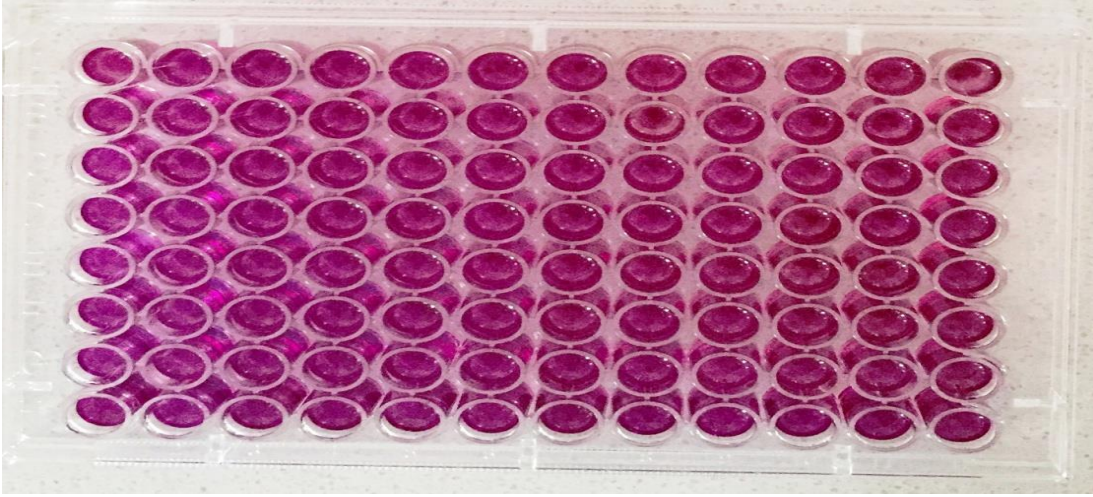
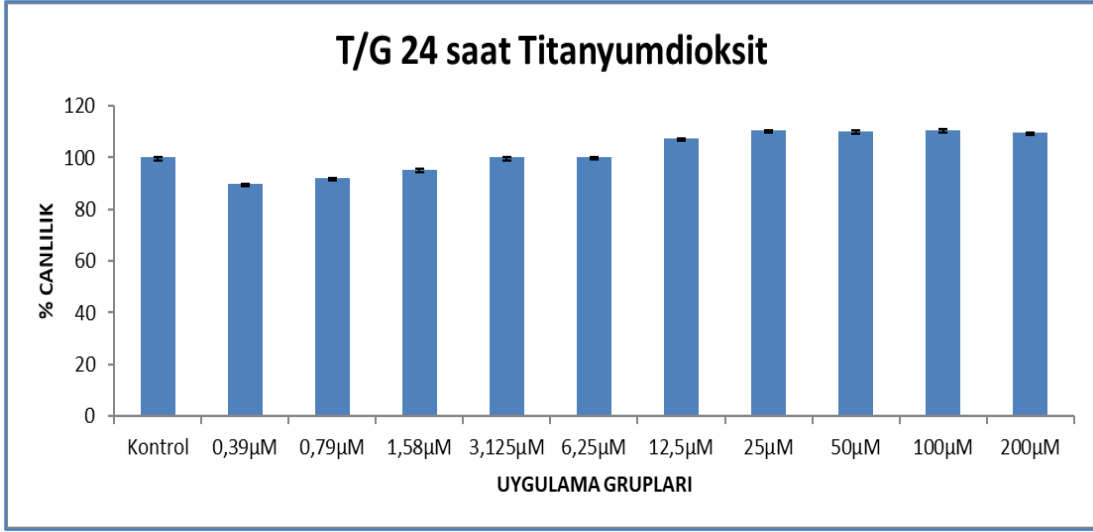
TiO₂ KONSANTRASYONLARININ T/G HA VSMC HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Çalışma kapsamında ilk olarak T/G HA VSMC hücre hatlarında TiO₂ uygulamasının 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı üzerine etkisi materyal ve metod bölümünde açıklandığı şekilde MTT testi ile saptanmış, sonuçlar One way Anova- Duncan Testi ile değerlendirilmiştir.

T/G HA VSMC Hücre Hattı Üzerine 24 Saat Süre ile Uygulanmış TiO₂ Konsantrasyonlarının MTT Testi Sonuçları

TiO₂ uygulaması yapılan T/G HA VSMC hücrelerinde 0.39 µM ile 200 µM arasında uygulanan TiO₂' nin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 8' de verilmiştir.

TiO₂ uygulamasından 24 saat sonra T/G HA VSMC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı belirlenmiştir (p>000.1).



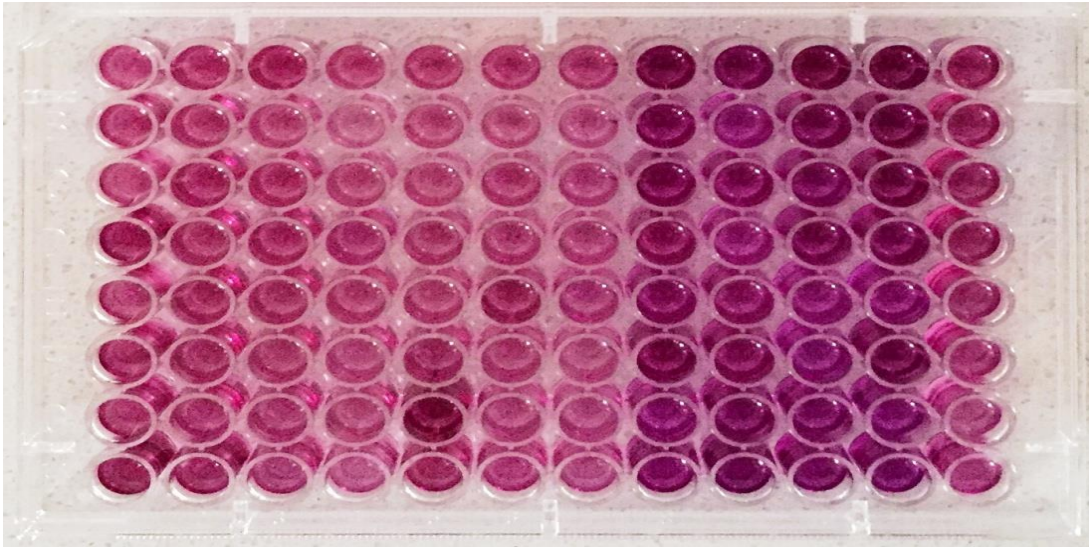
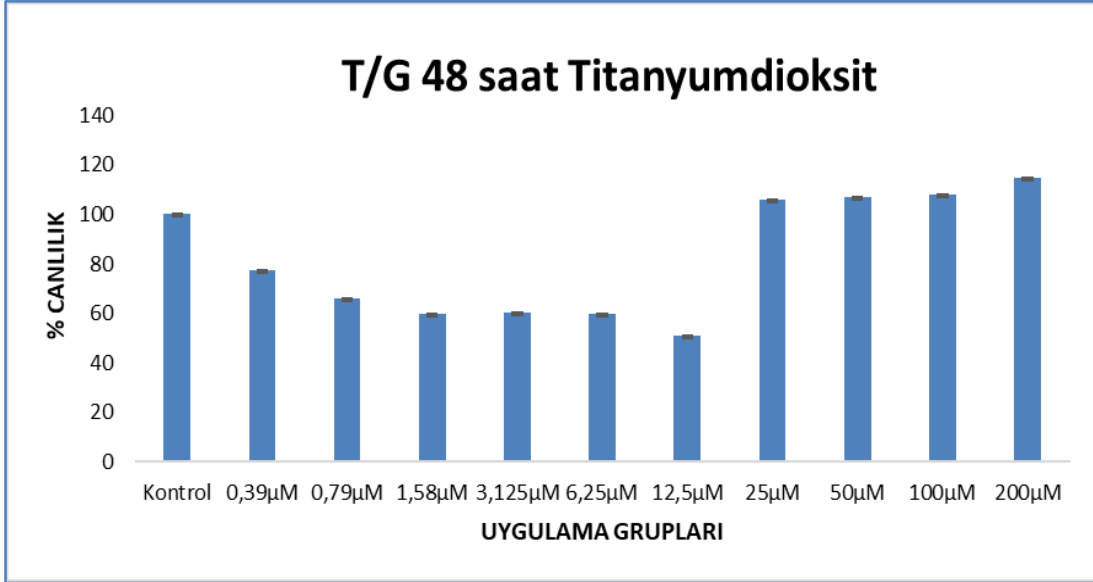
Şekil 8. T/G HA VSMC hücre hattında 24 saat süreyle 0.39 μ M ile 200 μ M konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT testi plağı, Veriler % Canlılık Ortalama \pm Standart Sapma.

