

**GÜMÜŞ-KALAY ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN
AKCİĞER EPİTEL HÜCRELER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hilal SEÇKİN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ-KALAY ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN AKCİĞER
EPİTEL HÜCRELER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hilal SEÇKİN
0000-0003-4370-6006

Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2020
Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Hilal SEÇKİN tarafından hazırlanan 'Gümüş-Kalay Alaşım Nanopartiküllerinin İnsan Akciğer Epitelyum Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

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

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı
0000-0002-0522-9432

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi Müh.
ve Doğa Bil. Fak. Biyomühendislik
Anabilim Dalı
0000-0002-0290-1166

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin AKSELEREN
Enstitü Müdürü

2020

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

beyan ederim.

04/02/2020

Hilal SEÇKİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÜMÜŞ-KALAY ALAŞIM NANOPARTİKÜLLERİNİN İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal SEÇKİN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Bu çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B insan akciğer epitel hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerin belirlenmesi için XTT testi, genotoksik etkilerin belirlenmesi için Komet testi uygulanmıştır. Reaktif oksijen varlığının belirlenmesi için ROS testi uygulanmıştır.

Deneylere başlamadan önce, kullanılan nanopartiküllerin karakterizasyonu için zeta potansiyeli, DLS ve TEM analizleri yapılmıştır. XTT testi için BEAS-2B hücreleri 24, 48 ve 72 saat süre boyunca 1 ile 1000 µg/ml arasında değişen dozlarda Ag-Sn alaşım nanopartikülüne maruz bırakılmıştır. Ag-Sn alaşım nanopartikülünün genotoksik etkisinin belirlenmesi için, BEAS-2B hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca 50 ile 500 µg/ml arasında değişen dozlarda nanopartikül ile muamele edilmiş ve Komet yöntemi uygulanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre konsantrasyon ve maruziyet süresi arttıkça Ag-Sn nanopartikülünün sitotoksik etkisinin arttığı görülmüştür. Komet testi ile Ag-Sn nanopartikülünün tek ve çift iplik DNA kırıklarına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen bulgulardan bu etkilerin hücre içi ROS oluşumu ile ilişkili olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Nanotoksikoloji, BEAS-2B hücre hattı, Gümüş-Kalay alaşım nanopartikülleri, Genotoksisite, Sitotoksisite.

2020, viii +45sayfa

ABSTRACT

Mcs Thesis

EVALUATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF SILVER TIN ALLOY NANOPARTICLES ON HEALTHY LUNG CELL LINE

Hilal SEÇKİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

In this study, cytotoxic and genotoxic effects of Ag-Sn metal alloy nanoparticles in BEAS-2B human lung epithelial cells were evaluated. XXT test was used to determine cytotoxic effects, Comet test was used to determine genotoxic effects. ROS test was applied to determine the presence of reactive oxygen species.

Before starting the experiments, zeta potential, DLS and TEM analyzes were used to characterize the nanoparticles. For XXT test, BEAS-2B cells were exposed to different concentrations (1 to 1000 ml) of Ag- Sn alloy nanoparticles for 24, 48 and 72 hours. To determine the genotoxic effect of the Ag-Sn alloy nanoparticle, BEAS-2B cells were treated with nanoparticles different concentrations (50 to 500 ml) for 24, 48 and 72 hours and a Comet method was applied.

According to the results obtained, it was observed that the cytotoxic effect of Ag-Sn nanoparticle increased different concentration and exposure time. Comet test showed that exposure to Cu-Zn alloy nanoparticles induced single and double stranded DNA damage in BEAS-2B cells. Our results further indicated that increased intracellular ROS formation could be related to the experiments that these effects

Keywords: Nanotoxicology, Silver-Tin alloy nanoparticles, BEAS-2B cells, Cytotoxicity, Genotoxicity.

2020, viii +45pages

TEŞEKKÜR

Tüm çalıőmalarım boyunca bana rehber olan, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Tez deneylerimde ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Doç.Dr. Özgür VATAN'a,

Deney aőamalarında yardımları ile bana destek olan değerli büyüğüm etin AKÇA'ya, sevgili arkadaşlarım Huzeyfe HURİYET ve Dilek YILMAZ'a,

Deney çalıőmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ümit KUMBIÇAK' a,

Bütün bu zahmetli süreçte desteklerini her zaman hissettiğim, evlatları olmaktan gurur duyduğum canım aileme,

Her daim yanımda olan, beni yüreklendiren canım eşime ve moral kaynağım oğluma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

04/02/2020

Hilal SEÇKİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller	3
2.1.1. Tanımı ve tarihçesi.....	3
2.1.2. Metal nanopartiküller	4
2.2. Nanotoksikoloji.....	5
2.2.1. Nanopartiküllerin hücrede ROS oluşumundaki rolü.....	8
2.3. Toksikite Test Yöntemleri.....	8
2.3.1. Sitotoksikite testleri.....	8
2.3.2. Genotoksikite testleri.....	9
2.3.3. Enzimatik analizler	10
2.4. Metal ve Metal Alaşım Nanopartiküllerin Toksik Etkileri	11
3. MATERYAL ve METOT.....	13
3.1. Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin temin edilmesi ve karakterizasyonu	13
3.2. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler.....	14
3.3. Sağlıklı akciğer epitel (BEAS-2B) hücre kültürü çalışmaları.....	15
3.4. Kontrol ve doz gruplarının belirlenmesi	17
3.5. XTT hücre canlılığı belirleme testi	18
3.6. Tek Hücre Jel Elektrophoresis (KOMET) yöntemi	19
3.6.1. Komet testi hazırlık aşamaları.....	20
3.6.2. Komet test protokolü.....	21
3.7. ROS Testi ile Olası Hücre İçi Etki Mekanizmalarının Tespiti	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Karakterizasyon ile İlgili Bulgular.....	23
4.2. Gümüş-Kalay Metal Alaşım Nanopartiküllerinin % Canlılık Oranına Etkisi	24
4.2.1. XTT test bulguları.....	24
4.3. Gümüş-Kalay Metal Alaşım Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisi	25
4.3.1. Komet test bulguları.....	26
4.3.2. ROS testi bulguları.....	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Au

Al

HT-1080

Cu

Zn

ZnO

dk

Fe

gr

Ag

AgCuNP

AgSnNP

AgNP

Ag-Sn

H₂O₂

HCl

OH[•]

A431

CO₂

Mn

M

Ni

HeLa

BEAS-2B

°C

cm²

CeO₂

Na₂EDTA

NaOH

NaCl

O₂^{•-}

TiO₂

V

Açıklama

Altın

Alüminyum

Bağ doku tümör hücreleri

Bakır

Çinko

Çinko oksit

Dakika

Demir

Gram

Gümüş

Gümüş Bakır Nanopartikül

Gümüş Kalay Nanopartikülü

Gümüş Nanopartikülü

Gümüş-Kalay Alaşım Nanopartikülü

Hidrojenperoksit

Hidroklorik asit

Hidroksil radikali

İnsan epidermal hücre hattı

Karbondioksit

Manganez

Molar

Nikel

Rahim ağzı kanser hücreleri

Sağlıklı insan akciğer bronşial epitel hücre hattı

Santigrad Derece

Santimetrekare

Seryum oksit

Sodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit

Sodyum hidroksit

Sodyum klorür

Süperoksit anyonu (radikali)

Titanyum dioksit

Volt

Kısaltmalar

DCFH-DA

nC₆₀

DNA

DCFH

DMSO

DLS

FBS

PBS

g/L

LMA

Açıklama

2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate

C₆₀ fullerene-Su süspansiyonu

Deoksiribonukleik asit

Dichlorodihydrofluorescein

Dimetil Sülfoksit

Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi

Fetal Bovine Serum

Fosfat Buffer Serum

Gram / Litre

Low Melting Agoroz

MN	Mikro Nükleus
$\mu\text{m/ml}$	Mikrogram / Mililitre
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mA	Milimolar
mV	Milivolt
nm	Nanometre
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TEN	Transmisyon Elektron Mikroskopisi
yy	Yüzyıl

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.Nanomateryal örnekleri ve biyolojik yapıların nano ölçekte boyutları	4
Şekil 2.2.Komet testi aşamaları.....	10
Şekil 4.1.Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin TEM gösterimi	24
Şekil 4.2.BEAS-2B hücreleri Ag-Sn alaşım nanopartikülleri ile 24,48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen canlılık oranları.....	25
Şekil 4.3.Komet testi ile oluşturulan preparatların mikroskop görüntü örnekleri (X20).....	28
Şekil 4.4.BEAS-2B hücrelerinin Ag-Sn alaşım nanopartikül ile 24,48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, 24. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerleri ile 48. ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerlerinin Wilcoxon testi ile karşılaştırılması	29
Şekil 4.5. BEAS-2B hücrelerinin Ag-Sn alaşım nanopartikülü ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen % DNA miktarı değerleri, 24. saatteki % DNA değerleri ile 48. ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının % DNA miktarı değerlerinin Wilcoxon testi ile karşılaştırılması	30
Şekil 4.6.BEAS-2B hücreleri Ag-Sn alaşım nanopartikülü ile 24,48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen Olive kuyruk momenti, 24. saatteki konsantrasyon gruplarının Olive kuyruk momenti değerleri ile 48. ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının Olive kuyruk momenti değerlerinin Wilcoxon testi ile karşılaştırılması.....	31
Şekil 4.7.ROS testi ortalama değerleri.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı metal nanopartiküller ve kullanım alanları	5
Çizelge 2.2. Genotoksitesisi çalışılan bazı nanopartiküller	7
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	16
Çizelge 3.3. Sitotoksitesite testleri için belirlenen konsantrasyonlar.....	18
Çizelge 3.4. Genotoksitesite testleri için belirlenen konsantrasyonlar	19
Çizelge 4.2. BEAS-2B hücreleri Ag-Sn alaşım nanopartikülleri ile 24,48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen kuyruk uzunluğu, %DNA miktarı ve Olive kuyrukmomentanti komet değerlerinin ortalaması ve standart hataları, tüm komet parametrelerinin negatif kontrolü ile Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin çeşitli doz değerlerinin Wilcoxon testi ile karşılaştırılması.....	27
Çizelge 4.3. BEAS-2B hücrelerinin Ag-Sn metal alaşım nanopartikülleri ile 24,48 ve 72 saat süreyle muamele edildiğinde elde edilen ROS değerleri, negatif kontrol ile Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin çeşitli doz değerlerinin Wilcoxon testi ile karşılaştırılması.....	32

1. GİRİŞ

Günümüzün ilerleyen teknolojisi nanoteknoloji hayatımızın birçok alanına girmiş bulunmaktadır. Kozmetik, gıda , tıp, savunma sanayi, giyim, enerji gibi alanlarda nanopartiküllerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Buna bağlı olarak insan ve çevre üzerinde etkileşimi gittikçe artmakta olan nanopartiküllerin etkilerinin araştırılması önem kazanmaya başlamıştır.

Nano kelimesi metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Nanopartikül ise 1-100 nm boyutundaki atomların bir arada bulunmasıdır (Özcan 2014).Normal metaller ile karşılaştırıldıklarında geniş yüzey alanına sahip nano parçacıklar farklı biyolojik özellikler gösterebilmektedir. Nanomateryallerin gümüş, bakır, çinko, altın, magnezyum gibi farklı tipleri bulunabilmektedir(Özcan 2014).

Amerikan Çevre Koruma Örgütü USEPA (Anonim 2007) nanopartikülleri 4 bölümde incelemiştir. Bunlar,

- 1) Karbon bazlı nanomateryaller
- 2) Metal bazlı nanomateryaller
- 3) Dendrimerler
- 4) Nanokompozitler

Nanopartiküller arasında en geniş kullanım alanına sahip olanlar metal nanopartiküllerdir. Özellikle antimikrobiyal etkilerinin yüksek olması antibiyotik tedavisine alternatif olarak araştırılmıştır (Kumbıçak 2013). Bunun yanında metal nanopartiküller, kolay sentezlenebilmeleri ve kimyasal açıdan şekillendirilmelerinin kolay olmasından dolayı makine sanayisinde, askeri malzemelerde ve özellikle tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Atlı-Şekeroğlu 2013).

Günümüzde metaller başka bileşiklerle bir araya gelerek alaşım formuna dönüştürülebilmekte ve geniş kullanım alanlarına sahip olabilmektedir. Alaşım; bir metalin başka bir bileşikle (metal/ametal) bir araya gelmesi sonucu oluşan, kendini oluşturan bileşiklerden farklı özellikler gösteren metalik karakterli malzemelerdir.

