

**İNDİUM TİN OKSİT VE BİZMUT (III) OKSİT
NANOMATERYALLERİNİN MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN
AMES TEST İLE ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Aykut TEPEKOZCAN**

Danışman

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Nisan, 2013

“Bu tez çalışması 051.FENED.01 numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDİUM TİN OKSİT VE BİZMUT (III) OKSİT
NANOMATERYALLERİNİN MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN
AMES TEST İLE ARAŞTIRILMASI

Aykut TEPEKOZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Muhsin KONUK

Nisan, 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Aykut TEPEKOZCAN tarafından hazırlanan “İNDİUM TİN OKSİT VE BİZMUT (III) OKSİT NANOMATERYALLERİNİN MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN AMES TEST İLE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca 25/ 04/ 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr.Muhsin KONUK

İmza

Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Biyoloji Bölümü

Üye : Doç.Dr. Süleyman CENKÇİ

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Doç.Dr. İbrahim H. CİĞERCİ

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Yrd.Doç.Dr. Levent ÖZCAN

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Üye : Yrd.Doç.Dr. Recep LİMAN

İmza

Uşak Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Biyoloji Bölümü

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun

...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Mevlüt DOĞAN

BEYANNAME

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi 100709007 nolu Aykut TEPEKOZCAN'ın danışmanlığını yapan, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Muhsin Konuk 15.10.2012 tarihinde emekli olmuştur.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 16.10.2012 tarihinde yapılan Enstitü Kurulu toplantısında alınan karar gereği Üniversitemizde görevli iken başka bir Üniversiteye atanan yada emekli olan Öğretim Üyelerinin ilgili danışmanlıklarının yeniden görevlendirilmesi veya öğrencilere yeni danışman atamalarının yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Yukarıdaki karar çerçevesinde, Aykut TEPEKOZCAN'ın tez danışmanlığı, tarafım I. danışman önceki danışman da II. danışman olacak şekilde, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 05.12.2012 tarih ve 721 sayılı kurul kararı ile yeniden yapılandırılmıştır.

Bu süreçte söz konusu yüksek lisans öğrencisi tarafıma, tezin sonuç raporunu yazdığını ve savunma aşamasına geldiğini beyan etmiştir. Bu kapsamda eş danışman olarak tarafımda tezin sadece şeklen sonuç raporunun hazırlanmasına katkı yapılmıştır.

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, adı geçen yüksek lisans öğrencisine ait tezin teorik ve deney aşamasına katkımın olmaması nedeniyle, söz konusu tez ve bu tezden üretilcek her türlü eser üzerinde herhangi bir hak iddia etmeyeceğimi beyan ederim.

25 Nisan 2013

Prof.Dr. M.Oğuz ÖZTÜRK

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi 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,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/ 04/ 2013

Aykut TEPEKOZCAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNDİUM TİN OKSİT VE BİZMUT (III) OKSİT NANOMATERYALLERİNİN MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN AMES TEST İLE ARAŞTIRILMASI

AYKUT TEPEKOZCAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin Konuk

Bu çalışmada, sanayinin birçok alanında sıkça kullanılan 2 farklı (İndium tin oksit ve Bizmut (III) oksit) nanomateryalin mutajenik etkileri, kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden olan *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Çalışmada *Salmonella typhimurium*'un iki suşu olan TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bunun için her iki suş mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, Bizmut (III) oksit nanomateryalinin 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak, 5000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları, İndium tin oksit nanomateryali için ise 12.5 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak, 75 µg/plak, 100 µg/plak, 125 µg/plak ve 150 µg/plak konsantrasyonlarında iki bağımsız paralel deneyde test edilmiştir. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA98 için 4-nitro-o-fenilendiamin, S9 varlığında ise 2-aminofluoren, TA100 için ise S9 yokluğunda sodyum azid ve varlığında ise 2-aminoantrasen kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise distile su kullanılmıştır. Test sonuçları iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilmiş, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; İndium tin oksit ve bizmut (III) oksit nanomateryallerinin kullanılan iki suşta da mutajenik etkisine rastlanmamıştır.

2013, x + 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ames test, mutajenite, Bizmut (III) oksit, İndium tin oksit, nanomateryal

ABSTRACT

M.Sc Thesis

THE INVESTIGATION OF MUTAGENIC PROPERTIES OF INDIUM TIN OXIDE AND BISMUTH (III) OXIDE NANOMATERIALS WITH AMES TEST

AYKUT TEPEKOZCAN

Afyon Kocatepe University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin Konuk

In this study, the mutagenic effects of Indium tin oxide and Bismuth oxide nanomaterials, commonly used in many fields of industry, have been investigated by using short-term bacterial mutagenicity test system namely *Salmonella*/microsome. In the *Salmonella*/microsome test system the mutant strains were used *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. These strains were tested both in the presence and absence of metabolic activation that contain microsomal enzymes. While 625 µg/plate, 1250 µg/ plate, 2500 µg/ plate, 5000 µg/ plate and 10000 µg/ plate label concentrations were tested for Bismuth oxide nanomaterials, 12.5 µg/ plate, 25 µg/ plate, 50 µg/ plate, 75 µg/ plate, 100 µg/ plate, 125 µg/ plate and 150 µg/ plate concentrations were tested independently in parallel experiment for Indium tin oxide nanomaterials. At the absence of S9, 4-nitro-o-fenilendiamine, at the presence of S9, 2-aminofluorene was used as a positive control for TA 98. At the absence of S9, Sodium azid, and the presence of S9, 2-aminoanthracene was used as a positive control for TA 100. Water solution were used as a negative control. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. Consequently; mutagenic effects were not observed both Indium tin oxide and Bismuth (III) oxide in two strains.

2013, x + 62 pages

Key Words: Ames test, mutagenicity, Bismuth oxide, Indium tin oxide, nanomaterial

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde ve tezimin hazırlanmasında bilgilerine başvurduğum tez danışmanım Prof. Dr. Muhsin Konuk Hocam'a katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tezin hazırlanması ve tezin yazımı süresinde beni yönlendiren, deneyimlerini benimle paylaşan Öğr. Gör. Dr. Recep Liman ve Arş. Grv. Dr. Dilek Akyl'a bana verdiği destekten dolayı çok teşekkür ederim. Bununla birlikte üzerimde bu güne kadar emeği olan Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında İngilizce çevirilerinde yardım eden ve manevi destek veren İngilizce öğretmeni Neriman Eryılmaz'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Uğur Gökçe arkadaşşıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve sürekli beni motive eden annem Nazan Tepekozcan ve babam Celal Tepekozcan'a teşekkürü bir borç bilirim.

AYKUT TEPEKOZCAN

AFYONKARAHİSAR, 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2 LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	5
2.1 Nanoteknoloji Nedir?.....	5
2.1.1 Nanopartiküller.....	6
2.1.2 Nanomateriyallerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.3 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	10
2.1.4 Nanopartiküllerin Avantaj ve Dezavantajları.....	12
2.1.5 Nanoteknolojinin Çevre ve İnsan Sağlığına etkileri.....	13
2.2 Nanobiyoteknoloji.....	14
2.3 Genotoksosite.....	15
2.4 Mutajenler.....	15
2.5 Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu.....	16
2.6 Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi.....	18
2.7 <i>Salmonella</i> / mikrozom Test sistemi.....	22
3. MATERYAL ve METOT.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.1.1 Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	27

3.1.3 <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları.....	27
3.1.4 Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları.....	28
3.1.5 Test Maddeleri Dozları ve Hazırlanışı.....	39
3.2 Metod.....	41
3.2.1 <i>Salmonella</i> Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması.....	41
3.2.2 <i>Salmonella</i> Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması.....	41
3.2.3 <i>Salmonella</i> Suşlarının Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması.....	42
3.2.4 <i>Salmonella</i> Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması.....	42
3.2.5 Sıvı Kültürün mL’indeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi.....	44
3.2.6 Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	44
3.2.7 Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonun Hazırlanması.....	45
3.2.8 Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	45
4 BULGULAR	47
4.1 Genetik İşaretlerin Kontrolü.....	47
4.2 Çalışmada Kullanılan Nanomateryallere Ait Bulgular.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR.....	55
7.ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Dk	Dakika
G	Gram
L	Litre
M	Molar
Mg	Miligram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
Rpm	Dakikadaki dönüş hızı
Sn	Saniye
°C	Santigrad derece
%	Yüzde
Nm	Nanometre

Kısaltmalar

pH	Hidrojen potansiyeli
DNA	Deoksiribonükleik asit
APS	American Physical Society
MEM	Mikroelektromekanik
SSB	Tek zincir kırıkları
DSB	Çift zincir kırıkları
2-AF	2-Aminofloren
NPD	4- Nitro-o-fenilendiamin
SA	Sodium Azid
2-AA	2-Aminoantrasen
NA	Nutrient Agar

NB	Nutrient Broth
ALS	Alkali labil bölgeler
LPS	Lipopolisakkarit
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
IPCS	International Programme on Chemical Safety
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin agar
STM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu
MGA	Minimal Glukoz Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Nanokristallerin bakteri, virüs ve moleküllerle boyut karşılaştırması	9
Şekil 2.2 Metal nanodemetler ve süper demetlerin oluşumunun şematik gösterimi.....	11

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun histidin gereksinimi kontrolü	48
Resim 4.2 <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü	49
Resim 4.3 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü sonuçları	49
Resim 4.4 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının <i>rfa</i> mutasyonu kontrolü sonuçları	49
Resim 4.5 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları	50
Resim 4.6 <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Nano yapıları içeren bazı materyaller	10
Çizelge 2.2 Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar	21
Çizelge 2.3 <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri.....	24
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan nanomateryallerin genel özellikleri	41
Çizelge 4.1 Bizmut (III) oksit nanomateryalinin metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarına göre mutajenitesi.....	52
Çizelge 4.2 İndium tin oksit nanomateryalinin metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarına göre mutajenitesi	52

1 GİRİŞ

Günümüzde nanoteknoloji gıda, tekstil, ilaç-kozmetik, kimya, malzeme, bilişim, otomobil ve metal endüstrileri gibi birçok sektörde her geçen yıl daha fazla uygulama sahası bulmakta ve artık insan hayatının vazgeçilmezi olmaktadır (Kaplan 2007). Son yıllarda piyasada nanomateryallerle ilgili ticari, kişisel, medikal ve askeri alanlarda ayrı ayrı kullanılan 200 den fazla tüketici ürün yer almaktadır (Brumfiel 2006; Griffith *et al* 2007). Boyutları 100 nm ya da bundan daha az olan nanomateryaller, bizlere bir çok alanda geniş bir kullanım imkanı sunmaktadır (Hu *et al* 2009).

Nano, yunanca cüce anlamına gelmektedir. Kelime anlamı olarak ise; herhangi bir birimin milyarda birini ifade eder. Bir nanometre (nm) bir milimetrenin milyonda birine eşit bir uzunluk birimidir ve 10^{-9} m ye karşılık gelir (Çıracı 2005; Hurt *et al* 2006; Mark *et al* 2007; Crane *et al* 2008; Bystrzejewsk *et al* 2009; Singh 2009; Savolainen *et al* 2010). Karşılaştırma yapılacak olursa bir saç telinin 80000 nm, bir kırmızı kan hücresinin yaklaşık 7000 nm olduğu söylenebilir (Royal Society 2004).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber, çeşitli alanlarda yararlanmak üzere sentetik olarak yeni yapı ve işlevler kazandırılan nanomalzemeler üretilmektedir. Bunun yanı sıra nanoboyutta parçacıklar, orman yangınları ve volkanik faaliyetler neticesinde oluşabileceği gibi viral parçacıklar ve ferritin gibi protein molekülleri şeklinde de doğada bulunmaktadır (Goldman and Coussens 2005).

Malzemenin boyutu nanoölçek düzeyine yaklaştıkça (malzemeyi oluşturan atom sayısı 100 ler düzeyine indikçe), atom yapının geometrisi ve hatta atom sayısı fiziksel özelliklerin (iletkenlik, elektronik, optik, manyetik özellikler gibi) belirlenmesinde etken olmaktadır. Nano ölçeklerdeki bir yapıya yeni eklenen her atomun, nano ölçekteki yapının fiziksel özelliklerinde neden olduğu değişiklikler, bu atomun cinsine, nanoyapının türüne ve geometrisine bağlı olarak belirginleşmektedir. Örneğin, nanoyapının iletkenliği, o yapıya tek bir atom eklense bile değişebilmektedir. Benzer şekilde, nanoölçeklerde atomlar arası bağ yapısı da değişikliklere uğrayabilmekte; mekanik olarak malzeme güçlenirken ya da zayıflarken, elektronik olarak iletkenlik

özelliği tümüyle değişebilmektedir. Örneğin, yarı iletken olarak bilinen ve çağımızın en önemli malzemesi olan silisyumdan yapılan bir telin çapı nanometreye yaklaşırken tel iletken bir karakter sergilemektedir (Çıracı 2005; Oberdörster 2007).