T/G HA VSMC Hücre Hattı Üzerine 48 Saat Süre ile Uygulanmış TiO_2 Konsantrasyonlarının MTT Testi Sonuçları

TiO_2 uygulaması yapılan T/G HA VSMC hücrelerinde 0.39 μ M ile 200 μ M arasında uygulanan TiO_2 ' nin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 9' da verilmiştir.

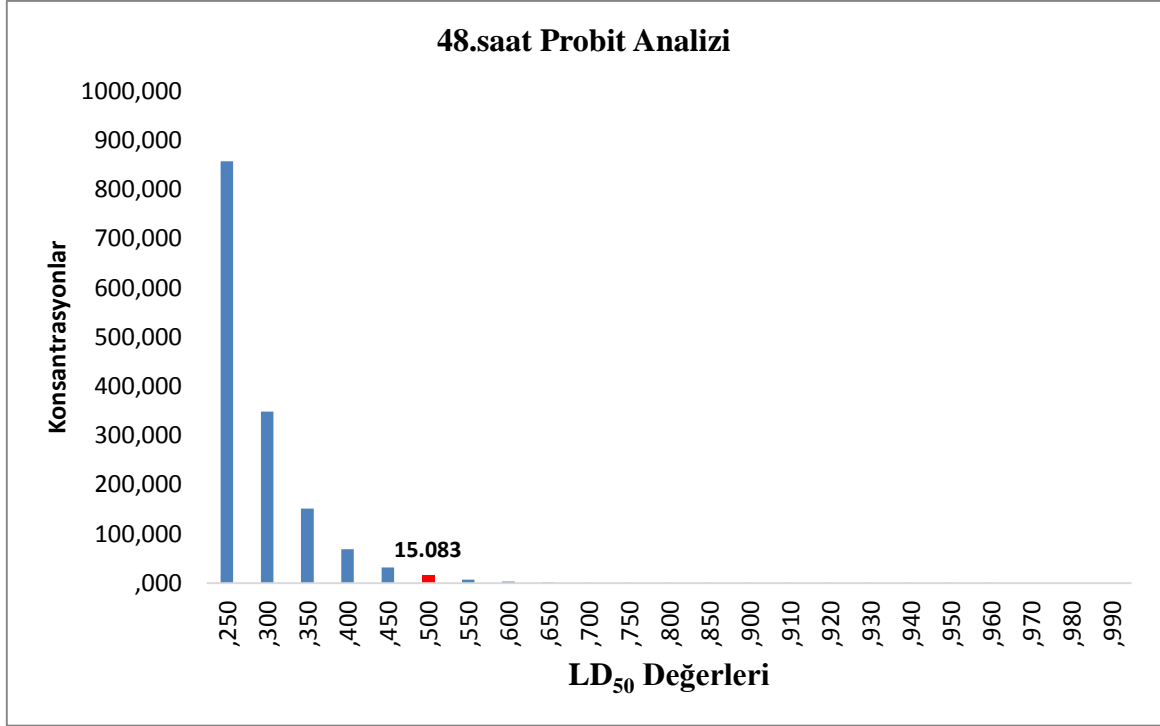
TiO_2 uygulamasından 48 saat sonra T/G HA VSMC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 12.5 μ M konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece 50.80 ± 0.067 'sinin canlı olduğu saptanmıştır. 25, 50, 100 ve 200 μ M'lık uygulama gruplarındaki hücre canlılığı kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.001$). En yüksek hücre canlılığının ise 200 μM TiO_2 konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı $\%114.65\pm 0.208$ olarak belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. T/G HA VSMC hücre hattında 48 saat süreyle 0.39 μM ile 200 μM konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT testi plağı, Veriler % Canlılık Ortalama \pm Standart Sapma.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan LD_{50} değeri 15.083 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. T/G HA VSMC hücre hattında 48 saat süre ile TiO₂ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve LD₅₀ değeri.

Titanyumdioksit Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Titanyum dioksit, T/G HA VSMC hücre serisine 24 ve 48 saatlik süreler ile uygulanmış ve her bir uygulama birbiriyle aynı olacak şekilde 0.39-200 µM aralığında 10 farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları (Tablo 9) ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi yapılmıştır (Tablo 10).

24 saatlik analiz değerlendirildiğinde, titanyum dioksit T/G HA VSMC hücre serisinde doza bağımlı bir düşüş görülmediği görülmektedir. Ancak özellikle 48 saatlik uygulama 24 saatlik uygulamadan farklı olarak T/G HA VSMC hücre serisinde doz bağımlı bir ölüm oluşturmuştur.

T/G HA VSMC hücre serisinde 24 ve 48 saat süreyle 0.39-200 μM doz TiO_2 uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Doza bağımlı değişim ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon 0.528 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulamada belirlenmiştir.

Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$.

Tablo 9. TiO_2 'in uygulama dozuna bağlı olarak değişen doz-% canlı hücre ilişkisi

Titanyum dioksit Doz-% Canlı Hücre Tablosu			
Doz	N	24 Saat	48 Saat
Kontrol	8	100,00 \pm 0,06 ^a	100,00 \pm 0,08 ^c
0,39 μM	8	100,00 \pm 0,07 ^a	77,34 \pm 0,08 ^b
0,78 μM	8	102,42 \pm 0,07 ^a	65,85 \pm 0,08 ^{ab}
1,56 μM	8	106,15 \pm 0,05 ^{ab}	59,96 \pm 0,05 ^{ab}
3,13 μM	8	111,27 \pm 0,19 ^{ab}	52,60 \pm 0,12 ^a
6,25 μM	8	111,35 \pm 0,07 ^{ab}	59,78 \pm 0,09 ^{ab}
12,5 μM	8	119,37 \pm 0,08 ^b	50,80 \pm 0,06 ^a
25 μM	8	122,11 \pm 0,09 ^b	105,70 \pm 0,12 ^c
50 μM	8	122,72 \pm 0,11 ^b	106,88 \pm 0,11 ^c
100 μM	8	123,00 \pm 0,09 ^b	107,99 \pm 0,10 ^c
200 μM	8	123,20 \pm 0,07 ^b	114,64 \pm 0,20 ^c

Tablo 10. TiO_2 doz-zaman ilişkisine ait pearson korelasyon tablosu

Titanyum dioksit Korelasyon Tablosu		24 Saat	48 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,370 ^{**}	,334 ^{**}
	Sig. (2-tailed)		,000	,001
	N	88	88	88
48 Saat	Pearson Korelasyon	,370 ^{**}	1	,528 ^{**}
	Sig. (2-tailed)	,000		,000
	N	88	88	88
Dozlar	Pearson Korelasyon	,334 ^{**}	,528 ^{**}	1
	Sig. (2-tailed)	,001	,000	
	N	88	88	88

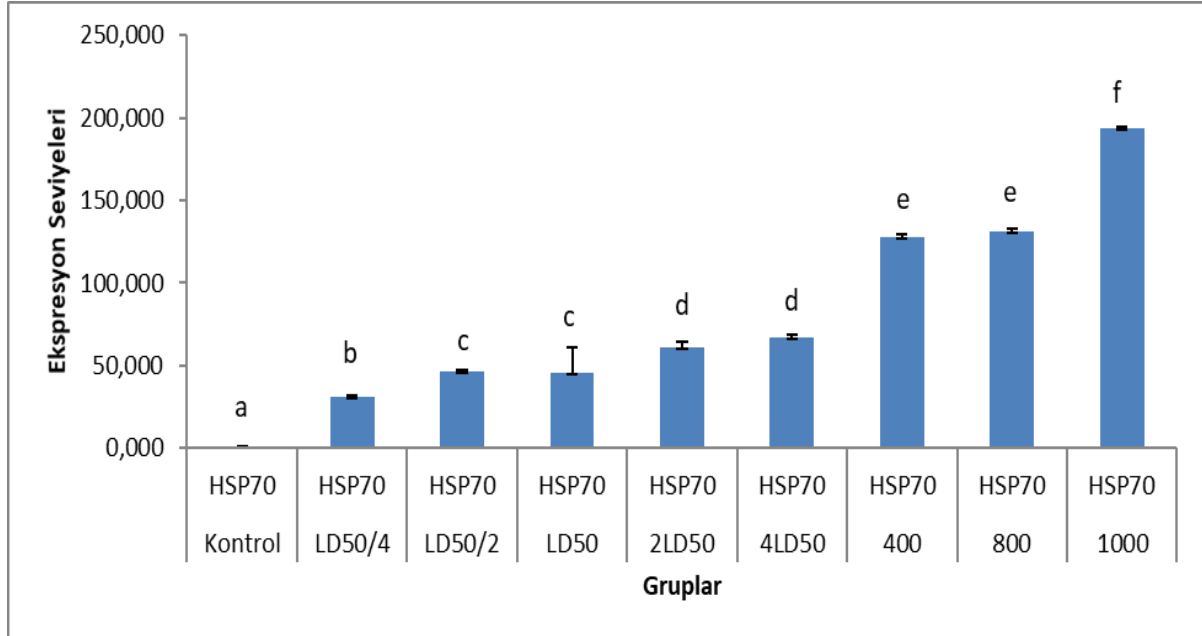
TiO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Çalışmada T/G HA VSMC hücre hattından materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde izole edilen RNA'lerden elde edilen, cDNA'lar kullanılarak gen ifadelerinde meydana gelen değişimler qRT-PCR metodu ile saptanmıştır. T/G HA VSMC hücrelerinde uygulamaların yapıldığı grupların, kontrol grubuna göre belirlenen genlerin ifadelerindeki değişiklikler 3 tekrarlı olmak üzere çalışmaya alınmış ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