Nanometallerin oluşturduğu alaşımlar gelecekte geniş kullanım alanlarına sahip olabilecektir.

Günümüzde alaşım oluşturarak en yaygın kullanıma sahip nanometal gümüş (AgNp) nanopartiküldür. Özellikle gümüş nanopartikülünün antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri nedeniyle tıp alanında kullanımını gittikçe yaygınlaştırmaktadır. AgNp emdirilmiş yara bantları ve kataterlerin tıp alanında kullanımını gittikçe artmaktadır (AshaRani ve ark. 2009). Bunların yanında gümüş-metal alaşım şeklinde nanoparçacıklar da kendine geniş kullanım alanı bulmuştur. Gümüş-Bakır (AgCuNp) ve Gümüş-Kalay (AgSnNp) alaşım nanopartiküller tıbbi cihazlarda ve tekstilde kullanılmaktadır. Bakır ve kalay nanopartiküllerinin de antibakteriyel etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Maniratanachote ve ark. 2018).

Gittikçe artan kullanım alanları düşünüldüğünde nanoparçacıkların insan sağlığı üzerine etkilerinin de araştırılması bir zorunluluk haline gelmiştir. Kullanım alanı yaygın olan birçok nanopartikül ile ilgili ciddi çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanında yine kullanımını gittikçe yaygınlaşan alaşım nanopartikülleri hakkında yapılan çalışmalar halen yetersizdir. Bu çalışmada, gümüş-kalay metal alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan akciğer hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller

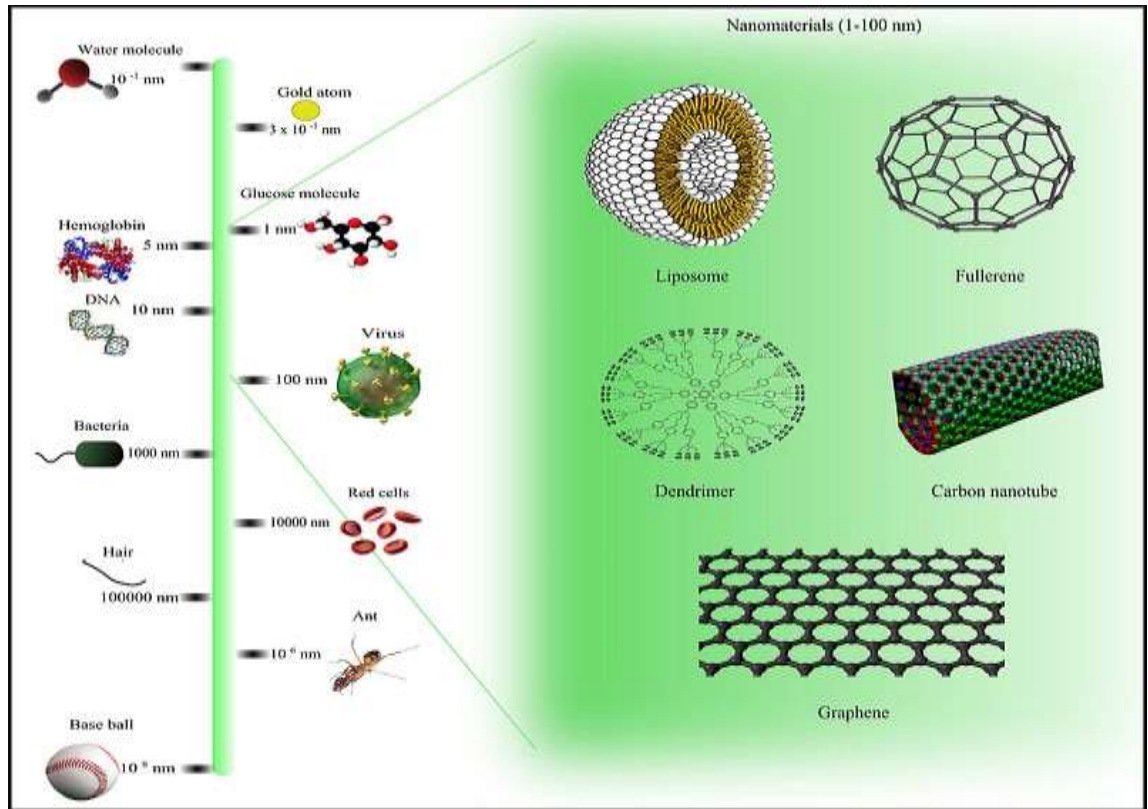
2.1.1. Tanımı ve tarihçesi

1974 yılında Norio Taniguchi 'ileri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji' olarak nanoteknolojiyi ilk kez tanımlamıştır (Beykaya ve Çağlar2016). 1981 yılında atomların direk görüntülerini veren taramalı tünelleme mikroskobunun keşfi ve 1986 yılında atomik kuvvet mikroskobunun keşfi ile nano boyutlu materyallerin incelemeleri mümkün olmuştur. Bu gelişmelerle birlikte biyolojik nano materyallerin incelemeleri de yaygınlaşmış ve bilim adamlarının nanoteknolojiye olan ilgisi daha da artmıştır (Atlı-Şekeroğlu 2013).

Nanoteknolojide, nanometre boyutlu malzemeler elde edilmekte ve bu malzemeler kullanılarak yeni teknolojiler üretilebilmektedir (Kumbıçak 2013). Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller, 100nm'nin altında en az iki boyutlu yapıya sahip parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (Foldbjerg 2011).

Nanomateryallerin bir türü olan nanopartiküller, son zamanlarda yapılan çalışmalarda adından çok söz ettirse de uzun bir geçmişe sahiptir. 9.yy.'da, Mezopotamya'da, sanatkarlar çanak ve çömlekleri parlatmak amacıyla nanopartikülleri kullanmışlardır. Orta Çağ ve Rönesans dönemlerinde, çömlekçilikte, altın ve bakır renkli metalik parlaklığı korumak amacıyla cilalama işlemleri yapılmıştır. Bu işlemlerde gümüş ve bakır nanopartikülleri seramik sıranı camsı matriksinde homojen olarak dağılarak ince bir tabaka oluşturulmuş ve atmosferik oksidasyonu engellenmiştir. Sanatkarlar, bakır ve gümüş tuzlarını oksitlerle birlikte sirke, toprak boyası ve kil karışımına eklemişler ve bu karışımı önceden sırlanmış çömlek yüzeyine uygulamışlardır. Daha sonra bu çömleği 600°C' de fırınlayarak çömlek yüzeyinde renk veren ve optik özellikler gösteren bu nanopartikülleri elde etmişlerdir (Rawson 1984).

Biyolojik açıdan bakıldığında aslında nanoteknolojinin geçmişi üç milyar yıl öncesine dayanmaktadır. Nanometre boyutlu hücresel yapılar, ilk canlının varlığından günümüze hücre içerisinde kendilerine özgü görevleri ile varlıklarını sürdürmektedirler (Goodsell 2000). Şekil 2.1'de bazı nanomateryal örnekleri ve biyolojik bazı yapıların nano boyutları belirtilmiştir.



Şekil 2.1. Nanomateryal örnekleri ve biyolojik yapıların nano ölçekte boyutları (Goodman 2005)

2.1.2. Metal nanopartiküller

Metal nanopartiküller kolay sentezlenebilmeleri ve kimyasal açıdan farklı formlara kolaylıkla dönüştürülebilmeleri nedeniyle tüketim ürünlerinde, askeri uygulamalarda, makine sanayinde, endüstriyel ürünlerde ve tıpta çokça kullanılmaktadır. Metal nanopartiküller ve alaşımları, kristal yapıları ve güçlü metalik bağları nedeniyle üstün mekanik özellikler taşımaktadırlar. Örneğin, titanyum dioksit (TiO₂), çinko (Zn),

alüminyum (Al), bakır (Cu) ve gümüş (Ag) nanopartikülleri, endüstriyel ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Altın nanopartiküller, birçok biyolojik molekül ile kolayca bağlanabildiğinden biyolojik görüntüleme, ilaç uygulaması, hücre işaretlemeleri, hedefe yöneltme, kanser tedavisi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Alüminyum nanopartikülleri ilaç uygulamaları gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Kumbıçak 2013).

Son zamanlarda metal nanopartiküllerin insan hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Çeşitli nanopartiküllerin insan üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu ve nanopartikül konsantrasyonu arttıkça DNA hasarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Oldukça küçük boyutlarından dolayı hücreye ve çekirdeğe nüfus edebilen metal nanopartiküllerin, hücrede serbest radikal oluşumuna yol açarak ve DNA'ya bağlanarak genetik hasara yol açabileceği belirtilmiştir. Çeşitli genotoksisite ve sitotoksisite testleri ile birçok hücre kültüründe incelenen altın, krom, gümüş, çinko oksit, titanyum dioksit ve bakır oksit nanopartiküllerinin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olabileceği gözlemlenmiştir (Atlı-Şekeroğlu 2013). Çizelge 2.1'de bazı metal nanopartiküller ve uygulama alanları gösterilmiştir.

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

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

2.2. Nanotoksikoloji

Nanometre boyutlu parçacıklar doğada kendiliğinden bulunabildiği gibi endüstriyel bazı işlemler sonucunda da ortaya çıkabilmektedir. Nano boyutlu malzemeler, hücresel düzeyde canlılar üzerinde oluşturabilecekleri olumsuz etkileri sebebiyle bilim insanlarını endişelendirmektedir. Sonuç olarak, nanopartiküllerin toksikoloji ve çevresel etkileri açısından incelenmeleri kaçınılmazdır (Ateş ve ark. 2017).

Nanotoksikoloji, toksikoloji için önemli bir çalışma alanıdır. Nanotoksikoloji, nanomateryaller ve canlılar arasındaki etkileşimler için çalışmalar yapmayı amaçlamaktadır. Nanomateryaller ile yapılan çalışmalar nanomateryallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Örneğin, altın nanopartiküllerin fetal bariyeri geçtiği ve fullerenlerin fare embriyoları üzerinde ölümcül etkisinin olduğu belirtilmiştir (Bacanlı ve ark. 2014). Nanopartiküllerin toksik özellikleri yüzey alanı, çözünürlük, kimyasal kompozisyon, miktar ve maruziyet süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Coşkun 2013).

Genotoksik açıdan ele alındığında, oldukça küçük boyutlarından dolayı nanomateryaller, hücre membranlarından hücre içine nüfus edebilir, DNA ile direk etkileşime girebilir. Oluşabilecek hasarlar onarılmazsa DNA'da mutasyona yol açabileceği düşünülebilir.

Nanopartiküllerin, DNA'ya hasar mekanizmaları incelendiğinde; mitoz sırasında çekirdeğe girebileceği ve DNA'ya doğrudan temas edebileceği öngörülmüştür. Nanopartikül yüzeylerinde reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumu ile hücrede bulunan DNA, protein, lipid gibi makromoleküller ile etkileşime girerek hücresel hasara sebep olabilir. Nanopartiküller mitokondride elektron taşıma sistemini etkileyerek veya mitokondriyal enzimlerle etkileşime girerek ROS oluşumuna neden olabilir ve bu şekilde hücrelere zarar verebilir (Kumbıçak 2013). Genotoksitesisi çalışılan bazı nanopartiküller Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2.Genotoksisitesi çalışılan bazı nanopartiküller

Materyal	Organizma	Test yöntemi	Bulgular	Referans
Altın nanopartikülü (AuNP)	İnsan fetal akciğer fibroblast hücre hattı (MRC-5)	8-OHdG ölçmek üzere HPLC	- Oksidatif DNA hasarı belirlenmiştir. -Hücre ölümünde artış olmamıştır. -Bazı DNA tamir genlerinin down regülasyonu görülmüştür.	Li ve ark. 2008
Gümüş nanopartikülü (AgNP)	Fare embriyonik kök hücre ve fibroblastları (MES ve MEF)	-MN testi -Kometi testi -8-MTT ve LDH testleri	-Önemli miktarda süperoksit(O ₂ • ⁻) ve hidroksil (OH•) radikallerinin oluşumu görülmüştür. -Mn frekansı, % komet kuruğu ve sitotoksisitede doza bağlı artış görülmüştür.	Papageorgiou ve ark. 2007
Su-C ₆₀ fulleren süspansiyonu (nC ₆₀)	Periferal kan lenfositleri (PBL)	- Komet testi	Genotoksik yanıt oluşumunda doza bağlı artış görülmüştür.	Dhawan ve ark. 2006
Titanyum oksit nanopartikülü (TiO ₂ NP)	Periferal kan lenfositleri (PBL)	-MN testi -Komet testi	-Hücre viabilitesinde doza ve zamana bağlı düşüş gözlenmiştir. -MN frekansı ve ROS oluşumunda doza bağlı artış gözlenmiştir.	Kang ve ark. 2008
Çok katmanlı karbon nanotüpler (MWCNT)	TipII pnömosit (AT-II) ve meme kanseri hücre hattı (MCF-7)	-Ex vivo ve in vitro MN testi	Ex vivo ve in vitro MN testlerinde doza bağlı olarak MN frekansında önemli ölçüde artış görülmüştür.	Muller ve ark. 2008

2.2.1. Nanopartiküllerin hücrede ROS oluşumundaki rolü

Nanomateriyallerin bileşimi ve yüksek yüzey alanları hücrede ROS oluşumuyla ilişkilidir. Hücrede oluşan ROS nanomateriyallerin toksisitesinin belirlenmesinde önemli etkenlerden biridir. Bazı çalışmalar metal-metal oksit nanopartiküllerinin ROS oluşumuna ve oksidatif stres aracılığıyla DNA hasarına sebep olduğunu göstermiştir (Kumbıçak 2013).