Nanoteknoloji sağlık (teşhis, tedavi ve koruyucu çalışmalarda), ulaşım (araç gövdesi, hidrojen depolama, atık emisyonun düşürülmesi, verim arttırılması, egzoz atık ısı geri kazanım çalışmalarda, boyama işlemlerinde), enerji (güneş enerjisi verimliliğinin artırılması, enerji nakil kayıplarının azaltılması, ısı yalıtımı, verim arttırma alanlarında), çevre (su ve hava filtrasyonu, atık emisyonunun düşürülmesi çalışmalarda), modern yaşam (ticari ürünler, kozmetik sanayi, savunma sanayi ve spor gereçleri sektörlerinde), elektronik (bilgisayarlar, görüntüleme cihazları, veri depolama) gibi konularda etkileşime geçmiş ve birçok alanda kullanım alanı bulmuştur (Karabulut 2009). Ayrıca boya sanayisinde de nanoteknolojik malzemelerden yararlanılmış, binaların çoğunlukla dış cephelerinde ve gerektiğinde iç cephelerinde kullanılmak üzere; kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku giderme, antimikrobiyal ve antibakteriyal gibi özellikler kazandırılmış boyalar geliştirilmiştir (Scientific Committee 2006).

Nanobiyoteknolojinin katılımıyla birlikte gelecekte biyolojik sistemlerde özelleşmiş bölgeleri hedefleyebilen, bulunduğu bölgeden farklı olarak çevresindeki yapıları denetleyebilen, çeşitli kimyasalların salınımında görev alabilen, dokuların veya hücrelerin verdikleri yanıtları algılayabilen ve çevresinde bulunan dokuları yeniden oluşturabilen çeşitli nanopartiküllerin veya başka yapıların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Sonuç olarak nanobiyoteknolojideki gelişmeler gelecek yıllarda özel olarak dizayn edilmiş nano yapıların iletişimi sağlayan bir operatör vasıtasıyla kontrol edilerek canlı bir organizma (örneğin bir hastada) içerisinde idare edilebileceğini ve verilen sinyallerle istenen noktalara yönlendirilebileceğini göstermektedir (Abamor 2010).

Eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak, nanomateriyaller endüstri uygulamalarında, çevresel toksisite çalışmalarda, insan sağlığı çalışmalarda ve buna benzer birçok araştırmada odak noktası olmuştur (Oberdorster *et al* 2005; Warheit *et al* 2007). Yapılan araştırmalar sonucunda bu materiyallerin avantajlarının, zararları yanında

daha ağır basacağı ya da her ikisinin de karşılıklı olabileceğine dair tahminler yürütülmektedir (Balasubramanyam 2010). Bu yüzden bu materyallerin tam anlamıyla potansiyel sağlık riskleri anlaşılmadan kullanılmaları tehlikeli sonuçlar doğurabilir (Oberdorster 2005). Nanoteknolojinin kullanım alanının genişliği ve hızla gelişip yayılması göz önünde bulundurulduğunda bu materyallerin mutajenik ve toksikolojik özelliklerinin de saptanması çevre ve halk sağlığı bakımından önem arz etmektedir.

Son on yılda, nanomateriyallerin toksisitesi üzerindeki çalışmaların yavaş da olsa ivme kazanmasına karşın, genel olarak yapılan çalışmalarda bu materyallerin sitotoksitesisi üzerine odaklanılmış, dolayısıyla genotoksisite çalışmaları büyük ölçüde gözden kaçmıştır (Singh *et al* 2009). Ancak bu yeni teknolojinin insan sağlığına ve çevreye ne şekilde etki edeceği hali hazırda çok sıcak ve ilgi uyandıran bir tartışma konusudur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu materyallerin bazılarının toksik olduğunu, organizmaların bünyelerinde birikebildiğini, kirleticileri adsorplayarak onların taşınımını artırabildiğini göstermiştir (Kaplan 2007).

Bu çalışmada, çeşitli sanayi kollarında yaygın olarak kullanılan iki nanomateriyalin [İndium tin oksit ve Bizmut (III) oksit] mutajenik etkileri, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile TA98 ve TA100 suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda araştırılarak sonuçların ortaya konulması amaçlanmıştır.

Kullanılan nanomateriyallerden Bizmut (III) oksit önemli geçiş metal oksitlerinden biridir ve metal oksitlere özgü karakteristik özelliklerinden (yarı iletken bant aralığı, yüksek kırılma indeksi, yüksek dielektrik geçirgenlik, yüksek oksijen iletkenliği, direnç, fotoiletkenlik ve fotoluminesans vb.) dolayı yoğun bir şekilde üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Yine bu özellikleri sebebiyle mikroelettronik (Bandoli *et al* 1996), sensör teknolojisi (Hyodo *et al* 2000; Khairy *et al* 2010), optik kaplama (Schuisky and Harsta 1996), şeffaf cam seramik imalatı (Pan and Ghosh 2000), nano enerjetik gaz jeneratörü (Martirosyan *et al* 2009), DNA hibritizasyon biyosensörü (Taufik and Yusof 2011), glukoz oksidazları için potansiyel sabitleme platformları (Ding *et al* 2010), polifenol oksidaz (Shan *et al* 2009), yakıt hücreleri (Azad *et al* 1994; Jiang *et al* 2009), katkı boyaları (Patil *et al* 2005), çeşitli tıbbi kremler ve merhemlerde sıkılaştırıcı, içme

suyunda, maden suyunda ve idrarda ağır metal iyonlarının tespiti için (Pauliukaite *et al* 2002) kullanılır.

İndium tin oksit ise yüksek elektriksel iletkenlik, şeffaflık ve üstün mekanik direnç özellikleri sebebiyle likit kristal ekran (LCD), elektrokromik görüntüler, düz panel ekranlar, dokunmatik veya dizüstü bilgisayar ekranları, cep telefonları, enerji tasarruflu mimari pencere, buğulanmayan uçak ve otomobil pencereleri, ısı-yansıtıcı ampul, gaz sensörleri ve antistatik pencere kaplamalarında kullanılmaktadır.

2 LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Nanoteknoloji Nedir?

Bilgisayarın, daha sonra internetin yaygın kullanımı, yaşam tarzımızı da çeşitli yönlerden etkiledi ve zamanla kullanılan teknolojiler yetersiz kalmaya başlamıştır. Yaşantımızı ve sağlığımızı yakından ilgilendiren, fakat daha önce hayal bile edilemeyen birçok gelişmenin kişisel kullanıma sunulması gündeme gelmiştir. Yeni teknolojilerin sağlık hizmetlerinde başarıyla uygulanması, DNA'yla ilgili teknolojilerin gelişmesi bilim insanları ve mühendisleri her gün daha küçük boyutlara inmeye, daha az yer kaplayan, daha az enerji harcayarak daha hızlı çalışabilen aygıtlar yapmaya zorlamıştır (Çıracı 2005).

Nanoteknoloji nanoölçeklerde malzeme tasarlayıp üretmeyi, bu malzemelerden yeni yöntemlerle aygıt, alet üretmeyi amaçlar. Bu bağlamda nanoteknolojide kullanılan yöntemler, bilinen yöntemlerden çok farklı olabilmektedir (Çıracı 2005).

Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri kadar küçük boyuta sahip materyallerin dizaynı, sentezi, karakterizasyonu ve uygulanması ile ilgilenen mühendislik ve bilimin iç içe olduğu bir bilim dalıdır (Emerich and Thanos 2003; Sahoo and Labhasetwar 2003). Cüce anlamına gelen nano kelimesi 6 karbon atomu veya 10 su molekülüne eşit olacak bir değerdir (Whitesides 2003). 1 nm kavramı, 5-6 atomun yanyana dizilmesiyle elde edilecek bir boyuta karşılık gelmektedir. Nanoyapılar ise yaklaşık 10-1000 kadar atomu içeren atom topaklarından oluşmaktadır. Bir başka deyişle; nanoteknoloji, metrenin bir milyarda biri olan nanometre ölçeğinde boyutlarla ilgilenen, maddenin atom seviyesinde işlenmesiyle daha gelişmiş ve tümüyle değişmiş malzemeler, araçlar ve sistemler elde etmeyi hedefleyen bir teknolojik alandır. Bu tanıma yönelik en güzel örnek, aynı atomlardan oluşmasına rağmen, atomların düzenlenmesi ile farklı maddeler olarak ortaya çıkan elmas ve maden kömürüdür. Doğada meydana gelen bu düzenleme çerçevesinde nanoteknoloji, farklı maddeleri atom seviyesinde işleyerek yeni maddeler elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Özer 2008).

21. yüzyılın başlangıcında nanoteknoloji iyi bir sıçrama yapmakla beraber bu multidisipliner bilim dalı hızla ilerlemeye devam etmektedir (Williams 2004). İlk olarak, 1959 yılında Amerikan Fizik Cemiyeti'nden (APS American Physical Society) Richard Feynman, nanoyapıların esas yapılardan daha farklı özellikler taşıdığını vurgulayarak bilim insanlarının dikkatini nanometre boyutlarına çekmiştir. Önce 1981 yılında taramalı tünelleme mikroskopunun (STM Scanning Tunneling Microscopy), daha sonra 1985 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM-Atomic Force Microscopy) keşfi, yüzeyde bulunan atomların ve moleküllerin gözlenmesine, atomsal düzeyde tepkimelerin izlenmesine olanak tanımıştır. Böylece 20. yüzyılın son çeyreğinde nanoteknolojiyle tanışılmış ve doğada bulunmayan yeni nanoyapıların atomsal düzeyde tasarlanarak sentezlenmesi devri başlamıştır (TÜBİTAK 2004).

21. yüzyılda bilgi alma teknolojileri, malzeme bilimi, biyoteknoloji, çevre mühendisliği, kimya mühendisliği, elektrik mühendisliği, moleküler kimya gibi birçok farklı bilim dalındaki gelişmeler nanoölçekte ilerlemektedir (Nowack and Bucheli 2007). Yakın bir gelecekte akıllı yüzeyler hemen her yerde insanların karşısına çıkacaklardır. Suyu ittiğinden dolayı silecekleri gerektirmeyen otomobil camları, buğulanmayan banyo aynaları ve araç iç camları, kendi kendini temizleyen bina dış cepheleri, tıkanmayan stent çeperleri, yosun ve deniz hayvanlarının yapışamadığı gemi dış yüzey boyaları, ve sürtünmesiz yüzeyler akla gelen ilk akıllı yüzey uygulamalarından bazılarıdır. Bu uygulamaların ekonomiye katkısı milyarlarca dolar olacaktır (Celep 2007).

2.1.1 Nanopartiküller

Nanoboyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar son yıllarda tek başına önemli bir alan olma doğrultusunda büyük bir gelişme göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanokabuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bu konu üzerine ilginin yoğunlaşmasının temel sebebi maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından farklı olarak olağandışı özellikler ve işlevsellik sergilemeleridir (Goldstain 1997). Boyutları 100 nm ve altında kalan tozlar olarak tanımlan nanopartiküller ise nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Miller *et al* 2004). Bu partiküller diğer ticari malzemelerden genelde

farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir. Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır (Liveri 2006).

Nanopartiküller boyut olarak insan hücrelerinden daha küçük olmakla birlikte enzimler ve reseptörler gibi biyolojik makro moleküllerle aynı boydadırlar. Bu nedenle nanopartiküller aynı boyda oldukları peptidler, antikorlar veya nükleik asitlerle konjuge edilerek problemler şeklinde kullanılabilirler. Böylece patolojik bölgeler ile ilgili olan hücresel hareketler ve moleküler değişiklikler gözlemlenebilir. Bu problemler geniş bir spektral aralığa karşı yüksek düzeyde hassasiyet, stabilite ve absorpsiyon kat sayısı sağlarlar (Cuenca 2006).