HSP70 Gen İfadesi

T/G HA VSMC hücre hattında endojen kontrol olarak GAPDH'nin kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre TiO₂' in ısı şok proteini olan HSP70 geninin ekspresyon düzeyinde meydana getirdiği değişimler Şekil 11'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında HSP70 gen ifadesinin T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanması T/G HA VSMC hücrelerinde ayrıca ısı şok proteini olan HSP70 geninin ekspresyon düzeyinde de doza bağlı artış gözlemlenmiştir (F: 240.17, p<0.0001) (Şekil 11).

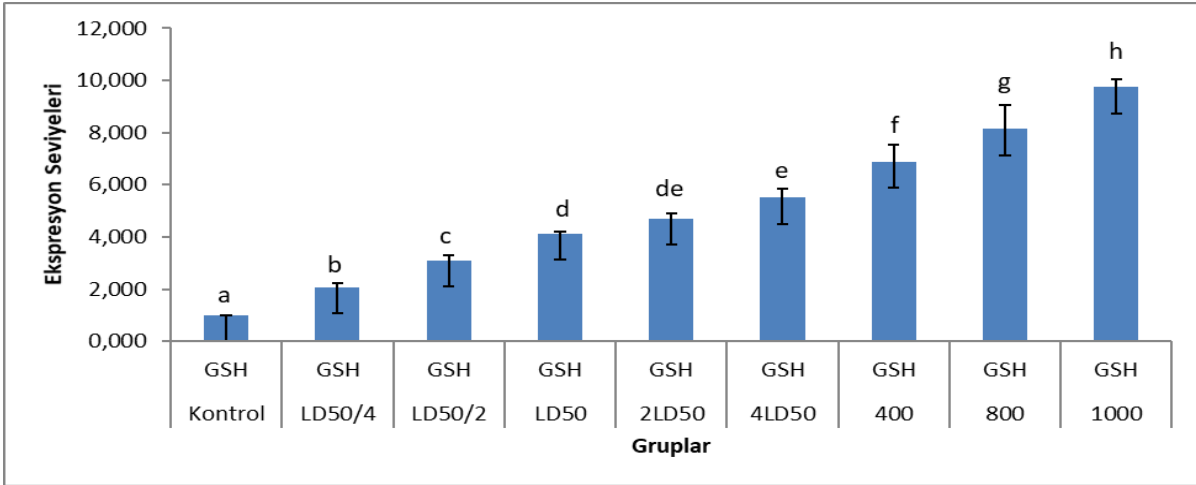


Şekil 11. T/G HA VSMC hücreleri HSP 70 ekspresyon düzeyi (ANOVA-Duncan Test, p<0.0001)

GSH (Glutatyon) Gen İfadesi

T/G HA VSMC hücre hattında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre TiO₂' in GSH gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 12'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında GSH gen ifadesinin T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanması T/G HA VSMC hücrelerinde GSH geninin ekspresyon düzeyi en yüksek 1000 µM'lık dozda 9.74 kat artış olurken en düşük artışın LD₅₀/4 olan 3.77 µM'lık dozda 2.05 kat olmuştur (F: 93.890, p<0.0001) (Şekil 12). µM'lık dozda 2.05 kat olmuştur (F: 93.890, p<0.0001) (Şekil 12).

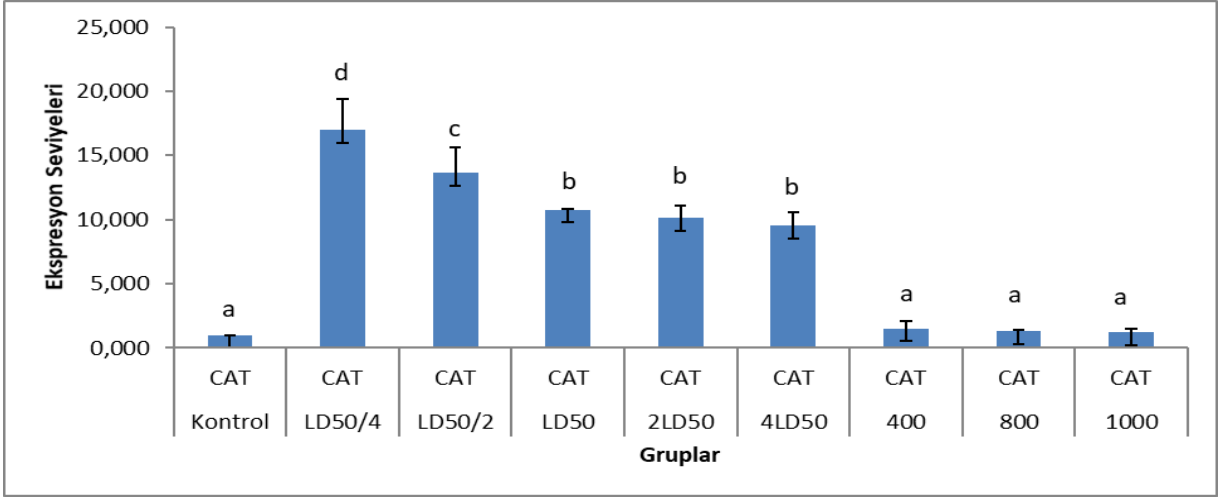


Şekil 12. T/G HA VSMC hücreleri GSH ekspresyon düzeyi (ANOVA-Duncan Test, p<0.0001)

CAT(Katalaz) Gen İfadesi

T/G HA VSMC hücre hattında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre TiO₂' in CAT gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 13'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında CAT gen ifadesinin T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanması T/G HA VSMC hücrelerinde CAT geninin ekspresyonunda en yüksek artışın uygulanan en düşük LD₅₀/4 olan 3.77 µM'lık dozda 17.01 kat olduğu saptanmıştır (F: 56.089, p<0.0001) (Şekil 13).

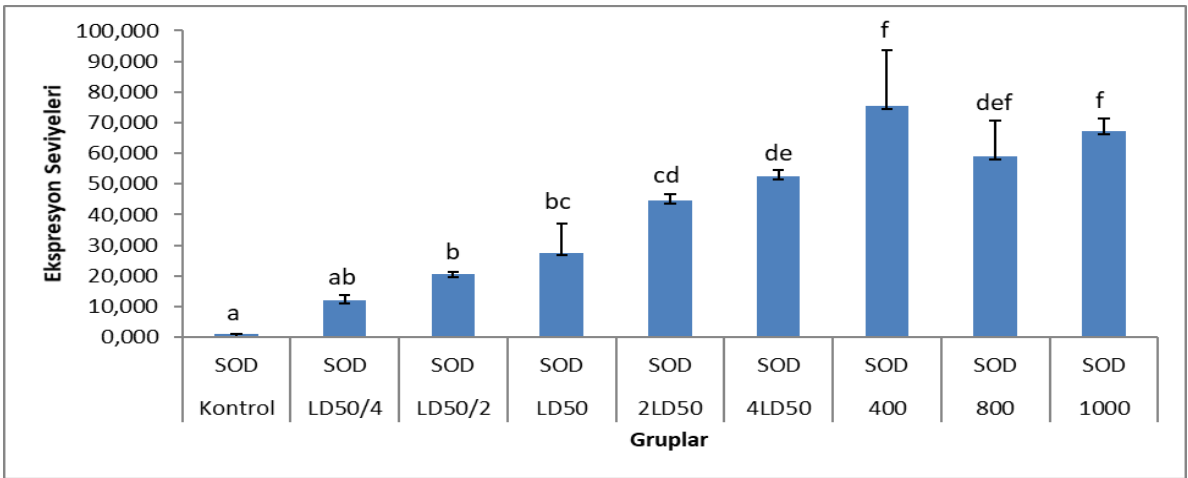


Şekil 13. T/G HA VSMC hücreleri CAT ekspresyon düzeyi (ANOVA-Duncan Test, $p<0.0001$)

SOD (Süper Oksit Dismutaz) Gen İfadesi

T/G HA VSMC hücre hattında endojen kontrol olarak GAPDH'nin kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre TiO_2 'in SOD gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 14'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında SOD gen ifadesinin T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanması T/G HA VSMC hücrelerinde SOD geninin ekspresyon düzeyi en yüksek 400 μM 'lık dozda 75.56 kat artış olurken en düşük $LD_{50}/4$ olan 3.77 μM 'lık dozda 12.21 kat olmuştur (F: 20.689, $p<0.0001$) (Şekil 14.).