Serbest radikaller, yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu elektronlar bir çok radikalle paylaşılabilir. Serbest radikaller hücrelerde metabolizma sonucunda üretilir. Organizmada oluşan serbest radikaller ya da ROS miktarı arttığında oksidatif stres oluşur. Buna bağlı olarak, hücrede serbest oksijen radikalleri artar ve antioksidan seviyeleri düşmeye başlayarak homeostasinin bozulmasına neden olabilir.

Birçok nanopartikülün hücrede oksidatif strese neden olduğu ve hücrel hasara yol açtığı ileri sürülmüştür (Stone ve ark. 2007). Nanopartikül boyutu küçüldükçe ve yüzey alanı arttıkça hücrede ROS oluşumunun arttığını, oksidatif stresin arttığını ve hücrel hasarın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

2.3. Toksikite Test Yöntemleri

2.3.1. Sitotoksikite testleri

XTT Testi

XTT testi, hücre canlılığı ve proliferasyonunu ölçen bir testtir. XTT test yönteminde, hücreler içindeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerin kapasitesi ile canlılık ve poliferasyon tespit edilir (Kocaoğlu 2014).

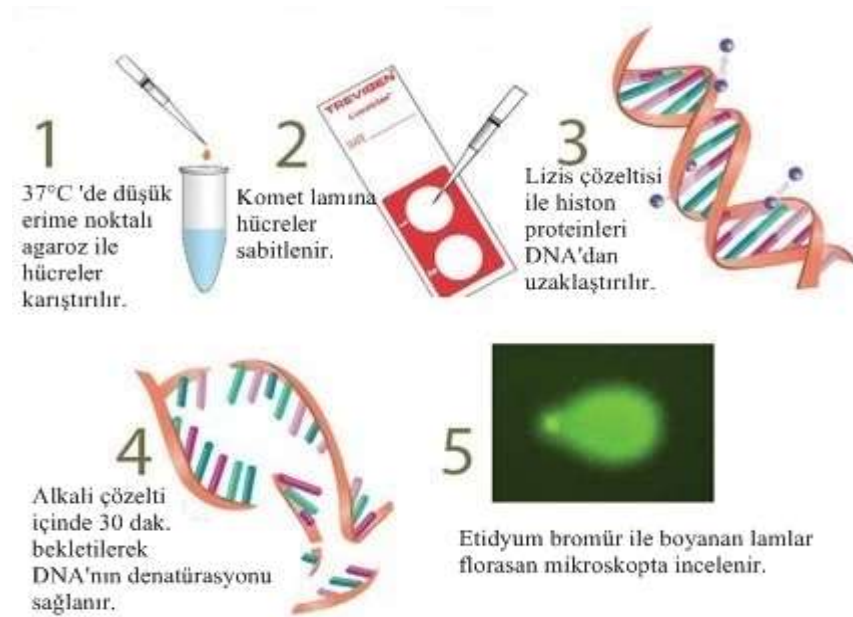
XTT yöntemi ilk defa 1988 yılında Scudiero ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Kocaoğlu 2014). XTT, renksiz ya da hafif sarı renkli bir bileşiktir. XTT ayracında bulunan tetrazolium halkası canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından parçalanarak turuncu-kırmızı renkli formazon kristalleri oluşturur. Dehidrogenaz enzimi hücre öldükten kısa bir süre sonra inaktive olur, bu nedenle turuncu-kırmızı renkli

formazon boyası sadece canlı hücrelerde oluşur. Sonuç olarak, örnekteki canlı hücre sayısı oluşan formazon boya miktarı ile doğru orantılıdır (Kumbıçak 2013).

2.3.2. Genotoksisite testleri

Komet Testi (Tek hücre jel elektroforez yöntemi)

Komet testi yani tek hücre jel elektroforez yöntemi, kısa sürede uygulanabilmesi ve güvenilir sonuç alınabilmesi açısından kimyasal ve fiziksel etmenlerin sebep olabileceği DNA hasarının tespiti için kullanılan bir yöntemdir (Akça 2015). Rydberg ve Johanson tarafından 1978 yılında DNA sarmal kırıklarının tespiti için kullanılmıştır. 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilerek, nötral pH lizis şartlarında DNA çift sarmal kırıklarının tespit etmek amaçlı kullanılmıştır. Komet yöntemi, diğer test yöntemlerine göre az maliyetli olması, hızlı ve basit bir yöntem olması nedeniyle fiziksel ve kimyasal etmenlere bağlı oluşan DNA hasarlarının tespitinde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesinin belirlenmesinde, bazı kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan düşük hasar seviyesini belirleyebilen ve az hücre sayısı ile sonuç alınabilen önemli bir yöntemdir.



Şekil 2.2.Komet testi aşamaları

Komet test yönteminde,alkali pH'da farklı moleköl ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklığa göç etmesi esastır. Sonuçta elde edilen görüntü kuyruklu yıldızı andırdığı için de "komet" (comet;kuyruklu yıldız) olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemde hücreler öncelikle agarozta yerleştirilerek lamalar üzerine yayılır. Sonrasında lizis işlemleri uygulanır ve alkali elektroforez tamponunda yürütme sağlanır. Floresan boyalar ile boyanan hücreler floresan mikroskop altında incelenir. Sonuçta oluşan hücreler kuyruklu yıldız görüntüsü vermektedir. Hücreler, nukleusun bulunduğu bir baş kısmı ve DNA fragmentlerinin bulunduğu bir kuyruk kısmından oluşmaktadır. Baş bölgesi ve komet kuyruğu arasındaki oranlardan yapılan hesaplamalar ile DNA hasarı belirlenmektedir (Kumbıçak 2013, Akça 2015).

2.3.3. Enzimatik analizler

ROS Testi

ROS testi hidroksil, peroksil veya hücre içinde reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Hücreye giren 2', 7'-Diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) hücreler esterazların etkisi ile 2', 7'-Diklorodihidrofloresine (DCFH) dönüştürülür. Bu yapıların floresan özelliği bulunmamaktadır. DCFH hücrede reaktif oksijenlerin olması durumunda floresan özellikteki

2', 7'- Diklorodihidrofloresin (DCF)'e hızlı bir şekilde oksitlenir. Hücre içindeki ROS seviyesinin artışına bağlı olarak floresan yoğunluğu da artar (Kumbıçak 2013, Huriyet 2017).

Hücreler, 96 kuyucuklu mikropalakalarda kültüre edilir ve sonra DCFH-DA ile birlikte inkübasyona bırakılır. Etkisi araştırılan ROS örnekleri hücrelere eklenir ve kısa süreli bir inkübasyondan sonra, hücreler standart floresan plate okuyucuda okunur. İncelenen örneklerin ROS içeriği DCF standart eğri ile karşılaştırılarak belirlenebilir.

2.4. Metal ve Metal Alaşım Nanopartiküllerin Toksik Etkileri

Nanopartiküller, geniş yüzey alanları ve küçük boyutları nedeniyle birçok sektörde geniş kullanım alanına sahiptir. Metal ve metal alaşım nanopartiküller kolay işlenebilir olmaları nedeniyle oldukça fazla tercih edilen nanopartiküllerdir. Gittikçe büyüyen kullanım potansiyeline bağlı olarak insana ve çevreye verebilecekleri zararlar açısından değerlendirilmeleri gerektiği bilim insanları tarafından düşünülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin hücrelere farklı yollarla girerek toksik etki oluşturabildiğini göstermiştir. Bakır, çinko, alüminyum, gümüş gibi metal tabanlı nanopartiküllerin toksik etkileri gösterilmişken metal alaşım nanopartiküller ile ilgili çalışmalar halen yeterli düzeyde değildir.

Kozmetikte yaygın olarak kullanılan maddelerden biri çinko oksit (ZnO) nanopartikülleridir. Sharma ve ark.(2009) ZnO nanopartiküllerinin A431 insan epidermal hücre hattında oluşabilecek genotoksik etkilerini araştırmak için bir çalışma yapmışlar ve ZnO nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda bile lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres yoluyla insan epidermal hücrelerinde genotoksik etkiye neden olduklarını göstermişlerdir.

Sözen(2017) gümüş nanopartikülü ile sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada, doz miktarı arttıkça vücutta oksidatif stres oluşumunun arttığını ve karaciğer toksisitesinin arttığını göstermiştir. Nanopartikülün sahip olduğu oldukça küçük boyutların da toksisitenin artmasında etkili olduğunu belirtmiştir.

Fare spermatogonium kök hücre hattı üzerinde yapılan başka bir çalışmada hücreler gümüş nanopartiküllere maruz bırakılarak sitotoksikite açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre nanopartiküle maruziyet doz ve süre bakımından arttıkça hücrelerde nekroz ve apoptoz oluşumuna bağlı toksisite gözlenmiştir. Sonuç olarak aynı şekilde maruziyetin insanlarda doğurganlığın azalma sebebi olabileceği düşünülmüştür (Hofmann 2005).

Klien ve Godnić-cvar (2012) farklı metal nanopartiküllerin genotoksik etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, bazı nanopartiküllerin deney hayvanlarında hem

kromozomal hasarlarahem de DNA zincirinde kırılmalara yol açtığını göstermiştir. Bu etkilerin, sadece partikül büyüklüğü, yüzey modifikasyonu ve maruz kalma şekline değil, aynı zamanda maruziyet süresine de bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Metal nanopartiküllerle ilgili fazla sayıda çalışma bulunmasına karşılık metal alaşım nanopartiküllerle ilgili yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Nano boyuttaki metallerin boyutları aynı elemental yapıdaki saf metallere oranla çok daha küçük olduğundan farklı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterebilmektedirler. Metal alaşım nanopartiküller ise kendilerini oluşturan metal nanopartiküllerden çok farklı özellikler göstermektedirler. Bu nedenler nanotoksisite çalışmalarının zamanla artarak devam etmesi zorunluluk haline gelmiştir.

Bu çalışmada, Gümüş-Kalay (Ag-Sn) metal alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan akciğer epitel hücreleri(BEAS-2B) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular adı geçen metal alaşım nanopartiküllerin biyolojik uygulamalarda dozaj belirlenmesi ve çevresel düzenlemelerde konsantrasyon belirlenmesi açısından veri oluşturacaktır.

3. MATERYAL ve METOT

Bu tez çalışması **Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde** bulunan **Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji** laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin sağlıklı insan akciğer epiteli (BEAS-2B) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma sırasında XTT testi, Komet yöntemi ve ROS testi uygulanmıştır. Deney basamakları aşağıda sıralanmıştır;

3.1. Ag-Sn alaşım nanopartikülünün temin edilmesi ve karakterizasyonu

3.2. Kullanılan ekipman ve sarf malzemeler

3.3. Sağlıklı akciğer epitel (BEAS-2B) hücre kültürü çalışmaları

3.4. Kontrol ve doz gruplarının belirlenmesi

3.5. XTT hücre canlılığı belirleme testi

3.6. Tek Hücre Jel Elektrophorez (COMET) yöntemi

3.7. ROS testi ile olası hücre içi etki mekanizmalarının tespiti

3.1. Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin temin edilmesi ve karakterizasyonu

Çalışmada 1 mg Ag-Sn metal alaşım nanoapartikülleri 1 ml besiyeri içinde çözülmüştür. 20 dk ultra sonikatörde sonike edilmiştir. Oluşan çözeltinin karakterizasyonu hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada zeta potansiyeli ölçümü, dinamik ışık saçılım spektrofotometresi (DLS) ve transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizleri yaptırılmıştır.