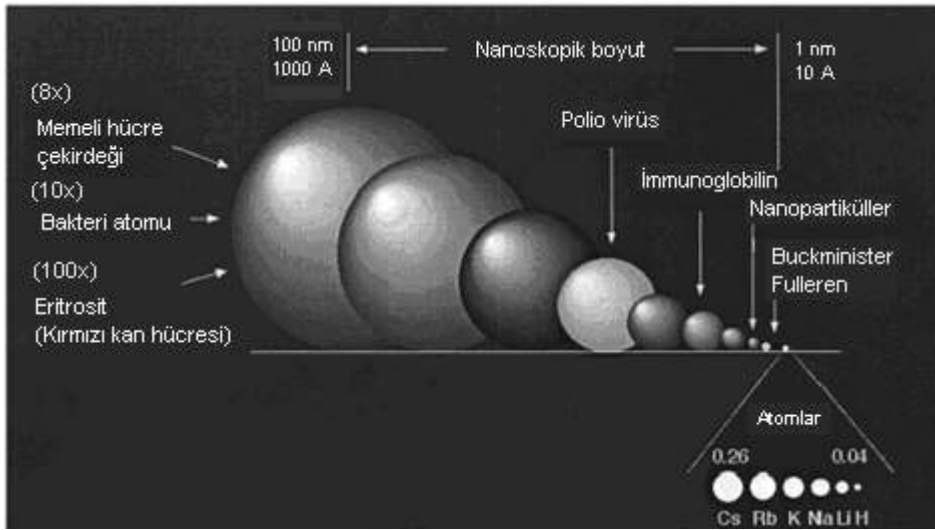
Antikorlarla, kollajenlerle ve mikro moleküllerle kaplanan nanopartiküller kanser gibi hastalıkların erken tanısı için de denenmektedir. Vitaminleri, hormonları, enzimleri sentezleyen genlerle tasarlanan biyolojik robotlar kalıtsal ya da sonradan kazanılmış hastalıkların tedavisinde kullanılabilir (Freitas 2005). Ayrıca nano boyuttaki aletler yüksek dozda antikanserojen ilaçların, genlere ve normal hücrelere zarar vermeden kötü huylu ve hasta hücrelerin içine taşınması için özelleşmiştirler. Bu sayede antikanserojen ilaçlar en az yan etki ile maksimum yeterlilik gösterirler. Bu nano taşıyıcılar aynı zamanda kimyasallar, manyetik alan, ısı ve pH gibi uyaranlar tarafından aktive olacak şekilde düzenlenebilirler (Lee 2008). Nano taşıyıcılar benzer şekilde ilaçların kan-beyin bariyeri gibi anatomik bariyerlerden, akciğerler ve deriden penetre olması için de kullanılırlar. Son zamanlarda nano taşıyıcılar hedefleme, ilaç taşıma cihazı ve biyolojik sensör olarak fonksiyon gösterme gibi çok fonksiyonlu şekilde tasarlanmaktadır (Lepage 2007).

Son yıllarda nanopartiküllerden mikrobiyoloji alanında da yararlanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin pek çok bakteri türü ve diğer hücre modelleri üzerinde antimikrobiyal özellik gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin mevcut antibiyotiklere karşı dirençli olan bakteriler üzerinde de etkili olması enfeksiyonlarla mücadele konusunda ümit verici bir gelişme olarak nitelendirilmektedir. Günümüzde hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere halen araştırılmakta olan

nanopartiküller ve nano cihazlar; quantum dotlar, nano kabuklar, nano küreler, metal nanopartiküller, paramanyetik nanopartiküller ve karbon nanotüplerdir. Kanseri tanı ve tedavisi ile nanoteknolojinin birleştirilmesi hızla ilerleyen çalışma alanlarından bir tanesidir ve bu kavramların daha geniş bir şekilde anlaşılabilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Abamor 2010).

2.1.2 Nanomateriyallerin Sınıflandırılması

Nanomateriyaller moleküler faz ile yoğunlaştırılmış faz arasında bir köprü kurmaktadır. Bu nedenle optik özellikleri, manyetik özellikleri, erime noktaları ve kristal morfolojileri gibi bir takım özellikler çok değişkenlik gösterebilir. Yeni buluşlar ve uygulamalar oldukça yüksek düzeydedir. Nano kristal yapıların boyutunu anlamak için dünyada bulunan diğer küçük şeylerle kıyaslamak mümkündür. Şekil 2.1’de virüs, bakteri, nano kristal ve fulleren molekülleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 2.1 Nano kristallerin bakteri, virüs ve moleküllerle boyut karşılaştırması

Normal sıcaklık ve basınçlarda katı olan binlerce madde; metaller, seramikler, yarı iletkenler, kompozitler ve polimerler olarak alt bölümlere ayrılabilir. İlave olarak biyomateriyaller, katalitik materyaller, kaplamalar, camlar, manyetik ve elektronik materyaller şeklinde bir sınıflandırma da mümkündür. Çizelge 2.1 nano yapılara ait

yaklaşık boyut aralıkları ve bu yapılar kullanılarak elde edilen materyalleri göstermektedir.

Geniş değişken özelliklere sahip tüm bu katı maddeler nanopartikül formunda üretildiklerinde yeni altkümelerde yer almaktadır. Olanaklar sonsuzdur fakat nanomateriyallerin sentezi ilk ön şarttır. Saflık, monodispersite, bağlanma, diğer kimyasal özellikler ve düzenlenebilme de önemlidir. Bu yüzden kimya ve kimyagerler bu yeni alan gelişirken liderlik rolünü almalıdır.

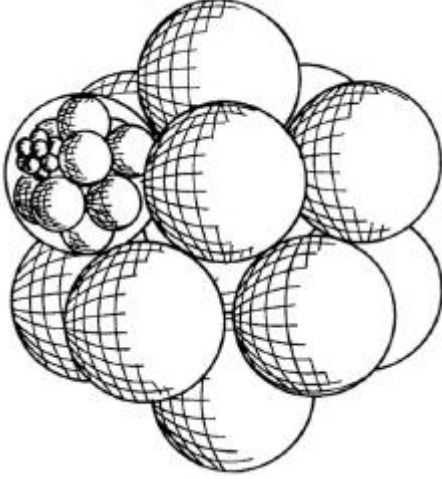
Çizelge 2.1 Nano yapıları içeren bazı materyaller

Materyaller	Boyut (yaklaşık)	Örnekler
Nano kristaller ve demetler (kuantum noktalar)	1–10 nm	Metaller, yarı iletkenler, manyetik materyaller
Diğer nanopartiküller	1–100 nm	Seramik oksitler
Nanoteller	1–100 nm	Metaller, yarı iletkenler, oksitler, sülfidler, nitritler
Nanotüpler	1–100 nm	Karbon, tabakalı metal kalkojenitler
Nano gözenekli katılar	0,5–10 nm (gözenek yarıçapı)	Zeolitler, fosfatlar
2-Boyutlu nanopartiküller	Birkaç nm ² -µm ²	Metaller, yarı iletkenler, manyetik materyaller
Yüzeyler ve ince filmler	1-1000 nm (kalınlık)	Çeşitli materyaller
3-Boyutlu yapılar	Üç boyutta birkaç nm	Metaller, yarı iletkenler, manyetik materyaller

Her geçen gün, nano yapılı materyaller geliştikçe bu alanda birçok isim ve tanımlama kullanılmaktadır. Önemli bazı kesin tanımlamalar aşağıda ifade edilmiştir.

Nanodemet (Cluster): Elliden fazla birimin (atom veya reaktif molekül) bir araya gelmesiyle oluşur. Demeti oluşturan bileşikler veya moleküler türlerin (kararlı, çözünebilir, izole edilebilir) izolasyonuna izin veren bir ligantla çevrilidir. Metal nanokristallerden meydana gelen demetler ve bu demetlerden meydana gelen süper demetler Şekil 2.2’de gösterilmektedir.

Kolloid: Sıvı faz içinde asılı duran partiküllerin konumunu kararlılıkla sürdürebildiği katı-sıvı karışımların genel adıdır. Kolloidal bir partikül 1–1000 nm arasında boyuta sahiptir.



Şekil 2.2 Metal nanodemetler ve süper demetlerin oluşumunun şematik gösterimi

Nanopartikül: Kristal olmayan, tek kristalli veya kristal agregatlardan oluşan 1–1000 nm aralığındaki katı partiküllerdir.

Nano kristal: Nanometre boyutunda tek kristalli katı partiküller.

Nano yapıli veya nano ölçekli materyaller: Nanometrik yönlenmeye sahip herhangi bir materyaldir; partiküller 3 boyutlu, ince filmler 2 boyutlu ve ince teller 1 boyutlu yapıdadır.

Nano faz materyaller: Nano yapıli materyallerle aynı anlamı taşır.

Kuantum nokta: Boyutu belirleme etkisine sahip en az bir boyutlu partiküllerdir.

2.1.3 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nanopartiküller aşağıda belirtilen birçok alanda uygulama şansı bulmuştur:

Mikro-Akışkan Bilimi: Nanoteknolojik gelişmeler sayesinde mikro/nano düzeydeki akışkan özelliklerine göre yararlanabilme yolunda çalışmalar da nanoteknoloji kapsamında değerlendirilmektedir. Gelecekte, akışkanların nano düzeydeki özelliklerine bağlı olarak hastalıkların teşhisi, ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi, DNA manipülasyonu ve işlenmesi, vücuda alınan gıda maddeleri ve sıvıların izlenmesi, bitki ve hayvanlarda sağlık takibi, çevresel izleme ve denetleme vb. uygulamalar mümkün olabilecektir (Tabrizi 2005).

Biyomikroelektromekanik– Biyonanoelektromekanik ve Biyoçipler: Son yıllarda mikroelektromekanik (MEM) sistemlerde oldukça önemli aşamalar kaydedilmiştir. Böylece, mikro düzeyde tam fonksiyonel pompalar, motorlar, duyargalar, vb. elektro mekanik sistemler kullanılabilmekte, posta pulundan daha küçük boyuttaki biyoçiplerin üretimi mümkün olabilmektedir. Günümüzde bu sistemlerin mikro düzeyden (MEM) nano düzeye (NEM) geçişinde ve bunların biyolojik sistemlerle kaynaştırılmasında devrim niteliğinde bilimsel aşamalar beklenmektedir (Tabrizi 2005).

Nükleik Asit Biyomühendisliği: DNA moleküllerinin yapı blokları olarak kullanılması suretiyle nanokablo ve nanomembran benzeri yapıların geliştirilmesi ve özellikle tarım ve gıda mühendisliğinde sayısız uygulama alanlarının bulunacağı öngörülmektedir (Tabrizi 2005).

Akıllı Taşıyıcı Sistemler: Moleküler ölçekte kodlanmış paketlerin kendilerine tanımlanan adres uyarınca vücudun ilgili bölgesine ulaştırılmasına imkan verecektir (Tabrizi 2005).

Nano-Biyoproses: Biyolojik malzemeden doğal biyolojik proseslerin kullanımıyla istenilen birleşimlerin elde edilmesi olarak tanımlanan biyoproses, nanoteknoloji sayesinde çok daha yüksek bir etkinlikte gerçekleştirilebilecektir. Moleküler problemlerin kullanımı, biyolojik malzemedeki mikropların çok daha hızlı bir şekilde tanımlanabilmesini sağlayacak olan kitler örnek olarak verilebilir.

Biyoanalitik Nanosensörler: Nano ölçekte duyargalar yardımıyla, tarım ve gıda sistemlerindeki çok düşük miktarlarda olsa dahi kimyasal kontaminasyonun, patojenlerin veya virüs partiküllerinin tespit edilmesi mümkün olacaktır. Gıda maddelerinin ambalajlanmasında kullanılacak bu sistemler sayesinde gıda ürünlerinin mikrobiyal kontaminasyonunun önceden tespiti ve kendi kendini koruma mekanizmaları yardımıyla önlenmesi ve böylece gerek depolama gerekse dağıtımda oldukça önemli kolaylıklar ve tasarruflar sağlanabilecektir.

Nanomalzeme: Gerek nanoteknoloji sayesinde yeni bir malzeme buluşuyla gerekse doğada var olan bazı malzemelerin (örneğin topraktaki nanopartiküller, kil, zeolit, imogolit) kullanılması suretiyle nano ölçekte farklı özellikler gösteren kompozit malzemelerin kullanımı mümkün olabilecektir. Bunlar arasında saydamlık, azalan ağırlık, artan dayanım özelliklerini gösteren malzemeler, giyenin sağlık ve fiziki durumu hakkında uyarılar veren akıllı kumaşlar örnek olarak verilebilir. Tarımsal materyalin faydalı ürünlere dönüştürülmesi ve bu sayede çevrenin korunumu nanoteknolojinin gelişiminde önemli ve heyecan verici bir potansiyel alan olarak görülmektedir. Günümüzde özellikle bitkisel yağların biyoyakıtlara ve endüstriyel çözeltilere dönüştürülebilmesinde ihtiyaç duyulacak nano-katalizörlerin geliştirilmesi ve tasarımı konusunda ciddi çalışmalar yapılmaktadır.