Şekil 14. T/G HA VSMC hücreleri SOD ekspresyon düzeyi (ANOVA-Duncan Test, $p<0.0001$)

T/G HA VSMC Hücre hatlarında SOD, CAT, HSP70, GSH Gen ifadesinin değışimi
Tablo 11’de özetlenmiştir.

Tablo 11. T/G HA VSMC hücre hatlarında SOD, CAT, HSP70, GSH gen ifadelerinin değışimi (ANOVA-Duncan Test).

UYGULAMA GRUPLARI												
GENLER		KONTROL	LD ₅₀ /4	LD ₅₀ /2	LD ₅₀	2LD ₅₀	4LD ₅₀	400µM	800µM	1000µM	F	p
	SOD	1,00	12,21	20,60	27,66	44,52	52,41	75,57	58,86	67,14	20,68	p<0.0001
	CAT	1,00	17,01	13,62	10,77	10,12	9,51	1,53	1,33	1,22	56,08	p<0.0001
	Hsp70	1,00	31,11	46,30	45,29	60,79	66,81	127,66	131,28	194,03	240,17	p<0.0001
	GSH	1,00	2,06	3,09	4,14	4,69	5,50	6,89	8,14	9,74	93,89	p<0.0001

TARTIŞMA

Küçük boyutlara ve geniş yüzey alanına sahip TiO₂ nanopartikülleri, yüksek düzeyde kimyasal reaksiyona girme eğilimindedirler ve bu özellikleri toksisiteye neden olmaktadır. Metal nanopartikülleriyle yapılmış olan bazı çalışmalar, bu partiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğunu ve bunlara maruz kalan insanlar için tehlikeli olabileceklerini ortaya koymaktadır (119). Bu sebepten dolayı hücre kültürü; kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimya, moleküler biyoloji çalışmalarında, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku mühendisliği, kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavileri ile kozmetik sanayinde sık sık kullanılmaktadır (120).

Hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen göstergeler parametrelerin ölçülmesi in vitro sitotoksik testlerine dayanmaktadır (121). Sitotoksik testleri in vitro çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Kültüre edilen hücreler kullanılarak yapılan in vitro çalışmalar materyallerin toksisitesinin belirlenmesinde önemli rol oynar. İn vitro hücre kültürüne dayalı sitotoksik belirlenme testleri, toksisiteyi belirlemede kullanılan hayvan sayısını azaltır ve modern toksikoloji test stratejilerinin ana dayanağıdır. Yüksek veri sağlayan hücre bağımlı testler biyolojik görüntüleme yaklaşımlarının başlangıç basamağıdır. Kültüre edilen hücrelerde sitotoksik ve/veya hücre canlılığının belirlenmesinde farklı in vitro toksik testleri kullanılmaktadır. Bunlar membran içeriğini değerlendirerek hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan kolorimetrik veya floresans özellikteki NR, MTT vb. testlerdir (122). Tek tabakalı kültürlerde sitotoksik ve hücre canlılığının belirlenmesinde sıklıkla Nötral Red ve MTT sitotoksik testleri kullanılmaktadır (123,124).

Değişik konsantrasyonlarda 21 nm TiO₂'in insan bronşial epitelyal (BEAS-2B) hücrelerinde sitotoksitesinin incelendiği bir çalışmada TiO₂'in oksidatif stres oluşturduğu ve ROS üretimini artırdığını, sitoplazmik yolları aktifleştirdiğini, böylece apoptotik süreçle hücre ölümünü başlattığını bildirmişlerdir. Ayrıca MTT testi ile TiO₂ nanopartiküllerinin zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını da belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu durum nanopartikül toksisitesinde, nanopartiküllerin hücre içerisinde tutulma süresinin ve konsantrasyonun önemini açığa çıkarmıştır (125).

Virgilio ve ark. (126) tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada 0, 25, 50, 100 µg/ml dozlarda TiO₂ (20±7 nm) ve Al₂O₃ (28±19 nm) ile yapılan çalışmada genotoksik ve sitotoksik etkiler araştırılmıştır. Nötral kırmızı alım (NR) ve hücre proliferasyonu testi (MTT) yöntemi ile sitotoksiteleri incelenmiş her iki madde ile de 5 µg/ml den yüksek konsantrasyonlarda önemli hücre ölümleri gözlenmiştir. TiO₂ için 100 µg/ml dozda % 60 yaşayan hücre gözlenmiştir. Kardeş kromatid değişimi ve sitokinez blok mikro çekirdek yöntemleri ile genotoksik etkileri incelenmiş her iki örnekte de gen mutasyonu gözlenmiştir.

Martins ve ark.(127) tarafından yapılan çalışmada Ag ve TiO₂ nanopartikülleri erkek Wistar sıçanlarına bireysel ve aynı anda maruz bırakılmıştır. Günlük 0.5 mg/kg TiO₂, 0.5 mg/kg Ag ve TiO₂-Ag karışımı uygulanmıştır. TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalan hayvanlarda ölçülen redoks parametrelerinde önemli bir değişikliğin olmadığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte, Ag nanopartikülleri uygulanan ve birlikte maruz kalan gruplarda GPx aktivitesinde bir azalma, GSH düzeylerinde bir artışın gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada TiO₂ ve Ag nanopartiküllerinin bireysel veya birlikte uygulanması kan ve karaciğer hücrelerinde genotoksisiteye neden olmadığı görülmüştür. Veriler, TiO₂ nanopartiküllerinin bu çalışmada kullanılan dozda sıçanlarda önemli oksidatif stres veya genotoksisite oluşturmadığını, aynı doz Ag nanopartiküllerinin düzeylerinin oksidatif stresle sonuçlandığını, ancak belirgin bir olumsuz genotoksik etkiye neden olmadığını gösterilmiştir.

İnsan burun mukozası hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada, TiO₂ ve ZnO nanopartikülleri ayrı ayrı ve birlikte 0,1 – 20 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmış ve TiO₂ nanopartikülleri sitotoksik ve genotoksik etkiye neden olmazken ZnO nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (128).

Armand ve ark. tarafından yapılan çalışmada TiO₂ nanopartiküllerinin uzun süreli ve düşük konsantrasyonda maruz kalma koşulları kullanılarak genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. A549 alveoler epitel hücreleri iki aya kadar 1-50 µg/mL konsantrasyonda, % 86 anataz/ % 14 rutil, 24 ± 6 nm ortalama primer çapa sahip TiO₂ nanopartiküllerine sürekli olarak maruz bırakılmıştır. TiO₂ nanopartiküllerine uzun süreli maruz kalmanın hücre

yaşayabilirliğini etkilemediğini DNA'nın oksidatif hasarına neden olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler TiO₂ nanopartiküllerine uzun süreli ve düşük konsantrasyonda maruz kalmanın akciğer alveolar epitel hücrelerinde genotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (129).

TiO₂ nanopartiküllerinin biyolojik etkisinin değerlendirilmesi ve sucul ekosistemde ekotoksikolojik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise *Limnoperna fortunei* (altın midye) olarak isimlendirilen tatlı su organizmasına 1, 5, 10 ve 50 µg/mL dozlarında TiO₂ nanopartikülleri uygulanmıştır. 2 saatlik maruziyet sonrasında hemositlerin DNA'sının zarar gördüğü ve 4 saatlik maruziyet sonucunda tüm konsantrasyonlarda genotoksik etkinliğin önemli ölçüde arttığı ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar, TiO₂ nanopartiküllerinin DNA hasarına yol açtığını ve oksidatif stres yarattığını göstermektedir (130).

Bayat ve ark. (131) tarafından yapılan çalışmada 1-3 nm boyuttaki ultra küçük TiO₂ nanopartiküllerinin in vitro endotel hücrelerindeki ve in vivo olarak da zebra balığı embriyoları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İn vitro maruziyet ultra küçük TiO₂ nanopartiküllerinin sitotoksik etkiye ve oksidatif strese neden olmadığını, buna rağmen genotoksik etkiye yol açtığını göstermiştir.