Zeta potansiyeli ölçümü

Zeta potansiyeli basit olarak tanecikler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü olarak tanımlanabilir (Hunter 1981). Zeta potansiyeli partikülün yüzey yüküne bağlı olup genellikle 15 mV 'dan yüksek ya da -15 mV'dan küçük değere sahip partiküller stabil olarak kabul edilir. Bundan dolayı çalışmalarda kullanılacak nanopartiküllerin çözeltideki zeta potansiyeli belirlenmelidir.

Çalışmada hazırlanan çözeltideki Ag-Sn alaşım nanopartikülünün zeta potansiyeli 25 °C 'de Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins.) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Dinamik ışık saçılım (DLS) spektrofotometresi analizi

Çalışmada, Ag-Sn alaşım nanopartikül çözeltisindeki parçacıkların büyüklükleri Malvern CGS-3 (Malvern Inst.) dinamik ışık saçılım spektrofotometresi ile 25 °C sıcaklıkta ve 90 derece açıda ölçülmüştür.

Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) analizleri

Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin büyüklük ve dağılımı hakkında veri elde etmek ve DLS verilerini doğrulamak amacıyla transmisyon elektron mikroskopik (TEM) analizleri yapılmıştır. Bu aşamada hazırlanan çözeltiden alınan örnekler 300 mesh'lik bakır gridler üzerine damlatılmış ve bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır (Dhawan ve ark. 2006).

3.2. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.1'de, kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman	Marka / Model
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Görüntüleme sistemi	KAMERAM
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar(devamı)

Ekipman	Marka / Model
pH metre	HANNA – HI 221
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CH
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO
Inverted mikroskop	SOIF
Elisa Reader Fluoroskan Ascent	FL 2.6THERMO
Hücre sayım cihazı	ROCHE

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma / Katalog No
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml' lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril 15 ml' lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Etil alkol	AY-KİM
Triton X-100	GERBU 2000
Bovine Serum Albumin	SIGMA- ALDRICH A9418
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA 12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA 08537
Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA	SIGMA – ALDRICH T4049
DPBS/Modified	THERMO SH30028.02
XTT Test Kiti	BI
DCFH-DA	TRC CANADA

3.3. Sağlıklı akciğer epitel (BEAS-2B) hücre kültürü çalışmaları

Çalışmada daha önce birçok genotoksisite araştırmasında kullanılmış olan BEAS-2B yani sağlıklı akciğer epitel hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, filtre kapaklı T-75 flasklarda, % 10 fetal sığır serumu (FBS), %1 PSA (Penisilin, Streptomisin,

Anfeterosin) ve 1g/L glukoz içeren RPMI besiyerinde çoğaltılmıştır. BEAS-2B hücre kültürleri, filtreli T-75 flasklar içerisinde 37 °C' lik %5 CO2 içeren ortamda büyütülmüştür.

Besiyerinin hazırlanması: 500ml'lik RPMI-1640 üzerine;3 ml L-Glutamin,6 ml Penisilin – Streptomisin,6 ml Sodyum piruvat,60 ml Fetal Bovine Serum (FBS) eklenerek hazırlanan besiyeri biraz çalkalanarak homojen karışması sağlanır. Çalışma bittikten sonra ağzı sıkıca parafin ile kapatılarak +4°C' ye kaldırılır. Besiyeri hücre hatları üzerinde tekrar kullanılacağı zaman su banyosunda uygun sıcaklığa getirilmesine dikkat edilir.

Hücrelerin pasajlanması protokolü

Hücre kültürlerinin devamını sağlamak ya da yeni deneyler kurmak için dolu flaskların yenilenmesine pasajlama denir.

BEAS-2B hücreleri kültür kabının yüzeyine tutunarak büyüeyebilen hücrelerdir. Bu nedenle pasajlama işlemi sırasında öncelikle tutundukları kültür kabı yüzeyinden ayrılmaları gerekmektedir. Bu işlem **tripsin** denen protein sindiren bir enzimle gerçekleştirilir. Tripsin çözeltisinin hazırlanması için 80 ml' lik PBS' e 20 ml' lik Tripsin eklenir. Pasajlama basamakları şöyledir;

1. Pasajlanacak hücre kültürü flaskından besiyeri aspire edilir.
2. Flaskta kalan hücreler uygun miktarda PBS ile ~1 dk yıkandıktan sonra PBS aspire edilmiştir.
3. Tripsin eklenerek birkaç dakika beklenmiş ve invert mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir.
4. Tripsin aktivitesini durdurmak için flaska tripsin ile aynı miktarda besiyeri eklenmiştir.
5. Flasktaki hücre süspansiyonu serolojik bir pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır.
6. Tüpte bulunan hücre süspansiyonu +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.

7. Hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 500 µl süpernatant kalacak şekilde aspire edilmiş ve kalan kısım tekrar süspansiyon edilmiştir.
8. Hücre sayım cihazı ile hücre sayısı belirlenmiştir.
9. Yeni bir flaska uygun miktarda besiyeri koyulmuş ve istenilen hacimdeki hücre süspansiyonu eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.

3.4. Kontrol ve doz gruplarının belirlenmesi

Bu çalışmada negatif ve pozitif kontrol olmak üzere iki çeşit kontrol grubu kullanılmıştır.

Negatif kontrol: Hücrelerin herhangi bir ajanla muamele edilmediği kontrol grubudur.

Pozitif kontrol: Genotoksisite ve sitotoksisite test sistemlerinin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla hücreler 1000 µM'lık hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilmiştir.

Sitotoksisite testleri;

Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için 24 saat boyunca BEAS-2B hücreleri Çizelge 3.3'te belirtilen konsantrasyonlarda nanopartikül çözeltisine maruz bırakılmıştır. Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla XTT testi uygulanmış ve IC50 değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.3. Sitotoksisite testleri için belirlenen konsantrasyonlar

KONTROL GRUPLARI	KONSANTRASYON		
Negatif Kontrol	1 µg/ml	24 µg/ml	256 µg/ml
Pozitif Kontrol	4 µg/ml	32 µg/ml	512 µg/ml
	12 µg/ml	64 µg/ml	1024 µg/ml
	16 µg/ml	128 µg/ml	

Genotoksisite testleri;

Sitotoksisite testleri değerlendirmesi sonucunda genotoksisite test dozları belirlenmiştir. Genotoksisiteyi belirlemek amacıyla Komet yöntemi uygulanmıştır. Belirlenen genotoksik test konsantrasyonları Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Genotoksisite testleri için belirlenen konsantrasyonlar

KONTROL GRUPLARI	KONSANTRASYON	
Negatif Kontrol	50 µg/ml	200 µg/ml
Pozitif Kontrol	100 µg/ml	400 µg/ml

3.5. XTT hücre canlılığı belirleme testi

Yapılan testte Ag-Sn nanopartikülünün sitotoksisitesinin tespiti amacıyla belirlenen konsantrasyonlarda XTT testi uygulanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) çözeltisinin hazırlanması;

%35'lik ana stok çözeltisinden alınan 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl steril saf su eklenerek 5 ml'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmıştır.

XTT çözeltisinin hazırlanması;

-20 derecede bulunan XTT^I ve XTT^{II} çözeltileri, ışısız ortamda 37°C su banyosunda ısıtılmış ve 1:50 oranında karıştırılmıştır.

XTT test protokolü;

1. 96 kuyucuklu plakada her bir kuyucuğa 200 µl besiyeri eklenmiştir. İlk sıraya ekilen besiyerleri blank olarak bırakılmış ve hücre eklenmemiştir. Burada amaç plaka

okuyucusu ELİSA cihazında besiyerinin absorbans değerlerini ne kadar etkilediğini bulup sonuçlarımızın ortalamasından çıkarmaktır.

2. Hücre sayımı yapılarak blanklar dışındaki her bir besiyeri içeren kuyucuğa 5000 adet hücre ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
3. 24 saat sonunda her kuyucuktan besiyeri aspire edilmiş ve tekrar 200 µl besiyeri eklenmiştir.
4. XTT testi için belirlenen konsantrasyonlardamade eklenmiş ve hücreler tekrar inkübatöre kaldırılmıştır.
5. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyerleri aspire edilerek PBS ile yıkama yapılmıştır.
6. Kuyucuklara 100 µl besiyeri ilave edilmiştir.
7. Her bir kuyucuğa hazırlanmış olan XTT solüsyonundan **50 µl** eklenmiştir.
8. XTT eklenmiş plak 37°C 'de %5'lik CO₂ içeren inkübatörde **2 saat** bekletilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda Elisa cihazında 450 nm ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

Bu çalışmada her bir kontrol ve muamele grupları farklı zamanlarda ikişer tekrarlı olmak üzere beş kez tekrar edilmiştir. Blanklar dahil her bir grubun ortalaması alınmıştır. Blankların ortalamaları, kontrol ve doz grupları ortalamalarından çıkarılmıştır. Elde edilen değerlerden her bir doz için aşağıdaki formül kullanılarak inhibisyon hesaplaması yapılmıştır.

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

$$\% \text{ Canlılık} = (100 - \text{Hesaplanan Doz İnhibisyonu})$$

3.6.Tek Hücre Jel Elektroforez (KOMET) yöntemi

Bu test, Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B hücre hattı üzerinde neden olduğu tek iplik kırıklarının belirlenmesi için uygulanmıştır. Kullanılacak dozlar canlılık testi değerlendirilerek 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 400 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır.

3.6.1. Komet testi hazırlık aşamaları

Lamların agar ile kaplanması;

0,75 gr normal melting agaroz 100 ml distile suya eklenip ve karışım ısıtılmıştır. Lamlar buzlu kısımlarının yarısına kadar agarozla batırılmış, alt kısmı silinerek havada kurumaya bırakılmıştır.

Low melting agaroz (LMA) için PBS hazırlanması;

50 ml distile suda 0,48gr PBS çözülmüştür.

Low Melting Agaroz (LMA) hazırlanması;

0.065 gr LMA tartılıp 10 ml PBS'de çözülmüştür.

Lizis Buffer hazırlanması;

178 ml distile su içerisinde 2,5 M NaCl'den 29,22 gr; 100 mM Na₂EDTA' dan 7,4448 gr; 10 mM Tris'den 0,2422 gr tartılarak çözülmüştür. NaOH veya HCl kullanılarak pH=10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Lizis buffer işleminden önce çözeltiye toplam hacmin % 1' i kadar Triton X 100 ve % 10' u kadar DMSO eklenmiştir.

Running Buffer hazırlanması;

0,56g Na₂EDTA ve 8g NAOH 1,5 lt distile suda (pH 13) çözülerek hazırlanmıştır. +4°C 'de saklanmıştır.

Nötralizasyon Buffer hazırlanması;

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

Etidyum bromür boyasının hazırlanması;

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

3.6.2. Komet test protokolü

1. Hücreler 15 ml'lik falkon tüpünde +4 °C' de, 1000 rpm' de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant kısım atılmış ve kalan kısım tekrar süspansiyon edilmiştir.
3. Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak hücre sayısı belirlenmiştir.
4. Hücrelerin yoğun olduğu türlere PBS eklenerek seyreltilmiştir.
5. Hücreleri agaroz içine gömmek için (LMA) agar hazırlanmıştır.
6. Su banyosunda 37°C'de bulunan ependorfların içine 250'şer µl LMA aktarılmıştır.
7. PBS hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak LMA bulunan ependorflara aktarılmış ve mikropipet yardımıyla süspansiyon edilmiştir.
8. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak önceden agaroz kaplanmış lamaların üzerine yayılmış ve lamelle kapatılarak buz akülerinin üzerinde soğumaya bırakılmıştır.
9. Lamalar +4°C'de 15 dk bekletildikten sonra üzerlerindeki lameller yavaşça alınmıştır.
10. Lamaların üzerine lizis buffer solüsyonu eklenerek +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.
11. Elektroforez tankına dizilen lamaların üzerini kapatacak kadar runnig buffer solüsyon eklenerek 20 dk bekletilmiştir.
12. 20 dk sonra yürütme işlemine geçilmiştir. Güç kaynağı 300 mA ve 25 V 'a ayarlanarak 25 dk yürütme işlemi yapılmış ve +4 °C nötralizasyon tamponunda 5dk bekletilmiştir.
13. İşlem sonunda lamalar distile su ile yıkanarak havada kurumaya bırakılmıştır.
14. Lamalar 5 dk soğuk etanolde fikse edilerek tekrar kurumaya bırakılmıştır.
15. Lamalar 1 dk süreyle Etidyum Bromür ile boyanarak üzeri lamel ile kapatılmış ve floresan mikroskopta 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.
16. Her lamadan 100 hücre sayılarak değerlendirme komet yazılımı yardımıyla yapılmıştır.