Biyoselektif Yüzeyler: Çeşitli kimyasal ve biyolojik etkileşimlerin meydana geldiği yüzeyler üzerinde çeşitli organizmaların veya moleküllerin tutunabilmesi veya bağlanabilmesini sağlayan seçici yüzeyler olarak tanımlanan biyoselektif yüzeylerdeki gelişmeler, biyosensörlerin, dedektörlerin, katalizörlerin gelişimi ve biyomoleküllerin ayrıştırılması veya pürifikasyonuna yönelik gelişmelere bağlıdır.

2.1.4 Nanopartiküllerin Avantaj ve Dezavantajları

Bilindiği gibi canlı ve cansız tüm varlıklar atomlardan oluşmuştur ve özelliklerini bu atomların dizilişlerinden almaktadırlar. Örneğin, eğer kömür atomlarının sıralanışı değiştirebilseydi elmas elde edilebilirdi. Günümüzde moleküler düzeyde üretim yöntemleri açısından önemli ölçüde geri sayılabilecek bir konumda bulunduğumuz söylenebilir. Kısaca, atomları çok büyük yığınlar halinde ancak hareket

ettirebilmekteyiz. Bu ise Merkle (1999)' nin benzetimine göre, ellerimizde boks eldivenleriyle legolardan bir şeyler üretmeye çalışmaya benzemektedir. Belki lego bloklarını büyük yığınlar haline getirebiliriz ancak onları istediğimiz düzende birleştiremez ve oluşturmak istediğimiz parçaları elde edemeyiz. Gelecekte, nanoteknoloji, bize bu eldivenleri çıkarma olanağı tanıyacaktır. Doğanın temel yapıtaşlarını kolayca, ucuz bir biçimde ve istediğimiz hemen her şekilde düzenleyebilme imkânı bulunacaktır. Böylece yeni nesil ürünlerin doğaya daha az zarar vererek üretilebilmesi ve bunların aynı zamanda daha dayanıklı, daha hafif ve daha hassas özelliklerle donatılmış olması mümkün olacaktır (Merkle 1999).

2.1.5 Nanoteknolojinin Çevre ve İnsan Sağlığına Etkileri

Çevresel uygulamalarda birçok avantajları olmasına rağmen nanoteknoloji ciddi çevre sorunlarına sebep olabilmektedir. Nano-materyallerin kullanımının artması sonucu bu materyallerin çevreye salınımları artacağı düşünülmektedir. Bu materyallerin alıcı ortamlarda ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda çalışmalara son 10 yılda hız verilmesine rağmen hala cevaplandırılması gereken bir çok soru ve literatürde eksik noktalar mevcuttur (Dreher 2004; UK Royal Society Report 2004). Birçok araştırmacı nano-materyallerin toksikolojik etkileri, alıcı ortamlara salınımları, taşınımları, karakterizasyonu, risk değerlendirilmesi konularında çalışmalar yapmış ve çalışmalar halen devam etmektedir (Morgan 2005; Thomas and Sayre 2005).

Güneş kremleri başta olmak üzere 300'den fazla nanomateryal içeren ürünler marketlerde yer almaktadır (USEPA 2007). Bu ürünlerin kullanım alanlarının yaygınlaşması sonucu insanlar, diğer canlılar ve alıcı ortamlar doğrudan veya dolaylı olarak nano-materyallere maruz kalmaktadır. Çevresel ortamlara salınan nano-materyallerin çevresel ortamlardaki taşınımı, miktarları, bozunumu, dönüşümü ve nihai akıbetleri tam bilinmemektedir (European Commission 2004). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, alıcı ortamlarda nano-materyallerin biyolojik olarak bozunabilecekleri ve birikebilecekleri, diğer kirleticilerle birlikte taşınabilecekleri veya bünyelerine daha toksik kirleticileri bağlayarak onların taşınımını artırabilecekleri, diğer kirleticilerle kimyasal ya da fiziksel reaksiyona girebilecekleri belirtilmektedir (USEPA 2007). Nano-materyallerin davranışlarının modellenmesinde doğal nanopartiküllerin

davranışları baz alınmaktadır. Ancak, bu nano-materyallerin su fazında çözünürlüğünün ve reaktivitesinin arttırılması için yüzey kimyaları çeşitli modifikasyon teknikleri ile değiştirilmektedir. Uygulanan yüzey modifikasyonları aynı model yaklaşımlarının uygulanmasını güçlendirmekte ve hatalı sonuçlar verebilmektedir (Wiesner 2006).

Nanopartiküllerin insan sağlığı üzerinde etkilerini belirlemek için toksikolojik çalışmalar yapılmıştır (Wiesner 2006). Nanomateryallerin toksik özellikleri kimyasal kompozisyonu, miktarı, çözünürlüğü, şekli, yüzey alanı ve yüzey yükleri gibi parametrelere bağlıdır. Ayrıca nanopartiküllerin üretimi sırasında kaynaklanan safsızlıklar da toksisitesini etkilemektedir. Farklı canlı türleri ve bitkiler nanomateryallere farklı hassasiyetler göstermektedir. Yüzey kaplamada ve güneş kremleri gibi kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılan TiO_2 'in hücresel absorpsiyonunun toksik bir etkisi yoktur. Ancak bu partiküllerin sucul ortamlara karışmaları algler ve su pireleri üzerinde toksik etki yapmaktır (Oberdörster *et al* 2004a). Fulleren nanopartikülünün balıklarda beyin hasarına sebep olduğu tespit edilmiştir (Oberdörster *et al* 2004b). Bakterilere karşı çok toksik olan fullerenin balık türleri için yapılan toksikolojik çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Colvin 2003; Oberdörster *et al* 2004b). Karbon nano tüplerin veya üretimi sonucu oluşan safsızlıkların solunumu veya ağız yoluyla alınımı deney hayvanlarında akciğer hasarlarına ve deri tarafından absorblandığında toksik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir (Lam *et al* 2004; Donaldson *et al* 2006). Sonuç olarak, literatürde güvenilir ve yeterli sayıda araştırma olmadığından nanopartiküllerin ekolojik yaşama etkileri konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Kaplan 2007).

2.2 Nanobiyoteknoloji

Nano boyuttaki materyallerin insan vücudunda bulunan hücrelerden daha küçük olmakla birlikte hücrelerin içerisinde bulunan makromoleküllerle hemen hemen aynı boyutta oldukları bilinmektedir. Yapılan araştırmalar DNA'nın eninin yaklaşık olarak 2.5 nm olduğunu ve protein moleküllerinin eninin ise 1-20 nm arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Canlı hücrelerin fonksiyonel bileşenlerinin bu doğal nano boyutları, nanoteknolojinin biyoteknoloji içerisinde uygulanmasını kaçınılmaz hale getirmektedir.

Bu durum nanobiyoteknoloji teriminin ortaya çıkmasını sağlar. Nanobiyoteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknolojinin ortak bir noktada birleşmesi sonucu ortaya çıkan bir bilim dalıdır. Nanobiyoteknoloji, nano boyuttaki materyallerin ya da ürünlerin yapımında biyolojik moleküllerden yararlanır. Oluşan bu nanomateriyaller ise biyolojik sistemleri etkilerler. Nanobiyoteknolojinin katılımıyla birlikte gelecekte biyolojik sistemlerde özelleşmiş bölgeleri hedefleyebilen, bulunduğu bölgeden farklı olarak çevresindeki yapıları denetleyebilen, çeşitli kimyasalların salınımında görev alabilen, dokuların veya hücrelerin verdikleri yanıtları algılayabilen ve çevresinde bulunan dokuları yeniden oluşturabilen çeşitli nanopartiküllerin veya başka yapıların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Sonuç olarak nanobiyoteknolojideki gelişmeler gelecek yıllarda özel olarak dizayn edilmiş nano yapıların iletişimi sağlayan bir operatör vasıtasıyla kontrol edilerek canlı bir organizma (örneğin bir hastada) içerisinde idare edilebileceğini ve verilen sinyallerle istenen noktalara yönlendirilebileceğini göstermektedir (Abamor 2010).

2.3 Genotoksisite

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductlarıdır (Bedir A. 2004). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir (Bedir 2004).

2.4 Mutajenler

Mutasyona neden olan ajanlara mutajen denir. Kansere neden olan ajanlar ise kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir. Kanserogenlerin taranmasında mutajenlerin esas alınması iki önemli nedene dayanır. Bunlardan birincisi, genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşudur. İkincisi ise karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur (Ramel and Rannung 1980).

Genellikle kabul edilen bir görüŖe göre, doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri yani mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun aksi, yani tüm mutajenik maddelerin kanserojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazı durumlarda gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen, kanserin çok basamaklı karmaşık bir biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkması olabilir (Bağcı 1985).

Mc Cann ve arkadaşları (1975a, 1976), karsinojen olan ve olmayan 300 kimyasalı, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile taradıklarında 175 karsinojen maddenin 157 tanesinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığını saptamışlardır.

2.5 Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak adlandırılabilir. Organizmaya yabancı olan kimyasal maddelere ksenobiyotik adı verilir. Bunların organizmadaki kimyasal değişimlerine de metabolizma denmektedir fakat biyotransformasyon bu anlamda daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır (Vural 1996).

Çeşitli yollarla organizmaya giren lipofilik kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece hidrofilik metabolitlere dönüşürler. Bir ksenobiyotiğin canlı organizmada uğradığı kimyasal değişimlerin tümüne biyotransformasyon adı verilir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizma için birçok açıdan önem taşımaktadır (Vural 1996).

İnsanlar ilaçlar, gıda katkı maddeleri veya çevre kirliliğine neden olan maddelerin giderek artan bir biçimde etkileri altında kalmaktadırlar. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece metabolitlere dönüşürler. Pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, yiyecek koruyucuları gibi vücuda yabancı olan maddeler uyarılabilen izozimlerden oluşan detoksifikasyon enzim gruplarınca metabolize edilirler. Genellikle yağda çözünür olan

bu yabancı maddeleri metabolize etmedeki amaç, onları daha polar yaparak suda çözünür hale getirmek ve bu şekilde vücut dışına atılmalarını sağlamaktır (Vural 1996).

Mikrobiyal mutajenite çalışmalarından elde edilen verilerin insanlara uygulanmasındaki zorluklardan en önemlisi, yabancı bir kimyasal maddenin insanda geçirdiği metabolik reaksiyonlardır. Bu metabolik yolların bilinmesi, memelilerde enzimatik reaksiyonlarla metabolik dönüşümlere uğrayan kimyasal maddelerin potansiyel aktivitelerinin tayininde kullanılabilecek, uygun *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerin geliştirilmesine olanak vermiştir. Birçok çevre kirleticisi, kendileri mutajen olmadıkları halde, memelilerin metabolizmasında karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminin etkisi altında aktif metabolitlere dönüşebilmektedir (Asal 1983).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu, genellikle spesifik olan kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerlerde yerleşmiştir. Bu nedenle karaciğerin, kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri, depolanma, dağılım ve safra ile atılımlarından önce metabolize etme kapasitesi çok etkindir. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar. Ayrıca biyotransformasyon barsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir (Dökmeci 1994, Vural 1996).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmalarında iki enzim grubu yer almaktadır.

1- Faz I enzimleri: Öncelikli olarak oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Bu fazda yer alan reaksiyonlar sonunda, hidrofobik molekülden bir ya da daha fazla polar grup ortaya çıkarılır. Bu reaksiyonlarla ana bileşik, Faz II'de yer alan konjugasyon enzimleri için uygun bir substrat haline gelir. Konjuge edilmiş ürünler, yeterli derecede polar olup, hücre ve vücuttan kolayca dışarı atılırlar.

2- Faz II enzimleri: Bu fazda endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar (Vural 1996, Yüksel 1999).

Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyon mekanizmalarından özellikle Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Faz I reaksiyonlarını katalizleyen bu enzimler, birçok hücrenin sitoplazmasında ağ şeklinde olan endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bu enzimler membrana bağlı enzimlerdir. Endoplazmik retikulum bir membran olup yağ ve proteinlerden oluşmuştur. İşte bu lipoprotein matriksi içinde yer alan mikrozomal enzimler, ancak lipid membranlara geçebilen lipofilik ksenobiyotikleri biyotransformasyona uğratırlar (Vural 1996).

