



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ

NANOTEKNOLOJİ DERSİ

**Düşük doz TiO_2 -polietilen glikol hepatosit hücreleri
Prolifrasyonu Uyarır**

Hazırlayan: ABDULHAMİD HAMSHO
Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. ÖMER AKTÜRK

KIRIKKALE

GÜZ 2016

DÖNEM PROJENİN AMACI

Bu projenin amacı düşük doz TiO_2 -PEG NP'lerine (Titanyum Dioksit polietilen glikol nanopartiküller) maruz kalmaya karşı hücresel tepkileri karakterize ve yanıtları gözlenmesi. Bu amaçla HepG2 (hepatoselüler karsinoma hücreleri) kullanıldı. TiO_2 -PEG NP'lernin hepatosit hücrelerin (karaciğer hücreleri) üzerinde etkisi göstermesi ve bu hücreler TiO_2 -PEG NPs düşük dozda maruz kaldığı zaman onun proliferasyonu uyarması. Günümüzde çok kullanılan bazı nanomalzemeler onun vücuda ya da çevreye sürekli kullanılmasıyla gelecekte çıkabilecek zararlı etkileri olabilir, bunlardan biri TiO_2 -PEG NPs. Titanyum Dioksit polietilen glikol nanopartiküller çok çeşitli endüstriyel ve tüketici ürünlerde kullanılır. Düşük doz bu maddeden HepG2 hatt hücrelerinin üzerine maruz kaldığı zaman, hücrenin proliferasyonu uyuracak ve fazla bir şekilde çoğalmasını sağlar ve böylece daha fazla düzensiz bir şekilde çoğalacak, TiO_2 -PEG NPs memelilerde intraperitoneal enjeksiyon, sindirim veya solunum sistem yoluyla aldığı anda onun hangi organlarda daha fazla derişimi artırıldı ve bu organların bu maddeye bir süre maruz kaldığında organa etkisi gözlenmesi için bu projeyi hazırlandı. Böylece nanotoksikoloji hakkında daha iyi bir şekilde bilgi sahibi olmamızı ve böyle nanomalzemeler onun toksik etkileri gösterildi.

İÇİNDEKİLER TABLOSU

DÖNEM PROJESİNİN AMACI.....	ii
İÇİNDEKİLER TABLOSU.....	iii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖRNEK ÇALIŞMA (MAKALE).....	2
2.1. Makale Özeti.....	2
2.2. Makale Malzeme ve Metotlar.....	2
2.2.1. Malzemeler.....	3
2.2.2. Hücre kültürü.....	3
2.2.3. NPs sentezi.....	3
2.2.4. Karakterizasyon Metotları.....	4
3. SONUÇ.....	6
REFERANSLAR.....	6

1. GİRİŞ

Titanyum metali gerek fiziksel gerekse kimyasal çok fazla özellikleri vardır. Ancak elde edilmesi ve işlenmesi çok zor olduğundan özel bir kullanımı vardır.

Titanyum dioksit nanopartiküller olduğunda geniş bir alanı vardır:

- Kontrollü ilaç salım sistemleri [1]
- Antibakteriyel malzemelerinde [2]
- Kozmetik alanlarında [3]
- Elektronik [4]
- Ve katalizör olarak da kullanılır [5]

Bu yüzden TiO_2 NP'ler çok fazla metotlarda hazırlanabilir bunlardan:

- Sol-jel teknikleri [6]
- Hidrotermal yöntemler [7]
- Solvotermal yöntemler [8]

Ancak, çok fazla geniş alanlarda kullanmasına rağmen TiO_2 NP'ler toksik bir madde olarak olabilir ve insan [9], havanlar [10] ve çevreye [11] tehlike yolları açabilir.

Bunun için Koivisto [12] ve Chen [13] bir deney yapmışlar bu deneyde birkaç fare kullanmışlar birisi ağız yoluyla [14] diğeri solunum sistem [15] ve intraperitoneal enjeksiyon [16] yoluyla düşük doz TiO_2 NP'ler verilmiş.

Ağız yoluyla alınan TiO_2 NP'ler en fazla depolanan organ karaciğerdi, solunum yoluyla en fazla akciğerde depolandı ve enjeksiyon yoluyla dalakta en fazla kütle bulundu.