3.7. ROS Testi ile Olası Hücre İçi Etki Mekanizmalarının Tespiti

ROS testi

Ag-Sn alaşım nanopartiküllerin hücre içi ROS oluşumuna etkisi 2', 7'- Diklorodihydrofloresein diasetat (DCFH-DA) kullanılarak belirlenmiştir. DCFH-DA hücrelerin içine girerek hücre esterazların etkisiyle 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCFH) oluşturur. Bu iki maddenin floresan özelliği yoktur ancak DCFH reaktif oksijenlerin varlığında yükseltgenerek 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCF) ye dönüşür. DCF yüksek oranda floresan özellikte bir maddedir.

Hücreler 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, konsantrasyonlarda Ag-Sn alaşım nanopartiküllere maruz bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır. Kısa bir süre inkübasyonun ardından, hücreler standart floresan plate okuyucuda okunmuştur.

ROS test protokolü;

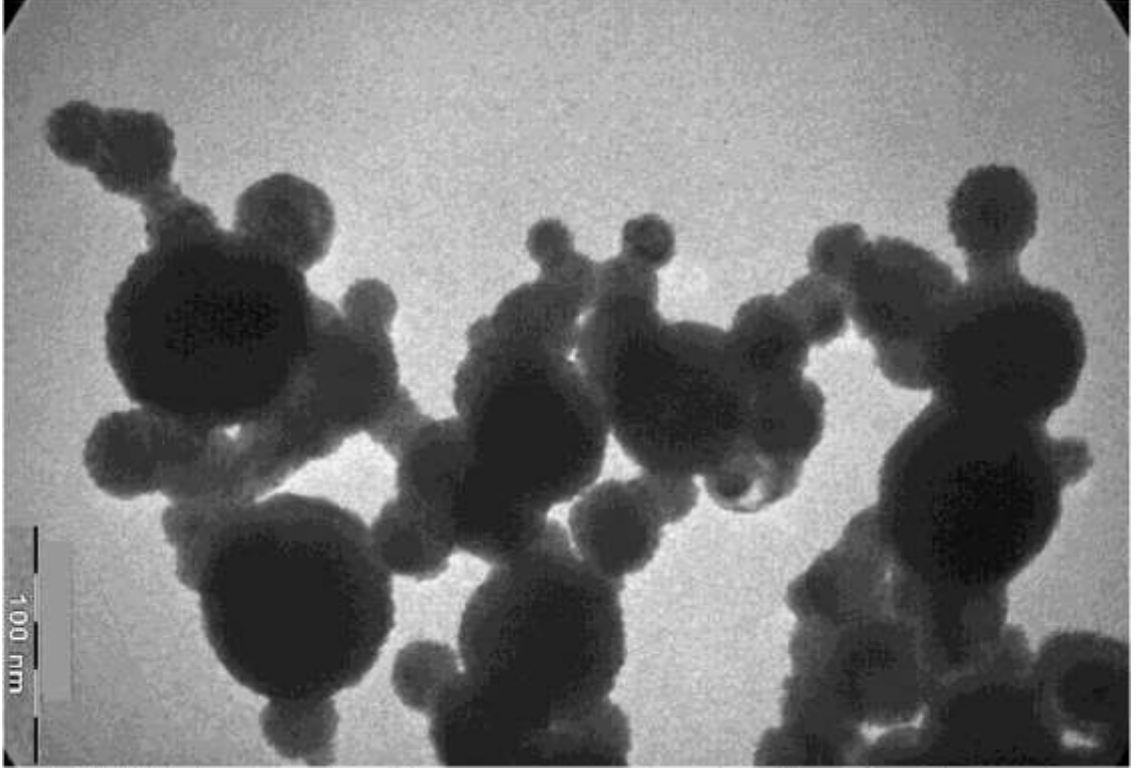
Çalışma için hücreler T75cm² lik flasklara ekilmiştir. Büyümeye bırakılan hücreler 96 kuyucuklu siyah plakalara aktarılmıştır. 24 saat süresince 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Bekleme süresinin sonunda besi yeri değiştirilen hücreler 2 defa PBS ile yıkanmıştır. 1X DCFH-DA/besiyeri çözeltisinden hücre kültürlerine 200' er µl eklenmiş ve 120 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler inkübasyon sonunda PBS ile 2 kez yıkanmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücreler Ag-Sn metal alaşım naopartikülünden 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 400 µg/ml dozları ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol H₂O₂' nin IC50 dozu baz alınarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartikülünün BEAS-2B hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesi için XTT testi; genotoksik etkinin belirlenmesi için Komet yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin besiyeri ortamında hücre içi karakterizasyonu belirlenmiştir.

4.1. Karakterizasyon ile İlgili Bulgular

Ag-Sn metal alaşım nanopartikül çözeltisinin karakterizasyonu zeta potansiyeli, DLS analizleri ve transmisyon elektron mikroskopisi ile belirlenmiştir. Çözeltinin zeta potansiyel değeri -20.5 mV olarak belirlenmiştir. Belirlenen değer çözeltinin stabil olduğunu göstermiştir. DLS ve TEM analizleri ile partikül boyutlarının ortalama 110 nm olduğunu göstermiştir. TEM ile çekilmiş partikül dağılımını gösteren fotoğraf Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Ag-Sn alaşım nanopartiküllerinin TEM gösterimi

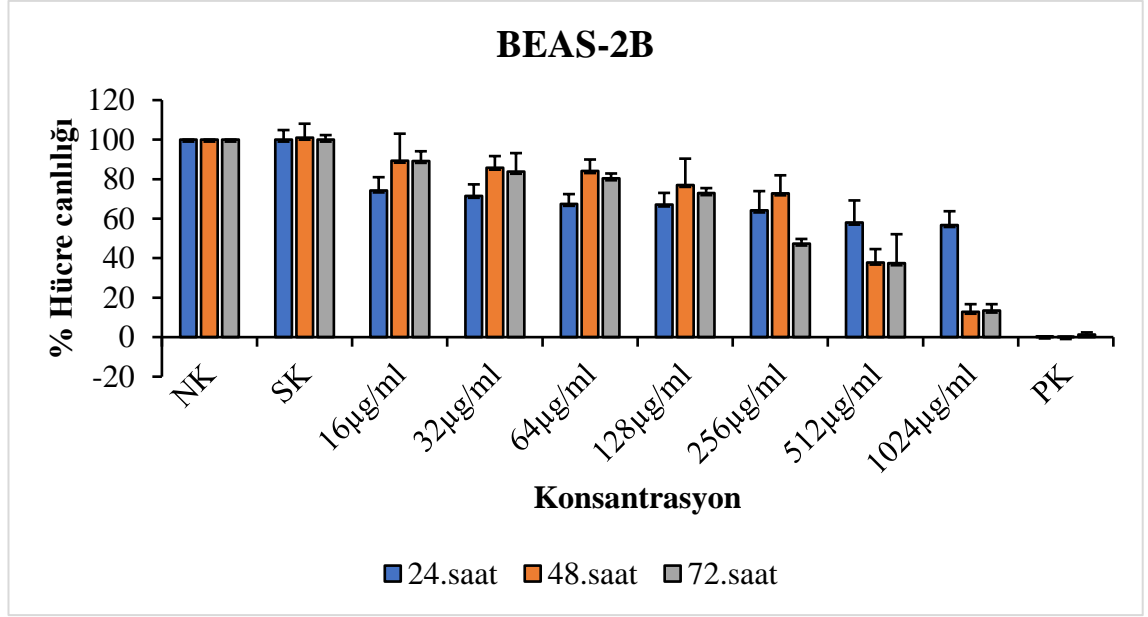
4.2. Gümüş-Kalay Metal Alaşım Nanopartiküllerinin % Canlılık Oranına Etkisi

Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin yapılan çalışmada IC50 konsantrasyonunun belirlenmesi için, BEAS-2B hücre hattı 0 µg/ml, 1µg/ml, 4 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 24 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml, 512 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında Ag-Sn alaşım nanopartikülleri ile 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle muamele edilerek XTT testi uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır.

4.2.1. XTT test bulguları

Bu çalışmada kullanılan Ag-Sn alaşım nanopartiküllerin sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla XTT testi uygulanmıştır. XTT testleri sonucunda % canlılık oranları ve standart sapma miktarları belirlenmiştir. XTT testi için uygulanan Ag-Sn metal alaşım nanopartikül süspansiyon dozları 1µg/ml, 4 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 24 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml, 512 µg/ml, 1024 µg/ml olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır.

Çalışmada uygulanan XTT testleri sonuçlarına göre belirlenen % canlılık ortalamaları ve standart sapma miktarları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. BEAS-2B hücreleri Ag-Sn alaşım nanopartikülü ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen canlılık oranları (NK: Negatif kontrol, SK: Solvent kontrol, PK: Pozitif kontrol)

XTT testlerinde elde edilen sonuçlara göre 24 saat Ag-Sn alaşım nanopartikülü ile muamele edilen hücreler için IC50 değeri hesaplanamamıştır. 48 saat Ag-Sn alaşım nanopartikülüne maruz bırakılan hücreler için IC50 değeri 487,0323; 72 saat için IC50 değeri 345,6547 olarak hesaplanmıştır.

4.3. Gümüş-Kalay Metal Alaşım Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisi

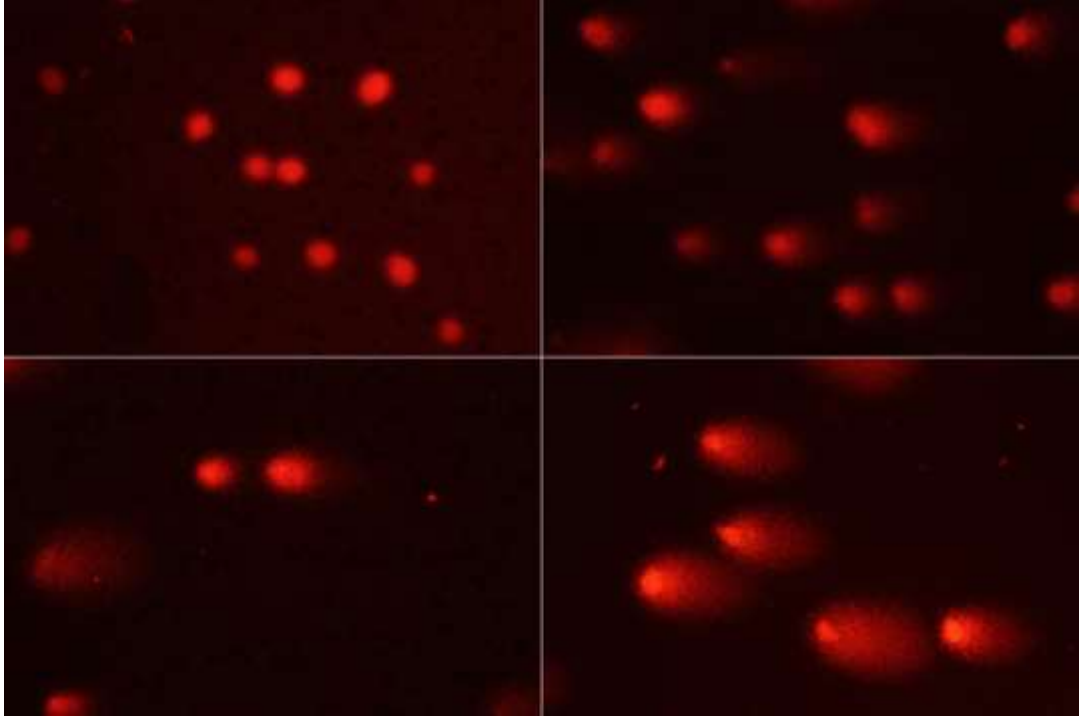
Çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için, BEAS-2B hücreleri 24, 48, 72 saat boyunca 0µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml konsantrasyonlarda Ag-Sn Metal alaşım nanopartikülü ile muamele edilerek Komet yöntemi uygulanmıştır. Doz değerleri belirlenirken XTT testi sonucunda belirlenen IC50 değerlerinden düşük dozlar sitotoksik etki göstermese de genotoksik etki gösterebileceği düşünülerek kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır.

4.3.1. Komet test bulguları

Bu tez çalışmasında yapılan komet testi bulguları içerisinde Kuyruk uzunluğu (K.U.) (μm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. Komet testinde elde edilen mikroskopi örnekleri şekil 4.3'te verilmiştir. Komet testinden elde edilen verilerin ortalama değerleri, negatif kontrol ile Ag-Sn maddesinin çeşitli doz değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması ($*p \leq 0,05$) Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. BEAS-2B hücreleri Ag-Sn alaşım nanopartikülü ile 24, 48 ve 72saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen kuyruk uzunluğu, %DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti komet değerlerinin ortalaması ve standart hataları (S.H),tüm komet parametrelerinin negatif kontrolü ile Ag-Sn alaşım nanopartikülünün çeşitli doz değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması (*p≤0,05)

		BEAS-2B					
		Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml
	Kuyruk Uzunluğu (µm)	4,6±0,15	33,1±2,6*	15,3±0,8*	19,7±1,1*	51,3±1,7*	61,2±1,6*
24.saat	% DNA miktarı	11,1±1,3	41,2±2,4*	31,6±1,6*	36,1±1,9*	72,2±2,3*	82,9±1,7*
	Olive kuyruk momenti	1,1±0,06	12,5±1,2*	5,7±0,44*	7,2±0,6*	25,7±1,1*	31,2±1,04*
	Kuyruk Uzunluğu (µm)	5,7±0,11	41,1±2,4*	13,7±0,8*	66,2±2,4*	79,7±2,7*	87,2±2,7*
48.saat	% DNA miktarı	8,2±0,3	42,7±0,06*	18,1±1,3*	74,9±1,7*	78,8±1,8*	88,7±1,1*
	Olive kuyruk momenti	1,1±0,04	19,04±1,42*	18,1±1,2*	32,9±1,4*	39,4±1,6*	44,3±1,4*
	Kuyruk Uzunluğu (µm)	4,7±0,08	48,5±2,25*	9,4±0,5*	22,9±1,4*	59,8±2,7*	119,1±1,9*
72.saat	% DNA miktarı	7,7±0,3	43,16±0,24*	12,1±0,8*	32,1±1,9*	63,9±2,2*	95,3±0,5*
	Olive kuyruk momenti	0,9±0,03	27,9±2,1*	1,9±0,16*	7,4±0,7*	27,4±1,6*	62,3±1,1*



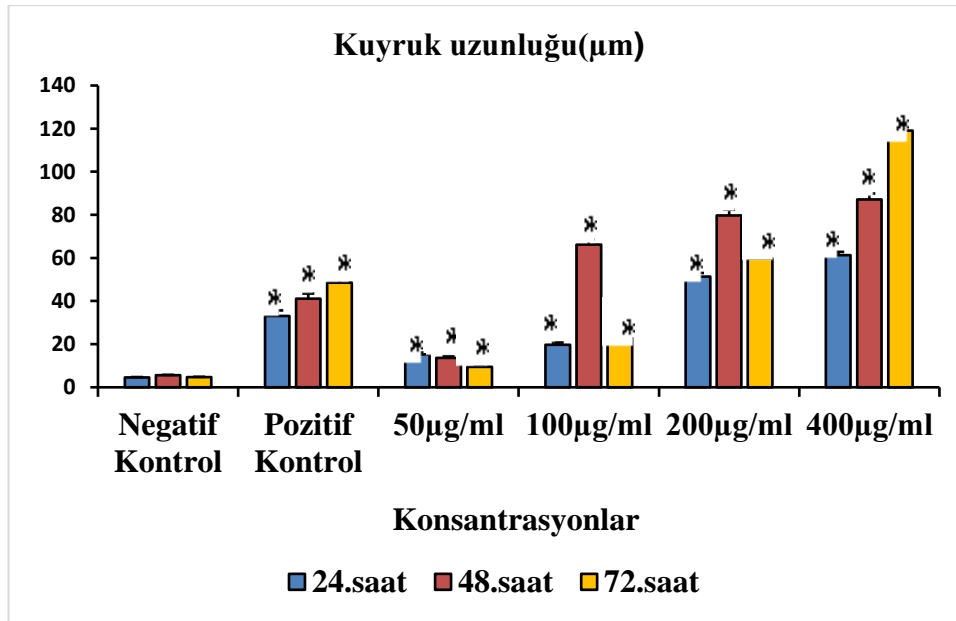
Şekil 4.3. Komet testi ile oluşturulan preparatların mikroskop görüntü örnekleri(X20)

Elde edilen veriler doğrultusunda 24 saat sonunda negatif kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri $4,6\mu\text{m}\pm 0,15\mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $33,1\mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında ise sırasıyla $15,3\mu\text{m} \pm 0,8\mu\text{m}$; $19,7\mu\text{m} \pm 1,1\mu\text{m}$; $51,3\mu\text{m} \pm 1,7\mu\text{m}$; $61,2\mu\text{m} \pm 1,6\mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer konsantrasyonlar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda 48 saat sonunda negatif kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri $5,7 \mu\text{m}\pm 0,11 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $41,1 \mu\text{m} \pm 2,4 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında ise sırasıyla $13,7 \mu\text{m} \pm 0,8\mu\text{m}$; $66,2 \mu\text{m} \pm 2,4\mu\text{m}$; $79,7 \mu\text{m} \pm 2,7\mu\text{m}$; $87,2 \mu\text{m} \pm 2,7\mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer konsantrasyonlar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

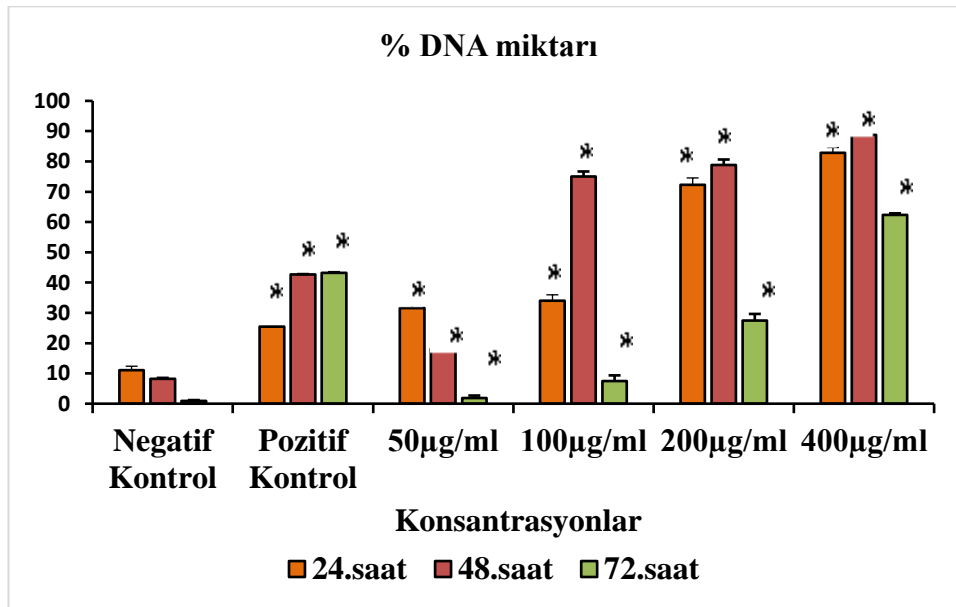
Elde edilen veriler doğrultusunda 72 saat sonunda negatif kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri $4,7 \mu\text{m} \pm 0,08 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $48,5 \mu\text{m} \pm 2,25 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. $50 \mu\text{g/ml}$; $100 \mu\text{g/ml}$; $200 \mu\text{g/ml}$; $400 \mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında ise sırasıyla $9,4 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$; $22,9 \mu\text{m} \pm 1,4 \mu\text{m}$; $59,8 \mu\text{m} \pm 2,7 \mu\text{m}$; $119,1 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.4.'te BEAS-2B hücrelerinin Ag-Sn alaşım nanopartikül ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, 24. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerleri ile 48 ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması ($*p \leq 0,05$) verilmiştir.



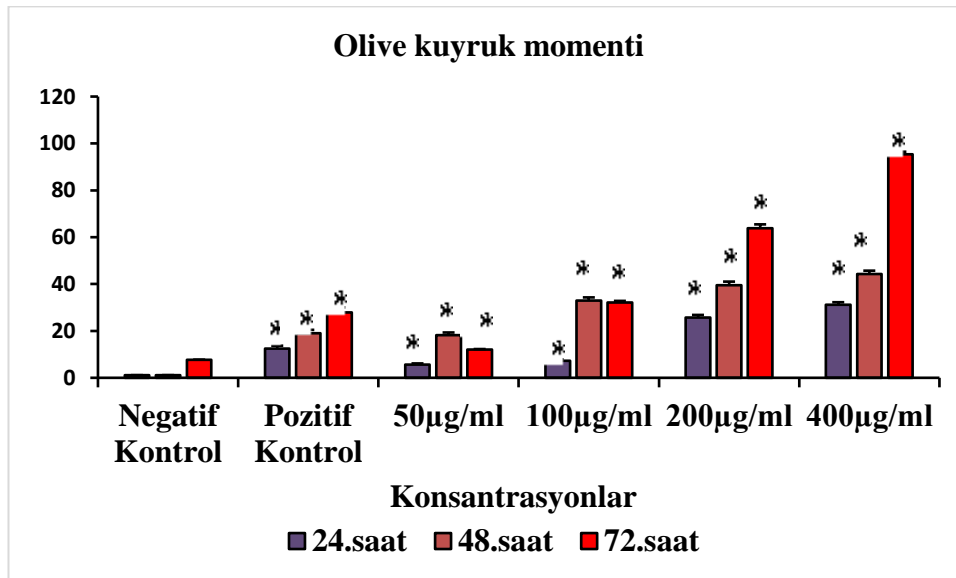
Şekil 4.4. BEAS-2B hücrelerinin Ag-Sn alaşım nanopartikül ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri, 24. saattaki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerleri ile 48 ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması ($*p \leq 0,05$)

Komet test uygulamasında diğer bir değerlendirme parametresi ise % DNA miktarıdır. Komet testinde ölçülen kuyruk % DNA grafiği Şekil 4.5' te gösterilmiştir. 24 saat sonunda negatif kontrol grubu için kuyruk % DNA miktarı $11,1 \pm 1,3$ iken pozitif kontrol grubu için değerler $41,2 \pm 2,4$ olarak bulunmuştur. 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında ise sırasıyla $31,6 \pm 1,6$; $36,1 \pm 1,9$; $72,2 \pm 2,3$; $82,9 \pm 1,7$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. 48 saat ve 72 saat uygulanan Ag-Sn alaşım nanopartikül maruziyetinden sonra kuyruk % DNA miktarları negatif kontrol için sırasıyla $8,2 \pm 0,3$ ve $7,7 \pm 0,3$ olarak, pozitif kontrol için sırasıyla $42,7 \pm 0,06$ ve $43,16 \pm 0,24$ olarak ölçülmüştür. Diğer doz grupları olan 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ için 48 saat sonunda sırasıyla $18,1 \pm 1,3$; $74,9 \pm 1,7$; $78,8 \pm 1,8$; $88,7 \pm 1,1$ olarak; 72 saat sonrasında sırasıyla $12,1 \pm 0,8$; $32,1 \pm 1,9$; $63,9 \pm 2,2$; $95,3 \pm 0,5$ olarak belirlenmiştir. 48 saat ve 72 saat için yapılan uygulamalarda negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. BEAS-2B hücreleri x maddesi ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen % DNA miktarı değerleri, 24. saatteki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerleri ile 48 ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının % DNA miktarı değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması (* $p \leq 0,05$)

Bu çalışmada uygulanan komet yönteminin bir diğer değerlendirme parametresi olive kuyruk momentidir. Elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. 24 saat ile çalışılan test grubunda negatif kontrol değeri $1,1 \pm 0,06$ pozitif kontrol değeri ise $12,5 \pm 1,2$ olarak belirlenmiştir. 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında ise sırasıyla $5,7 \pm 0,44$; $7,2 \pm 0,6$; $25,7 \pm 1,1$; $31,2 \pm 1,04$ olarak ölçülmüştür. 24 saatlik uygulamada negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. 48 saat ve 72 saatlik uygulamalarda negatif kontrol sırasıyla $1,1 \pm 0,04$ ve $0,9 \pm 0,03$ olarak, pozitif kontrol ise sırasıyla $19,04 \pm 1,42$ ve $27,9 \pm 2,1$ olarak belirlenmiştir. 48 saat yapılan testte uygulanan dozlar olan 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ değerleri sırasıyla $18,1 \pm 1,2$; $32,9 \pm 1,4$; $39,4 \pm 1,6$; $44,3 \pm 1,4$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. 72 saatlik uygulama sonunda olan 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 400 $\mu\text{g/ml}$ dozları için elde edilen değerler sırasıyla $1,9 \pm 0,16$; $7,4 \pm 0,7$; $27,4 \pm 1,6$; $62,3 \pm 1,1$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol ile pozitif kontrol ve diğer doz grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. BEAS-2B hücreleri x maddesi ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen Olive kuyruk moment'i değerleri, 24. saattaki konsantrasyon gruplarının kuyruk uzunluğu değerleri ile 48 ve 72. saatteki konsantrasyon gruplarının Olive kuyruk moment'i değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması (* $p \leq 0,05$)

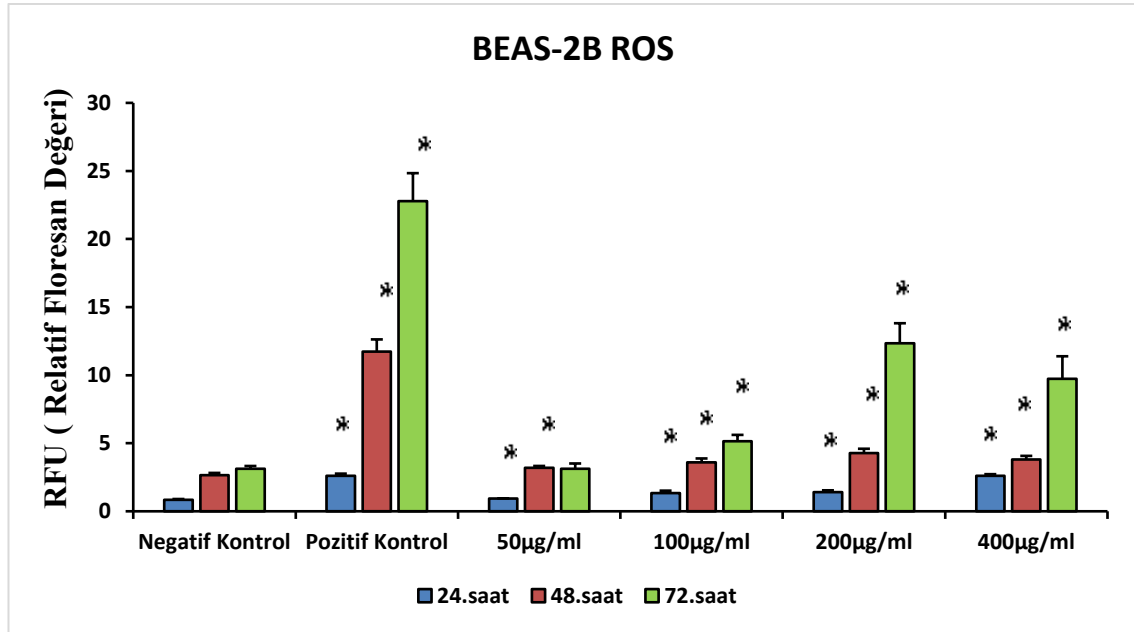
4.3.2. ROS testi bulguları

Bu çalışmada kullanılan Ag-Sn alaşım nanopartikülünün, hücre içi ROS oluşumu üzerine etkilerini araştırmak amacıyla BEAS-2B hücre hattı 24, 48 ve 72 saat sürelerde 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 400 µg/ml konsantrasyonlarda Ag-Sn alaşım nanopartikülüne maruz bırakılmıştır. Elde edilen ortalama değerler ile negatif kontrolün Ag-Sn alaşım nanopartikülünün çeşitli doz değerleri için karşılaştırılması Wilcoxon Testi ile yapılmıştır (* $p \leq 0,05$). Çizelge 4.3'te bu veriler gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. BEAS-2B hücrelerinin bAg-Sn metal alaşım nanopartikülü ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildiğinde elde edilen ROS değerleri, negatif kontrol ile Ag-Sn metal alaşım nanopartikülün çeşitli doz değerlerinin Wilcoxon Testi ile karşılaştırılması (*p≤0,05)

	BEAS-2B					
	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml
24.saat	0,85±0,05	2,61±0,16*	0,93±0,02*	1,33±0,2*	1,41±0,13*	2,6±0,13*
48.saat	2,66±0,16	11,7±0,9*	3,2±0,15*	3,59±0,3*	4,3±0,3*	3,8±0,3*
72.saat	3,1±0,2	22,8±2,05*	3,1±0,4	5,1±0,5*	12,3±1,5*	9,7±1,6*

Uygulanan ROS testinde elde edilen verilere göre negatif kontrol değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla $0,85 \pm 0,05$; $2,66 \pm 0,16$; $3,1 \pm 0,2$ olarak; pozitif kontrol değerleri ise sırasıyla $2,61 \pm 0,16$; $11,7 \pm 0,9$; $22,8 \pm 2,05$ olarak ölçülmüştür. Testte uygulanan dozlar olan $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$, $200 \mu\text{g/ml}$ ve $400 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonların 24 saat için değerleri sırasıyla $0,93 \pm 0,02$; $1,33 \pm 0,2$; $1,41 \pm 0,13$; $2,6 \pm 0,13$ olarak; 48 saat için değerleri sırasıyla $3,2 \pm 0,15$; $3,59 \pm 0,3$; $4,3 \pm 0,3$; $3,8 \pm 0,3$ olarak; 72 saat için değerleri sırasıyla $3,1 \pm 0,4$; $5,1 \pm 0,5$; $12,3 \pm 1,5$; $9,7 \pm 1,6$ olarak belirlenmiştir. 24 saat için kontrol grubu ile pozitif kontrol ve uygulanan diğer dozlar arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. 48 saat için kontrol grubu ile pozitif kontrol ve uygulanan diğer dozlar arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. 72 saat için negatif kontrol ile $50 \mu\text{g/ml}$ doz grubu ile arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$); ancak pozitif kontrol ve diğer dozlar arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen ortalama ROS miktarları Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. ROS testi ortalama değerleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nanoteknoloji, yeni özelliklere sahip malzemelerin oluşturulması için atom ve moleküllerin bir araya getirilmesi ile nanometre ölçeklerde işlevli yapıların oluşturulması şeklinde ifade edilebilir. Nanoteknoloji ile üretilen ürünlerde oldukça fazla kullanılan nanomateryallerin benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklerinin yanında çevre ve canlı üzerine olumlu veya olumsuz etkileri tam anlamıyla bilinmemektedir. Son dönemlerde yapılan araştırmalar nanomateryallerin sahip olduğu boyut, şekil, yüzey alanı, çözünbilme kapasiteleri gibi fizikokimyasal özelliklerinin biyolojik çevre üzerinde etkili olabileceklerini göstermektedir. Kullanım alanı gittikçe yaygınlaşan nanomateryal bazlı ürünlerin oluşturabileceği zararlar ve riskler bilim dünyasında zamanla endişe yaratmaya başlamıştır. Nanoteknolojik ürünler hayatımıza bu kadar yaygın şekilde girmeye başladığı için ortaya çıkabilecek risklerin belirlenmesi açısından gerekli çalışmaların yapılması önem kazanmıştır.

Gün geçtikçe yaşamın her alanına giren nanoteknolojik ürünler ile ilgili yatırımlar artmaktadır. Ancak üretimi yapılan ürünlerin toksisitesi ile ilgili çalışmalar halen yetersizdir (Atlı-Şekeroğlu 2013). Nanopartiküllerin neden olabileceği etkilerin belirlenmesinde in vivo ve in vitro yöntemler kullanılmaktadır. Toksisitenin in vivo belirleme yöntemleri arasında hücre kültürü uygulamaları ön plandadır.

Nanopartiküller sahip oldukları farklı özellikler nedeniyle hücre içine girebilmekte ve hücrelere farklı yollarla etki edebilmektedir. Bunu sağlayan özellikler nanopartikülün şekli, boyutu, farklı fizikokimyasal özellikleri ve yüzey yükü şeklinde ifade edilebilir (Kumbıçak 2013).

Hücreye giren nanopartiküller, hücre içinde serbest hareket edebilmekte, organel ya da DNA'ya hasar vererek hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Buzea 2007).

Bu çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B akciğer epitel hücreleri üzerinde neden olabileceği sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkinin tespiti için XTT test yöntemi, genotoksik etkinin tespiti için Komet yöntemi

kullanılmıştır. Olabilecek hücre içi etki mekanizmalarının tespiti için ise ROS testi uygulanmıştır.

XTT test yönteminde, solüsyonda bulunan tetrazolium halkası, dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşumuna neden olur. Böylelikle renk yoğunluğunun oranına bağlı olarak hücre canlılığı tespit edilir.

Komet yönteminde, alkali çözelti içerisinde oluşan tek ve çift halka DNA kırıkları tespiti hızlı bir şekilde yapılır. Böylece maruz kalınan nanopartiküllerin genetik yapıda neden olabileceği olumsuz etkileri görülebilmektedir. Yöntem oksidatif stres, toksik ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını doğru, hassas, hızlı, ucuz ve az bir örnek hacmi kullanarak ölçen bir uygulama olup, tüm canlı hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajları dikkate alınarak, son yıllarda komet yöntemi farklı insan hücre hatları üzerine uygulanan nanopartiküllerin etki seviyelerini belirlemek amacıyla da sıkça kullanılmaktadır. Toksik olduğu düşünülen ajanlar hücrelerde DNA parçalarının oluşumuna neden olabilmektedir. DNA parçaları Baş ve kuyruk kısmı olarak iki ana bölümde incelenir. Kuyruk kısmındaki DNA miktarı %DNA olarak ifade edilir. Bunların yanında kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti kullanılan parametrelerdir (Collins ve ark. 2008).

Ag-Sn alaşım nanopartikülleri ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında Ag ve Sn metal nanopartikülleri ile yapılan çalışmalar mevcut iken, Ag-Sn alaşım nanopartikülünü konu alan çok az çalışmaya rastlanmıştır.

Arora ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada HT-1080 (insan bağ doku kanser hücresi) ve A431 (insan deri kanser hücresi) hücreleri ile 7-20 nm boyutlu AgNP'lerinin etkileşimi sağlanmıştır. Sitotoksisite belirlemek için 24 saat AgNP maruziyetinden sonra XTT test yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda HT-1080 hücreleri için IC50 değeri 10,6 µg/ml, A431 hücreleri için IC50 değeri 11,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun incelenmesi amacıyla AgNP'lerine maruz bırakılan hücrelerde katalaz seviyesi, lipid peroksidasyonu, süperoksit

dismutaz seviyesi, glutasyon içeriği ve glutasyon peroksidaz seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda her iki hücre hattında nanopartikül içermeyen hücreler ile içeren hücreler karşılaştırıldığında lipid peroksidasyonunda artış gözlemlenmiştir. Aynı şekilde hücre hatları kıyaslandığında glutasyon seviyesinde ve süperoksit dismutaz seviyesinde azalma gözlenmiştir. Katalaz ve glutasyon peroksidaz seviyelerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu verilere göre AgNP'leri lipid yapısında bozulmalara sebep olabileceği gibi bazı antioksidan seviyelerinin düşmesine neden olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunun artmasına yol açabileceği düşünülmüştür.

Sukirtha ve arkadaşları(2012), AgNP'lerin HeLa hücrelerinin poliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için MTT analizi yapmışlardır. AgNP'lerin doz konsantrasyonundaki artışı HeLa hücrelerinde sitotoksik etkinin artmasına neden olmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda IC50 değeri HeLa hücreleri için 300 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bir diğer araştırmada, A549 ve normal periferik lenfositler (PL'ler) üzerinde MTT, ATP ve laktat dehidrojenaz analizleri ile AgNP'lerin 10 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının toksik etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, AgNPs A549 hücreleri üzerinde önemli seviyede sitotoksikite oluştururken normal sağlıklı periferik lenfositlerde sitotoksikite oluşturmadığı bildirilmiştir (Gengan ve ark. 2013).

Foldbjerg ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada A549 hücre hattı üzerinde AgNP ve AgNO₃ bileşiğinden elde edilen Ag⁺ iyonlarının sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Toksik etkilerin incelenmesinden önce AgNP'lerinin hücre içine ne kadar süre sonunda girebildiği ve konsantrasyon artışının hücre içine nanopartikül girişinde etkili olup olmadığı tespit edilmiştir. Buna göre 0 dak, 1dak, 4 saat ve 24 saat maruziyet sonunda 0 dak ve 1 dak sonunda hücre içinde AgNP görülmezken 4. saatten itibaren hücre içinde AgNP'lere rastlanmıştır. Aynı sürelerde 4. saatten itibaren doz artışına bağlı olarak hücre içinde partikül miktarı da artmıştır. Bu da maruziyet süresi ve doz miktarı arttıkça parçacıkların hücre içine daha fazla geçebildiğini göstermiştir. Yapılan çalışmada sitotoksik etki MTT test yöntemi ile mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi şeklinde araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre AgNP ve Ag⁺ iyonları

mitokondriyal aktivite üzerine benzer toksik etkileri göstermiştir. Hatta Ag^+ iyonları daha düşük dozlarda kullanılmış olmasına rağmen AgNP ile benzer toksik etki göstermiştir. Aynı çalışmada AgNP'lerinin ROS oluşumuna etkisi de araştırılmıştır. Elde edilen bulgularda AgNP'ne maruziyetin ROS oluşumuna neden olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışma sırasında antioksidan tedavisinin ise ROS oluşumunu azalttığı ve hücre canlılığını büyük ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Yapılan çalışmalar AgNP ile ilgili olarak toksik etkinin farklı hücre gruplarında hücre canlılığını farklı boyutlarda etkilediğini göstermiştir. AgNP'nün toksisitesinin gümüş iyonlarından kaynaklanmadığı, AgNP'nün kendisinden oluştuğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Nanogümüş toksisitesinin HepG₂ (karaciğer kanser hücreleri) hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2009).

Benzersiz optik ve elektronik özellikleri nedeniyle kalay oksit nanopartikülleri (SnO₂ NP'ler) güneş pili, katalizör ve biyotıp dahil çeşitli uygulamalar için önemli potansiyellere sahiptir. Bunun yanında SnO₂ nanopartiküllerinin biyolojik etkileri hakkında yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

SnO₂ nanopartiküllerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada SnO₂ nanopartikülleri ile dökme kalay formunun farklı dozlarının fare deri fibroblast hücreleri ile etkileşimi sağlanmıştır. Yapılan çalışmada hücreler 0,1 µg/ml ile 100 µg/ml arasında farklı dozlara 6, 24 ve 48 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Sitotoksitenin tespiti için MTT test yöntemi ile mitokondriyal aktivite ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre 50 µg/ml altındaki dozlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitotoksik etki gözlenmemiştir. 50 µg/ml üzerindeki dozlar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise düşük seviyede sitotoksik etki belirlenmiştir (Şeker 2018).

SnO₂ nanopartikülleri ile insan meme kanseri (MCF-7) hücreleri üzerinde sitotoksik etki mekanizmaları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SnO₂ NP'lerin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya, hücrede ROS oluşumuna bağlı olarak oksidatif stres meydana gelmesine neden olduğu bildirilmiştir (Ahamed ve ark. 2018).

Allium cepa bitkisi kökü meristematik hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada indiyum kalay oksidin genotoksik etkisi komet test yöntemi ile araştırılmıştır. Hücreler 4 saat süreyle 12,5 ve 100 ppm arasında değişiklik gösteren dozlarda indiyum kalay oksite maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında doz artışına bağlı olarak DNA hasarının arttığı belirtilmiştir (Ciğerci ve ark. 2013).

Diğer bir çalışmada ise insan THP-1 makrofaj hücre hattı üzerinde AgNP, AgCuNP ve AgSnNP'lerinin toksik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada her bir nanopartikül için 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlar kullanılmış ve 3 saat maruziyet sağlanmıştır. Sitotoksik etki belirlenmesi için MTS test yöntemi, genotoksik etki belirlenmesi için ROS test yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen bulgularda her bir nanopartikül için kullanılan konsantrasyonlar sitotoksik etki göstermemiştir. ROS testi bulgularına göre ise AgCuNP'ü önemli miktarda ROS oluşumuna neden olurken AgNP ve AgSnNP'ü için aynı etki söz konusu olmamıştır (Maniratanachote ve ark. 2018).

Bu çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartiküllerinin BEAS-2B insan akciğer epitel hücreleri üzerine sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesi için XTT testi, genotoksik etkilerin belirlenmesi için ise Komet yöntemi ve ROS testi uygulanmıştır.

Elde edilen bulgularda XTT testi için 24 saat süre ile uygulanan dozlarda hücre canlılığı için IC50 değeri hesaplanamamıştır. 48 saat için IC50 487,0323 µg/ml, 72 saat için IC50 345,6547 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre uygulanan konsantrasyonlarda 24 saat süre ile Ag-Sn alaşım nanopartiküllerine maruziyette sitotoksik etki görülmediği, AgNP ve SnO₂ ile yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Ancak maruziyet süresinin artışına bağlı olarak konsantrasyonların artışı sitotoksik etkiyi arttırabilmektedir.

Komet verilerinde 24, 48 ve 72 saatlik süreler için DNA kuyruk uzunluğu, %DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir. Kuyruk uzunluğu için 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda elde edilen veriler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında DNA'da meydana gelen hasar miktarında artış gözlenmiştir. Komet

yönteminde değerlendirme kriterlerinden biri olarak kullanılan % DNA miktarı, komet hücrelerinde oluşan kuyruktaki DNA miktarını gösterir. Çalışmada elde edilen verilere göre %DNA miktarı için 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonundaki sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında maruziyet süreleri sonunda doz artışına bağlı olarak DNA kırıklarının arttığı düşünülmüştür. Komet yönteminin bir diğer değerlendirme parametresi olan olive kuyruk momenti verileri 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında DNA hasarının maruziyet süresi ve doz artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Ag-Sn alaşım nanopartikülü hücrelerde DNA hasarlarının oluşmasına neden olabilmektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda Ag-Sn alaşım nanopartikülüne maruziyet süresi ve konsantrasyon miktarları arttıkça DNA'da meydana gelen hasarın arttığı görülmüştür. AgNP ve SnO₂ ile yapılan diğer çalışmalarda DNA hasarını destekler niteliktedir.

Hücreler içinde reaktif oksijen türleri miktarının artışı hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. Bu da kimi zaman hücre ölümleriyle sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmada Ag-Sn metal alaşım nanopartikülüne 24,48 ve 72 saat süreyle 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 400 µg/ml olarak belirlenen dozlarda BEAS-2B hücreleri muamele edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda nanopartikül maruziyet süresi ve doz konsantrasyonu arttıkça hücre içi ROS oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada 3 saatlik süre sonunda AgSn alaşım nanopartikülüne maruziyette ROS oluşumu görülmemesine karşın bizim çalışmamızda süre artışına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin artabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Ag-Sn alaşım nanopartikülünün BEAS-2B hücre hattı üzerinde oluşturabileceği genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda alaşım nanopartiküllerin hücre içine girebileceği, sitoplazmada etki edebileceği ve muamele süresi ve doz artışına bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik etkilerinin artabileceği saptanmıştır. Gelecek dönemde Ag-Sn nanopartikül kullanımında meydana gelecek olan artışa bağlı olarak ortaya çıkabilecek toksik etkilerinin de araştırılması biyolojik sistemler açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adriana, C.C., Francisco, P.D., Erasmo, O.B., Antonia, L.V. 2016.**Size effect of SnO₂ nanoparticles on bacteria toxicity and their membrane damage, *Chesosphere*; 165: 33-40.
- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Majeed, Khan M.A., Alhadlaq, H.A. 2018.** Oxidative stress mediated cytotoxicity of tin (IV) oxide (SnO₂) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.040>
- Akça, Ç. 2015.** Eşek sütünün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin kanserli ve sağlıklı insan akciğer hücre hatları üzerine karşılaştırmalı olarak araştırılması.*Yüksek lisans tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.
- Anonim, 2007.** U. S. Environmental Protection Agency Nanotechnology White Paper.U.S. EPA., yayın no: 100/B-07/001, Washington DC.
- Arora, S.,Jain, J.,Rajwade, J.M.,Paknikar, K.M., 2008.** Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179: 93-100.
- Asharani, P.V., Mun, G.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.*, 3:279–290.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B.2019.** The Role Of Antioxidant Enzymes İn Oxidative Stress - Superoxide Dismutase (Sod), Catalase (Cat) And Glutathione Peroxidase (Gpx). *Med J SDU*; 26(3): 362-369.
- Ateş, M., Çakıroğulları, G.Ç. 2017.** Akuatik nanotoksikoloji. *Ziraat Mühendisliği*, s:364 (47-53).
- Atlı-Şekeroğlu, Z. 2013.** Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Türkiye Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 70(1): 33-42.
- Bacanlı, M., Başaran, N. 2014.** Nanotoxicology New Research Area in Toxicology. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (2): 231-240.
- Beykaya, M., Çağlar, A. 2016.** Bitkisel özütler kullanılarak gümüş nanopartikül (AgNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*16:035403 (631-641).
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hoffman, M-C. 2005.** İn vitro citotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. *Toxilological Science*, 88:412-419.

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

Ciğerci, İ.H., Liman, R., Özgül, E., Konuk, M. 2013. Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests. *Cytotechnology*, 67;157–163.

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

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

Coşkun, M. 2013. Fulleren nanopartiküllerinin radyasyona maruz bırakılan A549 insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerinin mikronükleus ve gH2AX test yöntemleri kullanılarak araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.

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

Diñçer, Y., Kankaya, S. 2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*.30(4):1365-73.

Foldbjerg, R., Dang, D.A., Autrup, H. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*. 85:743-750.

Franken, N.A.P, Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.*, 1(5):2315-2319.

Gengan, R.M., An K., Phulukdaree A., Chuturgoon A. 2013. A549 lung cell line activity of biosynthesized silver nanoparticles using Albizia adianthifolia leaf. *Colloids Surf B Biointerfaces*.105:87-91.

Goodman, R.P. 2005. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science*. 310 (5754). s:1661-1665.

Goodsell, D.S. 2000. Biomolecules and Nanotechnology. *American Scientist*, 88(3):230.

Hunter, R.J. 1981. Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications, Editors: Ottewill, R.H., Rowel R.L., Academic Press, London, pp: 17-21.

Huriyet, H. 2017. Montivipera Xanthina (Gray, 1840) ve Vipera Ammodytes (Linnaeus, 1758) zehirlerinin sağlıklı ve kanser akciğer epitel hücre hatları üzerindeki in

vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.

Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*; 23(6): 1076-84.

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

Kocaoğlu, E. 2014. Kinik asidin sitotoksik / genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer epitel hücre hatlarında belirlenmesi. *Yüksek lisans tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.

Kumbıçak, Ü. 2013. Bakır çinko alaşım nanopartiküllerinin in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. *Doktora Tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.

Monprasit, P., Lawanprasert, S., Maniratanachote, R. 2018. Effects of silver, silver-copper and silver-tin nanoparticles in THP-1 cells. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, Vol. 42.

Myllynen, P.K., Loughran, M.J., Hovard, C.V., Sormunen, R., Walsh, A.A., Vähäkangas, K.H. 2008. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol*, 26 (2): 130-137.

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

Özcan, M. A. 2014. Gümüş nanopartiküller ve kanatlı hayvan beslemede kullanımına yönelik çalışmalar. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 11 (2): 16-20.

Rawson, P.S. 1984. Ceramics. University of Pennsylvania Press. ISBN 0-8122-1156-1.

Schrand, A. M., Rahman M. F., Hussain, S. M., Schlager, J., Smith, D. A., Syed, A. F. 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (5): 544–568.

Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A. 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, 185: 211–218.

Sözen, M.E. 2017. Gümüş nanopartikülünün boyut ve doz bağımlı olarak karaciğere etkisinin araştırılması. *Doktora tezi*, NEÜ, Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı.

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

Sukirtha, R., Priyanka, M.K., Antony, J.J., Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P. 2012. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochem*;47:273-9.

Şeker, Ş. 2018. Comparative evaluation of nano and bulk tin dioxide cytotoxicity on dermal fibroblasts by real-time impedance-based and conventional methods. *Turkish Journal of Biology*, 42: 435-446.

Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y.N., Miyata, N. 1996. Novel harmful effects of (60) fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. *FEBS Lett*, 393 (1): 139-145.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal SEÇKİN
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / 24.01.1985
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : Bursa Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi/ 1996-2003
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü
2004-2008

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Bursa Ahmet Yesevi Anadolu Lisesi
İletişim (e-posta) : crescent.e@hotmail.com