Faz I metabolizması büyük ölçüde P-450-enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar "heme" içeren proteinlerdir ve birincil olarak karaciğerde bulunurlar (Yüksel 1999). Bu pigmentlere P-450 adı, 450 nm'de absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik sitokrom P-450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans veren dalga boylarına sahiptir (Özerol 1996).

P-450 enzim sistemi; dışarıdan alınan ilaçlar, kimyasal maddeler, insektisitler, petrol ürünleri vb. maddeleri metabolize eden sistemdir (Yüksel 1999).

2.6 Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz bilinmeyen sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gerekmele birlikte laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserojenezis deneylerinin hem çok zaman almaları hem de çok pahalı olmaları nedeniyle başırlamayacak bir durum arz etmektedir (Bağcı 1985).

Karsinojenlerin saptanmasında genellikle sıçan ve farelerin kullanıldığı hayvan testleri yapılır. Ancak bu testler çok pahalıdır ve çok uzun zaman alırlar (Ames 1979a). Ayrıca fazla sayıda kalifiye iş gücü gerektirmeleri, besinlerdeki doğal kimyasal maddelerle, su

ve hava kirleticileri gibi kompleks bileşiklerin testine uygun olmamaları ve kullanılan hayvan sayısının azlığı nedeniyle, test duyarlılığının düşük oluşu gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Asal 1983).

Bu nedenle, kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için, canlı hayvan deneyleri yerine birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler (short-term tests) diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde

Çizelge 2.2 Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar (Diril 1988)

Kısa Zamanlı Testler	İzlenen Genetiksel Biyokimyasal Yol	Literatür
1. <i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	Ames vd. 1973a, Maron ve Ames 1983.
2. <i>Escherichia coli</i>	Arginin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı	Green ve Murial 1976 Elesperu ve Yarmolinsky 1979 Moreu vd. 1976 Rosenkranz ve Mermelstein 1980 Slater vd. 1971 Quillardet ve Hofnung 1985 Quillardet vd. 1985
3. <i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşlar	Kada ve Hirano 1980
4. <i>Neurospora crassa</i>	Adenin okzotrofları	Brockman 1984
5. Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar	Beaudet 1973
6. Fare karaciğeri epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik	Vogel ve Sobels 1976
7. <i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	Vogel ve Sobels 1976
8. Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar	Pienta vd. 1977
9. Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi	Perry ve Evans 1975
10. İnsan periferel lenfositleri	Kromozomal hatalar	Preston vd. 1981

edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985).

Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk sebebi, memelilerin bu test sistemlerine oldukça az duyarlı olmaları yüzündendir. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır (Arı 1998).

Bakteriyel test sistemlerinin kullanım amaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

- a) Çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin taranmasında
- b) Kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin ayrıştırılmasında
- c) Prokarsinojenlerin öncül ya da nihai metabolitlerinin saptanmasında
- d) Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle, insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde
- e) Kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda
- f) Konakçılar üzerinde yapılan (host mediated) deneylerde
- g) Karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır (Öksüzoğlu 1997).

DNA ile etkileşerek kanserojenik etki gösteren kimyasal maddeler genotoksik kanserojenler olarak sınıflandırılır. Ames, bu amaçla çok duyarlı bir yöntem geliştirmiştir. *Salmonella* bakterileri kullanarak yapılan bu yöntem genotoksik kanserojenik etkinin araştırılmasında, mutajenezis kanserojenenezis ilişkisinden yararlanarak, birçok çevre kirleticileri ve ilaçlara uygulanmaktadır (Vural 1984).

Bruce Ames tarafından geliştirilen *Salmonella typhimurium* mikrozomal test sistemi, mutajen ve kanserojen maddelerin tespitinde kullanıldığı gibi, başta antioksidantlar olmak üzere çeşitli antimutajenik ve antikanserojenik etkileri olan inhibitör maddelerin

de belirlenebildiği ve etkilerinin izlenebildiği, çok önemli, kısa zamanlı test sistemlerinden biridir (Kalaycıoğlu ve Öner 1994).

2.7 *Salmonella*/ mikrozom Test Sistemi

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir (Maron and Ames 1983).

Bu test sisteminde, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bir seri *Salmonella typhimurium* mutant suşları kullanılmaktadır (Maron and Ames 1983).

Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *S. typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his^-) olan suşlarının test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirip his^+ haline dönüşmesi esasına dayanır (Ames 1973a).

Ames testinde, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin belirlenebilmesi için histidine ihtiyaç duyan suşlar kullanılmaktadır. Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları; TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu 1997).

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	-	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA1537	His C3076	Rfa	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA1538	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA98	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA97	His D6610	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA102	PAQ1 His G428 Δ His	Rfa	$\Delta uvrB$	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X-Işınları, U.V., mitomisin C, bleomisin, H ₂ O ₂ ve kinonlar

Histidin Mutasyonu

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames *et al* 1973b).

Salmonella typhimurium TA100 ve TA1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir. Bu mutasyon, his G geninde lösin amino asidinin kodonu olan ^{-GAG-}_{-CTC-} yerine prolin amino asidinin kodonu olan ^{-GGG-}_{-CCC-} 'nin gelmesine neden olur. *Salmonella typhimurium* TA1535 ve *Salmonella typhimurium* TA100 suşu, özellikle G-C baz çiftlerinde baz çifti değişimlerine neden olan mutajenlerin keşfinde kullanılan suşlardır (Maron and Ames 1983).

His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA1538 ve *S. typhimurium* TA98 suşlarında bulunur ve histidinolü histidine çeviren histidin biyosentezindeki son enzim olan histidin dehidrogenazı kodlayan his D geni üzerindedir. His D3052 mutasyonu, His D geni içinde, ^{-GCGCGCGC-}_{-CGCGCGCG-} dizilimi olan, 8 defa tekrarlanan GC dizisine sahiptir ve bu dizi -1 çerçeve kayması mutasyonunun yanındadır (Isono and Yournon 1974). His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup çerçeve kaymasına neden olan mutajenler DNA'nın tekrarlanan diziler ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri dönüştürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar (Ames *et al* 1972). *S. typhimurium* TA1538 ve *S. typhimurium* TA98 suşları, çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan mutajenler maddeler ile tekrar his⁺ hale geri dönüştürülmektedir (Maron and Ames 1983).

Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını artırmak üzere, bu suşlara bazı mutasyonlar eklenmiştir. Bunlar:

Rfa Mutasyonu

S. typhimurium'da normal olarak mutajenlerin hücre membranına ulaşmalarında kısmi bir engel olarak iş gören bir kapsül bulunmaktadır. Bu kapsül lipopolisakkarit (LPS) yapısındadır. Bu engelin kalkması, yani LPS kusurları mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin daha duyarlı olmasına yol açmaktadır. Rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bu nedenle de büyük moleküllere karşı duyarlıdırlar. *S. typhimurium*'un his⁻ ve onarım sistemlerinde mutasyon taşıyan test suşlarından, LPS kusurlu türevler elde edilmiş, bu şekilde de sistemin mutajenlere duyarlılığı artırılmıştır (Ames *et al* 1973b).

uvrB Mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. *uvrB* mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biotin genine kadar uzanmaktadır. Biotin geni ise vitamin H denilen biotin sentezinden sorumludur. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için histidinin yanında biotine de gereksinim duyarlar (Ames *et al* 1973b).

R-faktörü

TA1535, TA1537, TA1538 LT2'den mutajenize edilmiş plazmid taşımayan suşlardır. Ancak, bunlardan mutajenler pekiyi tayin edilememektedir. Bu yüzden bu suşlara R-faktör plazmidi, yani ampisiline dirençlilik geni taşıyan bir plazmid olan pKM 101 plazmidi yerleştirilmiştir. Bu plazmid, TA1535'e eklenerek TA100 suşu, TA1537'ye eklenerek TA97 ve TA1538'e eklenerek TA98 suşları elde edilmiştir. Bu iki suşun çeşitli mutagen/karsinogenlere karşı duyarlılığı, tüm diğer TA serisi bakterilerinden daha fazladır.

Bu plazmid, DNA'nın kesme-çıkarma yoluyla onarım mekanizmasının aktivasyonuna ve dolayısıyla, spontan mutasyonların ve kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasına neden olur.

Bunların dışında son olarak *Salmonella*/mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg süpernatantını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır (Ames vd. 1973b). Önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermişlerdir (Ames *et al* 1973b).

3 MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden nutrient broth no:2 Oxoid markalı olup, diğer kimyasallardan magnezyum sülfat, sitrikasit monohidrat, potasyum fosfat, sodyum amonyum fosfat, D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampicilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glukoz, agar, sodyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, glukoz-6-fosfat, S9 fraksiyonu, 2-aminofluorene, 2-aminoanthracene ve 4-nitro-o-fenilendiamine Aldrich, Sodyum azid ise Riedel'den alınmıştır. Yine bu çalışmada kullanılan Bizmut (III) oksit (CAS No. 1304-73-3) ve İndium tin oksit (CAS No. 50926-11-9) nanopartikülleri Aldrich'den temin edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, Nüve marka soğutmalı inkübatör ES110, 0,0001 g hassasiyetindeki Sartorius marka terazi, Nüve marka OT 4060 Otoklav, Hanna Instruments H1221 pH metre, Devir hızı 4 000 rpm'e kadar yükselebilen Hettich Universal marka santrifüj, Olympus CH20 marka ışık mikroskobu, BM 302 NÜVE marka 0-60 °C ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu, UV ve floresan ampülü olan Labormed marka flow (steril) kabin, +4-8 °C arasında olan derin donduruculu (Profilo) buzdolabı, Polietilen, vida kapaklı steril kültür tüpleri, 24x76 cm'lik lam ve buna uygun ebatlarda 24x60 mm lameller, 5 cc'lik plastik steril enjektörler ve MUB-12A analog ultrasonik su banyosu olarak sıralanmaktadır.

3.1.3 *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde, Maron ve Ames (1983) tarafından, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri'nden olan Prof. Dr. Nuran

Diril'den temin edilmiştir. TA98 suşları kodon kayması, TA100 suşu baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

3.1.4 Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: Minimal glukoz agar (MGA) ve Histidin/Biyotin/Ampisilin agar (HBA) plakları

	<u>1000 mL</u>
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	175 g
Distile su (45 °C)	670 mL

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya eklenmiştir. Toplam hacim 1000 mL'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 mL top agara 10 mL olarak)

	<u>250 mL</u>
D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 mL

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş, daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir. Çözelti +4 °C’de saklanmıştır.

(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

	<u>100 mL</u>
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 N Sodyum hidroksit	100 mL

Ampisilin trihidrat, 0,02 N NaOH içinde çözülmüş ve sterilizasyon için 0,22 µm çaplı filtreden geçirilmiş ve +4 °C’de saklanmıştır.

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü

	<u>100 mL</u>
Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 mL
Kristal viyole ve distile su karıştırılmış ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4 °C’de saklanmıştır.	

(%0,13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>50 mL</u>
D-biotin	0,65 mg
Distile su	50 mL

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%0,5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>400 mL</u>
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	2 g
Distile su	400 mL

Madde distile su içinde çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%20) Glukoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	<u>100 mL</u>
Glukoz	20 g
Distile su	100 mL

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110 °C’de 15 dk sterilize edilmiş ve 0-4 °C’de saklanmıştır.

(2 µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO)’de çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. +4 °C’de saklanmıştır.

	<u>10 mL</u>
2AF	0,02 g
DMSO	10 mL

(0,02 µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

2 µg/plak olmak üzere DMSO’da çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

	<u>10 mL</u>
NPD	0,02 g
DMSO	10 mL

(0,1 µg/µl) Sodyum Azid (SA)

Kullanım: Pozitif kontrol

10 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. +4 °C’de saklanmıştır.

	<u>100 mL</u>
Sodyum azid	0,01 g
Distile su	100 mL

(0,05µg/µl) 2-Aminoantrasen (2AA)

Kullanım: Pozitif Kontrol

5 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır

	<u>100 mL</u>
2-aminoanthracene	0,005 g
DMSO	100 mL

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

	<u>1000 mL</u>
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 mL

Agar, su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

Histidin/Biyotin Plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
%20 glukoz	50 mL
Histidin HCl. H ₂ O	10 mL
0,5 mM Biyotin	6 mL
50XVB	20 mL
Distile su	914 mL

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin ilave edilmiş, karıştırılıp petri kutularına 30 mL olarak dağıtılmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
Distile su	910 mL
50XVB tuzları	20 mL
%20 glukoz	50 m
Histidin HCl.H ₂ O	10 mL
0,5 mM Biyotin	6 mL
(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin	3,15 mL

Agar ve su otoklavlanmış, 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 mL olarak aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler 4 °C'de 2 ay saklanabilmektedir.