Önceden çok araştırmalarda yüksek doz TiO_2 NP'ler kullanıyorlardı bu da çok riskli sonuçları yol açıyordu:

- Reaktif oksijen türleri (ROS) yüksek dozlarda üretir [17]
- DNA' da hasarı [18]
- Apoptosis yol açar [19, 20]
- Enflamasyon [21]
- Ve farklılaştırma [22]

Bu yüzden yüksek dozda TiO₂ NP'ler araştırmaları çok fazla yapılmadı ve düşük dozda araştırmaya başladı ve şimdiye kadar çok fazla tehlikeleri ve zararları belli değildir.

Bizim projemiz PEG (polietilen glikol) TiO₂'nin yüzeyini kaplamak için kullanmış. PEG polieter bileşiğidir güvenli ve biyouyumluluk gösteren bir polimerdir. PEG, TiO₂ NP'lerin kaplanınca TiO₂ NP'in sitotoksiği azaltması ve biyouyumluluğu artması sağlar.

PEG Kullanma alanları:

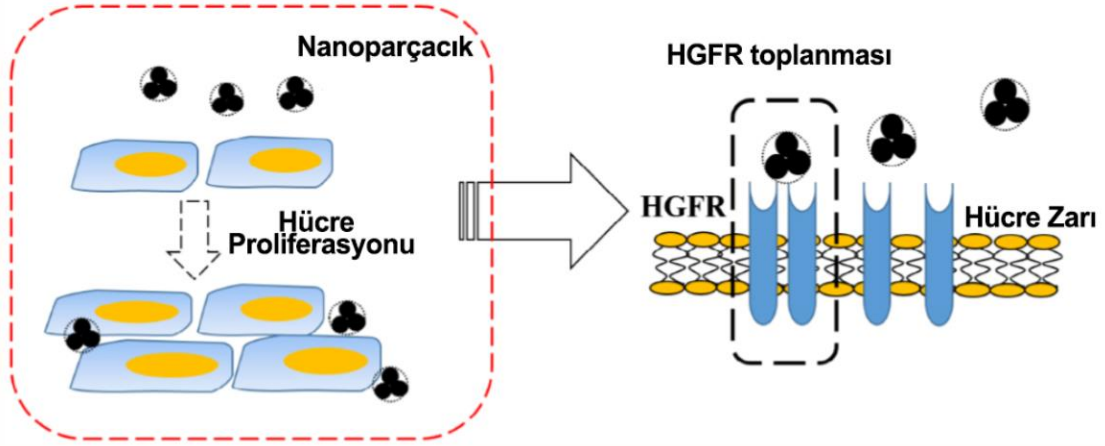
- Medikal alanlarda [23]; kolonoskopi, protein ilacı, ilaçlarda vs.
- Kimyasal alanlarda [24]; sulu ve sulu olmayan ortamlarda çeşitli yüzeyler için kaplama olarak, gaz kromatografisi için durağan faz olarak kullanılır vs.
- Biyolojik alanlarda [25]; Plazmid DNA izolasyonu ve protein kristalleřmesi için bir çöktürücü olarak, gen terapi vektör olarak vs.
- Ticari alanlarda [26]; cilt kremlerde

2. ÖRNEK ÇALIşMA (MAKALE)

2.1. Makale Özeti

Bu çalışmada 100 nm TiO₂- PEG NP'lerin düşük konsantrasyonu HepG2(hepatoselüler karsinoma hücreleri) hücrelerin üzerinde etkisi gözlenmiştir, HepG2 düşük doz (<100 µg ml⁻¹) TiO₂- PEG NP'lerden maruz kaldığında hücrelerin proliferasyonu önemli ölçüde arttırıldı, bu sonuçlar hücre sayı ve hücre döngüsü analizi ile ispat edildi. HepG2 hücrelerin TiO₂- PEG NP'lere düşük doz maruziyeti ile hücrenin çoğalması nedenini belirlemek için hücresel alım testi gerçekleştirildi, sonuç şöyle çıktı: hücreler maruz kaldığında hücresel alımı azaltıldı ve NP'lerin sitotoksiği azalmasına neden oldu. Bu yüzden TiO₂- PEG NP'lerin hepatosit büyüme faktör reseptörlerin(HGFRs) üzerinde etki etmesini varsaydık. İmmünofloresan boyama işlemi ve konfokal mikroskopi vasatisiyle HGFRs hücrenin dış yüzeyinde yerleşmesi belirlendi. Sonuç şöyle çıktı hepatosit hücreleri TiO₂- PEG NP'ler maruz kaldıktan sonra hücrelerin HGFRs'inin toplandığını gözlendi. En sonunda, sonuç olarak TiO₂- PEG NP'lerin HepG2 hücrelerin HGFRs'nin toplandığını ve

hücrelerin proliferasyonu desteklenmesinin potansiyele sahip olduğunu ve TiO_2 NP'lerin yüzeyini polietilen glikol ile kaplandığında NP'lerin sitotoksliğini azaltması gözlemlendi, ve hücrelerin TiO_2 - PEG NP'ler maruz kaldığında hücrelerin yanıtları göz altına alındı.