Carmona ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada üçüncü evredeki *Drosophila* larvalarına 0.08 ila 1.60 mg / mL arasında değişen konsantrasyonda sindirim yoluyla TiO₂ nanopartikülleri uygulanarak bu nanopartiküllerin in vivo genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak sitotoksik etki gözlemlenmiş ancak genotoksik etkiye yol açmadığı sonucuna varılmıştır (132).

Trachinotus carolinus (deniz balığı) ile yapılan bir çalışmada TiO₂ nanopartiküllerinin genotoksitesisi, sitogenotoksik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Çalışmada balıklara intraperitoneal enjeksiyon ile 1.5 µg ve 3.0 µg TiO₂ dozları 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Sonuçlar TiO₂ nanopartiküllerinin genotoksik etkiye yol açtığını ve bu türe karşı potansiyel olarak sitotoksik olduğunu bunun da DNA hasarına yol açtığını göstermiştir (133).

TiO₂ nanopartiküllerinin ratlarda üreme sistemi üzerinde ki etkileri değerlendirilmiş, 21 nm boyuta sahip TiO₂ nanopartikülleri intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Çalışmada CAT, GPx ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde önemli bir düşüş görülürken, lipid peroksidaz ve kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. TiO₂ nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik değişiklikler gösterdiği ve oksidatif strese neden olduğu sonucuna varılmıştır (134).

Chen ve ark. (135) tarafından yapılan çalışmada in vivo ve in vitro olarak titanyum dioksit nanopartiküllerinin genotoksitesisi değerlendirilmiş, in vivo çalışmada, yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlara her gün 0, 10, 50 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı ile 30 gün boyunca intragastrik uygulama yoluyla anataz formda 75 ± 15 nm boyutta TiO_2 nanopartiküllerine maruz bırakılmıştır. İn vitro çalışmada, Çin hamster akciğer fibroblastları (V79 hücreleri) TiO_2 nanopartiküllerine 0, 5, 10, 20, 50 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarında maruz bırakılmıştır. 24 saat ve 48 saat maruz kaldıktan sonra tüm uygulama gruplarında hücre yaşayabilirliğinde belirgin azalmalar tespit edilmiştir. Comet testi kullanarak, 24 saat muamele edildikten sonra önemli DNA hasarı sadece 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunda gözlemlendiği belirtilmiştir. Elde edilen veriler, TiO_2 nanopartiküllerinin hem in vivo hem de in vitro çalışmada genotoksik olduğunu ortaya koymuştur.

Demir ve ark. (136) tarafından yapılan çalışmada insan periferik kan lenfositleri ve kültürlenmiş embriyonik böbrek hücrelerinde TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3 nanopartiküllerinin ve bunların iyonik formlarının genotoksik etkinlikleri araştırılmıştır. Hem insan periferik kan lenfositleri hem de kültürlenmiş embriyonik böbrek hücreleri TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3 nanopartikülleri ile 1, 10 veya 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda inkübe edilmiş ve TiO_2 nanopartiküllerinin sadece 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lik en yüksek konsantrasyonu genotoksik bir yanıt oluşturduğu belirlenmiştir.

Hackenberg ve ark. (137) tarafından yapılan çalışmada anataz kristal fazındaki TiO_2 nanopartiküllerinin in vitro genotoksitesisi ve sitotoksitesisi 10 erkek donörden alınan insan periferik kan lenfositlerinde değerlendirilmiştir. Hücreler 24 saat süreyle artan 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz bırakılmış, sonuç olarak TiO_2 nanopartiküllerinin, hem sitoplazmaya hem de çekirdeğe ulaştığı ve insan periferik kan lenfositlerinde sitotoksik veya genotoksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir.

Çin hamster yumurtalıkları (CHO-K1) hücrelerindeki TiO_2 ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin sitotoksitesisi ve genotoksitesisi araştırıldığı bir başka çalışmada, 24 saat sonra lizozomal ve mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesindeki değişikliklerle kanıtlanan doza bağlı bir sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Genotoksik etkiler ise 0.5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 ve 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Al_2O_3 konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir (138).

Yapılan bir başka çalışmada, HSP70'in neredeyse tanımlanmış tüm hücre ölüm bloke ettiği ve bu nedenden dolayı en güçlü anti-apoptotik proteinlerden biri olduğu ifade edilmiştir (139). HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın aşırı sentezlenmesi durumunda apoptozisin inhibe olabileceği ve farklı hücre modelleri ile yapılan çalışmalarda ısı şok proteinlerinin, hücrede hatalı katlanmış proteinlerin birikimini engellediği ifade edilmiştir. Bununla birlikte

hücrede, serbest radikallerce tetiklenen, hücrel stres sonucu gözlenen DNA hasarlarında HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90 ekspresyonundaki artışların apoptozisi inhibe edebileceği bildirilmiştir (140).

Sun ve ark. (141) tarafından yapılan çalışmada 90 gün boyunca TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakılan farelerde pulmoner enflamasyonla ilgili oksidatif stres ve moleküler mekanizmaları değerlendirilmiştir ve HSP 70 ifadesinin azaldığı görülmüştür.

Cui ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 60 gün boyunca farelere TiO₂ nanopartikülleri intragastrik yöntemle uygulanmış ve TiO₂ nanopartiküllerinin hepatositlerde apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte SOD, CAT, GPX ve HSP 70 gen ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir (142). Bu çalışmalar hücrel stresin in vivo ve kronik olarak değerlendirildiği çalışmalardır. Bu anlamda, hücrel toksisitenin değerlendirilmesinde, in vitro ve in vivo çalışmaların birlikte ele alınmasının gerekliliğini ortaya koyma bakımından önem arz etmektedirler.

Çalışmamızda, oksidatif stres parametresi olarak kabul edilen enzim ekspresyonlarında gözlemlenen artışlar ve bu durumun yarattığı hücrel strese bağlı olarak geliştiği düşünülen muhtemel DNA hasarının, apoptozu tetiklemiş olabileceğine dair elde ettiğimiz sonuçlar mevcut çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Ayrıca doza bağlı olarak indüklenmiş HSP70 ekspresyonunun, yüksek doz gruplarında hücre canlılığını artırıcı bir etki yaratmış olması anti-apoptotik etkisinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Gelişen günümüz teknolojileri ile birlikte nanomateriyallerin kullanımı giderek hız kazanmakta pek çok alanda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu anlamda doğrudan ya da besin zinciri yolu ile canlı sistemler bu materyallere maruz kalmaktadır. Ancak bu nanomateriyallerin kullanımına yönelik olarak yasal düzenlemeler yetersizdir. Gerekli yasal düzenlemelerin yapılabilmesi açısından, doğada birikimlerinin ve toksik etkilerinin, araştırıldığı, minimum kullanım dozlarının belirlenmesine yönelik ve canlı sistemler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalara ihtiyaç vardır. Hızlı ve etkili stratejilerinin geliştirilmesi açısından ciddi bir bilgi birikimine gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak; TiO₂ nanopartikülünün belirlenen dozlarda, insan aort düz kas hücre hattı olan T/G HA VSMC hücrelerinde oksidatif strese yol açtığı ve strese karşı hücrenin savunma mekanizmasını tetiklediği düşünülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler TiO₂ nanopartiküllerinin özellikle genotoksik etki mekanizmalarının aydınlatılması konusunda daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların bu konudaki bilgi birikimine ve risk değerlendirme çalışmalarında katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

SONUÇLAR

Günümüzde yaygın kullanımı olan TiO₂ nanopartiküllerinin T/G HA VSMC hücre hattında sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmanın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

1. T/G HA VSMC hücre hatlarında TiO₂ uygulamasının 24 saatlik uygulama süresi sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile saptanmış ve bunun sonucunda uygulanan TiO₂ dozlarının 24 saatlik sürede, hücre canlılığı üzerine etki göstermediği belirlenmiştir. Bu süre içerisinde TiO₂'in önemli bir oksidatif stres oluşturmadığı ve hücrelerin savunma mekanizmalarının hücreyi korumada etkin rol oynamış olabileceği düşünülmüştür (p>000.1).
2. T/G HA VSMC hücre hatlarında TiO₂ uygulamasından 48 saatlik uygulama süresi sonunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (p<0.0001). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 12.5 µM konsantrasyonda olduğu belirlenmiş ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin hücre canlılığı %50.80±0.067 olarak saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığı ise 200 µM TiO₂ konsantrasyonunda %114.65±0.208 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TiO₂ konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak T/G HA VSMC hücre serisinin göstermiş olduğu adaptif cevabın farklılığını yansıtması açısından önemlidir.
3. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben yapılan probit analiziyle 48. saatte

hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan LD₅₀ değeri 15.083 µM olarak hesaplanmıştır.