Minimal Glukoz Agar Plakları

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
Distile su	930 mL
50X VB	20 mL
%20 glukoz	50 mL

Agar ve su 2 L'lik kapta karıştırılıp çözölmüş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz ve 50XVB tuzları eklenip petri kutularına 30 mL olarak aktarılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanım: Gecelik költürün mL'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü

	<u>1000 mL</u>
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Agar, broth ve su 2 L'lik kapta karıştırılıp otoklavlanmış ve petri kutularına 30 mL olacak şekilde aktarılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kùltür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kùltürde büyütùlmeleri

200 mL

Oxoid nutrient broth no:2

5 g

Distile su

200 mL

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilip 4 °C’de saklanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 mL

Potasyum klorür

61,5

Magnezyum klorür

40,7 g

Distile su

500 mL

Maddeler distile suda çözülmüş ve 121 °C’de 20 dk otoklavlanarak sterilize edilip 4 °C’de saklanmıştır.

0,2 M Fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 mL

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

13,82 g

0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)

14,2 g

Distile su

500 mL

Karışım pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

0,1 M β -NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

5 mL

β -NADP (F.W. 765,4)

383 mg

Steril distile su

10 mL

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

1 M Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	<u>10 mL</u>
Glukoz-6-fosfat	2,82 g
Steril distile su	10 mL

Sterilizasyon 0,22 µm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 mL</u>
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 mL
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 mL
1 M Glukoz-6-fosfat	0,25 mL
0,1 M β-NADP	2 mL
0,2 M fosfat tamponu pH=7,4	25 mL
Steril distile su	19,75 mL

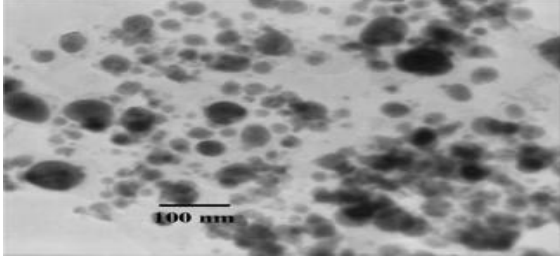
Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlanmıştır. İçerikler daima buz içinde tutulmuştur.

3.1.5 Test Maddeleri Dozları ve Hazırlanışı

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean vd. (1985)'e göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 mL top agara 0,1 mL bakteri kültürü ve 0,1 mL değişik konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden ilave edilmiştir. Öncelikli olarak maddelerin 0,1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

Elde edilen verilerden sonra deneyde kullanmak üzere Bizmut (III) oksit için test bileşiklerinin 625 µg/plak, 1250 µg/plak, 2500 µg/plak, 5000 µg/plak, 10000 µg/plak konsantrasyonları, İndium tin oksit için test bileşiklerinin 12,5 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak, 75 µg/plak, 100 µg/plak, 125 µg/plak ve 150 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır. Araştırmanın materyali olan bu nanomateriyaller Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan nanomateryallerin genel özellikleri

Kimyasal adı	Parçacık boyutu ve TEM (Transmission Electron Microscopy) görüntüsü	Safılık derecesi %
Bizmut (III) oksit (Bi_2O_3)		% 99,5
İndium tin oksit [$\text{In}_2(\text{SnO}_2)$]		% 99,99

3.2 Metod

Bu çalışmada, test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, mikrozomal fraksiyonun hazırlanması ve Ames/*Salmonella*/mikrozom testi Maron ve Ames yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

3.2.1 *Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nden getirilen bakteri plakları HBA plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'de 48 saat inkübasyonda bekletilmiştir. Daha sonra iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 mL nutrient broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/biyotin/ampisilin agar (HBA) üzerine çizgi ekim yapıp plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar +4 °C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

3.2.2 *Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 mL bakteri kültürü ve 90 µl DMSO eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1-2 yıl süre ile tazeliklerini korur.

3.2.3 Salmonella Suşlarının Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması

TA98 ve TA100 suşları için, master plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 mL nutrient broth ve 63 µL ampisilin içerisinde süspanse edilmiş ve 140 rpm'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze kültür hazırlamak için 16 saatin sonunda bu kültürlerden 500 µL alınıp 20 mL nutrient broth ve 63 µL ampisilin içerisinde süspanse edilmiş ve 110 devir/dk'da kullanımına kadar inkübasyonu sağlanmıştır.

3.2.4 Salmonella Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması

Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin minimal glukoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'de, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

uvrB Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp nutrient agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plakın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm. yüksekte 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri

öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir.

Rfa Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'da bir gece büyütülen 0,1 mL sıvı kültür, 45 °C su banyosunda tutulan 2,5 mL top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0,1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kâğıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R-faktör Varlığı Kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (%0,8 Ampisilin/0,02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler.

Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA98 için 20-50 revertant/plak; TA100 için 75-200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C'de, NB'da

büyütülen bir gecelik kültürden 0,1 mL alınıp, 45 °C'deki su banyosunda tutulan 0,25 mL 0,5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2,5 mL top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

3.2.5 Sıvı Kültürün mL'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün mL'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 mL nutrient broth içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon işleminden sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 110 rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gecelik kültürden 100 µL alınmış ve 20 mL NB bulunan erlen içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde bir dizi sulandırmaları hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µL'lik miktarlarda alınarak 45 °C'deki su banyosunda tutulan 2,5 mL top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 mL'sinde $1-2 \times 10^9$ mL/bak. olması öngörülmektedir.

3.2.6 Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean vd. (1985)'e göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 mL top agara 0,1 mL bakteri kültürü ve 0,1 mL değişik konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden ilave edilmiştir. Öncelikli olarak maddelerin 0,1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

3.2.7 Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması

Ames test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7,4 ve bu karışımın her mL'si için 0,04 mL derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresince buz içerisinde saklanmıştır.

3.2.8 Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır.

S9'suz (-) Deney

Bu işlem için, içlerine 0,25 mL histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2 mL'lik top agar içeren deney tüpleri 45 °C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0,1 mL test maddesi ve 0,1 mL 5 saatlik taze bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37 °C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrillerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak iki bağımsız deney yapılmış ve sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (H₂O) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA100 suşu için 0,1 µg/µL sodyum azid (NaN₃), TA98 suşu için ise 2 µg/µL 4-nitro-o-fenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

S9'lu (+) Deney

Plak inkorporasyon testinde, test bileşiği, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak minimal glikoz agarlı plaklara dökülmüştür. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat

inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his⁺ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır.

Bu yöntemde, 0,25 mL histidin biyotin eklenmiş 45 °C'deki 2,5 mL'lik top agara, test suşu kültüründen 0,1 mL, test edilecek kimyasaldan 0,1 mL ve S9 karışımından 0,5 mL eklenip düşük hızda 3 saniye vorteksenerek oda sıcaklığındaki minimal glikoz agarlı plaklara yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme, yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgülüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen olarak TA100 suşu için 0,05 µg/µL 2-Aminoanthracene (2AA), TA98 suşu için 2 µg/µL 2-aminofluorene (2AF) kullanılarak rutin olarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi SPSS 15.0 for Windows paket programında DUNCAN çoklu karşılaştırma Testi ile yapılmıştır.

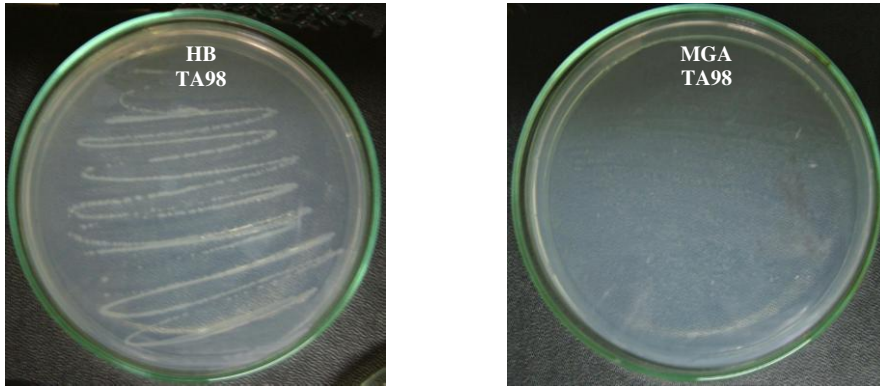
4 BULGULAR

Bu çalışmada sanayinin çeşitli alanlarında sıklıkla kullanılan 2 çeşit nanomateryalin (Bizmut (III) oksit ve İndium tin oksit) mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda araştırılmıştır.

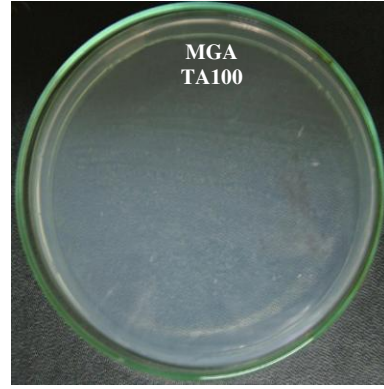
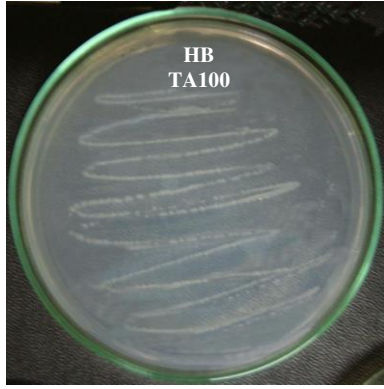
4.1 Genetik İşaretlerin Kontrolü

Çalışmada kullanılan standart test suşlarından TA98 suşunun histidin gereksinimi (Resim 4.1), TA100 suşunun histidin gereksinimi (Resim 4.2), *uvrB* mutasyonu (Resim 4.3), *rfa* mutasyonu (Resim 4.4), R-faktör varlığı (Resim 4.5) ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı (Resim 4.6) bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapıldı.

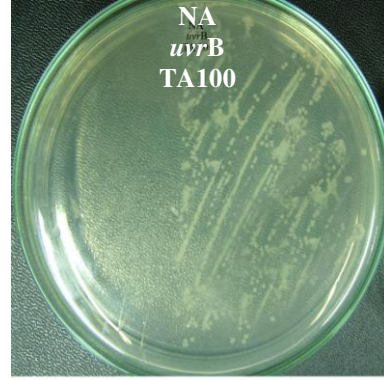
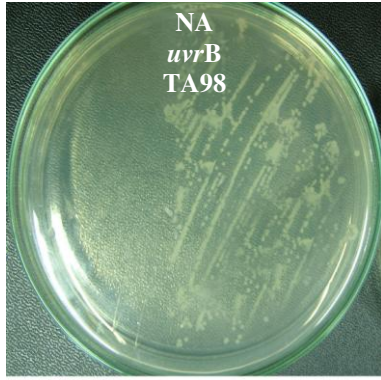
S. typhimurium ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 mL'sinde $1-2 \times 10^9$ mL/bak. olması öngörülmektedir. Yaptığımız çalışmada bu sayıya taze kültürün 5 saatlik inkübasyonu sonunda ulaşılmış ve mL'deki bakteri sayısı $1,4 \times 10^9$ olarak hesaplanmıştır.