Şekil 1. HEPG2 hücrelerin TiO_2 - PEG NP'lere maruz kaldığında HGFRs reseptörlerin toplanması ve hücrelerin çoğalması artar

2.2. Makale Malzeme ve Metotlar

2.2.1. Malzemeler

- HepG2 hepatosit karsinoma hücrelerin hattı
- DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) ve HFBS (heated fetal bovine serum) hücrelerin kültürü için
- Penisilin ve streptomisin hücre kültüründe antibakteriyel olarak
- Titanyum (IV) okside partiküller
- Nanomizer jeneratör nemli ortam ve yüksek basınç sağlıyor NPs sentezi
- Polietilen glikol- Maleik asit kopolimeri TiO_2 NPs'in kaplanması
- 4- amino- salisilik asit TiO_2 NPs'in yüzeyini PEG ile kaplanması için yardımcı olarak
- propidium iodide (PI) ve Rnase boyma çözeltisi, hücre döngüsü testi
- Fosfat tamponlu salin (PBS), HFBS, PI ve Tiyazol turuncu, Hücre alım testi

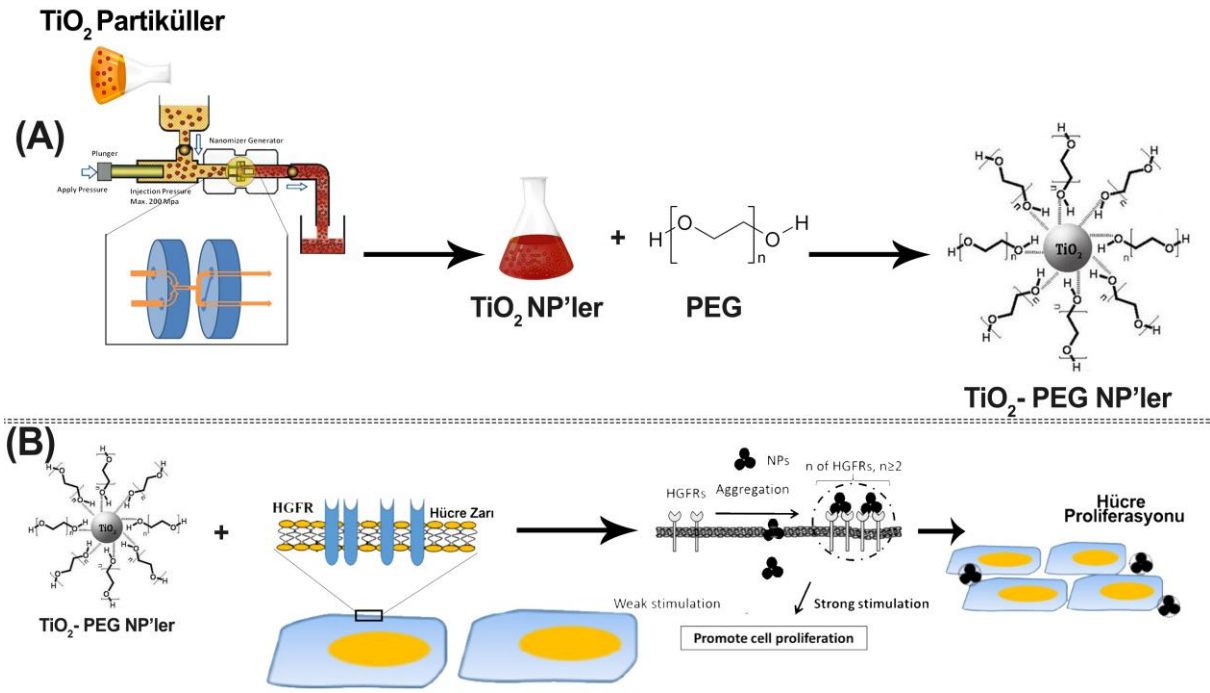
- Paraformaldehid (PFA), bovine serum albumin (BSA), goat serum ve anti-rabbit IgG, İmmünofloresans ve konfokal lazer tarama mikroskopisi için kullanılmıştır
- Deneyler için gerekli diğer malzemeler ve kimyasallar