4. Doza bağımlı değişim ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon 0.528 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulamada belirlenmiştir.
5. Tüm uygulama gruplarında GSH, CAT, SOD gen ifadelerinde T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir (p<0.0001). Enzimlerin ekspresyon düzeyindeki artışlar ile TiO₂'in neden olduğu oksidatif strese karşı T/G HA VSMC hücrelerinin adaptif yanıt oluşturulduğu belirlenmiştir.
6. Tüm uygulama gruplarında TiO₂, HSP70 gen ifadesinin T/G HA VSMC hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış saptanmıştır (p<0.0001). TiO₂ nanopartiküllerinin HSP70 indüksiyonuna neden olduğu ve bu artışın oksidatif etkileri azaltmaya yönelik olduğu sonucuna varılmıştır.
7. Tüm uygulama gruplarında doza bağlı olarak HSP70 indüksiyonunda artış gözlenmiştir. Bu artışın hücrelerde oluşan oksidatif stresin etkilerini azaltmaya yönelik olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte HSP70 indüksiyonunda gözlenen artışın apoptosizi inhibe etmiş olabileceği ve bu nedenden dolayı 25µM, 50µM, 100µM, 200µM TiO₂ konsantrasyonunda hücre canlılığında artış gözlendiği kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Nanomalzemeler, endüstride yaygın kullanım alanına sahiptirler. Küçük boyutları ve geniş yüzey alanına sahip olan metal oksit nanopartikülleri oksidatif stres oluşumunda önemli rol oynarlar. Günümüzde en fazla kullanılan nanopartiküllerin başında titanyum dioksit gelmektedir. Titanyum dioksit nanopartikülleri fotokatalitik özelliklere sahiptirler ve bu özelliklerinden dolayı, boya, plastik, kaplama, ilaç ve kozmetik sektörlerinde yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Bu sektörlerde çalışan kişiler titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalmaktadırlar.

Bu çalışmanın amacı, bir çok alanda yaygın olarak kullanılan titanyum dioksit nanopartiküllerinin insan aort düz kas hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışma kapsamında aort düz kas hücreleri 24 ve 48 saat süreyle titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilmiştir. Sitotoksik etki (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfonik)-2H-tetrazolyum) testi ile belirlenmiştir. Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi amacıyla, oksidatif stres göstergeleri olarak kabul edilen, Glutasyon, Süper oksitdismutaz, Katalaz ve HSP70 proteininin gen ifadeleri qRT-PCR metodu ile saptanmıştır. Aort düz kas hücre hattı üzerine titanyum dioksit uygulamasının 24 saatlik süre sonunda, hücre canlılığı üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0.0001$). Titanyum dioksit uygulamasından 48 saat sonra aort düz kas hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir ($p<0.0001$). Çalışmada farklı konsantrasyonlarda titanyum dioksit uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben yapılan probit analiziyle 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan LD₅₀ değeri 15.083 µM olarak hesaplanmıştır.

Tüm uygulama gruplarında Glutasyon, Süper oksitdismutaz, Katalaz ve HSP70 proteininin gen ifadelerinde kontrole göre artış gözlenmiştir ($p<0.0001$).

Çalışmamız, titanyum dioksit nanopartiküllerinin aort düz kas hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin ve oksidatif strese yol açarak, hücre savunmasını tetiklendiğinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bununla birlikte HSP70 geninin ifadesinde ki artış, apoptotik sürecin inhibisyonuna karşı hücrenin adaptif yanıtı gösterme bakımından ayrı bir öneme sahiptir.

Anahtar Kelimeler: TiO₂, nanopartiküller, sitotoksisite, genotoksisite, kalp düz kas hücreleri

THE EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

SUMMARY

Nanomaterials are widely used in the industry. Metal oxide nanoparticles with small size and large surface area play an important role in the formation of oxidative stress. Titanium dioxide is one of the most used nanoparticles today. Titanium dioxide nanoparticles have photocatalytic properties and, due to their properties, they are widely used in the dye, plastic, coating, pharmaceutical and cosmetic sectors. People working in these sectors are exposed to titanium dioxide nanoparticles. The purpose of this study is to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of commonly used titanium dioxide nanoparticles on a human aortic smooth muscle cell line. Aortic smooth muscle cells were treated with titanium dioxide nanoparticles for 24 and 48 hours. The cytotoxic effect was determined by (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfonyl) -2H-tetrazolium) test. In order to evaluate the antioxidant capacity, gene expressions of Glutathione, Superoxide dismutase, Catalase and HSP70 protein, which are accepted as oxidative stress indicators, were determined by qRT-PCR method. It was determined that the application of titanium dioxide on aortic smooth muscle cell line had no effect on cell viability after 24 hours ($p > 0.0001$). It was determined that cell viability decreased in Aortic smooth muscle cells after 48 hours of titanium dioxide application ($p < 0.0001$). The LD50 value, which caused the death of 50% of the cells at 48 hours, was calculated to be 15.083 μM by probit analysis following the determination of the effect of titanium dioxide application on cell viability at different concentrations in the study. Glutathione, Superoxide dismutase, Catalase and HSP70 protein expression levels were increased in all treatment groups ($p < 0.0001$). Our study is important

in determining whether titanium dioxide nanoparticles induce cytotoxic effects on the Aort smooth muscle cell line and induce cell defense by inducing oxidative stress or not. The increase in the expression of the HSP70 gene, however, has a separate proposition to demonstrate the adaptive response of the cell to the inhibition of the apoptotic process.

Keywords: TiO₂, nanoparticles, cytotoxicity, genotoxicity, aort muscel cell

KAYNAKLAR

1. Dowling, AP. Development of Nanotechnologies. *Nano Today*. 2004;7(12): 30-35.
2. Modrea A. Strategy for the Future in Terms of Research and Development in the Field of Nano and Microtechnology. *Procedia Technology*. 2014;12:283-288.
3. Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* 2006;91:227–36.
4. Wang JJ, Barbara JS, Sanderson He Wang. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 2007;634(1-2): 243-4.
5. Curtis J, Greenberg M, Kester J, Phillips S, Krieger G. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol Sci* 2006;25 (4):245–260.
6. Huff TB, Hansen MN, Zhao Y, Cheng JX, Wei A. Controlling the cellular uptake of gold nanorods. *Langmuir* 2007;23:1596-9.
7. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem* 2004;15:897-900.
8. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007;3(11):1941–9.
9. Rogers RA, Antonini JM, Brismar H, Lai J, Hesterberg TW. In situ microscopic analysis of asbestos and synthetic vitreous fibers retained in hamster lungs following inhalation. *Journal of Environmental Health Perspectives*. 1999;107 (5):367-75.
10. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *Journal of Environmental. Science Health*. 2006;41:2699-711.

11. Brown SC, Kamal M, Nasreen A, Baumuratov A, Sharma P, Antony VB et al. Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. *Adv Powder Technol* 2007;18(1):69–79.
12. Niosh. *Approach to Safe Nanotechnology: An Information Exchange With Niosh: Ciccinnati*;2007.
13. Niosh. *Niosh current intelligence bulletin: Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. Draft. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. National Institute for Occupational Safety and Health. Ciccinnati: DHHS (NIOSH) publication; 2005.*
14. Niosh. *Strategic Plan for NIOSH Nanotechnology Research: Filling the Knowledge Gaps; 2005.*
15. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdoerster G, et. al. Safe handling of nanotechnology. *Nature* 2006;444:267–9.
16. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006;311:622–7.
17. Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K et al. Research Strategies For Safety Evaluation Of Nanomaterials. Part V. Role Of Dissolution On Biological Fate And Effects Of Nanoscale Particles. *Toxicol Sci* 2006;90:23–32.
18. Yamamoto A, Honma R, Sumita M. ve Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J Biomed Mater Res* 2004;68:244–56.
19. Karakoti AS, Hench LL, Seal S. The potential toxicity of nanomaterials—the role of surfaces. *J Min Met Mater Soc* 2006;58:77–82.
20. Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J et al. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotechnol* 2007;2:108–13.
21. Yoshida K, Morita M, Mishina H. Cytotoxicity of metal and ceramic particles in different sizes. *JSME Int J Mech Syst* 2003;46:1284–9.
22. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* 2007;2:249–55.
23. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro* 2005;19 (7):975-983.
24. Brayner R, Ferrari-Lliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano letters* 2006;6:866-70.

25. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of Inflammation in Vascular Endothelial Cells by Metal Oxide Nanoparticles: Effect of Particle Composition. *Environmental Health Perspectives* 2007;115: 403-9.
26. Sharma V, Shukla K, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA Damaging Potential of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Epidermal Cells. *Toxicol Letters* 2009;185:211-8.
27. Sayes CM, R.Wahi PA, Kurian Y, Liu JL, West KD, Ausman DB. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006;92: 174–85.
28. Turkez H, Geyikoglu F. An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. *Toxicol Ind Health* 2007;23:19-23.
29. William FV, Awadhesh J. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology* 2008; 17:410-20.
30. Wilson AD, Nicholson JW, Prosser HJ. *Surface Coatings*. Elsevier Applied Science Publishers. London. 1988; 2: 355-365.
31. Anderson O, Bange K, Otterm C. *Thin Films on Glass: Titanium Oxide*. New York.1997.
32. Yeşilöz R. *Titanyum Dioksit Ve Lesitin Kitosan Nano Partiküllerinin İn Vitro Genotoksik Ve Sitotoksik Değerlendirmesi (tez)*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2011.
33. Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. *Environment Int* 2006;32:967-76.
34. Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. 2008;3-15.
35. Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2005; 44(12R), 8269.
36. Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, J an KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005;213:66-73.
37. Popov AP, Priezzhev AV, Lademann J, Myllyla R. TiO₂ nanoparticles as an effective uv-B radiation skin-protective compound in sunscreens. *App Physics* 2005;38: 2564-2570.
38. Kominami H, Kohno M, Kera Y. Synthesis brookite type titanium oxide nano crystals inorganic media. *J Material Chem* 2000;10:1151-6.
39. Kavan L, Gratzel M, Gilbert SE, Klemenz C, Scheel HJ. Electrochemical and photoelectrochemical investigation of single-crystal anatase. *J Am Chem Soc* 1996;118:28.

40. Saadoun LA. Photoelectrochemical properties of single-crystal anatase TiO₂. J Am Mat Res Bull 2000;35:193.
41. Kim H, Lee S, Han Y, Park J. Preparation of dip-coated TiO₂ on ceramic foam pellets. J Mat Sci Lett 2005;1:10-50.
42. <https://kimyasimya.blogspot.com.tr/2012/10/fotokataliz.html> 09.12.2017 tarihinde erişime açık
43. Wang D, Xiao L, Li X, An J, Duan Y. Highly Efficient Visible Light TiO₂ Photocatalyst Prepared by Sol-Gel Method at Temperatures Lower Than 300°C. J Hazardous Mat 2011;192:150–9.
44. Machida M, Norimoto K, Kimura T. Antibacterial Activity of Photocatalytic TiO₂ Thin Films with Photodeposited Silver on the Surface of Sanitary Ware. J Am Ceramic Soc 2005; 88: 95-100.
45. Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. Environmental. Sci Technol 1998;32:726–728.
46. Goswami DY, Trivedi DM, Block SS. Photocatalytic disinfection of indoor air. J Sol Energy 1997;119:92–6.
47. Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: Dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. J Photochem Photobiol Am Chem 1997;106:51–6.
48. Hur JS, Koh Y. Bactericidal activity and water purification of immobilized TiO₂ photocatalyst in bean sprout cultivation. Biotechnol Lett 2002;24:23–5.
49. Sakai N, Fujishima A, Watanabe T, Hashimoto K. Highly hydrophilic surfaces of cathodically polarized amorphous TiO₂ electrodes. J Electrochem Soc 2001;148:3023–6.
50. Miyauchi M, Nakajima A, Fujishima A, Hashimoto K, Watanabe T. Photoinduced surface reactions on TiO₂ and SrTiO₃ films: Photocatalytic oxidation and photoinduced hydrophilicity. Chem Mat 2000;12:3–5.
51. Fujishima A, Hashimoto K. Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. Thin Solid Films.1999;351:260–3.
52. Das RC. Proteins and antibodies make advantages as therapeutic products. Am Clin Lab 2001;20(5)8:10-4.
53. Griffiths B. Animal cell products, overview. In: Spier, RE(Eds.). Encyclopedia of Cell Technology. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons; 2000. p.70-76.
54. Finter NB, Garland AJ, Telling RC. Large-scale mammalian cell culture: A perspective. Bioprocess Technol 1990;10: 1-14.

55. Öztürk S, Hu W. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. New York London. 2006;1-5:41-79.
56. Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D, Burchell B. Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. Toxicology 1993;82(1-3):119-29.
57. Gunaratna C. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I. Current Separations. 2000;19(1):17-23.
58. Çiçek C, Bilgiç A. Klinik viroloji laboratuvarlarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı: Bir model. İnfeksiyon Dergisi 2006;20(3):231-41.
59. De Ridder L, Mareel M. Morphology and 125I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. Cell Biol Int Rep 1978;2:189-94.
60. Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. Nucleic Acids Res 2009;37:925-32.
61. Altıntaş G. Bakterilerin Antitümörejenik Aktivitesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2017.
62. <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/304556297A964992AE400BBB921F1E8B.ashx> 09.12.2017 tarihinde erişime açık
63. Freshney RI. Authentication of cell lines: ignore at your peril. Expert Rev Anticancer Ther 2008;8(3):311-4.
64. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 1955;122:501.
65. Yamane I, Matsuya Y, Jimbo K. An autoclavable powdered culture medium for mammalian cells. Proc Soc Exp Biol Med 1968;127:335-6.
66. Stanners CP, Eliceire GL, Green H. Two types of ribosome in mouse hamster hybrid cells. Nat New Biol 1971;230:52-4.
67. McCoy TA, Maxwell M, Kruse PF. Amino acid requirements of the Novikoff hepatoma in vitro. Proc Soc Exp Biol Med 1959;100(1):115-8.
68. Hsu TC, Kellogg DS. Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. J Natl Cancer Inst 1960;25:221-35.
69. Iwakata S, Grace JT. Cultivation in vitro of myeloblasts from human leukemia. NY State J Med 1964;64: 2279-82.
70. Park MS, Terasaki PI. Storage of human lymphocytes at room temperature. Transplantation 1974;18(6):520-4.

71. Biggers JD, Gwatkin RBL, Heyner S. Growth of embryonic avian and mammalian tibiae on a relatively simple chemically defined medium. *Exp Cell Res* 1961;25:41.
72. Morgan JF, Morton HJ, Parker RC. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950;73(1):1-8.
73. Ozturk SS, Hu WS. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. New York Taylor & Francis, 2005.
74. Arat S, Taş A, Çetinkaya G. *Primer Hücre Kültürü Uygulamalı Kursu. Türkhyaygen-1 Projesi*. 2008.
75. Işık K. Farklı Özellikteki ZnO Nanopartiküllerinin Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İn vitro Olarak Değerlendirilmesi (tez). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2010.
76. Putnam KP, Bombick DW, Dootittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro* 2002;16:599-607.
77. Gad SC. *In vitro toxicology*. Second Edition. New York Taylor & Francis, 2000.
78. Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol Vitro* 2001;15:477-88.
79. Morgan JF, Campbell ME, Morton HJ. *Natl Cancer Inst* 1955;16:577.
80. Bulychev A, Trouet A, Tulkens P. Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Cell Res* 1978;115: 343-55.
81. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharmaceut* 2005;288:369–76.
82. Andreoli C, Gigante D, Nuziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim reducing the toxicity of smoke. *Toxicol Vitro* 2003;17; 587-94.
83. Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol App Pharmacol* 2005;202:99-107.
84. Barile FA. *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*. Florida. USA: CRC Pres., Boca Raton. 1994;53-5.
85. Yano CL, Marcondes CCG. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biol Med* 2005;39:1378-84.
86. Popiolkiewicz J, Polkowskip K, Skierski JS, Mazurek A. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Lett* 2005;229:67-75.

87. Mossman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
88. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48:589-601.
89. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. A Feasibility Study of The MTT Assay for Chemosensitivity Testing in Ovarian Malignancy. *Br J Cancer* 1990;62:189-94.
90. Abe K, Matsuki N. Measurement of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT) Reduction Activity and Lactate Dehydrogenase Release Using MTT. *Neurosci Res* 2000;38:325-9.
91. Türker P. Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Naringin ile Farklı Kemoterapi Ajanları Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2017.
92. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Res* 2000;463(2):111-72.
93. Wright J. Color Atlas of Genetics. Türkiye. Nobel Tıp Kitapevi. 2000:38.
94. Relier C, Dubreuil M, Lozano GO, Cordelli E, Mejia J, Eleuteri P et al. Study of TiO₂ P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. *Toxicol Sci* 2017;156(2):527-37.
95. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. Instant Notes in Genetics. Englad Bios Scientific Publishers Limited. 1998; 274.
96. Santagati S, Garnier M, Carlo P, et al. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Br Res Prot* 1997;217.
97. Özalp GR, Şimşek G, Akçağlar S, Shenavai S. Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek Plasentomu İçin Oldukça Etkili Metod Değerlendirmesi. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med* 2010;29(1):1-6.
98. Souzae F, Noudu-Thome A, Tron CY, et al. Quantitative RT-PCR: Limits and Accuracy. *Biotechniques* 1996;280.
99. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-3.
100. Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosomal puffs. *J Molec Biol* 1974;84:389-98.