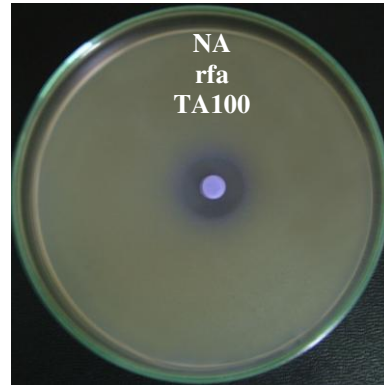
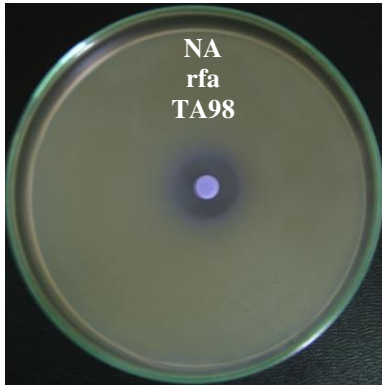
Resim 4.1 *S. typhimurium* TA98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



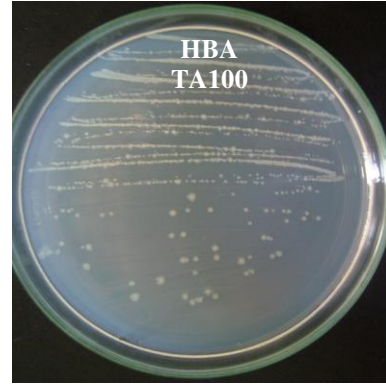
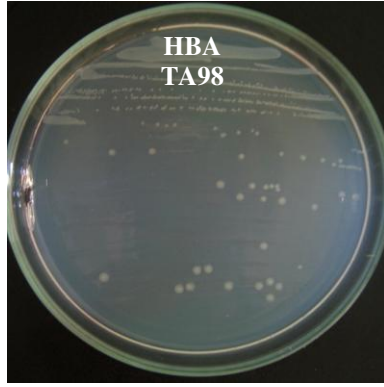
Resim 4.2 *S. typhimurium* TA100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



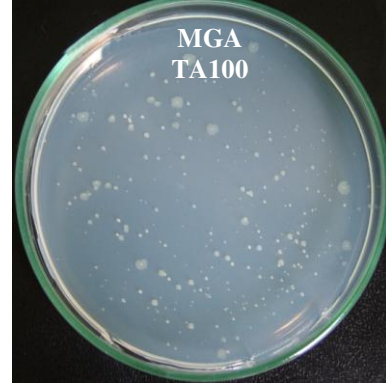
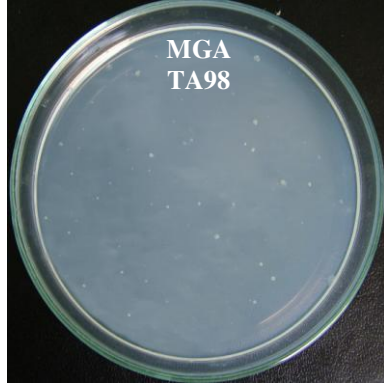
Resim 4.3 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının *uvrB* mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 4.4 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının *rfa* mutasyonu kontrolü sonuçlar



Resim 4.5 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 4.6 *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

4.2 Çalışmada Kullanılan Nanomateryallere Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan nanopartiküllerin ikisi de su içerisinde ultrasonik su banyosu kullanılarak süspansiyon haline getirilmiştir. Kullanılan nanopartiküllerin sitotoksik etki gösterdikleri dozlar belirlenmiştir. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

Kullanılan nanopartiküllerin TA98 ve TA100 suşları ile S9'lu ve S9'suz olarak plak inkorporasyon testleri yapılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve birbirinden bağımsız iki deney yapılmıştır.

Yapılan testler sonucunda elde edilen bulgulara göre, TA98 ve TA100 suşlarının da her iki nanomateryalin de tüm konsantrasyonları hem S9 karaciğer enzimi fraksiyonunun varlığında hem de yokluğunda koloni sayısını iki katına çıkaran bir konsantrasyon tespit

edilememiştir. Aynı zamanda doza bağılı olarak koloni sayısında yine bir artış bulunamamıştır. Bu sonuçlar, bu iki nanomateryalin de kullanılan tüm dozlarının bu iki suşta mutajenik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla bu nanomateryaller TA98 suşunun belirlediği çerçeve kayması mutasyonlarına, TA100'ün belirlediği baz çifti değişimine neden olan mutasyonlara sebep olmamaktadır.

Bizmut (III) oksit nanomateryalinin mutajenitesini belirlemek üzere yapılan Ames testi sonuçlarına göre bu madde, kullanılan iki bakteri suşunda da Çizelge 4.1'deki sonuçlara göre istatistiksel bir anlam ifade etmemektedir. TA98 için S9 yokluğunda bulunan en yüksek değer 625 µg/plak konsantrasyonunda $30,2 \pm 2,16$ revertant koloni ve en düşük değer 10000 µg/plak konsantrasyonunda $24,6 \pm 2,19$ revertant koloni olarak tespit edilmiştir. TA98 için S9 varlığında bulunan en yüksek değer 1250 µg/plak konsantrasyonunda $27 \pm 1,22$ revertant koloni ve en düşük değer 2500 µg/plak konsantrasyonunda $25,2 \pm 1,48$ revertant koloni olarak tespit edilmiştir. TA100 için S9 yokluğunda bulunan en yüksek değer 5000 µg/plak konsantrasyonunda $103 \pm 9,24$ revertant koloni, en düşük değer ise 2500 µg/plak konsantrasyonunda $90,8 \pm 4,76$ revertant koloni olarak tespit edilmiştir. TA100 için S9 varlığında bulunan en yüksek değer 1250 µg/plak konsantrasyonunda $195,6 \pm 6,58$ revertant koloni ve en düşük değer ise 5000 µg/plak konsantrasyonunda $144,2 \pm 7,15$ revertant koloni olarak tespit edilmiştir.

İndium tin oksit nanomateryali ile yapılan çalışmanın sonuçlarına göre yine kullanılan iki suş içinde Çizelge 4.1'de yer alan sonuçlar kontrol grubunun iki katına çıkmamıştır. Yani istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmemektedir. TA98 suşu ile yapılan çalışmada rastlanan en büyük değer S9 varlığında 150 µg/plak konsantrasyonunda $36 \pm 2,91$ revertant koloni, en düşük değer ise S9 yokluğunda 150 µg/plak konsantrasyonunda $25,8 \pm 1,64$ revertant koloni olarak tespit edilmiştir. TA100 suşu ile yapılan çalışmada ise bulunan en yüksek değer S9 varlığında 100 µg/plak konsantrasyonunda $126,2 \pm 9,2$ revertant koloni, en düşük değer ise S9 yokluğunda 150 µg/plak konsantrasyonunda $87,2 \pm 2,38$ revertant koloni olarak bulunmuştur.

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları ile yaptığımız çalışmada TA98 suşu dışında uygulanan tüm dozların S9 varlığında elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu tespiti göre kullandığımız nanomateriyallerin metabolik aktivitesi insan vücudundaki metabolik reaksiyonlardan sonra artmaktadır. Deney sonuçları standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bizmut (III) oksit nanomateriyalinin metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına göre mutajenitesi

Test Maddesi	Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama± Standart Sapma			
		TA98		TA100	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
Bizmut (III) oksit	10000	24,6±2,19a	26,4±0,89a	91,2±5,93a	150,4±10,43a
	5000	27±1,22a	25,2±1,78a	103±9,24a	144,2±7,15a
	2500	25,2±1,78a	25,2±1,48a	90,8±4,76a	185,4±7,98a
	1250	28,2±3,11a	27±1,22a	94±3,53a	195,6±6,58a
	625	30,2±2,16a	26,4±2,3a	97,4±4,15a	162±9a
Kontrol		32±3,31a	34,8±1,48a	105±7,21a	147,6±12,05a
SA	10			1646,2±112,34b*	
2AA	5				2279,2±108,72b*
2AF	200		885,6±81,15b*		
NPD	200	1380,4±114,61b*			

* Kontrole göre revertant sayısı p< 0,05 düzeyinde anlamlı, SA: Sodium azide, 2AA: 2-aminoanthracene, 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

Çizelge 4.2 İndium tin oksit nanomateriyalinin metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına göre mutajenitesi

Test Maddesi	Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama± Standart Sapma			
		TA98		TA100	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
İndium tin oksit	150	25,8±1,64a	36±2,91a	87,2±2,38a	106,4±7,36a
	125	30,4±2,07a	31,2±1,3a	90,2±4,32a	113,4±7,95a
	100	26,8±1,92a	28,2±1,92a	95,6±2,7a	126,2±9,2a
	75	30,6±2,4a	31±1a	99,6±3,91a	115,6±4,72a
	50	30,6±2,3a	35,2±2,58a	91±6,32a	119,8±8,58a
	25	30±2,64a	30±2,12a	92,4±5,31a	120,8±9,6a
	12.5	30,4±3,04a	29,2±1,64a	101,2±4,43a	105±3,67a
Kontrol		32±3,31a	34,8±1,48a	105±7,21a	147,6±12,05a
SA	10			1646,2±112,34b*	
2AA	5				2279,2±108,72b*
2AF	200		885,6±81,15b*		
NPD	200	1380,4±114,61b*			

* Kontrole göre revertant sayısı p< 0,05 düzeyinde anlamlı, SA: Sodium azide, 2AA: 2-aminoanthracene, 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda kanser ve kanserojen terimleri fazlasıyla popüler terimler haline gelmiştir çünkü dünya yıprandıkça insanların hatta tüm canlıların yaşam kaliteleri düşmeye başlamış buna paralel olarak gün geçtikçe kanserli birey sayısındaki artış gözle görülür hale gelmiştir. Bu durum insanların kanserojenler konusunda daha hassas davranmaları gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Sayıları milyonları bulan kimyasalların çok azının (20.000 civarında) kanserojenik potansiyelleri hakkında bilgimiz vardır. Geriye kalanların ve her gün listeye giren yeni sentezlenen maddelerin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekmektedir (Vural 1996).

Salmonella/mikrozom test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik potansiyellerini saptamak üzere geliştirilmiş ve çeşitli ülkelerde oldukça yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir. Çünkü bu test, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı test sistemlerinden birisidir (Maron and Ames 1983, Kaplan *et al* 2004, Watanabe-Akanuma 2005, Reid 2006, Mathur *et al* 2005, İpek *et al* 2005, Kutlu 2005).

Salmonella/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Maron and Ames 1983).

Bu çalışmada oldukça genç bir bilim dalı olan nanoteknolojinin sanayi sektöründe yer bulması sonucu birçok alanda kullanımı olan Bizmut (III) oksit ve İndium tin oksit nanomateriyallerinin mutajenik etkileri kısa zamanlı test sistemlerinden biri olan Ames testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda TA98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ortalama revertant koloni sayısı $34,8 \pm 1,48$, yokluğunda ise $32 \pm 3,31$ olarak bulunmuştur. TA100 suşu için ise bu değerler sırasıyla $147,6 \pm 12,05$ ve

105±7,21 olarak bulunmuştur. Ames'e (1973) göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA98 için 20-50 revertant/plak; TA100 için 75-200 revertant/plaktır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sayılar bu değerler arasındadır. Bu değerlerin bu derece farklı olmaları çeşitli parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Bu parametreler arasında minimal ortamın tipi, glikoz-6-fosfat, β-NADP, fosfat tamponu, glikoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrillerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabiliriz (Boath *et al* 1980, Belser *et al* 1981).

Bizmut (III) oksit nanomateryalinin TA98 suşu ile S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda yapılan çalışmada maddemizin hiçbir konsantrasyonu geri dönüşüm sayılarını aşmadığından bu madde TA98 suşu üzerine doğrudan mutajenik etki göstermemiştir. Bu madde ile yapılan çalışmada en yüksek değer S9 yokluğunda 625 µg/plak konsantrasyonunda 30,2±2,16 revertant plak, en düşük değer ise 10000 µg/plak konsantrasyonunda 24,6±2,19 revertant plak olarak bulunmuştur. TA100 suşunda ise deney S9 fraksiyonu varlığı ve yokluğunda yapılan ve elde edilen ortalama revertant koloni sayıları, kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değerlerine yakın bulunmuştur. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 1250 µg/plak konsantrasyonunda 195,6±6,58 revertant koloni, en düşük değer ise S9 yokluğunda 2500 µg/plak konsantrasyonunda 90,8±4,76 revertant plak olarak bulunmuştur.

İndium tin oksit nanomateryalinin TA98 ve TA100 suşları ile S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda yapılan çalışmada da maddenin hiçbir konsantrasyonu geri dönüşüm sayılarını aşmamıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda TA98 suşu için en yüksek değer S9 varlığında 150 µg/plak konsantrasyonunda 36±2,91, en düşük değer ise S9 yokluğunda yine 150 µg/plak konsantrasyonlarında 25,8±1,64 revertant plak olarak bulunmuştur. TA100 suşu için ise yapılan çalışmada bulunan en yüksek değer S9 varlığında 100 µg/plak konsantrasyonunda 126,2±9,2, en düşük değer ise S9

yokluğunda 150 µg/plak konsantrasyonunda 87,2±2,38 revertant plak olarak bulunmuştur.

Kullandığımız bu iki nanomateriyal için yapılan literatür taramasında mutajenik etkisine dair bir araştırmaya rastlanmamıştır. Daha önce de belirtildiği gibi parçacıkların nanoboyutlarının işlevlendirilmesi veya kullanılması yeni yeni gün yüzüne çıkan çalışmalardır. Dolayısıyla bu materyaller ile ilgili toksisite çalışmaları yetersizdir.

Yaptığımız çalışmada çözücü olarak su kullanılmıştır. Nanomateriyallerin çözünürlüğüne bakıldığı zaman büyük çoğunluğunun suda çözünmediğini görmekteyiz. Bununla alakalı olarak yapılan bir araştırmada TiO₂ ve Fe₃O₄ nanotozlarının suda çözünürlüklerinin düşük olması nedeniyle test çözeltileri sonikasyon banyosunda tutularak nanoparçacıkların çözelti içinde dağılımı sağlanmıştır. 30 d'lık sonikasyonun ardından nanoparçacık çözeltileri bulanık bir yapı göstermişlerdir. Çözeltilerin kararlı yapıda olmaması nedeniyle 24 saat içinde parçacıklar tortular oluşturarak dibe çökmüşlerdir (Baykal 2010). Çalışmamızda buna paralel olarak nanomateriyallerin çözünürlüklerinin az olması sebebiyle maddeler su içerisinde elektronik su banyosu yardımıyla süspanse hale getirilmiştir. Nanomateriyallerin suda çözünürlüğünün olmamasının sebebinin, alüminyum oksit (Al₂O₃) nanomateriyalinin 30 nm ve 40 nm boyutlarındaki formları üzerine Balasubramanyam'ın 2010 yılında yaptığı bir çalışmada, zayıf Van der Waals kuvvetlerinin sonucu veya bireysel parçacıkların yaptığı kuvvetli bağların sonucu olabileceği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA1535, TA98, TA97 ve TA102 suşları ile çalışılmış ve alüminyum oksit nanomateriyalinin bu suşlarda S9 varlığında ve yokluğunda toksik dozuna rastlanmamıştır.

2010 yılında Yina Huang'ın yaptığı bir çalışmada poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) (PCEC) nanomateriyallerinin genotoksitesisi mikronükleus, kromozomal aberasyon testi ve Ames testi ile araştırılmıştır. Ames testi için *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşları kullanılmıştır. Sonuç olarak bu maddeler S9 varlığında ve yokluğunda genotoksik etki göstermemiştir ve ilaç bileşenleri için kullanımında güvenli bir aday olduğu açıklanmıştır.

Ames testindeki negatif sonuçların, nanomateriyallerin hücrelere nüfuz etmesindeki yetersizliğinden (Landsiedel *et al* 2009; Nabeshi *et al* 2011, Doak *et al* 2012), test suşlarının oksidatif DNA hasarına duyarsızlığı (Li *et al* 2012) veya büyük ölçekli DNA hasarına sebep olan genotoksinlerin tespit edilememesi (Doak *et al* 2012) nedenleriyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

1997 yılında Yuzuki Nakagawa ve arkadaşlarının TiO₂ nanopartikülü ile yaptığı genotoksisite çalışmasında ise TiO₂ nanopartikülünün UV/vis ışınları olmadan zayıf genotoksisite sergilediği, UV/vis ışık ışınlama varlığında ise kardeş kromatit ve kromozom aberasyon testlerine göre yüksek genotoksisite sergilediği gösterilmiş ve sonuç olarak TiO₂ nanopartikülünün fotogenotoksik olduğu açıklanmıştır. Warheit (2007) sırasıyla yaptığı Ames ve kromozomal aberasyon deneylerinde ultrafin TiO₂ partiküllerinin mutajenik ve klastojenik olmadığını ileri sürmüştür.

Rie Yoshida ve arkadaşlarının (2009) yaptığı suda çözünür ZnO nanopartikülünün Ames testi ile genotoksisitesinin değerlendirilmesi deneyinde *Salmonella typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları ve E. Coli suşu WP2uvrA⁻ bakterisi kullanılmıştır. S9 bulunan ve bulunmayan paralel deneylerde tüm sonuçlar genotoksisite adına negatif çıkmıştır.

Nanomateriyallerin genotoksisitesi hakkında yapılan çalışmalar son yıllarda artmakta ve bu konu su yüzüne çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bizmut (III) oksit ve İndium tin oksit nanomateriyallerinin genotoksik aktivitelerinin Ames testine göre genotoksik çıkmaması diğer kısa zamanlı mutajenite test yöntemleriyle de desteklenmelidir. Çünkü bu maddeler farklı dış etkenlere maruz bırakıldıklarında farklı genotoksik aktiviteler gösterebilmektedir.

6 KAYNAKLAR

- Abamor, E. Ş. (2010). Gümüş (Ag) Ve Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartiküllerinin Kütanöz Leishmaniasis Etkeni *L.Tropica* Parazitleri Üzerindeki Antileishmanial Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone, P. (1998). DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro, *Mutat Res.* **429**: 239-248.
- Albertini R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **463(2)**: 111-72.
- Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. (1973b). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., **70**: 782-786.
- Ames, B.N. (1972). A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens, in: Sutton, E.H. and Harris, I.M., (Eds.), *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants Academic Press*, New York., 57-66.
- Ames, B.N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer, *Science*. **204**: 587-793.
- Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Research*, **113**:173-215.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. (1973a). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., **70**: 2281-2285.
- Anonim. (2009). <http://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon>.

- Arı, E. (1998). Ames/*Salmonella*/mikrozom ve Ames-Fluktasyon Test Yöntemleri ile Kinoksalin Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ateş, A. (2002). *Moleküler Biyoloji*, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, **9**: 113-121.
- Asal, S. (1983). Türkiye’de yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin mutagen etkilerinin *Salmonella typhimurium* histidin mutantlarıyla saptanması üzerinde araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Ankara.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Hussain, S.M. and Grover, P.(2010). In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using *Salmonella*/microsome assay. *Toxicol In Vitro*, September, **24(6)**: 1871-6.
- Bahçeci, Z. (2002). *Moleküler Biyoloji*, Gazi Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, Ankara, **10**: 209-216.
- Bağcı, H. (1985). Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
- Bedir, A. ve ark. (2004). DNA Hasarı Analizinde μ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması., *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2(3)**: 97-103.
- Baykal, S. (2010). Nanomateryallerin *Tetrahymena thermophila* üzerine toksikolojik etkilerinin ekotoksikolojik yöntemlerle saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri Ana Bilim Dalı. İstanbul.
- Bilge, E. (1981). İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, Genetik, 221.
- Brumfiel, G. (2006). Consumer products leap aboard the nano band-wagon. *Nature*, 440:262.
- Bystrzejewsk, G., Golimowski, J. and Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management, *Waste Management*, **29**: 2587–2595.
- Cai, R., Kubota, Y., Shuin, T., Sakai, H., Hashimoto, K. and Fujishima, A., Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res* (1992). **52**: 2346–8.

- Cuenca, A.G., Jiang, H., Hochwald, S.N., Delano, M., Cance, W.G. and Grobmyer, S.R. (2006). Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*, **107**: 459–466.
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J. and Owen R. (2008). Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles, *Ecotoxicology* , **17**: 421-437.
- Çıracı, S. (2005). Nanoteknolojinin Doğuşu : Türkiye’ de nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik*, **8**.
- Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J.S. and Singh, N., (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res-Gen, Tox. En.* **745**: 104-111.
- Dökmeci, I. (1994). Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 364-547.
- Emerich, D. F. and Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther*, **3**:655 - 63.
- Freitas R.A. (2005). What is nanomedicine? Nanomedicine, 12–9.
- Goldman, L. and Coussens, C. (2005). Implications of Nanotechnology for Environmental Health Research, *Environmental Health Sciences, Research and Medicine*, **70**: 6-9
- Goldstain, A. (1997). Handbook of Nanophase Materials, Marcel Dekker Inc, New York.
- Griffitt, R. J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N. D., Powers, K., Taylor, D. and Barber, D. S. (2007). Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*, Dec, **1**;41(23):8178-86.
- Hu, X., Cook, S., Wang, P. and Hwang, H. (2009). In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles, *Science of the Total Environment*, **407**: 3070–3072.
- Huang, Y., Gao, H., Gou, M., Ye, H., Liu, Y., Gao, Y., Peng, F., Qian, Z., Cen, X. and Zhao, Y. (2010). Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) nanomaterials. Elsevier B.V. All rights reserved. *Mutation Research* **696**: 101–106.

- Kalaycıoğlu, A., Öner, C. (1994). Bazı bitki özütlerinin antitümör etkilerinin Ames/Salmonella test sistemi ile araştırılması, Doğa. *Turkish Journal of Botany*, 117-122.
- Kaplan, Ş., Karanfil, T. ve Kitiş, M. (2007). Nanomateryallerin Potansiyel Çevresel Etkileri, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi Yaşam Çevre Teknoloji. İzmir.
- Karabulut, S. E. (2009). Bor karbür nanopartiküllerin ve karbon nanotüplerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı. Konya.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K. and Oesch, F. (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. *Mutat. Res.* 681, 241–258.
- Lee, E.S., Gao, Z. and Bae, Y.H. (2008). Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *J. Control. Release.* **132**: 164–170.
- Lepage, M., Jiang, J., Babin, J., Qi, B., Tremblay, L. and Zhao, Y. (2007). MRI observation of the light-induced release of a contrast agent from photo-controllable polymer micelles. *Phys. Med. Biol.* **52**: 249–255.
- Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R.A., Zhang, Y., Biris, A.S., Heflich, R.H. and Chen, T. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* 745, 4-10.
- Liveri, V. T. (2006). Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, Springer Science Business Media, Inc., New York.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M. (2010). Mikroorganizmaların biyolojisi, çeviri editörü: Prof. Dr. Cumhur Çökmüş, Palme yayıncılık, Ankara.
- Mark, R., Wiesner, P E. and Bottero, J. (2007). Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials. Inc. McGraw-Hill, 231- 331.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215.
- Miller, J. C., Serrato, R. and Kundahl, G. (2004). The Handbook of Nanotechnology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Itoh, N., Tsunoda, S. and Tsutsumi, Y. (2011). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. Part. Fibre. Toxicol. 8, 1.
- Nakagawa, Y., Wakuri, S., Sakamoto, K. and Tanaka, N. (1997). The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. Elsevier Science B.V. Mutation Research **394**: 125–132.
- Nowack, B. and Bucheli, T.D. (2007). Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in The Environment. *Environmental Pollution*, **150** (1): 5-22.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, **113** (7): 823–829.
- Oberdörster, G., Stone, V. and Donaldson, K. (2007). Toxicology of Nanoparticles: A Historical Perspective, *Nanotoxicology*, **1**(1): 2-25.
- Öksüzoğlu, E. (1997). Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin *Salmonella*/mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Özer, Y. (2008). Nanobilim Ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği / Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kara Harp Okulu, Savunma Bilimleri Enstitüsü, Teknoloji Yönetimi Ana Bilim Dalı. Ankara.
- Özerol, E. (1996). Sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **3**(3): 257-275.
- Perry, P. and Evans, H.J. (1975). Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange. *Nature*. **258**: 121-125.
- Ramel, C. and Rannung, U. (1980). Short- term mutagenicity test. *Environmental Health*, **6**: 1065-1076.
- Royal Society. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>
- Sahoo, S. K. and Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov*, **8**: 1112- 20.

- Sanchez, F. and Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete – A review, *Construction and Building Materials*, **24**: 2060–2071.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Thierry G.G., Chris J. Wright and Shareen H. Doak. (2009). *NanoGenotoxicology*, The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*. **30**: 3891–3914.
- TÜBİTAK. (2004). Nanoteknoloji Strateji Grubu: Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi. Ankara, Türkiye.
- Vural, N. (1984) *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, **56**: 32-81.
- Vural, N. (1996) *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara, 344-363.
- Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L. and Sayes, C.M. (2007). Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters*, **171**: 99–110.
- Warheit, D.B., Borm, P.J., Hennes, C. and Lademann, J. (2007). Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusion of an ECETOC workshop. *Inhal. Toxicol.* **19** (8): 631–643.
- Williams, D. (2004). *Nanotechnology: a new look*. *Med Device Technol*; **15**: 9 - 10.
- Whitesides, G. M. (2003). The dright size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*, **21**: 1161- 5.
- Yoshida, R., Kitamura, D., and Maenosono, S. (2009). Mutagenecity of water soluble ZnO nanoparticles in Ames test. *The Journal of Toxicoloical Sciences*, **34** (1): 119-122.
- Yüksel, N. (1999). Sitokrom P-450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri. 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Trabzon.

7 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aykut TEPEKOZCAN

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir, 08.05.1988

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim (Telefon/e-posta) : 05056735909 aykuttepekozcan@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :	Vali Vecdi Gönül Lisesi	2005
Lisans :	Afyon Kocatepe Üniversitesi	BİYOLOJİ
	2010	
Adres :	362 Sok. No. 15 D.2 Şentunalı apt. Konak/İzmir	