2.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Biostat B fermentöründe fermentasyon 37 °C ve 5% CO₂ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) çözeltisinde HepG2 hücrenin kültürü yapıldı ve 10% (v/v) heated fetal bovine serum (HFBS) çözeltisi, 100 µg.ml⁻¹ of penisilin ve 10 µg.ml⁻¹ streptomisin ile tamamlandı.

2.2.3. NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ

İlk önce titanyum (IV) okside partikülleri ve 20 ml 25%(ağırlık) suda dağılmış TiO₂ partikülleri Nanomizer jeneratöründen 10 defa nemli ve yüksek basınç ortamda 200 MPa basınç altında geçerek büyükten küçülterek metotla TiO₂ nanoparçacıkları oluşturur, jeneratöründen TiO₂ partikülleri 10 defa geçtikten sonra kalan TiO₂ parçacıkları yeniden kendiliğinden toplanıyor ve oluşan TiO₂ nanoparçacıkları suda dağılmış halde kalır daha sonra TiO₂ nanopartiküllerin yüzeyini polietilen glikol kopolimer ile kaplamak üzere suda dağılmış TiO₂ NP'leri polietilen glikol maleik asit kopolimer ile 4-aminosilasik asit yardımıyla karıştırılmış. TiO₂ ile PEG son konsantrasyonu 0.5%(ağırlık) TiO₂ ve 1.5 mg/ml PEG düzenlemek amacıyla dimetilformamid (DMF) çözeltisi kullanılmıştır. Sonra 20 ml çözeltiden alındı ve 130 °C 16 saat sürede inkübe edildi ve ardından 10 dk içinde 40 °C düşük basınç altında 5 hPa kurutması tamamlandı. Bundan sonra TiO₂ -PEG NP'leri 1%(ağırlık) konstrüksiyonu hazırlamak üzere saf suda dağıldı. Böylece TiO₂ -PEG NP'leri hazır oldu.



Şekil 1. TiO₂- PEG NP'lerin sentezi anlatılıyor (A)'da sol-jel metodu ile TiO₂ NPs üretimi ve sonra PEG ile kaplanması, (B)'da HepG2 hücrelerin TiO₂- PEG NP'lerine maruz kaldığında çoğalmasının artması gösteriyor

2.2.4. Karakterizasyon Metotları

- ❖ Transmisyon elektron mikroskobu (TEM): Sentezlenen TiO₂- PEG NP'lerin boyutu ve boyut dağılımlarının bulunması
- ❖ Taramaları elektron mikroskobu (SEM): Sentezlenen TiO₂- PEG NP'lerin yüzey morfolojisi ve boyut analizi
- ❖ Elektronik ışık saçılımı (ELS): nanopartiküllerin boyutu sıvı halinde alabilme
- ❖ Hücre canlılığı analizi: Luminometre
- ❖ Hücre sayma testi: Hemositometre
- ❖ Hücre döngü ve alımı analizi: SP6800 spektral analiz cihazı ve flow sitometri
- ❖ HGFs reseptörleri toplanmasını izlenmesi: Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM)

3. SONUÇ

Bu dönem projesinde:

- ❖ TiO₂ NP'lerin sentezini anlatılmıştır
- ❖ TiO₂ NP'lerin çok fazla alanlarda kullanmasına rağmen insanlara bazı durumlarda tehlikeli olduğunu ispat edilmiştir
- ❖ Hepatosit karsinoma hücrelerin TiO₂- PEG NP'lerine maruz kaldığında proliferasyonu uyarması gösterilmiştir
- ❖ Ve HEPG2 hücrelerin sayısı 24 saat ve 48 saat TiO₂- PEG NP'lerine maruz kaldıktan sonra ne kadar artması gösterilmiş
- ❖ Hücrelerin yüzeyindeki hepatosit büyüme faktör reseptörleri (HGFRs) TiO₂- PEG NP yardımıyla toplanmasını izlenmiştir

REFERANSLAR

1. Zhang H, Wang C, Chen B, et al. Daunorubicin-TiO₂ nanocomposites as a “smart” pH-responsive drug delivery system. *Int. J. Nanomed.* 2012;7:235–242.
2. Etacheri V, Michlits G, Seery MK, et al. A highly efficient TiO₂-x C x nano-heterojunction photocatalyst for visible light induced antibacterial applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2013;5:1663–1672.
3. Tucci P, Porta G, Agostini M, et al. Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes *Cell Death Dis.* 2013;4:e549–559.
4. Nunzi F, Agrawal S, Selloni A, et al. Structural and electronic properties of photoexcited TiO₂ nanoparticles from first principles. *J Chem Theory Comput.* 2015;11:635–645.
5. Ba-Abbad MM, Kadhum AAH, Mohamad AB, et al. Synthesis and catalytic activity of TiO₂ nanoparticles for photochemical oxidation of concentrated chlorophenols under direct solar radiation. *Int J Electrochem Sci.* 2012;7:4871–4888.
6. Macwan DP, Dave PN, Chaturvedi S. A review on nano-TiO₂ sol–gel type syntheses and its applications. *J Mater Sci.* 2011;46:3669–3686.
7. Cheng WY, Deka JR, Chiang YC, et al. One-step, surfactant-free hydrothermal method for syntheses of mesoporous TiO₂ nanoparticle aggregates and their

- applications in high efficiency dye-sensitized solar cells. *Chem Mater.* 2012;24:3255–3262.
8. Mohan R, Drbohlavova J, Hubalek J. Water-dispersible TiO₂ nanoparticles via a biphasic solvothermal reaction method. *Nanoscale Res. Lett.* 2013;8:503–506.
 9. Long TC, Tajuba J, Sama P, et al. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1631–1637.
 10. Koivisto AJ, Mäkinen M, Rossi EM, et al. Aerosol characterization and lung deposition of synthesized TiO₂ nanoparticles for murine inhalation studies. *J Nanopart Res.* 2011;13:2949–2961.
 11. Wang J, Zhou G, Chen C, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 2007;168:176–185.
 12. Chen J, Dong X, Zhao J, et al. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol.* 2009;29:330–337.
 13. Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, et al. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol In Vitro.* 2011;25:231–241.
 14. El-Said KS, Ali EM, Kanehira K, et al. Effects of tolllike receptors 3 and 4 induced by titanium dioxide nanoparticles in DNA Damage-detecting sensor cells. *J. Biosens. Bioelectron.* 2013;4:5–9.
 15. Shukla RK, Kumar A, Gurbani D, et al. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology.* 2013;7:48–60.
 16. L’Azou B, Jorly J, On D, et al. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and fibre toxicology. Part Fibre. Toxicol.* 2008;5:22–35.
 17. Okuda-Shimazaki J, Takaku S, Kanehira K, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *Int J Mol Sci.* 2010;11:2383–2392.
 18. Liu X, Ren X, Deng X, et al. A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31:3063–3070.
 19. Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, et al. Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.* 2011;18:1197–1204.
 20. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW, et al. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line[J]. *Toxicol Appl Pharm.* 2009;234:222–235.
 21. Matsuda S, Hitsuji A, Nakanishi T, et al. Induction of cell death in mesothelioma cells by magnetite nanoparticles. *ACS Biomater Sci Eng.* 2015;1:632–638.
 22. Dell’Orco D, Lundqvist M, Oslakovic C, et al. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS ONE.* 2010;5:e10949–10956.
 23. Garvas M, Testen A, Umek P, et al. Protein corona prevents TiO₂ phototoxicity. *Plos One.* 2015;10:129577–129593

24. Zhang M, Ferrari M. Reduction of protein adsorption on silicon coated with a self-assembled poly(ethylene glycol) and monomethoxypoly(ethylene glycol). In: Gourley PL, editor. Proceedings SPIE; 1998; San Jose (CA). 3258; p. 15–19.
25. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1992;7:2549–2553.
26. Natali PG, Nicotra MR, Di Renzo MF, et al. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br. J. Cancer*. 1993;68:746–750.
27. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, et al. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*. 2001;85:733–741.
28. Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions: what does the cell see? *Nat. Nanotechnol*. 2009;4:546–547.
29. https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol
30. <http://www.zararlar.com/titanyum-dioksit-zararlari.html>
31. https://tr.wikipedia.org/wiki/Titanyum_dioksit