101. Tutar Y. Structure function studies with the cAMP Receptor Protein of E. Coli (Dissertation). Lubbock: Texas Tech University; 2003.
102. De Maio A. Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999;11(1), 1-12.
103. Korber P, Stahl JM, Nierhaus KH. A ribosome associated heat shock protein. *EMBO J* 2000;163(2):495-506.
104. Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000.
105. Tutar Y. Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. *Protein Pept Lett* 2006;13(7):699-705.
106. Karabulut H, Gülay ŞM. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2016;1:65-76.
107. Tekeli H, Bildik A. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında Glutatyon (GSH) ve Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi üzerine N-Asetil sisteinin etkisi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2016;5:2.
108. Sen S, Chakraborty R. The role of Antioxidants in human health. *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. Am Chem Soc* 2011;1-37.
109. Bucak MN, Satılmış M, Kızıl S, Karaşahin T, Akyol N, Sığır Embriyolarının in vitro Gelişiminde Kültür Medyumlarına Katılan Antioksidanların Etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010;16(1):69-74.
110. Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem* 2008;107:690-700.
111. Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;72(1):19-66.
112. Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*. 1900;11(279):701-2.
113. Boon EM, Downs A, Marcey A. Catalase: H₂O₂, H₂O₂ Oxidoreductase 2010 07/10/2010]; Available from: http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/mm/catalase/cat1.htm.
114. Karadağ H, Kaplan F. Effect of lambda cyhalothrin and fenthion pesticides on bovine liver catalase activity. *Fresenius Environ Bull* 2016;25:3012.
115. Sheng L, Zheng X, Tong H, Liu S, Du J, Liu Q. Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu, Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves. *Plant Sci* 2004; 167(6):1235-41.

116. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biol Med* 2006;41:1338–50.
117. Helle RA, Jesper BN, Fleming N. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 1997;43(4):562-8.
118. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 1975;44(1):147-59.
119. Şekeroğlu Z. Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: Kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2013;70(1):33-42.
120. Gad, S.C. *Toxicology*. Second Edition. New York: Taylor & Francis. 2000
121. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol Vitro* 2002;16:599-607.
122. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line, *Toxicol App Pharmacol*, 2009;234:222–35.
123. Fotakis G, Timbrell JA. Cytotoxicity assays: comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol Lett* 2006;160:171-7.
124. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schneidenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Euro J Pharmaceutics Biopharmaceutics* 2009;72:370–7.
125. Kim H, Lee S, Han Y, Park J. Preparation of dip-coated TiO₂ on ceramic foam pellets, *J Mat Sci Lett* 2005;1:10-50.
126. Virgilio AL, Reigosa M, Arnal, PM, Mele M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells, *J Hazardous Mat* 2010;11:1-8.
127. Martins ADC, Azevedo LF, Souza Rocha CC, Carneiro MFH, Venancio VP, Adeyemi JA et al. Evaluation of distribution, redox parameters, and genotoxicity in Wistar rats co-exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles. *J Toxicol Environ Health A*. 2017;80(19-21):1156-65.
128. Hackenberg S, Scherzed A, Zapp A, Radeloff K, Ginzkey C, Gehrke T, et al. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in nasal mucosa cells are antagonized by titanium dioxide nanoparticles. *Mutat Res* 2017;816:32-3.
129. Armand L, Tarantini A, Beal D, Biola-Clier M, Bobyk L, Sorieul S, et al. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 2016;10(7):913-23.

130. Girardello F, Custódio Leite C, Vianna Villela I, da Silva Machado M, Luiz Mendes Juchem A, Roesch-Ely M, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aqua Toxicol* 2016;170:223-8.
131. Bayat N, Lopes VR, Schoelermann J, Jensen LD, Cristobal S. Vascular toxicity of ultra-small TiO₂ nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2015;63:1-13.
132. Carmona ER, Escobar B, Vales G, Marcos R. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. *Mutat Res* 2015;778:12-21.
133. Vignardi CP, Hasue FM, Sartório PV, Cardoso CM, Machado AS, Passos MJ, et al. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat Toxicol* 2015;158:218-29.
134. Meena R, Kajal K, Paulraj R. Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male wistar rat. *App Biochem Biotechnol* 2015;175(2):825-40.
135. Chen Z, Wang Y, Ba T, Li Y, Pu J, Chen, T, et al. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 2014;226(3):314-9.
136. Demir E, Burgucu D, Turna F, Aksakal S, Kaya B. Determination of TiO₂, ZrO₂, and Al₂O₃ nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells. *J Toxicol Environ Health* 2013;76(16):990-1002.
137. Hackenberg S, Friehs G, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, et al. Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2011;52(4):264-8.
138. Di Virgilio AL, Reigosa M, Arnal PM, De Mele MFL. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazardous Mater* 2010;177(1):711-8.
139. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12 (3): 743-761.
140. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, et al. Hsp70 regulates erythro-poiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*.2007; (445): 102-5.
141. Sun Q, Tan D, Ze Y, Sang X, Liu X, Gui, S, et al. Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *J Hazard Mater*. 2012; (235): 47-53.
142. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, et al. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater*. 2010; 183(1): 874-880.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Titanyum dioksitin A-Anataz, B-Rutil, C-Brukite kristal yapısı.....	7
Şekil 2. TiO ₂ 'in fotokatalitik etkisi	10
Şekil 3. Fotokatalizlenme mekanizması: A-İndirgenbilir ve B-Oksitlenebilir maddeler	11
Şekil 4. Fotokatalitik nano TiO ₂ ' in uygulama alanları.....	11
Şekil 5. T/G HA VSMC hücre hattı	14
Şekil 6. MTT'nin formazana dönüşümü	20
Şekil 7. T/G HA VSMC hücre hattının mikroskopik görüntüsü (x100)	27
Şekil 8. T/G HA VSMC hücre hattında 24 saat süreyle 0.39 µm ile 200 µm konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT testi plağı, Veriler % Canlılık Ortalama±Standart Sapma.....	34
Şekil 9. T/G HA VSMC hücre hattında 48 saat süreyle 0.39 µm ile 200 µm konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT testi plağı, Veriler % Canlılık Ortalama±Standart Sapma.....	35
Şekil 10. T/G HA VSMC hücre hattında 48 Saat Süre İle TiO ₂ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve LD ₅₀ değeri.....	36
Şekil 11. T/G HA VSMC hücreleri HSP 70 ekspresyon düzeyi.....	38
Şekil 12. T/G HA VSMC hücreleri GSH ekspresyon düzeyi.....	39
Şekil 13. T/G HA VSMC hücreleri CAT ekspresyon düzeyi	40
Şekil 14. T/GHA VSMC hücreleri SOD ekspresyon düzeyi.....	40

TABLULAR

Tablo 1. TiO ₂ 'nin temel fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
Tablo 2. TiO ₂ ' in uygulama alanları.....	9
Tablo 3. Memeli hücre sistemleri için temel ve temel olmayan amino asitler.....	18
Tablo 4. cDNA sentez protokolü	30
Tablo 5. Kullanılan hücre hattının/ kimyasal maddenin adı, markası ve katalog numaraları .	30
Tablo 6. Kullanılan cihazların adı ve markası	31
Tablo 7. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları	32
Tablo 8. qRT-PCR karışım içeriği.....	32
Tablo 9. TiO ₂ 'in uygulama dozuna bağlı olarak değişen doz-% canlı hücre ilişkisi.....	37
Tablo 10. TiO ₂ doz-zaman ilişkisine ait pearson korelasyon tablosu.....	37
Tablo 11. T/G HA VSMC hücre hatlarında SOD,CAT, HSP70, GSH gen ifadelerinin değişimi.....	41

ÖZGEÇMİŞ

19 Eylül 1989 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlköğretimimi Çanakkale İstiklal İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra, ortaöğretimimi Edirne Yüksel Yeşil İlköğretim Okulu'nda tamamladım. 2007 yılında Edirne İlhami Ertem Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi Fen Bilimleri Bölümünü bitirdim. 2008 yılında kazandığım Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldum. 2013 yılında Edirne'de Pereja İleri Kimya Sanayi A.Ş'de üretim sorumlusu olarak görev yaptım.2014 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım. 2014 Nisan ayında Üretim Uzman Yardımcısı olarak başladığım Deva Holding A.Ş. Çerkezköy üretim tesisleri Hormon üretim departmanındaki görevime Üretim Uzmanı olarak halen devam etmekteyim.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2015/81	
	PROTOKOL ADI	Titanium Dioksit Nanopartiküllerinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 07/10	Tarih: 15.04.2015	
	Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Mumin AKICI'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi			

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Üfret VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KOŞE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Bakı KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan