



**Fe₂O₃ NANO- VE MİKRO-PARTİKÜLLERİNİN MEMELİLERDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Tolgahan ÖZER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tolgahan ÖZER

05/07/2023

Fe₂O₃ NANO- VE MİKRO-PARTİKÜLLERİNİN MEMELİLERDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tolgahan ÖZER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2023

ÖZET

Fe₂O₃ nanopartikülleri-NP ve mikropartikülleri-MP, teşhis, hipertermi, gen taşınması ve manyetik rezonans gibi tıbbi alanlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan, kozmetik, tekstil, gıda, tarım ve savunma sistemlerinde de yararlanılmaktadır. Yaygın kullanımları nedeniyle, insanların bu partiküllere maruziyeti ve insan sağlığı üzerindeki etkileri de artış göstermektedir. Fakat bu partiküllerin sitotoksik ve özellikle genotoksik etkileri konusundaki bilgiler hem yetersiz ve hem de tartışmalıdır. Dolayısıyla, bu araştırmanın amacı, ilgili partiküllerin insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattında ve periferik lenfositlerdeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini, sırasıyla, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT), komet, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile ilk kez incelemek ve karşılaştırmaktır. MTT testinde hücre canlılığı frekansında anlamlı bir değişim gözlenmezken, lenfositlerde, hem 24 hem de 48 saatte, mitotik indekste, özellikle NP uygulamaları açısından anlamlı düşüşler gözlenmiştir. Komet testinde, bütün Fe₂O₃ NP'leri ve MP'leri, üç saatlik uygulamada, kuyruk uzunluğunu anlamlı düzeyde artırmıştır. Bazı konsantrasyonlar kuyruk yoğunluğunu da anlamlı şekilde artırmıştır. Fe₂O₃ NP'lerinin bütün konsantrasyonları (250 µg/mL hariç), 48 saatte, anormal hücre frekansını ve KA/Hücre oranını da anlamlı düzeyde yükseltmiştir. KKD testinde, bütün konsantrasyonlar ve uygulama süreleri (48 saat, 500 µg/mL hariç), KKD/Hücre oranını anlamlı düzeyde artırmıştır. MN testinde, NP ve MP'lerin sadece 250 µg/mL'lik dozunda MN frekansında anlamlı artış gözlenirken, nükleer tomurcukların frekansı, MP uygulamasında, 125, 250, ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda anlamlı artış göstermiştir. Bu sonuçlar hem NP hem de MP'lerin insan hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik olabileceğini göstermektedir. Bununla beraber, Fe₂O₃ partiküllerinin sitotoksik etkisi için diğer insan hücre hatlarında, primer hücrelerde ve genotoksik etkisi için de diğer *in vitro* ve özellikle *in vivo* testler ile daha detaylı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Bilim Kodu : 20316

Anahtar Kelimeler : Demir (III) oksit partikülleri, nanopartikül, mikropartikül, sitotoksisite, genotoksisite

Sayfa Adedi : 104

Danışman : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

GENOTOXIC EFFECTS OF Fe_2O_3 NANO- AND MICRO-PARTICLES IN MAMMALS

(M. Sc. Thesis)

Tolgahan OZER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2023

ABSTRACT

Fe_2O_3 nanoparticles-NPs and microparticles-MPs are widely used in medical treatments such as diagnosis, hyperthermia, gene delivery, and magnetic resonance imaging. They are also used in cosmetics, textile, food, agriculture and defense systems. Due to extensive use, exposing of human to these particles and their potential threat to human health is getting increasing. However, there is inadequate and controversial knowledge on the toxic especially genotoxic effects of these particles. Therefore, the present study aimed to investigate and compare cytotoxic and genotoxic effects of these particles on human breast cancer cell line (MCF-7) and human peripheral lymphocytes (HPLs) using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), comet, chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) tests, respectively, for the first time. The results have revealed that while there was no significant variation in the frequency of cell viability in MMT assay, there was a significant reduction in mitotic index in lymphocytes following 24h and 48h of NP treatment. In comet assay, all the concentrations of Fe_2O_3 NPs and MPs significantly increased comet tail lengths at 3h treatment. Some concentrations also significantly increased comet tail moment. Fe_2O_3 NPs significantly increased the frequency of aberrant cells and CAs/Cell at all the concentrations (except 250 $\mu\text{g/mL}$) at 48h. In SCE assay, all the concentrations and treatment periods of both particles (except 500 $\mu\text{g/mL}$, at 48 h treatment) increased SCEs/Cell. In MN test, while only 250 $\mu\text{g/mL}$ concentration of both NPs and MPs significantly elevated MN frequency, the frequency of nuclear buds has significantly increased at 125, 25, and 500 $\mu\text{g/mL}$ in lymphocytes treated with MPs. These results have indicated that both NPs and MPs may induce cytotoxic and genotoxic effect in lymphocytes. However, more experiment should be conducted on the cytotoxic effect of these particles using other human cell lines and primer cells. Besides, more studies should be carried out using *in vivo* genotoxicity assays.

Science Code : 20316

Key Words : Iron (III) oxide particles, nanoparticles, microparticles, cytotoxicity, genotoxicity

Page Number : 104

Supervisor : Prof. Fatma UNAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademik hem kişisel desteğini asla eksik etmeyen, hiçbir zaman hakkını ödeyemeyeceğim danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a teşekkürlerimi sunuyorum. Aynı şekilde samimiyeti ve güler yüzüyle gerektiğinde her daim danışabileceğim Sayın Hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na çok teşekkür ediyorum. Amasya Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Bilgisayar Teknolojileri Bölümü'nden Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Ece Avuloğlu Yılmaz'a da deneysel çalışmalarım ve özellikle MTT testinin uygulanmasında sağladığı büyük katkıları nedeniyle çok teşekkür ediyorum. Ayrıca, Genetik Laboratuvarı'nda araştırmalarını yürüten ve çalışmalarımda emeği geçen tüm lisansüstü arkadaşlarıma da teşekkürlerimi iletiyorum. Çalışmalarım sırasında sabrından ve her koşulda yanımda olmasından ötürü sevgili eşim Burcu ÖZER'e de en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim, Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı tarafından sağlanan 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Bu değerli burs olanakları için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkür ediyorum. Aynı zamanda bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü tarafından, FYL-2022-7510 No'lu proje koduyla desteklenmiş olup, destekleri nedeniyle Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri, Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nanopartiküller.....	3
2.2. Nanopartikül-Canlı Etkileşimleri.....	4
2.2.1. Nanopartiküllerin insan vücudundaki seyri.....	6
2.3. Genetik Toksikoloji/Genotoksikoloji.....	7
2.4. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	9
2.5. Demir Oksit Nanopartiküllerinin Genotoksitesitesi.....	9
2.6. Genotoksikolojide Kullanılan Testler.....	10
2.6.1. MTT testi.....	12
2.6.2. Komet testi.....	12
2.6.3. Kromozom anormallikleri testi.....	13
2.6.4. Kardeş kromatit değişimi testi.....	14
2.6.5. Mikronükleus-sitom testi.....	15

	Sayfa
3. MATERYAL & METOT.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Numuneler.....	19
3.1.2. Test materyalleri.....	19
3.2 Metot.....	20
3.2.1. Uygulama materyallerinin ve konsantrasyonlarının hazırlanması.....	20
3.2.2. Sitotoksisite testi.....	21
3.2.3. Genotoksisite testleri.....	22
3.2.4. İstatistiksel analizler.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
4.1. Sitotoksisite Testi Sonuçları.....	27
4.1.1. MTT testi.....	27
4.2. Genotoksisite Testlerinin Sonuçları.....	31
4.2.1. Komet testi.....	31
4.2.2. Kromozom anormallikleri testi.....	37
4.2.3. Kardeş kromatit değişim testi.....	44
4.2.4. Mikronükleus-sitom testi.....	49
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ & ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Morfoloji ve özellik bakımından NM'lerin geniş bir sınıflandırması....	4
Çizelge 4.1. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, 24 saatlik uygulamasının MTT testi sonuçları.....	27
Çizelge 4.2. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, 48 saatlik uygulamasının MTT testi sonuçları.....	29
Çizelge 4.3. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, iki saatlik uygulamasının komet testi sonuçları.....	32
Çizelge 4.4. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, üç saatlik uygulamasının komet testi sonuçları.....	34
Çizelge 4.5. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin KA testi sonuçları.....	39
Çizelge 4.6. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin KKD testi sonuçları.	46
Çizelge 4.7. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin MN testi sonuçları.....	50
Çizelge 5.1. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin DNA hasarı üzerine etkileri.....	70
Çizelge 5.2. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri.....	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Teknolojik ürünlerin biyolojik materyallerle boyut bakımından karşılaştırılması.....	3
Şekil 4.1. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının absorbands değerleri.....	28
Şekil 4.2. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	28
Şekil 4.3. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının absorbands değerleri.....	30
Şekil 4.4. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	30
Şekil 4.5. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk uzunluğuna etkisi.....	32
Şekil 4.6. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk yoğunluğuna etkisi.....	33
Şekil 4.7. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk momentine etkisi.....	33
Şekil 4.8. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk uzunluğuna etkisi.....	35
Şekil 4.9. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk yoğunluğuna etkisi.....	35
Şekil 4.10. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk momentine etkisi.....	36
Şekil 4.11. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının anormal hücre frekansına etkisi.....	40
Şekil 4.12. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KA/Hücre oranına etkisi.....	40
Şekil 4.13. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının anormal hücre frekansına etkisi.....	41
Şekil 4.14. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KA/Hücre oranına etkisi.....	41

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KKD/Hücre frekansına etkisi.....	47
Şekil 4.16. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının mitotik indekse etkisi.....	47
Şekil 4.17. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının KKD/Hücre frekansına etkisi.....	48
Şekil 4.18. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının mitotik indekse etkisi.....	48
Şekil 4.19. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin mikronükleus üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.20: Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin nükleer tomurcuk üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.21. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin ve MP'lerinin nükleoplazmik köprü üzerine etkisi.....	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. 96 kuyucuklu plaklarda 24 ve 48 saatlik MTT deney tasarımları.....	22
Resim 4.2. İzole lenfositlerde komet testi görsel değerlendirmesi.....	37
Resim 4.3. Lenfosit metafazlarında KA testi görsel değerlendirmesi.....	43
Resim 4.4. Lenfosit metafazlarında KKD testi görsel değerlendirmesi.....	49
Resim 4.5. Lenfositlerde MN-sitom testi görsel değerlendirmesi.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

cm²	Santimetre kare
Hz	Hertz
m	Metre
mA	Mili amper
mL	Mili litre
mM	Mili molar
nm	Nano molar
°C	Santigrat
pH	Hidrojen kuvveti
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
µM	Mikro molar
µm	Mikro metre

Kısaltmalar

Açıklamalar

BrdU	Bromodeoksiüridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EFSA	Avrupa Gıda ve İlaç Ajansı
EtBr	Etidyum bromür
Fe	Demir
Fe₂O₃	Demir (III) oksit
FBS	Fetal bovine serum
H₂O₂	Hidrojen peroksit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HeLa	İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı
KA	Kromozom anormallikleri
KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatit değişimi
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
Mİ	Mitotik indeks
MN	Mikronükleus
MP	Mikropartikül
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
MMC	Mitomisin-C
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NK	Negatif kontrol
NKP	Nükleoplazmik köprü
NM	Nanomateriyal
NT	Nanoteknoloji
NTM	Nükleer tomurcuk
NP	Nanoparikül
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı
Rİ	Replikasyon indeksi
ROT	Reaktif oksijen türleri
SH	Standart hata
TEM	Geçirimli elektron mikroskopisi
USEPA	Amerikan Çevre Koruma Ajansı
US-FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji (NT) ve bu teknolojinin omurgasını oluşturan nanomateriyaller (NM), insanların günlük hayatında ve çevresel alanlarda önemli bir bileşen haline gelmiştir. Günümüzde ticari olarak üretilen binlerce NT ürünü mevcuttur. Ebatları 1-100 nm arasında değişen nanopartiküller (NP) ve NP'lerden oluşan NM'ler, günümüzde birçok ev eşyasında, tıbbi uygulamalarda, farmasötiklerde, inşaat malzemelerinde, gıda ve kozmetikte, tekstil ve boya üretiminde, enerji dönüşümünde ve depolanmasında, endüstriyel ve askeri alanlarda, oyuncaklarda ve spor malzemeleri gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çok küçük yapıları nedeniyle NP'ler, hacimlerine oranla çok büyük yüzey alanına sahiptir. Bu durumda, mikron boyutlu alternatiflerine kıyasla, NP'lerin, kimyasal, yapısal, katalitik, çözünürlük, mekanik, manyetik, optik ve biyolojik açıdan oldukça farklı ve avantajlı özellikler kazanmasını sağlamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle, demir (III) oksit (Fe_2O_3) NP'leri ve mikropartikülleri (MP), başta kanser olmak üzere birçok hastalığın teşhisinde, tedavisinde ve takibinde, doku mühendisliğinde, gıda sektöründe, tarımda, atık suların geri kazanılmasında, manyetik rezonans görüntüleme, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde, elektronik, tekstil ve askeri alanlarda çokça kullanılmaktadır.

Demir (Fe) en önemli geçiş metallerinden biri olup, canlı organizmalarda biyolojik süreçlere dâhil olabilmekte ve insan vücudunda metabolik olaylara katılabilmektedir. Fe elementinin doğal süreçlerde yer almasından da yola çıkarak, Fe_2O_3 NP'leri, sergiledikleri manyetik özellikleri ve üretim kolaylığı gibi nedenlerden dolayı, biyolojik sistemlerde en çok tercih edilen metal oksit NP'lerinden biridir. Üstün özellikleri nedeniyle insan sağlığında özellikle ilâç salınımı, kanser teşhisi ve tedavisi, manyetik hipertermi, gen taşınması, biyogörüntüleme kontrast artırımı ve doku onarımı gibi çeşitli biyomedikal alanlarda büyük avantajlar sağlayan Fe_2O_3 NP'lerinin toksisitesi ve özellikle genotoksisitesi konusunda, son yıllarda, bazı bilim insanlarında endişeler oluşmaya başlamıştır. Bu nedenle yapılan bir kısım araştırmalarda, bu partiküllerin toksik etkisinin olmadığı belirtilir iken, diğer araştırmalarda partiküllerin biyolojik bariyerlerden kolayca geçerek beyine, karaciğer, böbrek vb. farklı organlara ve hücrelere ulaşabildiği bildirilmektedir. Hatta mitokondri ve çekirdek ile etkileşerek hücre metabolizmasında bozulmalara, mitokondride hasara, DNA ve kromozomlarda mutasyonlara, kırıklara ve yeniden düzenlenmelere sebep olabildiği rapor

edilmiştir. Ancak, yine de bu NP'lerin genotoksitesisi ile ilgili çalışmalar, bu alandaki teknolojik çalışmaların gerisinde kalmaktadır. En önemlisi de mevcut çalışmaların sonuçlarının birbirleriyle çelişir durumda ve tartışmalı olmalarıdır.

Genotoksiste, fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanların genetik materyalde doğrudan veya dolaylı olarak hasar meydana getirme gücü olarak tanımlanmaktadır. Bu hasarlar, hücrelerdeki tamir mekanizmaları tarafından onarılmaya çalışılsa da bazen yanlış onarılabildiği gibi, bazen de hiç onarılamamaktadır. Kalıcı hasarlar yeni hücrelere veya yeni nesillere aktarılabilmekte ve zamanla çeşitli metabolik ve nörolojik bozukluklara ve hatta çeşitli kanserlere yol açabilecekleri gibi, yeni nesillere de aktarılarak, bu nesillerde genetik anormalliklerin ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

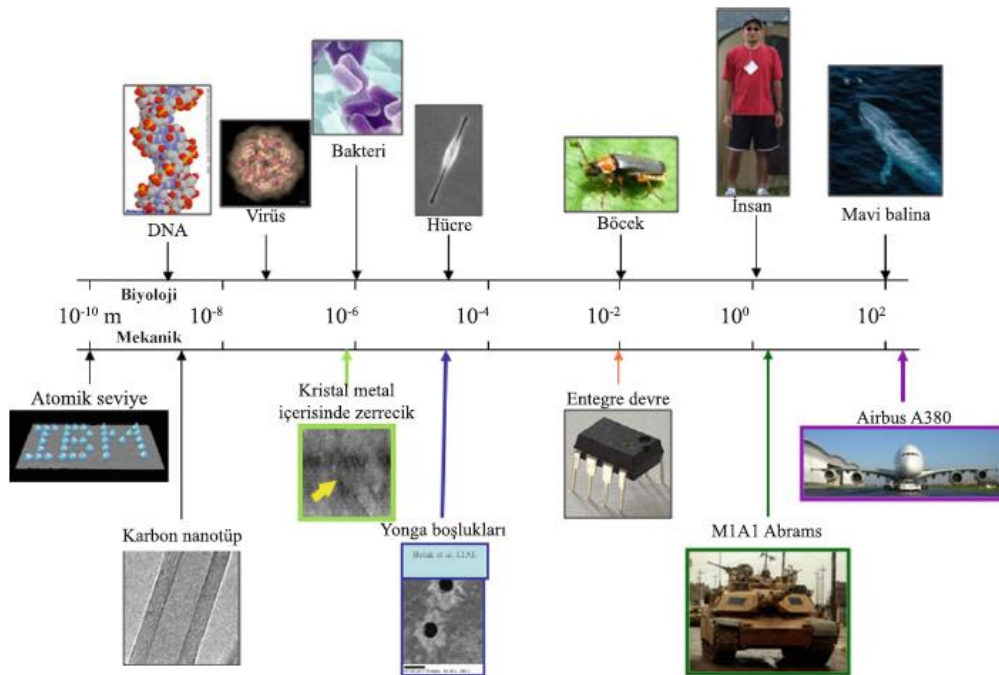
Bir yandan Fe_2O_3 NP'lerinin kullanımı ve insanların maruziyet düzeyinin giderek artış göstermesi, diğer yandan bu partiküllerin, MP'lere kıyasla sitotoksik ve genotoksik risklerinin olabileceğine yönelik bulguların olması ve ayrıca bu verilerin çelişkili olması nedeniyle, Fe_2O_3 NP'lerinin hücresel seviyedeki toksik etkilerini belirlemek amacıyla daha ayrıntılı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bütün bu sebeplerden dolayı, bu tez çalışmasında, Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattında sitotoksik etkisinin ve insan lenfositlerinde *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşmak amacıyla, MCF-7 hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) testi ve insan lenfositlerinde komet, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri uygulanmıştır. Bu çalışma, aynı tip partikülün nano- ve mikro-boyutlarının sitotoksik ve genotoksik etkilerinin, iki farklı hücre tipinde beş farklı test kullanılarak ilk kez incelenmesi ve karşılaştırılması açısından bir ilk olma özelliğine sahiptir.

Bu araştırma sayesinde, çevremizde yaygın şekilde kullanılan ve canlıların hemen her alanda maruz kalabildiği Fe_2O_3 'ün NP'lerinin ve MP'lerinin çeşitli konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin genetik açıdan herhangi bir risk oluşturup oluşturmadığı ve fiziko-kimyasal özellikleriyle toksik etkileri arasında bir ilişki olup olmadığı da tartışılmıştır. NT'nin ve bu teknolojiye kullanılan Fe_2O_3 partiküllerinin en az zararla, en güvenli şekilde kullanımı birçok sektör açısından büyük önem taşımaktadır. Elde edilen veriler, başta insan olmak üzere, doğada bulunan bütün canlıların sağlığı ve çevrenin korunması açısından da büyük önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanopartiküller

Nanoteknoloji, temel fizik/kimya alanlarındaki gelişmelerle birlikte ilerleyen, maddenin yeniden yapılandırılmasını atomik ve moleküler seviyede gerçekleştiren bir alandır [1-4]. Başka bir ifadeyle nanoteknoloji, 0,1 ile 100 nm arasındaki çok küçük ve hassas üretim, mühendislik, bilim ve teknoloji araştırmalarının tamamını kapsayan bir alandır [5-6]. Bu teknolojiyle elde edilen materyal ya da yapılar, mikron ebatlı yapılarına kıyasla birçok olağan üstü işlevler kazanmaktadır (Şekil 1.1). Partiküller nano boyuta ulaştıkça, yüzey:hacim oranları da gittikçe artış göstermekte, yüzeydeki atom oranları iç kısımlarına kıyasla artmakta, bu da yeni özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Nano boyutta yerçekimi yerine elektrostatik kuvvetler ve kuantum etkileri devreye girmektedir [7-8]. Sonuçta NP'ler fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan eşsiz fonksiyonellik, reaktivite, optik, manyetik ve elektriksel özellikler kazanmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle de tıbbi uygulamalardan çeşitli mühendislik ve askeri uygulamalara, gıda katkılarından kozmetik, tekstil, elektronik ve uzay endüstrisine, tarım ilaçlarına ve suların arıtılmasına kadar pek çok alanda tercih sebebi olmaya başlamıştır.



Şekil 1.1. Teknolojik ürünlerin biyolojik materyallerle boyut bakımından karşılaştırılması [9].

NT, çeşitli NM'lerin sentezini ve geliştirilmesini de sağlar. NM'ler, yapısal ve bileşimsel özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılabilir (Çizelge 1.1). Bu sınıflandırmalar, NM'lerin belirli uygulamalara yönelik özelliklerini belirlemede ve farklı alanlarda kullanımlarını açıklamada önemli bir rol oynamaktadır. Böylece NP'lerin, özellikle partikül boyutu, yüzey alanı, yüzey reaktivitesi, yükü ve şekli gibi benzersiz özellikleri tespit edilmekte ve kullanılabilir [10-11].

Çizelge 1.1. Morfoloji ve özellik bakımından NM'lerin geniş bir sınıflandırması.

Nanomateriyal	Morfolojisi	Özelliği	Yorum
Diskrit nano materyaller	Partiküller, ipçikler	Geniş yüzey alanı modifikasyonları	Potansiyel olarak sağlığa zararlı
Nano boyutlu cihazlar	İnce filmler ve teller	İşlevselleştirmeler, elektriksel/termal özellikler	Yarı iletken fabrikasyon
Nano kristaller ya da nano yapılar	Minimum mm ³	Mekanik ve yapısal uygulamalar	Diskrit nano materyallerden veya Nano boyutlu cihazlardan da yapılabilir

Nanopartiküller, fiziksel, kimyasal ya da son yıllarda biyolojik (yeşil sentez) yollarla sentezlenmektedir. Üretilen nano yapıların belirli bir büyüklüğe ve özel bir morfolojiye sahip olmaları hedeflenmektedir. Klasik yöntemlerle üretilen NP'lerden kaynaklanan bazı toksik etkilerin yüzeye yapışan bazı toksik kimyasallar ve sentez yöntemleriyle ilişkilendirilmesi nedeniyle son yıllarda kimyasal yöntemlere alternatif olarak çevre dostu ve biyolojik yöntemlerde; mikroorganizmalar [12-15], enzimler [16], mantarlar [17-18], bitkiler ve bitki özleri [15, 19-20] kullanılabilir [15, 19-20] kullanılabilmektedir.

2.2. Nanopartikül-Canlı Etkileşimleri

Nanopartiküllerin sentezinde, kullanımında, nakliyesinde veya imha etme aşamalarında, canlı organizmalarla ve sonuçta doğayla doğrudan ya da dolaylı etkileşimleri kaçınılmazdır. Kullanım alanı her geçen gün genişleyen NP'lerin, özellikle sağlık alanında, gıda katkı maddelerinde, kozmetikte, tekstilde ve remediasyonlarda yaygın kullanımı, başta insan olmak üzere, bitkiler, hayvanlar ve hatta mikroorganizmaların bu partiküllerle doğrudan veya dolaylı olarak etkileşimine sebep olmaktadır.

Yapılan birçok araştırmada, mühendislik ürünü olan partiküllerin, bina cephelerinden akan suda, atık su arıtma tesislerinin dibinde, nehirlerde, çamurlarda ve toprakta tespit edildiği bildirilmiştir [21-24]. Ayrıca, partiküllerin atıklarının ve yan ürünlerinin karasal veya sucul ortamlara yayılmasıyla bütün canlılar ve doğa, istenmeden de olsa değişik sıklıklarda ve farklı düzeylerde etkilenmektedir [25-28].

Nanopartiküller, canlıların vücuduna temas yoluyla veya soluma yoluyla girerek hücrelerin içerisine, çekirdeğe ve mitokondriye kadar ulaşabilmektedir. Eğer solunursa, sinir sistemine, özellikle koku duyusuyla ilişkili epitel dokuya ulaşmaktadır. NP'ler ayrıca, akciğere, karaciğere, beyine, dalağa, kana, kemik iliğine, kalbe ve lenf nodlarına da ulaşabilmektedir. Bu maruziyetler sonucu inflamasyon, oksidatif stres ve antioksidan sistemler tetiklenebilmektedir [29-30]. Sadece NP'ler değil, MP'ler de endüstriyel ve tıp alanlarında kullanıldıkları gibi, çevresel remediasyonlarda oldukça fazla tercih edilmektedir [31-34]. Ağır metalleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla kullanılan MP'lerin genotoksik riskleri de beraberinde getirebileceklerine yönelik bulgular mevcuttur. Birden fazla çevresel faktörün varlığında, NP'lerin ve MP'lerin, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileri de önemli ölçüde değişebilmektedir [35-36]. Bu değişiklikler, biyoyararlanımlarını (organizmalar veya hücreler tarafından kullanılabilirliklerini) ve toksisitelerini büyük ölçüde etkileyebilmektedir [37].

Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerde meydana getirdiği toksik etkilerin en önemli sebebinin, oluşturdukları reaktif oksijen türlerinden (ROT) kaynaklandığı belirtilmektedir [38-39]. Yüksek ROT seviyesinin sonucunda hücrede oksidatif strese artış gerçekleşmektedir. Artan oksidasyon düzeyleri, lipid peroksidasyonuna, hücre ve çekirdek zarlarında tahribata, deoksiribonükleik asitte (DNA) oksidasyona ve sonrasında DNA'da kırıklara sebep olabildiği gibi, gen transkripsiyonunu engelleyerek, gen ürünü olan proteinleri okside ederek, sinyal yollarını engelleyerek birçok hücresel fonksiyonu da bozabilmektedir. Oksidatif stresin daha da fazla artış gösterdiği durumlarda ise hücrelerde nekrotik ve apoptotik süreçlerin ortaya çıktığı gözlenmektedir [40-42].

Yapılan araştırmalar, partiküllerin üretiminde kullanılan malzemeler kadar, bu partiküllerin boyutları ve yüzey modifikasyonlarının da toksik etkilerinde önemli rol oynadığını göstermektedir [43-44]. Özellikle Al Faraj ve arkadaşlarının (2015) yürüttükleri karşılaştırmalı çalışmalarda olduğu gibi, partiküllerin fiziko-kimyasal karakteristiklerinin

genotoksiteleri üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiş olduğundan, kimyasal ya da doğal olarak üretilen NP'lerin/MP'lerin karakterizasyonlarının da iyi bilinmesi gerekmektedir [45]. Bu nedenle, NP'ler, kullanım alanları ve amaçları dikkate alınarak farklı ebatlarda, şekillerde, yüzey modifikasyonlarında olacak şekilde üretilmekte ve daha sonra karakterizasyonları yapılmaktadır. Sonuçta, farklı özelliklere sahip olan bu partiküllerin hem toksik etkileri hem de toksisite mekanizmaları farklılıklar gösterebilmektedir [46-48].

2.2.1. Nanopartiküllerin insan vücudundaki seyri

Nanopartiküller insan vücuduna soluma, yutma veya deri yoluyla giriş yapabilmektedir. Vücuda girdikten sonra vücut sıvısı, şekerler ve lipitler dâhil olmak üzere çok çeşitli biyomoleküllerle etkileşime geçebilmektedir [49-51]. Hücreler büyük ölçüde proteinlerden ve diğer makromoleküllerden oluşmaktadır. Proteinler hücrede, hücre şeklinin ve iç yapısının oluşması, gerekli ürünlerin üretilmesi, atıkların atılması ve hasarların onarılması gibi birçok hayati fonksiyondan sorumludur. Proteinler ayrıca hücre dışından sinyalleri almakta ve hücreye yanıtı harekete geçirmektedir. Bu nedenle, proteinlerin normal işleyişleri tüm hayati hücresel faaliyetler için gereklidir. Doğru moleküler konformasyon ve uygun ortam, proteinlerin amaçlandığı gibi çalışması için çok önemlidir. Konformasyonel yapıdaki küçük değişiklikler bile proteinin işlevini değiştirebilmekte veya yok edebilmektedir. NP'ler, hücre sinyalizasyonuna müdahale edebilmekte [52-53] veya proteinlerle etkileşime girebilmektedir [54-56]. Etkileşimler sonucu ortaya çıkan konformasyonel bozukluklar ciddi hastalıklara yol açabilmektedir [57].

Genetik materyal olan DNA, NM'lerin potansiyel toksikolojik risklerinin değerlendirilmesinde ana molekül olarak odak konusu olmuştur. Bazı çalışmaların, NP'lerin çekirdek zarından geçebildiklerini ve DNA'ya ulaşabildiklerini yayımlamalarından sonra, bu partiküllerin genotoksiteleri dikkatli ve detaylı biçimde araştırılmaya başlanmıştır [58-60]. Ancak ilgili çalışmalarda, hangi NP'nin hangi parametresinin genotoksik açıdan zararlı etki oluşturduğu konusunda net ve genel bir sonuca ulaşılammıştır. Ayrıca, NM'lerden kaynaklı olası DNA hasarının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Doğrudan etkileşim ve/veya elektrokimyasal etkileşim dışında [61-62], ROT'un DNA hasarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bu açıklama, partiküllerin mutlaka çekirdeğe ulaşması gerekmediği, oksidatif stres yoluyla da genotoksiteyi tetikleyebileceklerini ifade etmektedir [63-65].

2.3. Genetik Toksikoloji/Genotoksikoloji

Toksikoloji, zehirlerin canlı organizmalar üzerindeki doğasını, yan etkilerini, tespit ve tedavi yöntemlerini inceleyen; tıp, eczacılık, kimya ve biyoloji alanlarını kapsayan bir bilim dalıdır [66-67]. Genotoksikoloji de toksikolojinin bir alt dalı olup, normal biyolojik işlevler esnasında ortaya çıkan ürünlerin veya eksojen fiziksel, kimyasal veya biyolojik etmenlerin DNA molekülünde oluşturduğu gen mutasyonlarını, kırıkları, eklentileri veya kromozom anormalliklerini incelemektedir. DNA molekülünde mutasyonlara sebep olan ve mutajen olarak adlandırılan ajanlar, etkilerini direkt gösterebildikleri gibi gen ürünü olan proteinlere bağlanarak veya onların fonksiyonlarını değiştirerek/engelleyerek dolaylı biçimde de oluşturabilmektedir [68].

Genetik materyaldeki veya hücresel işlevlerdeki hasarlar, hızlı ve doğru biçimde onarılmaz ise DNA dizisi ve diğer hücresel olaylar değişmekte ve sonuçta metabolik hastalıklara, doku hasarına, infertiliteye, kansere ve hatta gelecek nesillere aktarılabilecek genetik hasarlara yol açmaktadır [69-70]. Bu nedenle, son yıllarda insan sağlığı ve geleceği açısından önemli bilgiler sağlayan genetik toksikoloji alanında yapılan araştırmalarda büyük artışlar gözlenmektedir.

Genotoksisite, bir maddenin güvenlik değerlendirmesi süreci boyunca fazlasıyla ilgi gerektiren, önemli bir toksikolojik son noktadır. İnsanların veya diğer canlıların maruz kaldığı/kalabileceği bazı ajanların potansiyel tehlikelerinin tanımlanması için bazı güncel *in vitro* ve *in vivo* testler kullanılmaktadır. Genetik toksikoloji testleri, bazı fiziksel ve kimyasal etmenlerin karsinojenik riskinin belirlenmesinde kullanılan ve bazı kurumlar tarafından da özellikle zorunlu tutulan testlerdir. Özellikle gelişmiş ülkelerde, insanların maruz kaldığı ajanların kalıtsal etkileri önemli bir kamuoyu sorunu olarak kabul edilmektedir [71-73].

In vivo yaklaşımların avantajları, çoğunlukla inflamasyon [74-76] ve oksidatif stres [77-79] yoluyla ortaya çıkan genotoksisite hakkında bilgi sağlayabilmeleridir [80]. *In vitro* testler ise, basit, ucuz ve kolay uygulanabilen testlerdir. Bu testler, ticari olarak temin edilebilen ve laboratuvarında çoğaltılabilen hücre hatlarının veya lenfositler gibi primer hücrelerin kullanılmasına imkân sağlarken, deneylerde canlı hayvanların kullanılmasını gerektirmeyerek, sonuçta 3R kuralı olarak da bilinen; Replacement (yerine koyma), Reduction (azaltma) ve Refinement (iyileştirme) terimlerinin baş harflerini kapsayan,

ilkelerin birincisine de büyük özen, önem ve sorumlulukla yaklaşmaktadır. Replacement ilkesi; “bilinci yerinde, canlı omurgalıların kullanıldığı yöntemlerin yerine geçebilecek hissiz materyallerin kullanılması” olarak tanımlanmıştır [81-83]. Bu yaklaşımların, genotoksisiteyi biyolojik olarak farklı seviyelerde incelemek için kendi özgünlükleri vardır, ancak uygulanacak her bir testin yine kendine özgü sınırlamaları da mevcuttur. Örneğin, bakterilerde uygulanan Ames ve kemirgenlerde uygulanan lenfoma analizleri veya HPRT mutasyonlarının analizi mutajenitenin saptanmasını sağlarken; komet, KA, KKD ve MN gibi diğer analizler genotoksisiteyi tespit etme özelliğine sahiptirler [80, 84-85].

Solunum yoluyla vücuda alınan 100 nm’den küçük partiküllerin, tahmin edilenden fazla düzeyde pulmoner cevap oluşturup oluşturmadığı ilk kez 1990’da incelenmiş ve yayımlanmıştır [86-87]. Çalışmalarda, nanoboyuttaki titanyum dioksit (TiO_2) ve alüminyum oksit (Al_2O_3) partiküllerinin, büyük olanlarına kıyasla sıçan akciğerinde daha fazla inflamatuvar cevap oluşturduğu belirtilmiştir. Bu makalelerde, “partiküllere maruziyet sonucunda oluşan pulmoner cevabın bu partiküllerin primer ebatlarıyla bağlantısı” ve “nanometre boyutundaki malzemelerin sıra dışı biyolojik aktivitelerinin olabileceği” beyan edilmiştir. Daha sonra, 2004 yılında, Donaldson ve arkadaşlarının, nanopartiküllerin sebep olduğu hasarları incelemek ve bu konudaki eksikliği kapatmak amacıyla toksikolojinin yeni bir alt dalı olması gerektiğini önermeleriyle birlikte “nanotoksikoloji” terimi kullanılmaya başlanmıştır. “Nanogenotoksikoloji” terimi ise, yeni nanoboyutlu partiküllerin üretildiği nanoteknoloji endüstrisindeki hızlı gelişmelerle birlikte, tasarlanan ve üretilen NM’lerin DNA ve kromozomlardaki potansiyel risklerinin ve bu riskleri artıran faktörlerin incelenmesi esnasında önerilmiştir [88-91]. İlgili terim ve bu terimi kapsayan araştırmalar, son yıllarda her geçen gün daha da fazla önem kazanmaya başlamıştır. Araştırmalar, NP’lerin hem üretiminde hem de uygulamalarında kullanılacak konsantrasyon miktarları hakkında daha fazla bilgi sağlayacaktır. Çeşitli hücre ve canlılardaki olumlu veya olumsuz etkileri konusunda detaylı bilgilere erişildikçe partiküllerin, öncelikle tıp alanında olmak üzere, pek çok alandaki uygulamaları konusunda daha büyük farkındalıklar oluşacak ve gerekli görüldüğü takdirde üretiminde ya da kullanımında yeni düzenlemeler yapılarak daha sağlıklı biçimde yararlanılması sağlanacaktır.

2.4. Nanopartiküllerin Sınıflandırması

Nanopartiküller genel olarak organik, inorganik ve karbon esaslı olarak sınıflandırılmaktadır. Dendrimer, misel, lipozom ve ferritin gibi partiküller organik NP veya dendrimer olarak gruplandırılmaktadır. Fulleren, grafen, karbon nanotüp, karbon nanofiber, karbon karası ve aktif karbon, tamamen karbon esaslı olan sınıf içerisinde yer almaktadır. Metal ve metal oksit esaslı NP'ler inorganik NP sınıfını oluşturmaktadır. Altın (Au), alüminyum (Al), bakır (Cu), çinko (Zn), Fe, gümüş (Ag), kadmium (Cd), kobalt (Co) ve kurşun (Pb) NP'leri metal grubu içerisinde yer alır iken; Al_2O_3 , çinko oksit (ZnO), maghemit (Fe_2O_3), manyetit (Fe_3O_4), seryum oksit (CeO_2), silikon dioksit (SiO_2) ve TiO_2 NP'leri ise metal oksit grubu içerisinde yer almaktadır [92-94].

2.5. Demir Oksit Nanopartiküllerinin Genotoksitesi

Yapılan birçok araştırmada, çok çeşitli ve farklı alanlarda yaygın olarak kullanılan Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin, insan ve diğer canlılarda, hücresel olaylarda ve genetik materyalde toksik etkiler oluşturabilecek, hatta ekosisteme zarar verebilecek potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. NP'lerin çok küçük yapıda olması nedeniyle, çok büyük yüzey/hacim oranı kazanması, bu partiküllerin manyetik, optik, katalitik ve mekanik özelliklerini değiştirmekte ve biyolojik sistemlerle etkileşimlerini de önemli düzeyde etkilemektedir. Özellikle metal oksit NP'lerinin, ROT oluşturabildikleri ve bu türlerin miktarındaki artışa bağlı olarak programlı hücre ölümü için gerekli sinyal mekanizmalarının aktive edildiği bilinmektedir [95-97]. ROT düşük düzeylerde olduğunda ise, yaşam mücadelesi için gerekli sinyal mekanizmalarının uyarıldığı belirlenmiştir. Diğer yandan, NP kaynaklı ROT'un, önemli transkripsiyon faktörlerini etkilediği, çekirdek DNA'sında ve mitokondriyal DNA'da mutasyonlar ve kırıklar oluşturduğu, baz modifikasyonları ve abazik bölgeler oluşturarak genom fonksiyonlarını engelleyip genomda düzensizliğe sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu durumlar aynı zamanda, histonların ve DNA'yı modifiye eden enzimlerin fonksiyonunu bozarak gen ifadelerini de etkilemektedir. Gerçekleştirilen çalışmalarda; ZnO, CuO, Fe_3O_4 , TiO_2 , Ag ve SiO_2 NP'lerine maruz bırakılan hücrelerde hücre içi ROT seviyesinde ve DNA hasarında artışın yanı sıra apoptoz da gözlenmiştir. NP'lere maruziyet sonucunda oluşan sitotoksitenin/genotoksitenin, konsantrasyona ve boyuta bağlı olarak artan oksidatif stresle yakından ilişkili olduğuna [98] ek olarak, tespit edilen önemli bir antioksidan geninde hasara sebebiyet vererek gen ifadesini de bozabildiği belirtilmiştir [99]. Bir tarafta risk

taşıdığına dair kanıtlar mevcut iken, diğer yanda, bu partiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri olmadığı yönünde bulgular da mevcuttur. Gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda; Fe₃O₄ NP'leri yüksek konsantrasyonlarda, uzun maruziyet sürelerinde kullanılarak XTT [100] ve MTT [101] testleri uygulanmıştır. Sonuçlarda anlamlı bir değişiklik elde edilmemiştir. Ek olarak, Fe₂O₃ NP ve bulk formları, yine yüksek konsantrasyonlarda ve uzun maruziyet sürelerinden sonra gerçekleştirilen komet, KA ve MN testi sonuçlarına göre, genetik hasarda anlamlı bir artış gözlenmemiştir [102]. Tüm bu bilgiler, NT alanındaki kullanımları hızlı biçimde artış gösteren Fe₂O₃ NP'lerin ve MP'lerin genotoksik açıdan riskler taşıyabileceğini, bu konuda hâlâ cevaplanmamış sorular olduğunu ve eldeki verilerin yetersiz, çelişkili ve hem de bu teknolojiye ilerlemelerin oldukça gerisinde kaldığını göstermektedir [103-108].

2.6. Genotoksikolojide Kullanılan Testler

Kimyasal maddelerin genotoksik riskleri çeşitli testlerle incelenmektedir. Bu testler, insanların kullanımına sunulacak/sunulmuş olan kimyasalların genotoksik risklerini belirlemek amacıyla Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD), Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı (US-FDA), Amerikan Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve Avrupa Gıda ve İlaç Ajansı (EFSA) gibi çeşitli düzenleyici kuruluşlar tarafından da önerilen ve uluslararası düzeyde kullanılan testlerdir. Bu testlerde gen mutasyonları, kromozomal seviyedeki kırıklar ve yeniden düzenlenmeler, bütün bir kromozomun veya kromozomal parçanın kaybı veya kazanımları gibi genetik değişimler tespit edilmektedir ki bu anormallikler insan sağlığıyla yakından bağlantılı olan anormalliklerdir. Hücre için önemli genlerin nükleotit dizisinde, ifade düzeyinde veya kromozom düzeyinde ortaya çıkan değişimler, öncelikle kanser olmak üzere, gelişimsel anormalliklere, çeşitli nörodejeneratif ve kalıtsal hastalıklara, prenatal ölümlere, infertiliteye ve hatta doğumsal sorunlara sebep olmaktadır [109-110]. Bazen de kimyasalların kendileri veya metabolik ürünleri hücre içi proteinlerle etkileşime girebilmektedir [111]. Böylece hücre bölünmesi ve hücre döngüsünde rol oynayan önemli gen ürünlerinin fonksiyonlarında bozulmalara sebep olmaktadır [112-113]. Bütün bu sebeplerden dolayı, bir kimyasalın genetik risk oluşturup oluşturmayacağını belirlenmesi bir yandan bireyin kendisi veya gelecek nesilleri için diğer yandan da doğadaki bütün canlılar ve hatta doğanın kendisi için de büyük önem taşımaktadır [114-116].

İnsanların doğrudan veya dolaylı olarak temas ettikleri yeni kimyasal maddelerin potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkileri, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* toksisite testleriyle değerlendirilmektedir. Bu testlerin kılavuzları OECD tarafından da yayımlanmış olup, ulusal ve uluslararası birçok çalışmada sıklıkla kullanılan testlerdir. OECD'nin sayfasında yer alan ilgili testler; “TG 489 *In vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay” [117], “TG 473 *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test” [118], “TG 479; Genetic Toxicology: *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells (bu kılavuz 2014'te kaldırılmış olmasına rağmen, hâlen uluslararası kaynaklarda genotoksisite çalışmalarında kullanıldığından dolayı, bu çalışmaya da dâhil edilmiştir)” [119] ve “TG 487 *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test” [120] insan kullanımına sunulacak kimyasalların test edilmesi için önerilen testlerdir. Ayrıca bu testler, EFSA [121] ve US-FDA [122] gibi çeşitli kuruluşlar tarafından önerilen ve uluslararası düzeyde kabul gören testlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ilk kez iki farklı hücre tipi (MCF-7 hücre hattı ve periferel insan lenfositleri) ve beş farklı test (MTT, komet, KA, KKD ve MN) kullanılarak oldukça detaylı biçimde araştırılması planlanmıştır. Hiçbir test tek başına, oluşan hasarları ve hasarların mekanizmasını belirlemek için yeterli olmadığından, birbirlerini tamamlayan kısa süreli farklı toksisite testleri bir arada kullanılmıştır [123]. Tüm bu testler kullanılarak, DNA'da ve kromozomlarda ortaya çıkan anormalliklerin artışıyla, çeşitli hastalıklar ve özellikle kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir [124-126]. Bu nedenle, insanların maruz kaldığı kimyasalların klastojenik ve anöjenik etkilerinin ve dolayısıyla kanser oluşturma risklerinin belirlenmesi, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında uygulanması hedeflenen tüm testler, canlıların maruz kaldığı elektromanyetik alanlar, UV ışınları, NP'ler, pestisitler, gıda katkı maddeleri, ilaç etken maddeleri gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların canlılarda oluşturabileceği genotoksik riskleri tespit etmede yaygın biçimde kullanılan, uluslararası düzeyde kabul gören ve uygulanan tekniklerdir [25, 67, 85, 127-132].

2.6.1. MTT testi

MTT testi, son yıllarda hücre canlılığının/sitotoksitesinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerin başında yer almaktadır. 1983'te Mosmann tarafından geliştirilen [133] ve sonrasında farmasötik ve antikanser ilaçların toksisitesini değerlendirmek amacıyla kullanılan bu teknik, sitotoksite testlerinin “altın standardı” olarak adlandırılmaktadır [134]. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür), sarı renkli bir formazan tuzu olup, pozitif yükü ve lipofilik yan gruplarından dolayı hücre zarından geçebilen bir boyadır [135]. Testin prensibi, metabolik olarak aktif ve proliferasyon geçiren hücrelerdeki mitokondriyal süksinat-dehidrogenaz enziminin, sarı renkli çözünbilir nitelikte MTT boyasındaki tetrazolyum halkasını parçalaması sonucunda suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmesi olayına dayanmaktadır. Bu kristalleri çözmek için izopropil alkol kullanılmakla birlikte, en yaygın kullanılanı dimetil sülfoksit (DMSO)'tir. Çözünme sonucunda oluşan formazan miktarı, kalorimetrik yöntemlerle ölçülmektedir [136]. Elde edilen değer, kültürdeki canlı hücrelerin metabolik aktiviteleriyle doğru orantılıdır. Tetrazolyum halkası sadece mitokondri tarafından kırılabilceğinden, renk değişimi sadece canlı hücrelerde gerçekleşmektedir. Hücre canlılığı ve dolayısıyla mitokondriyal fonksiyon olmadığında, hücrelerin tetrazolyum tuzunu formazana dönüştürebilme gücü de yok olmaktadır. Böylece sitotoksite, kalorimetrik olarak tespit edilmektedir. MTT, basit, hızlı ve güvenilir bir test olup, çok çeşitli hücre tiplerine uygulanabilmektedir [135].

2.6.2. Komet testi

Komet testi, fiziksel etmenlerin ve/veya kimyasal maddelerin genotoksik potansiyellerinin tespitinde özellikle son 10 yıldır yaygın biçimde kullanılan bir tekniktir. Çeşitli kaynaklarda “tek hücreli jel elektroforezi” veya “kuyruklu yıldız testi” olarak da isimlendirilmektedir [137]. Test, DNA'da oluşan tek ve çift zincir kırıklarının, oksitlenmiş bazların, alkali hassas bölgelerin ve onarılmamış hasarların gözlenmesini sağlayan hassas, basit, az maliyetli, güvenilir, hızlı ve tek hücre süspansiyonu hâline getirilebilen her hücre tipinde kullanılabilen bir testtir. Çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını hem bölünen hem de bölünmeyen, oldukça az sayıdaki hücrede belirleyebilmesi de bu testin önemli avantajları arasında yer almaktadır. Doğru hücre seçimi, detaylı inceleme ve doğru istatistik sayesinde önemli sonuçlar veren bir tekniktir [138-139].

İlk kez Rydberg ve Johnson tarafından 1978 yılında kullanılan bu test [140], daha sonra 1984 yılında, Östling ve Johanson (1984) tarafından tek hücre jel elektroforezi şeklinde geliştirilmiştir [141]. Testin çalışma prensibi, hasar gören hücrelerin agaroz tabakası arasında kalacak şekilde lam üzerine yayılması, nötral deterjan ve yüksek tuz ortamında liziz uygulanması, açığa çıkan DNA'yı gözlemlemek amacıyla nötral koşullarda elektroforez ve nötralizasyonu takiben boyama işlemine dayanmaktadır. Liziz basamağında, hücre zarı, çekirdek zarı, hücre içeriği ve histonları çözünmekte ve uzaklaştırılmaktadır. Sonuçta, nükleoit olarak adlandırılan çıplak DNA ortaya çıkmaktadır. Hasar görmüş kısa, düşük molekül ağırlıklı ve negatif yüklü DNA kırıkları, elektroforez sırasında, büyüklüklerine göre pozitif kutba doğru hareket etmektedir. Böylece, bir baş ve bir de kuyruk bölgesinden oluşan ve sonuçta kuyruklu yıldız benzeyen görüntüler elde edilmektedir. Oluşan kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk moment, DNA'da oluşan hasarın düzeyiyle bağlantılıdır [142]. Bu testin birçok avantajı bulunmakla birlikte, tekrarlanabilirliğin düşük olması ve kullanılan boyanın çoğunlukla karsinojenik olması gibi bazı dezavantajları da mevcuttur. Buna rağmen komet testi, tek başına uygulanabildiği gibi, özellikle mikronükleus testiyle birlikte geniş bir kullanımı da mevcuttur [138, 143-145].

Komet testi, son yıllarda pestisitlerin, NP'lerin, gıda katkılarının, mikotoksinlerin vb. daha pek çok kimyasal maddenin; insan lenfositlerindeki, çeşitli hücre hatlarındaki, farelerdeki, ratlardaki ve çeşitli bitki türlerindeki genotoksik risklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [146-148]. Ayrıca, zaman içerisinde geliştirilen farklı modifikasyonlarla, özellikle kanser hastalarında olmak üzere, çeşitli klinik araştırmalarda ve çevresel maruziyetin toksik etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, diyabet, böbrek hastalığı, koroner kalp hastalığı, Alzheimer ve özellikle kanser hastalığı olan insanlarda, komet testiyle tespit edilen DNA hasarının, kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir [149]. Bu nedenle, komet testiyle DNA hasarlarının tespit edilmesi, başta insan sağlığı olmak üzere, doğadaki birçok türün sağlığı açısından da önem teşkil etmektedir.

2.6.3. Kromozom anormallikleri testi

Kromozom anormallikleri testi, klastojenik (DNA üzerinde etkili olan) ajanların tetiklediği kırılma, delesyon, dublikasyon, inversiyon ve translokasyon gibi yapısal anormalliklerin tamir edilememesinden ya da yanlış tamir edilmesinden kaynaklanan veya anöjenik (iğ

iplikleri, sentromer/kinetokor veya sentriyol üzerinde etkili olan) ajanların etkisiyle oluşan sayısal kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde kullanılan, önemli ve öncü test tekniklerinden birisi ve belki de en eskisidir [150-151].

Evans (1984) tarafından geliştirilen bu test hem *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çalışlabilmektedir [152-157]. *In vitro* uygulamalarda hücreler, içerisinde mitojen (fitohemaglutinin), antibiyotik, aminoasit, vitamin, inorganik tuzlar ve diğer bileşiklerin bulunduğu, ticari olarak temin edilebilen sıvı besi ortamlarında çoğaltılmaktadır. Hücreler, bu kültürler içerisinde, genotoksitesi incelenecek olan test maddesine belli bir süre maruz bırakılmaktadır. Hücre hasadından yaklaşık iki saat önce, iğ ipliklerinin oluşumunu engellemek ve mitoz bölünmedeki hücreleri metafaz evresinde durdurmak amacıyla kolşisin vb. bir madde eklenmektedir. Takiben hücreler toplanmakta, boyanmakta ve metafaz hücreleri, KA açısından mikroskopik olarak analiz edilmektedir. KA testi, hassas ve aynı zamanda güvenilir olmasına rağmen, uygulanması oldukça zor, yavaş ilerleyen ve preparatların taranmasında deneyim gerektiren bir testtir [154-155].

Çeşitli ajanların somatik hücrelerde KA oluşturma kapasitesi özellikle kanser açısından risk teşkil etmektedir. Bu nedenle KA testi, kanser riskinin değerlendirilmesinde önemli bir biyogösterge olarak kabul edilmektedir. Somatik hücrelere ek olarak, eşey hücrelerinde oluşan genetik hasarlar, genetik hastalıklara veya üremede anormalliklere sebep olabilmekte ve bu da gelecek nesiller açısından önemli bir risk oluşturabilmektedir [158-161].

2.6.4. Kardeş kromatit değişimi testi

Kardeş kromatit değişimi testi, kromozomun iki kromatitinde birden meydana gelen DNA kırıklarının, homolog rekombinasyonla onarılmış kromozom bölgelerinin tespit edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu nedenle, KKD'ler, ekzojenler tarafından uyarılan DNA çift zincir kırıklarını göstermektedir. KKD'ler, genotoksik ajan maruziyetine cevap olarak meydana gelen kromozom karasızlığının ve dolayısıyla genotoksik potansiyelin erken biyogöstergesi olarak değerlendirilmektedir. KKD artışı, hücre canlılığında azalmaya ve hücre döngüsü kinetiğinde değişimlere sebep olmaktadır. Genelde enfeksiyonel/malign hastalıklarda, UV ışığa, kimyasallara maruziyette ve yetersiz beslenmede KKD frekansında artış gözlenmektedir. KKD, özellikle akut lösemilerde, kalıtsal bir hastalık olan Bloom sendromunda, fankoni anemisi ve kseroderma pigmentosum gibi hastalıkların klinik

tanısında önemli bir göstergedir [162-168]. KKD testi, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda birçok memeli türünde, primer hücrelerde, çeşitli hücre hatlarında ve ayrıca bazı bitkilerde de uygulanabilen bir yöntemdir [129, 169-172]. KKD testi kullanılarak çeşitli pestisitlerin [171, 173], gıda katkı maddelerinin [174-175] ve NP'lerin [129, 176] genotoksik potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Bu tekniğin son uygulanan versiyonu, Perry ve Wolff (1974) tarafından geliştirilmiştir [177]. Testin çalışma prensibi, metafaz evresindeki bir kromozomun kromatitlerinden birinin daha açık renkli boyanmasına dayanmaktadır. Kültür işlemi sırasında, ortama bir timin analogu olan 5-bromodeoksiüridin (BrdU) ilave edilmektedir. İki hücre döngüsü boyunca DNA replikasyonu esnasında BrdU'nin yeni oluşan kromozomlara dâhil olmasını takiben UV ışığa maruz bırakılması, boyanın gücünü kısmen azaltmakta ve bu bölgeler daha soluk boyanmaktadır. Sonuçta kromozomların iki kromatiti aynı renge boyanabileceği gibi, farklı renklere de boyanabilmektedir. BrdU girişi gerçekleşen ve UV'ye duyarlı yeni kromatit bölgeleri daha açık renkte görüldüğü için KKD'lerin incelenmesine imkân sağlamaktadır. Elde edilen preparatlarda, bölünme esnasında kromozomlarda oluşan renklere dayanarak, hücrelerin kaçınıcı mitoz bölünme geçirdikleri, M₁ (birinci mitoz), M₂ (ikinci mitoz) ve M₃ (üçüncü mitoz geçiren hücre) şeklinde tespit edilmektedir. M₁; BrdU'nun etkisinin henüz gözlenmediği ve bir kromozomun her iki kromatitinin de koyu renkli boyandığı fazdır. M₂; BrdU girişi gerçekleşmiş ve kromatitlerden birinin açık renkli görüldüğü ve KKD'nin incelendiği fazdır. M₃; kromozomlardan bazılarının tamamen koyu renkli ve bazılarının da BrdU girişi nedeniyle tamamen açık renkli görüldüğü evredir. KKD testi için hazırlanan preparatlarda ayrıca proliferasyon indeksi de değerlendirilebilmektedir ki bu da sitostatik etki için bir gösterge olarak kabul edilmektedir [128, 169, 178-179].

2.6.5. Mikronükleus-sitom testi

Mikronükleus, bir hücrede, ana çekirdekten daha küçük olan ayrı bir çekirdektir. MN'ler, mitoz veya mayoz bölünmeyi takiben, telofazın sonunda oluşmaya başlayan yavru hücrelerin kromozomları etrafında çekirdek zarları yeniden teşekkül ederken meydana gelmektedir. Buna göre MN testi, klastojenik ajanların sebep olduğu DNA kırıklarından ve dolayısıyla kromozom fragmentlerinden köken alan veya anöjenik ajanların sebep olduğu ve iğ ipliklerindeki anormalliklerden ya da kinekotor bölgesindeki bozulmalar sonucunda kutuplara çekilemeyerek ortada kalan bütün kromozomlardan köken alan mikronükleusların,

nükleoplazmik köprülerin (telomer sonu birleşmesi ya da DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluk biyobelirteci), nükleer tomurcukların (DNA tamir mekanizmalarındaki hasarların ya da fazla kopya sayısı bulunan DNA'nın biyobelirteci), apoptotik ve nekrotik hücrelerin, tekli, ikili ve üçlü çekirdekleri olan hücrelerin (hücre proliferasyonunun bir göstergesi) oranlarını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Genotoksisite testleri arasında en fazla tercih edilen, hızlı ve güvenilir bir uygulamadır. Farklı hücre tiplerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda uygulanabilir. Bir interfaz hücresinde, mikronükleusun “var” ya da “yok” olduğuna kolayca karar verilebilmesi, bu testin en önemli avantajıdır [131, 180-182].

Periferal kan lenfositlerinde kromozomal hasarı tespit etmek amacıyla mikronükleus oluşumlarının kullanılabileceği ilk olarak 1976 yılında Countryman ve Heddle tarafından ileri sürülmüştür. Fenech ve Morley, 1985 yılında, mikronükleus/ların, özellikle çekirdek bölünmesini yeni tamamlamış hücrelerde spesifik olarak tespit edilmesine imkân sağlayan sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) versiyonunu geliştirmiştir [183]. Aynı test daha sonra Fenech (2000) tarafından yeniden geliştirilmiştir [184]. Testin farklı uygulama yöntemleri olmakla birlikte, en yaygın kullanılan yöntemin çalışma prensibi; uygulama maddesiyle 48 saat muamele edilen hücrelere, kültürün 44'üncü saatinde sitokinezi durduran sitokalsin-B ilave edilmektedir. Böylece, sadece “bir kez” bölünme geçirmiş binükleat (çekirdek bölünmesini tamamlamış fakat sitoplazma bölünmesini gerçekleştirememiş-iki çekirdekli) hücreler değerlendirilmektedir [184].

Mikronükleus testiyle ksilitol gibi bazı gıda katkı maddelerinin [185], metidatyon, klorotiyofos gibi birçok pestisit [171, 173], Ag, TiO₂ ve amorf silika gibi çok sayıda NP'lerin genotoksik potansiyelleri [186-188], farede *in vivo* [189], insan lenfositlerinde [190] ve TK6, 3T3-L1 gibi birçok hücre hatlarında [186-188] *in vitro* olarak incelenmiştir. MN testi ayrıca, çeşitli mesleki çalışma şartlarının, çevresel ortamların, yaşam tarzlarının, belli ilâçlarla tedavilerin kişilerde oluşturabileceği genotoksik hasarı tespit edebilmek amacıyla da kullanılmaktadır [191-194].

Mikronükleus frekansındaki artışların, ileride kanser riskinde de artış oluşturması, otoimmün, nörodejeneratif ve diyabet gibi hastalıkların riskini artırması ve hatta embriyoda, yeni nesillerde doğumsal anormallik riskinde artışa sebep olması, bu testin önemini daha da artırmaktadır [195-198].

Mikronükleus frekansında artış; genotoksinlere ve iyonlaştırıcı radyasyona yüksek düzeyde maruziyetten, hücrelerde ortaya çıkan aşırı stres ve bunun oluşturduğu biyokimyasal bozulmalardan, mitoz ve mitozun genetik kontrolü için görev yapan proteinlerdeki hasarlardan, DNA tamir enzimlerindeki hasarlardan, DNA replikasyonu ve onarımında kofaktör olarak gerekli bazı mikrobelerin yetersizlik vb. sebeplerden kaynaklanmaktadır [182, 199-202].

Bu tez çalışmasının amacı, kimya endüstrisi, tıbbi, elektronik, biyo-tıp, kozmetik, gıda ve remediasyon gibi birçok alanda kullanılan ve insanların çeşitli yollarla maruz kaldığı Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin MCF-7 hücrelerinde ve insan lenfositlerinde *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin karşılaştırmalı şekilde araştırılması ve bu partiküllerin kullanımlarının güvenliği konusunda daha detaylı bilgilere erişilmesini sağlamaktır. Böylece Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin, birçok uygulama konsantrasyonu ve süresinin birebir karşılaştırması yapılabildiği gibi fiziko-kimyasal özellikleri ve etki mekanizmaları konusunda yeni çıkarımlara da ulaşılabilecektir. Sonuçta, bu partiküllerin daha güvenli bir şekilde kullanımları konusunda yeni bilgiler sağlayacaktır.

3. MATERYAL & METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Numuneler

İnsan periferik kanı

Periferik kan örnekleri, 20-30 yaş aralığındaki, gönüllü olur formunu imzalayan, yapılacak araştırmanın bilincinde olan, sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı donörlerden elde edilmiştir. Örnekler, her uygulama için bir erkek ve iki kadın donörden temin edilmiştir. Araştırmanın insan lenfositlerinde yürütülebilmesi için, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Tarih: 17.05.2021, Karar No: 449).

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri

İnsan meme kanseri MCF-7 hücre hattı (ATCC HTB-22) Amasya Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.2. Test materyalleri

Demir (III) oksit nanopartikülleri ve mikropartikülleri

Fe_2O_3 NP'leri ve MP'leri (bulk formu) Sigma-Aldrich'den (sırası ile nanopowder CAS-No: 1309-37-1 ve powder CAS-No: 1309-37-1) ticari olarak temin edilmiştir. Kum rengi olan toz hâlindeki NP'lerin boyutu <50 nm, moleküler ağırlığı 159,69 g/mol ve yüzey alanı 50-245 m²/g. Kiremit rengi olan MP'lerin boyutu <5 μm , moleküler ağırlığı 159,69 g/mol ve saflığı $\geq 96\%$ 'dır.

Diğer materyaller

MTT boyası Sigma-Aldrich'den; Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (DMEM) (F0445), fetal bovine serum (FBS) (S0613), penicillin/streptomycin (A2213), L-

glutamine (K0283), trypsin (L2163) ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (L1825) Biochrome'den; LymphoPlus Medium (CY100-100), BrdU (59-14-3), Giemsa (HX947066), formaldehit (50-00-0), kolşisin (64-86-8), Sitokalsin B (14930-96-2), Mitomisin-C (MMC) (200 008-6), saf asetik asit (64-19-7), metil alkol (I624608208), sodyum klorür (NaCl) (7647-14-5), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4) (A585477452) ve entellan (1079610500) Carlo Erba'dan; sodyum hidroksit (NaOH) (1310-73-2), DMSO (67-68-5), Triton X-100 (9002-93-1), etidyum bromür (EtBr) (1239-48-8), normal erime sıcaklığına sahip agar (9012-36-6), düşük erime sıcaklığına sahip agar (9012-36-6), potasyum klorür (KCl) (7447-40-7), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (6381-92-6) ve Tris (77-86-1) AppliChem'den temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Uygulama materyallerinin ve konsantrasyonlarının hazırlanması

Uygulanacak olan Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin fiziksel/kimyasal karakterizasyonları Kızılkaya (2021) [203] tarafından daha önce gerçekleştirilmiştir. TEM sonuçlarına göre NP'lerin ortalama boyutları 44,48 nm iken MP'lerin 210,68 nm olduğu tespit edilmiştir.

Uygulamadan kısa bir süre önce Fe_2O_3 NP'lerin ve MP'lerin stok süspansiyonları deiyonize suyla hazırlanmış ve tam süspansiyon elde edene kadar karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen bir görünüme ulaştıktan sonra oda sıcaklığında, ultrasonik banyo içerisinde (50-60 Hz) 30 dakika sonikasyon uygulanmıştır. Süspansiyon tekrar karıştırılarak stok çözelti hazır hale getirilmiştir. Diğer konsantrasyonlar için dilüsyon işlemi deiyonize suyla gerçekleştirilmiştir. Dilüsyon sonrası yeni süspansiyonlar hızlı bir karıştırma sonrası 15 dakika boyunca sonikasyona bırakılmışlardır. Sonikasyondan sonra, süspansiyonlar hücre kültürüne ilave edilmeden önce 3-5 dakika karıştırılmış ve süspanse olarak uygulanmıştır.

Optimum uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için ilgili testlerle insan lenfositleri üzerinde ön çalışmalar yürütülmüştür. Ön çalışmalarda, hem testlerin yürütüldüğü laboratuvar da daha önce kullanılan ve hem de literatürde kullanılan konsantrasyonlardan yola çıkarak, komet testinde Fe_2O_3 NP'lerin ve MP'lerin üç farklı konsantrasyonuyla (300, 600 ve 1200 $\mu\text{g/mL}$) iki saatlik; dört farklı konsantrasyonuyla (25, 125, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) 24 saatlik iki deneme yapılmıştır. KA testinde dört (100, 250, 500, 750 $\mu\text{g/mL}$) ve MN

testinde sekiz farklı konsantrasyonun (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 µg/mL) 24 ve 48 saatlik uygulamaları denenmiştir. Hazırlanan preparatlarda partiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Elde edilen verilerde, komet ve MN testlerinde negatif kontrole kıyasla anlamlı sonuçlar gözlenmemekle birlikte, konsantrasyon yükseldikçe komet testi için hasar tespiti, partiküllerin yoğunlukları sebebiyle güç duruma gelmiştir [204]. Diğer yandan, KA testi sonuçlarında yüksek konsantrasyonlarda anlamlı hasarlar tespit edilmiştir. Mitotik indeks değerleri dikkate alınarak, EC₅₀ (etkili konsantrasyon) değeri orta-yüksek konsantrasyon (500 µg/mL) olarak belirlenmiştir. Ön değerlendirmeler ve literatür taramaları sonucunda dört konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Komet testinde en yüksek konsantrasyon değerlendirmeyi zorlaştırdığından 25, 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlar uygun görülür iken MTT testi için daha geniş doz aralığı ve 5, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µg/mL, diğer testler için de 125, 250, 500 ve 750 µg/mL konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.2. Sitotoksisite testi

MCF-7 hücre hattı kültürü

Hücreler, Amasya Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı, Hücre Kültürü Laboratuvarında, standart koşullarda (37°C, nemlendirilmiş, %5 CO₂ ortamında), yüzey alanı 75 cm² kültür flasklarında, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM’de geliştirilmiştir. Hücreler istenilen sayıya ulaşıncaya kadar çoğaltılarak depolanmıştır.

Çoğaltılan hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak biçimde ekilmiş ve hücrelerin plakaya tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir.

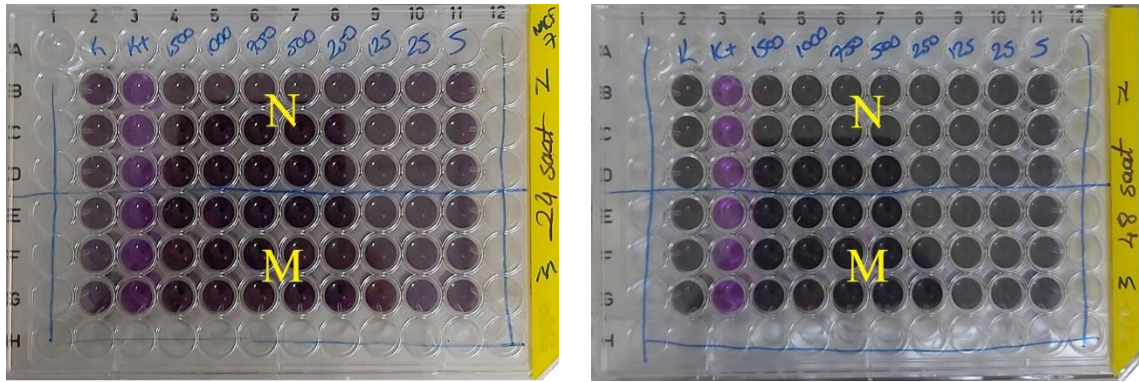
MTT testi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi, Mosmann (1983) tarafından geliştirilen metotta [133] yapılan modifikasyonlar dikkate alınarak [85, 135] uygulanmıştır. Bu teknik, MCF-7 hücre hattıyla gerçekleştirilmiştir.

Fe₂O₃ NP’lerinin ve MP’lerinin sekiz farklı konsantrasyonuna (5, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µg/mL) ek olarak, bir negatif (deiyonize su) bir de pozitif (0,2 µg/mL MMC)

kontrol grubu çalışılmıştır. Belirtilen konsantrasyonlarda partiküller, kültür ortamlarına ilave edilmiş ve kültürler karbondioksitli inkübatörde 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde, tüm kuyucuklara MTT çözeltisinden eklenmiş ve daha sonra hücreler yaklaşık olarak 2-4 saat kadar aynı şartlarda inkübe edilmiştir. Son olarak tüm kuyucuklara, oluşacak formazan kristallerinin çözünmesi için DMSO ilave edilmiştir (Resim 4.1).

Uygulamalar tamamlandığında, ELISA plaka okuyucuda (Thermo Fisher Scientific/Multiscan) 570 nm dalga boyunda, her bir uygulama sonrası absorbans değerleri tespit edilmiştir. Çalışılacak her bir konsantrasyonun üç teknik replikasyonu için elde edilen üç farklı absorbans değerinin ortalaması hesaplanmıştır. Bu değerlerden yararlanarak, Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin absorbans değerleri, replikasyon sonuçlarının toplanıp replikasyon sayısına bölünmesiyle; kontrole kıyasla nispi canlılık üzerine etkileri ise “Uygulama absorbans değeri x100 / Negatif kontrol absorbans değeri” formülüyle yüzde cinsinden belirlenmiştir.



Resim 4.1. 96 kuyucuklu plaklarda 24 ve 48 saatlik MTT deney tasarımları. N: nanopartikül, M: mikropartikül.

3.2.3. Genotoksisite testleri

Lenfosit izolasyonu

Üç gönüllü donörden elde edilen periferik kan numunelerinin 100 μ L'si, 1 mL PBS'yle süspansiyon edilip buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra, 100 μ L Biocoll eklenerek

santrifüj edilmiştir. Bulutsu ara faz toplanarak lenfosit izolasyonu tamamlanmıştır. Hücre canlılığı, tripan mavisiyle değerlendirilmiş ve sonuç $>93,6$ bulunmuştur.

Komet testi

Komet testi, Singh ve arkadaşlarının (1988) geliştirdikleri metotta [205] birtakım modifikasyonlar yapılarak [128, 138, 206] uygulanmıştır. Bu teknik, izole edilmiş lenfositlerle gerçekleştirilmiştir. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin dört farklı konsantrasyonu (25, 125, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) kullanılmıştır. Ek olarak, bir negatif (deiyonize su) bir de pozitif (100 μM hidrojen peroksit, H_2O_2) kontrol grubu çalışılmıştır. 1:1 oranında hazırlanan lenfosit: Fe_2O_3 partiküllerinin karışımı, iki ve üç saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir. Düşük erime sıcaklığına sahip agarla karıştırılan hücre süspansiyonu, önceden hazırlanmış agar kaplı lamalar üzerine yayılmıştır. Hazırlanan preparatlar, liziz çözeltisi içerisinde (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, pH=10, 100 mM EDTA, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) bir saat boyunca 4°C 'de inkübe edilmiştir. Elektroforez tamponunda (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) 20 dakika bekletilen preparatlara daha sonra, alkali ortamda (pH>13), 25 V, 300 mA'de 20 dakika elektroforez uygulanmıştır [128, 138, 206]. Nötralizasyon (0,4 M Tris, pH=7,5) işleminin ardından EtBr'yle boyanan çekirdekler (nükleoidler), olası DNA hasarlarını tespit etmek amacıyla floresan bağlantılı mikroskopta (Olympus BX-51) (uyarılma filtresi: 546 nm; bariyer filtresi: 590 nm), x400 büyütmede, Comet Assay-IV programı (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, UK) kullanılarak, komet parametreleri açısından incelenmiştir. Her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için her donörden hazırlanan en az iki preparatta toplam 100 hücre (her preparatta 50 hücre) analiz edilmiştir. Test, üç biyolojik ve iki teknik replikasyonla tamamlanmıştır.

Lenfosit kültürü

Üç gönüllü donörden, heparin içeren enjektörlerle alınmış periferik kan örneklerinin 0,2 mL'si, steril şartlarda 2,5 mL besi yeri (LymphoPlus Medium) içeren kültür tüplerine ilave edilmiştir. KKD testi için her bir tüpe, 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona ulaşacak şekilde 50 μL 5-Bromo-2-deoksiuridin (Bromodeoksiüridin, BrdU) eklenmiş ve tüpler 37°C 'lik etüvde, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimi testleri

Kromozom anormallikleri testi, Evans'ın (1984) geliştirdiği metotta [152] yapılan bazı modifikasyonlarla [153]; KKD testi ise Perry ve Wolf'un (1974) geliştirdikleri metotta [177] yapılan bazı modifikasyonlarla [169, 206-208] uygulanmıştır. Bu teknikler, kültürdeki lenfositlerde gerçekleştirilmiştir. Hücrelere, son 24 ve 48 saatte Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin dört farklı konsantrasyonu (125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$) 60 μL olarak uygulanmıştır. Ek olarak, bir negatif (deiyonize su) bir de pozitif (0,15 $\mu\text{g/mL}$ MMC) kontrol grubu çalışılmıştır. 70'inci saatte her tüpe, 0,06 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona ulaşacak şekilde 10 μL kolşisin eklenmiştir. İnkübasyondan sonra kültürdeki örnekler santrifüj edilmiş ve hücrelere 0,075 M hipotonik çözeltiden (KCl) 5 mL olacak şekilde karıştırılarak verilmiştir. Sonrasında, hücreler 3:1 oranında metanol:asetik asitle (fiksatif) üç kez tespit edilmiş ve hücre süspansiyonu lamaların üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Preparatların boyanması

Hazırlanan preparatların bir kısmı kromozom anormalliklerinin, bir kısmı da kardeş kromatit değişimlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. KKD'lerin ayırt edilebilmesi için, Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta [208] birtakım modifikasyonlar yapılarak, preparatlar, 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışınlanmış ve takiben 60°C'de sodyum klorür ve trisodyum sitrat karışımında (SSC) bir saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, her iki test için de kullanılacak preparatlar %5'lik Giemsa içerisinde 8-10 dakika boyanmış, oda sıcaklığında kurutulmuş ve entellanla daimî hale getirilerek mikroskop altında incelenmiştir.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Daimî preparatlarda, her bir partikülün farklı konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin, Mİ (yüzde cinsinden bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı) üzerindeki etkileri, toplam 3000 (her bir donörden 1000) metafaz hücresi incelenerek tespit edilmiştir. KA'ları tespit etmek için, her bir uygulamayı temsilen, kromozomları iyi boyanmış ve dağılmış 300 (her bir donörden 100) metafaz incelenmiştir. Metafazlarda, hücre başına düşen kromozom anormallikleri sayısı ve anormal hücre yüzdesi belirlenmiştir. İncelemeler Leica-DMLB2 mikroskopta, Mİ için x40 ve KA için x100 büyütme kullanılarak

gerçekleştirilmiş, fotoğraflar x1000 büyütmede, Leica-DFC-320 CCD kamerayla alınmıştır. Test, üç biyolojik ve iki teknik replikasyonla tamamlanmıştır.

Kardeş kromatit değişiminin ve replikasyon indeksinin saptanması

Daimî preparatlarda, her bir uygulama süresi ve konsantrasyonda KKD'nin tespiti için, ikinci mitoz bölünme geçiren ve homojen dağılmış toplam 75 (her bir donörden 25) metafaz hücresi incelenmiştir. KKD sayısı, bir kromozomdaki kırılmalar sonucu oluşmuş açık renkli kromatitteki koyu renkli parçaların ya da koyu renkli kromatitteki açık renkli parçaların sayılmasıyla belirlenebilmektedir. Replikasyon indeksi ($R\dot{I}$) için toplam 300 (her bir donörden 100) hücre taranarak, birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) mitoz evresindeki hücreler tespit edilmiş ve $[1 \times (M_1) + 2 \times (M_2) + 3 \times (M_3)] / N$ (incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hesaplanmıştır [169]. İncelemeler Leica-DMLB2 mikroskopta $R\dot{I}$ için x40 ve KKD için x100 büyütme kullanılarak gerçekleştirilmiş, fotoğraflar x1000 büyütmede, Leica-DFC-320 CCD kamerayla alınmıştır. Test, üç biyolojik ve iki teknik replikasyonla tamamlanmıştır.

Mikronükleus-sitom testi

Mikronükleus testi, Fenech'in (2000) geliştirdiği metotta [184] yapılan bazı modifikasyonlarla [182, 209-210] uygulanmıştır. Bu teknik, lenfosit kültüründeki hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Kültürdeki hücreler, 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki Fe_2O_3 NP'lerine ve MP'lerine kültürün son 48 saati boyunca maruz bırakılmıştır. Ek olarak, bir negatif (deiyonize su) ve bir de pozitif (0,15 $\mu\text{g/mL}$ MMC) kontrol grubu çalışılmıştır. İnkübasyonun 44'üncü saatinde kültürler 7 μL Sitokalsin B eklenmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilmiş ve hücrelere 0,075 M konsantrasyondaki hipotonik çözeltiden (KCl) 5 mL karıştırılarak eklenmiştir. Sonrasında, hücreler fiksatifte üç kez tespit edilmiştir. Üçüncü tespit 40:1 oranında fiksatif:formaldehit karışımıyla gerçekleştirilmiş ve takiben hücre süspansiyonu lamaların üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş preparatlar %5'lik Giemsa içerisinde 5-8 dakika boyanmış, oda sıcaklığında kurutulmuş ve entellanla daimî hale getirilerek mikroskop altında incelenmiştir.

Mikronükleus-Sitom frekansının ve nükleer bölünme indeksinin saptanması

MN frekanslarını belirlemek amacıyla, partiküllerin her bir uygulama süresi ve konsantrasyonunda, toplamda 3000 (her bir donörden 1000) binükleat hücre taranmıştır. MN içeren binükleat hücreler bir mikronükleuslu (1MN), iki mikronükleuslu (2MN), üç mikronükleuslu (3MN) vb. olacak şekilde belirlenmiş ve her uygulama için MN yüzdesi $[1 \times (1MN) + 2 \times (2MN) + 3 \times (3MN + 4MN)] / N$ formülü kullanılarak tespit edilmiştir. Nükleoplazmik köprü (NKP) ve nükleer tomurcuk (NTM) içeren binükleat hücreler sayılmış ve N'ye bölünerek hesaplanmıştır. Nükleer bölünme indeksini (NBİ) belirlemek için aynı preparatlarda toplamda 1500 (her bir donörden 500) hücre incelenerek, bir çekirdekli (1N), iki çekirdekli (2N), üç çekirdekli (3N) ve dört çekirdekli (4N) olanların sayısı tespit edilmiş ve $[1 \times (1N) + 2 \times (2N) + 3 \times (3N + 4N)] / N$ formülüyle hesaplanmıştır [206, 211]. İncelemeler Leica-DMLB2 mikroskopta x40 büyütmede yapılmış, fotoğraflar x1000 büyütmede, Leica-DFC-320 CCD kamerayla alınmıştır. Test, üç biyolojik ve iki teknik replikasyonla tamamlanmıştır.

3.2.4. İstatistiksel analizler

İncelemeler tamamlandığında, Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin insan lenfositlerinde Mİ, Rİ, MN, NBİ, hücre başına düşen KA, anormal hücre frekansı, KKD sayısı ve kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti; MCF-7 hücre hattında MTT sonuçları için konsantrasyon-etki ilişkilerini ortaya koymak amacıyla SPSS 22.0 bilgisayar programında regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin uygulamalarından ve kontrol gruplarından elde edilen Mİ, Rİ, hücre başına düşen KA, anormal hücre frekansı ve MN sonuçları z-testi, KKD ve komet testi sonuçları Student's t-testi, MTT testi sonuçları One Way ANOVA-Dunnett testi kullanılarak karşılaştırılmış ve $p < 0,05$ 'e uygun değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

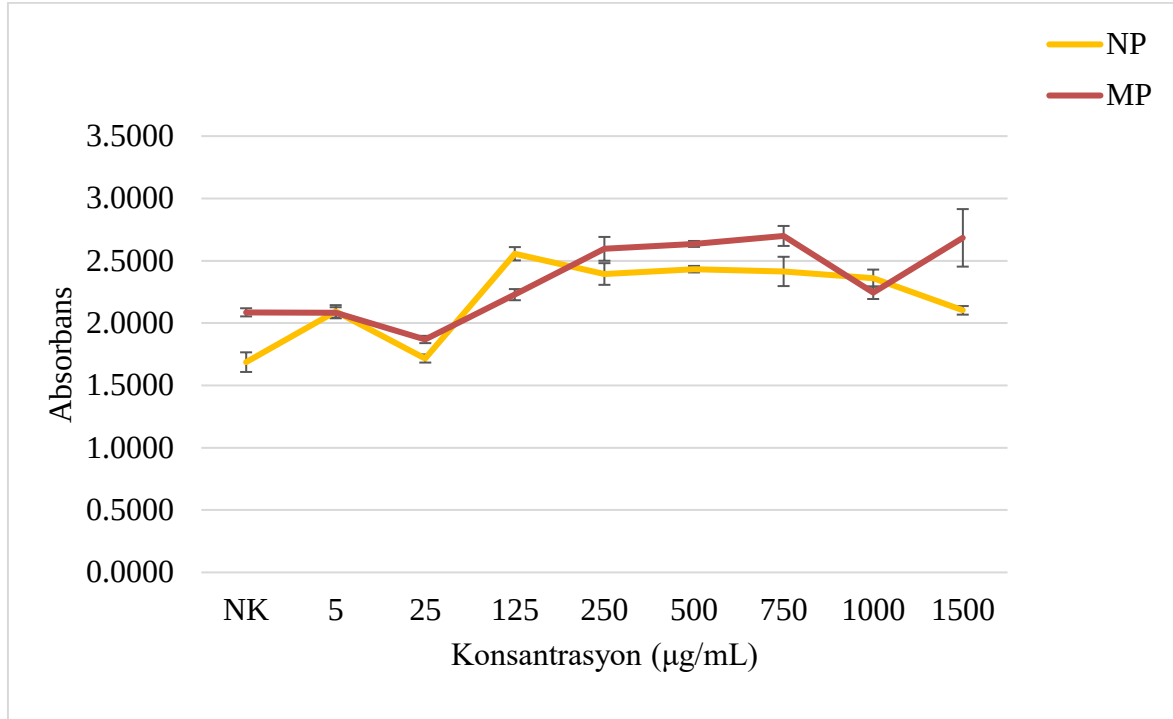
4.1. Sitotoksosite Testi Sonuçları

4.1.1. MTT testi

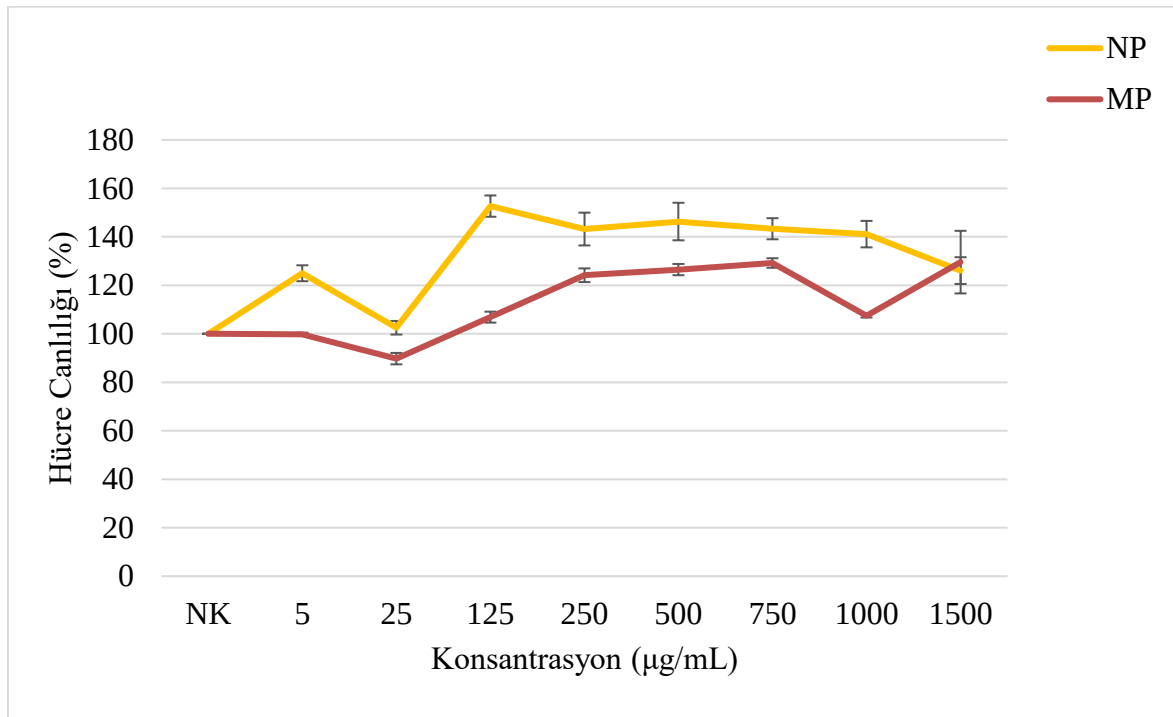
Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin insan meme kanseri MCF-7 hücreleriyle 24 saatlik uygulamasının sitotoksitesini belirlemek amacıyla elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. NP'lerin ve MP'lerin bazı konsantrasyonları, absorbans değerlerinde değişiklikler oluşturmakla beraber (NP'ler için $r=0,5363$ ve MP'ler için $r=0,7250$), bu değişikliklerin hiç birisi negatif kontrole kıyasla anlamlı değildir. Ancak MP uygulamaları için pozitif yönde düşük bir konsantrasyon korelasyonu görülmüştür. Benzer şekilde, absorbans değerlerinden türetilen hücre canlılığı (%) değerleri de negatif kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemiştir (NP'ler için $r=0,5429$ ve MP'ler için $r=0,7309$) (Şekil 4.1, 4.2).

Çizelge 4.1. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, 24 saatlik uygulamasının MTT testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama	NP	MP
	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans ± SH	
NK	-	1,6868 ± 0,1364	2,0863 ± 0,0565
PK	0,2	0,6166 ± 0,0542	0,6146 ± 0,0953
Fe ₂ O ₃	5	2,0941 ± 0,0866	2,0829 ± 0,0767
	25	1,7161 ± 0,0567	1,8686 ± 0,0506
	125	2,5562 ± 0,0924	2,2281 ± 0,0774
	250	2,3939 ± 0,1506	2,5956 ± 0,1656
	500	2,4326 ± 0,0455	2,6351 ± 0,0411
	750	2,4145 ± 0,2034	2,6991 ± 0,1388
	1000	2,3608 ± 0,1186	2,2434 ± 0,0869
	1500	2,1023 ± 0,0595	2,6838 ± 0,3997
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), SH: standart hata.			



Şekil 4.1. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının absorbans değerleri. NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

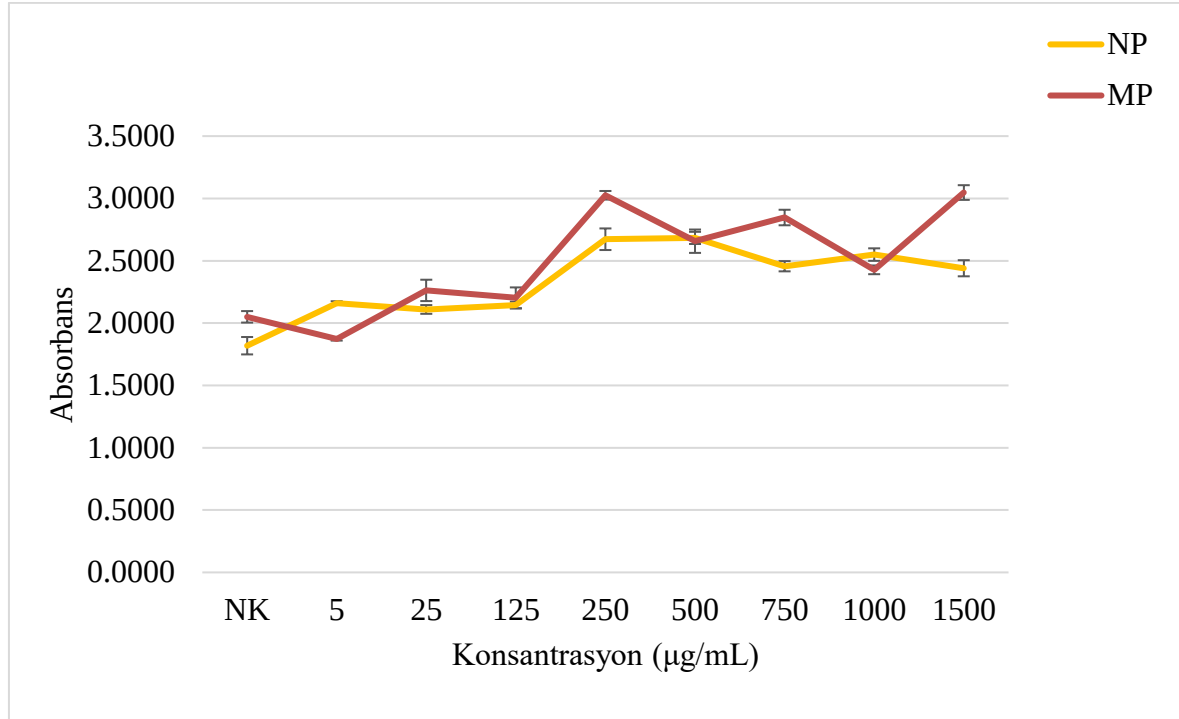


Şekil 4.2. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

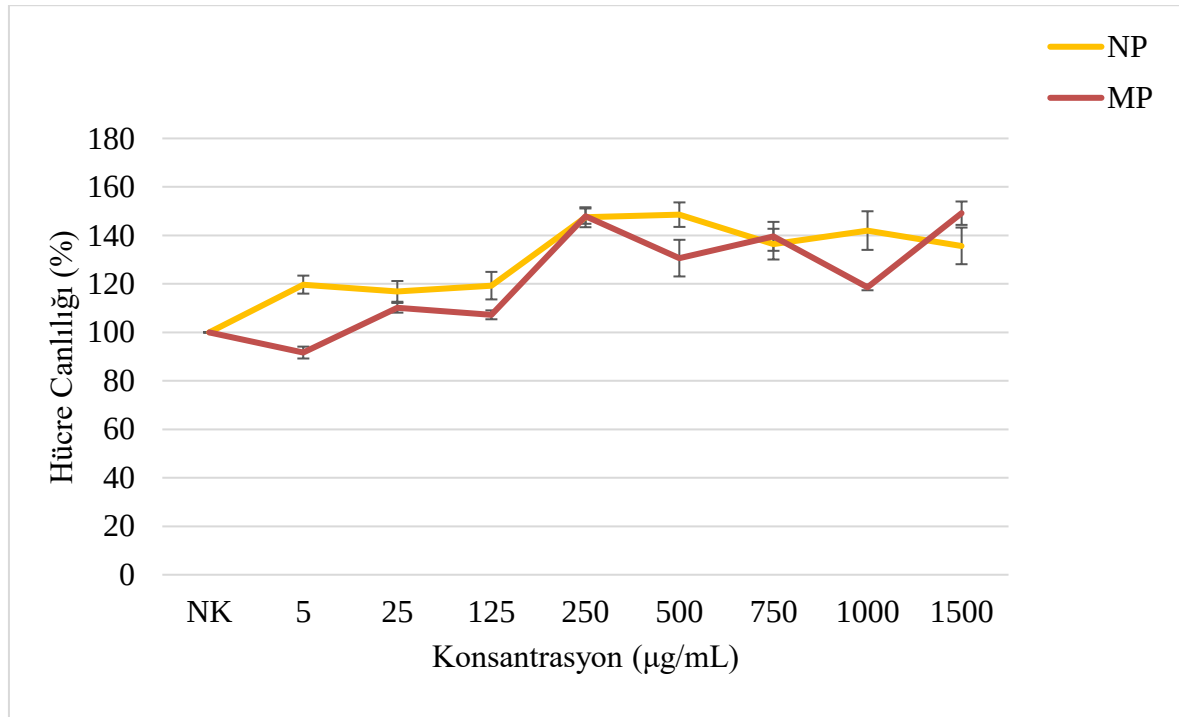
Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin MCF-7 hücreleriyle 48 saatlik etkileşimlerinin sitotoksosite sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. 24 saatlik uygulamada olduğu gibi konsantrasyona bağlı olmayan bazı değişiklikler gözlenmekle beraber (NP'ler için $r=0,7582$ ve MP'ler için $r=0,7760$), bu değerlerin hiçbiri negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde değişmemiştir. Ancak her iki partikül uygulamaları için de pozitif yönde düşük bir konsantrasyon korelasyonu görülmüştür. Benzer şekilde, absorbans değerlerinden türetilen hücre canlılığı (%) değerleri de negatif kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemiştir (NP'ler için $r=0,7721$ ve MP'ler için $r=0,7771$) (Şekil 4.3, 4.4).

Çizelge 4.2. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, 48 saatlik uygulamasının MTT testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama	NP	MP
	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans ± SH	
NK	-	1,8186 ± 0,1209	2,0502 ± 0,0800
PK	0,2	0,2080 ± 0,0093	0,2136 ± 0,0111
Fe ₂ O ₃	5	2,1611 ± 0,0246	1,8726 ± 0,0223
	25	2,1095 ± 0,0606	2,2623 ± 0,1485
	125	2,1451 ± 0,0470	2,2025 ± 0,1451
	250	2,6727 ± 0,1500	3,0253 ± 0,0597
	500	2,6835 ± 0,0845	2,6570 ± 0,1623
	750	2,4561 ± 0,0708	2,8469 ± 0,1078
	1000	2,5496 ± 0,0870	2,4273 ± 0,0607
	1500	2,4399 ± 0,1119	3,0474 ± 0,1021
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), SH: standart hata.			



Şekil 4.3. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının absorbans değerleri. NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.



Şekil 4.4. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

Her iki partikülün, bütün uygulama konsantrasyonlarının (MP için 5 µg/mL hariç) absorbans değerlerinden türetilen hücre canlılığı frekanslarını artırdığı gözlenmiştir. NP'lerin, özellikle 125 µg/mL'den itibaren bütün konsantrasyonlarının hücre canlılığını artırdığı, MP'lerin de özellikle 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırdığı, ancak bu artışların hiçbirinin negatif kontrole kıyasla anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan MMC uygulaması sonucunda, MCF-7 hücrelerinde gözlenen canlılık frekansı, negatif kontrole kıyasla anlamlı derecede azalmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

4.2. Genotoksisite Testlerinin Sonuçları

4.2.1. Komet testi

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin izole insan lenfositlerinde üzerindeki genotoksisite potansiyeli komet testiyle incelenmiştir. Bu testin uygulanması sonucunda elde edilen hücre görüntülerinde kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk yoğunluğu (kuyrukta % DNA) ve kuyruk momenti değerlendirilmiştir.

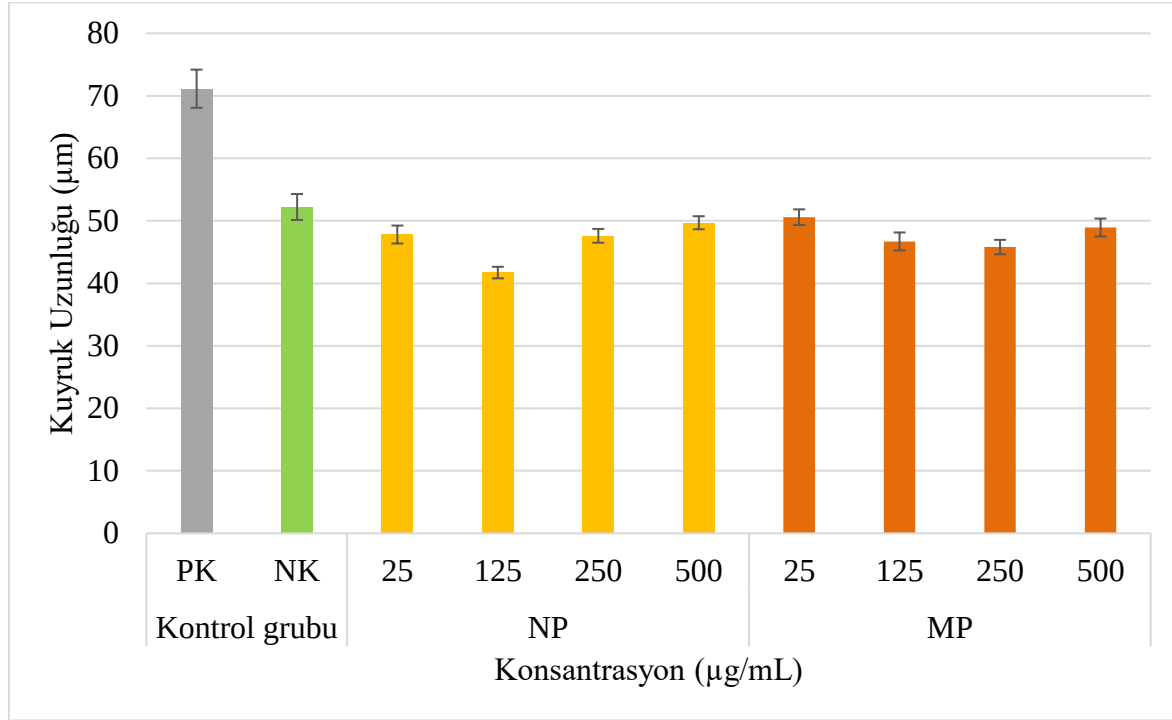
İki saatlik uygulama

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin izole lenfositlerle iki saatlik etkileşimlerinin DNA hasarı üzerindeki etkileri Çizelge 4.3'te verilmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7). İncelenen parametreler açısından NP'ler ve MP'ler DNA hasarında, konsantrasyona bağlı olmayan artışlar veya azalışlar (MP kuyruk momenti hariç) oluşturmakla birlikte (NP'ler için kuyruk uzunluğu $r=0,2142$, kuyruk yoğunluğu $r=0,1237$ ve kuyruk momenti $r=0,5243$; MP'ler için kuyruk uzunluğu $r=0,6758$, kuyruk yoğunluğu $r=0,1520$ ve kuyruk momenti $r=0,8047$), bu değerlerin hiç birisi, negatif kontrole kıyasla anlamlı değildir.

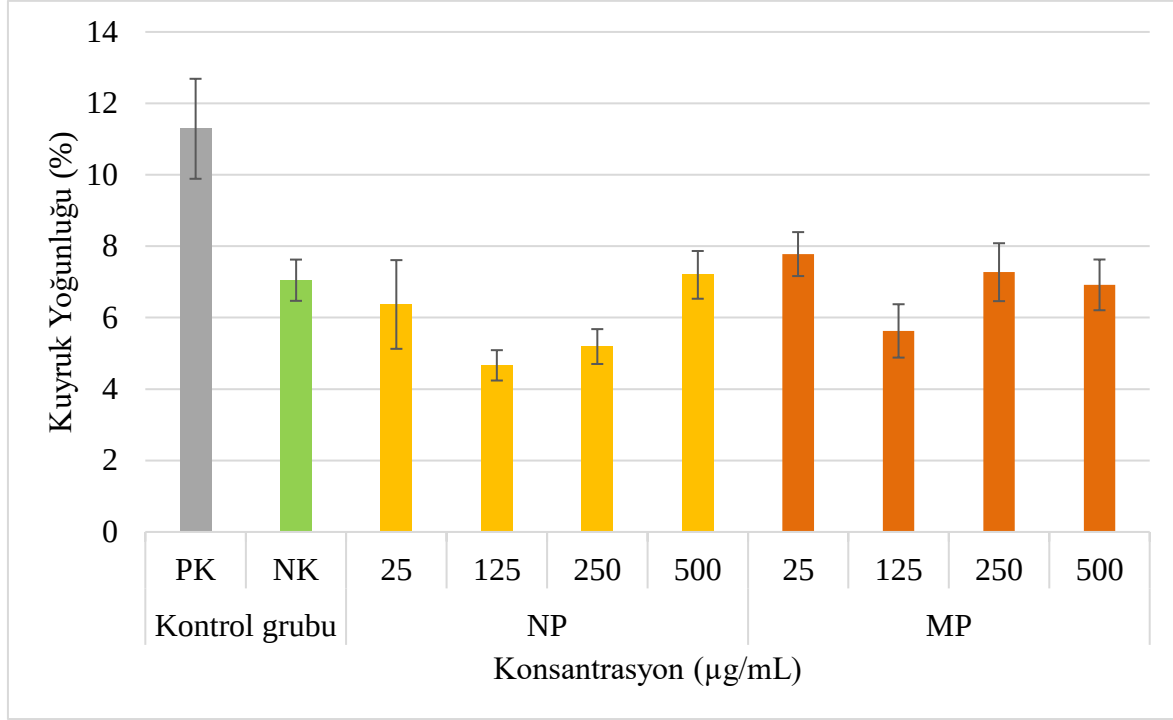
Çizelge 4.3. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, iki saatlik uygulamasının komet testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Uzunluğu (μm) ± SH	Kuyruk Yoğunluğu (%) ± SH	Kuyruk Momenti ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μg/mL)			
NK	2	-	52,22 ± 2,07	7,05 ± 0,58	2,24 ± 0,30
PK		100 (μM)	71,14 ± 3,06	11,29 ± 1,40	3,39 ± 0,49
Fe ₂ O ₃ NP		25	47,81 ± 1,44	6,37 ± 1,24	1,86 ± 0,35
		125	41,72 ± 0,92	4,66 ± 0,43	0,98 ± 0,10
		250	47,60 ± 1,10	5,19 ± 0,49	1,22 ± 0,16
		500	49,70 ± 1,05	7,20 ± 0,67	1,72 ± 0,19
Fe ₂ O ₃ MP		25	50,59 ± 1,25	7,78 ± 0,62	1,81 ± 0,18
		125	46,71 ± 1,43	5,63 ± 0,75	1,83 ± 0,40
		250	45,81 ± 1,15	7,27 ± 0,81	1,80 ± 0,25
		500	48,93 ± 1,43	6,92 ± 0,71	1,72 ± 0,24
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (H ₂ O ₂), NP: nanopartikül, MP: mikropartikül, SH: standart hata.					

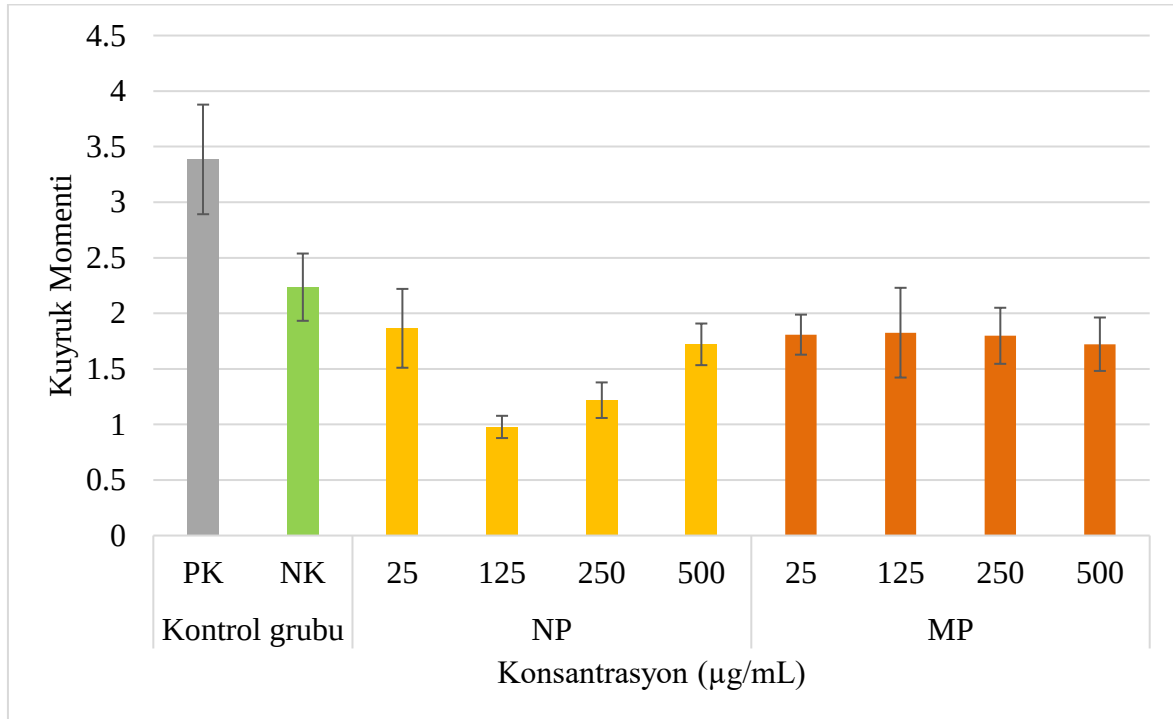
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (H₂O₂), NP: nanopartikül, MP: mikropartikül, SH: standart hata.



Şekil 4.5. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk uzunluğuna etkisi. PK: pozitif kontrol (H₂O₂), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.



Şekil 4.6. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk yoğunluğuna etkisi. PK: pozitif kontrol (H_2O_2), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.



Şekil 4.7. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin iki saatlik uygulamasının komet kuyruk momentine etkisi. PK: pozitif kontrol (H_2O_2), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

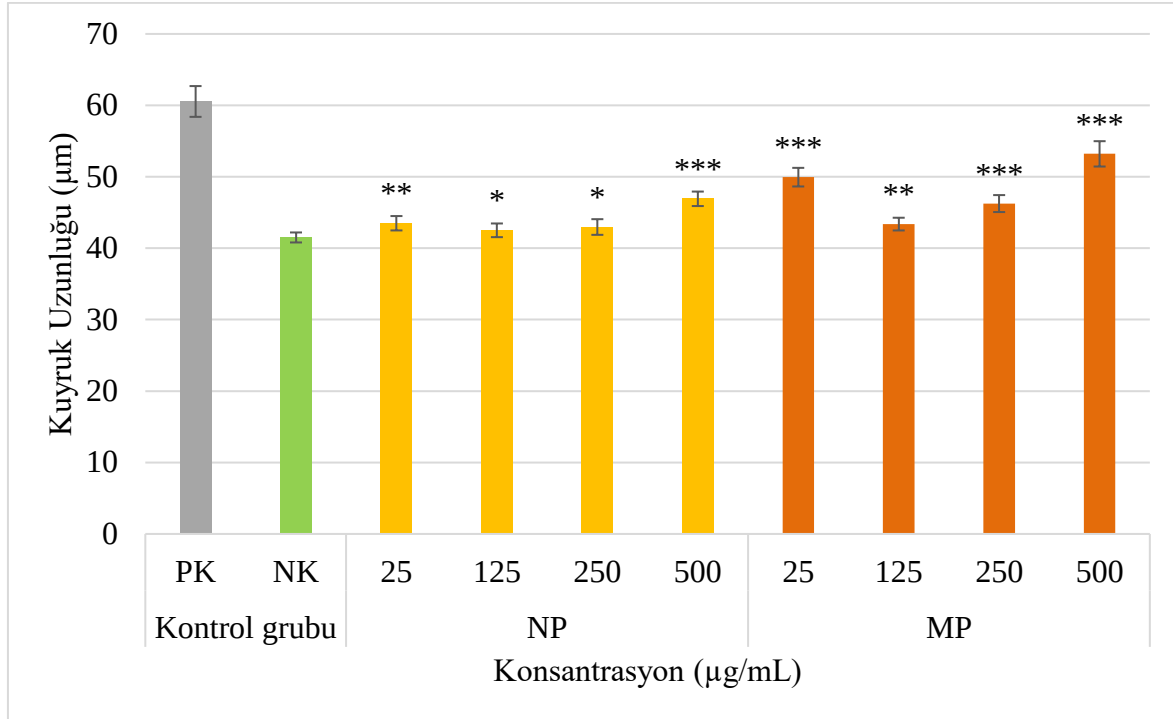
Üç saatlik uygulama

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin izole lenfositlerle üç saatlik etkileşimlerinin DNA hasarı üzerindeki etkileri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, her iki partikülün uygulanan tüm konsantrasyonları, negatif kontrole kıyasla, kuyruk uzunluğunda, konsantrasyon artışına NP'ler açısından bağlı, (NP'ler için $r=0,7916$ ve MP'ler için $r=0,6534$) anlamlı artışlar oluşturmuştur (Şekil 4.8). Partiküllere bakıldığında, genel olarak MP'lerin oluşturduğu hasarın anlamlılık düzeyi ($p<0,001$), NP'lere kıyasla ($p<0,05$ veya $p<0,01$) daha anlamlı düzeydedir.

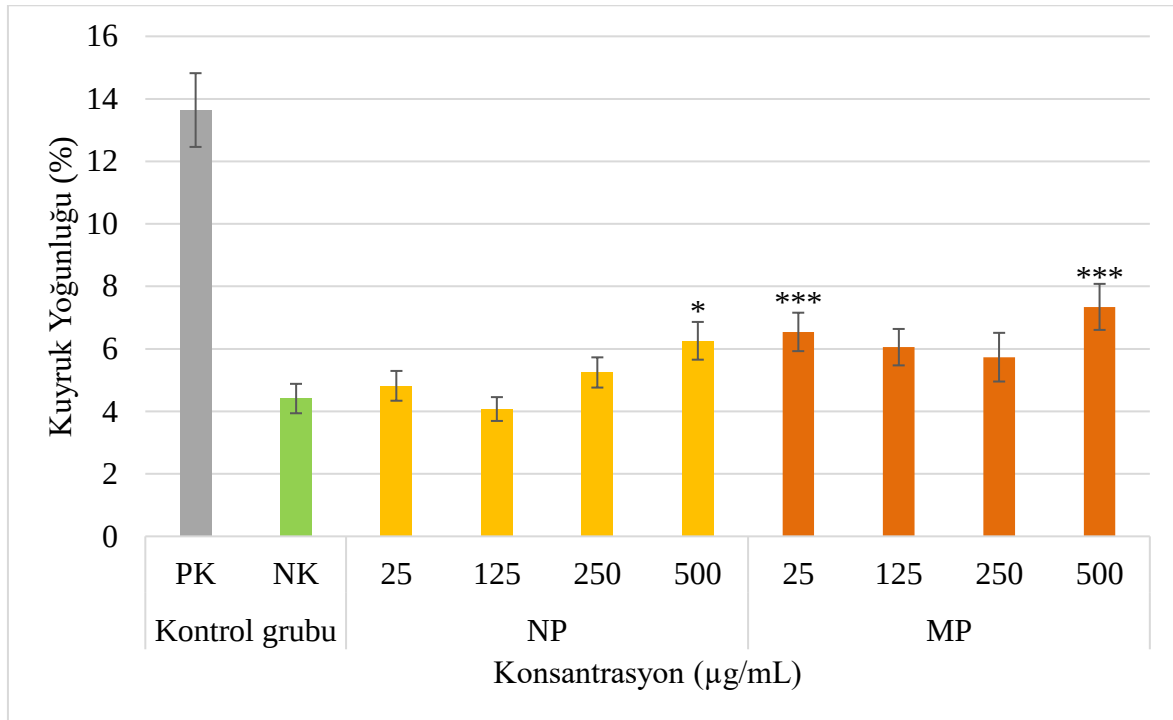
Çizelge 4.4. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, üç saatlik uygulamasının komet testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Uzunluğu (μm) ± SH	Kuyruk Yoğunluğu (%) ± SH	Kuyruk Momenti ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μg/mL)			
NK	3	-	41,51 ± 0,70	4,41 ± 0,47	0,83 ± 0,13
PK		100 (μM)	60,54 ± 2,16	13,64 ± 1,18	4,17 ± 0,48
Fe ₂ O ₃ NP		25	43,50 ± 1,01**	4,82 ± 0,48	1,07 ± 0,12
		125	42,51 ± 0,96*	4,07 ± 0,38	0,88 ± 0,90
		250	42,97 ± 1,10*	5,24 ± 0,48	1,17 ± 0,14
		500	46,92 ± 1,01***	6,26 ± 0,60*	1,37 ± 0,16
Fe ₂ O ₃ MP		25	49,95 ± 1,30***	6,54 ± 0,61***	1,63 ± 0,24
		125	43,38 ± 0,89**	6,05 ± 0,58	1,36 ± 0,16
		250	46,25 ± 1,19***	5,73 ± 0,78	1,67 ± 0,36
	500	53,21 ± 1,77***	7,34 ± 0,74***	2,06 ± 0,34	
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (H ₂ O ₂), NP: nanopartikül, MP: mikropartikül, SH: standart hata. Kontrole kıyasla * <i>p</i> <0,05; ** <i>p</i> <0,01; *** <i>p</i> <0,001 düzeyinde anlamlı (t-testi).					

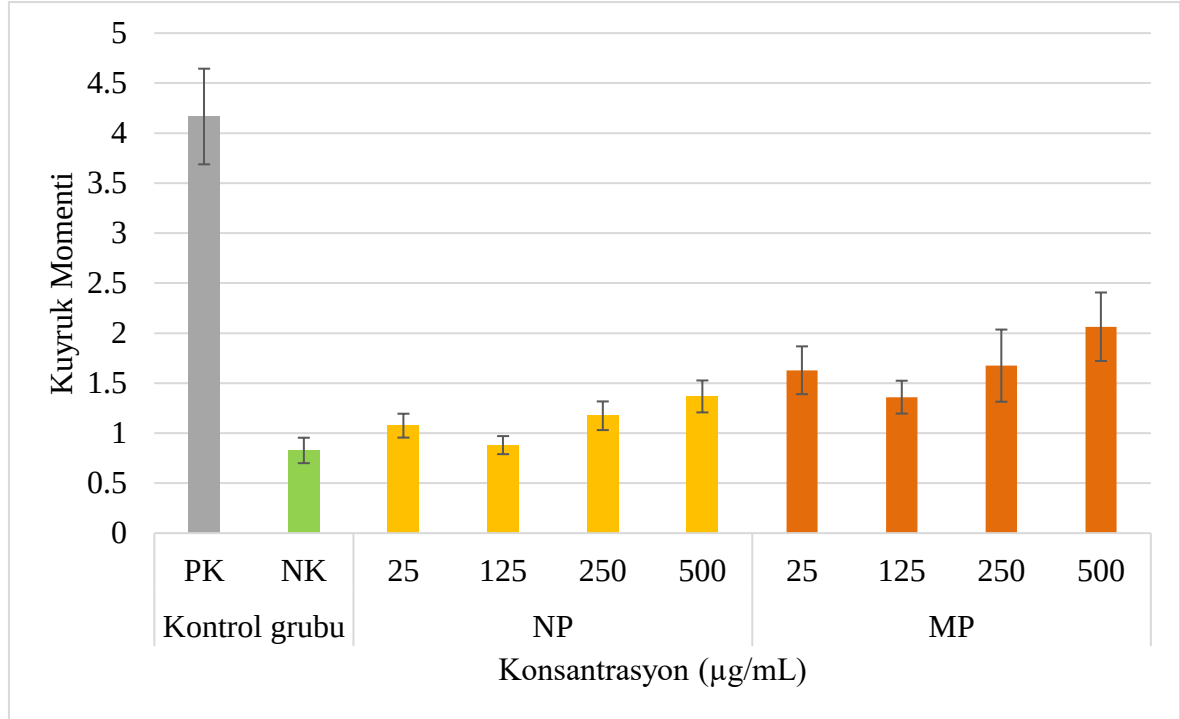
Oluşan DNA hasarları kuyruk yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde, Fe₂O₃ NP'leri en yüksek konsantrasyonda (500 $\mu\text{g/mL}$), Fe₂O₃ MP'leri ise 25 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'de, negatif kontrole kıyasla anlamlı artışlara sebep olmuştur (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$ düzeyinde anlamlı) (Şekil 4.9) ve konsantrasyon artışına bağlı bir artış görülmüştür (NP'ler için $r=0,7693$ ve MP'ler için $r=0,7379$). Diğer yandan, Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin uygulanan hiçbir konsantrasyonu lenfositlerde kuyruk momentini açısından, negatif kontrole kıyasla anlamlı bir artış oluşturmamıştır (Şekil 4.10) fakat regresyon analizi sonucuna göre konsantrasyon artışına bağlı olarak etkili bir moment artışı tespit edilmiştir (NP'ler için $r=0,8467$ ve MP'ler için $r=0,8709$).



Şekil 4.8. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk uzunluğuna etkisi. PK: pozitif kontrol (H_2O_2), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (t-testi).

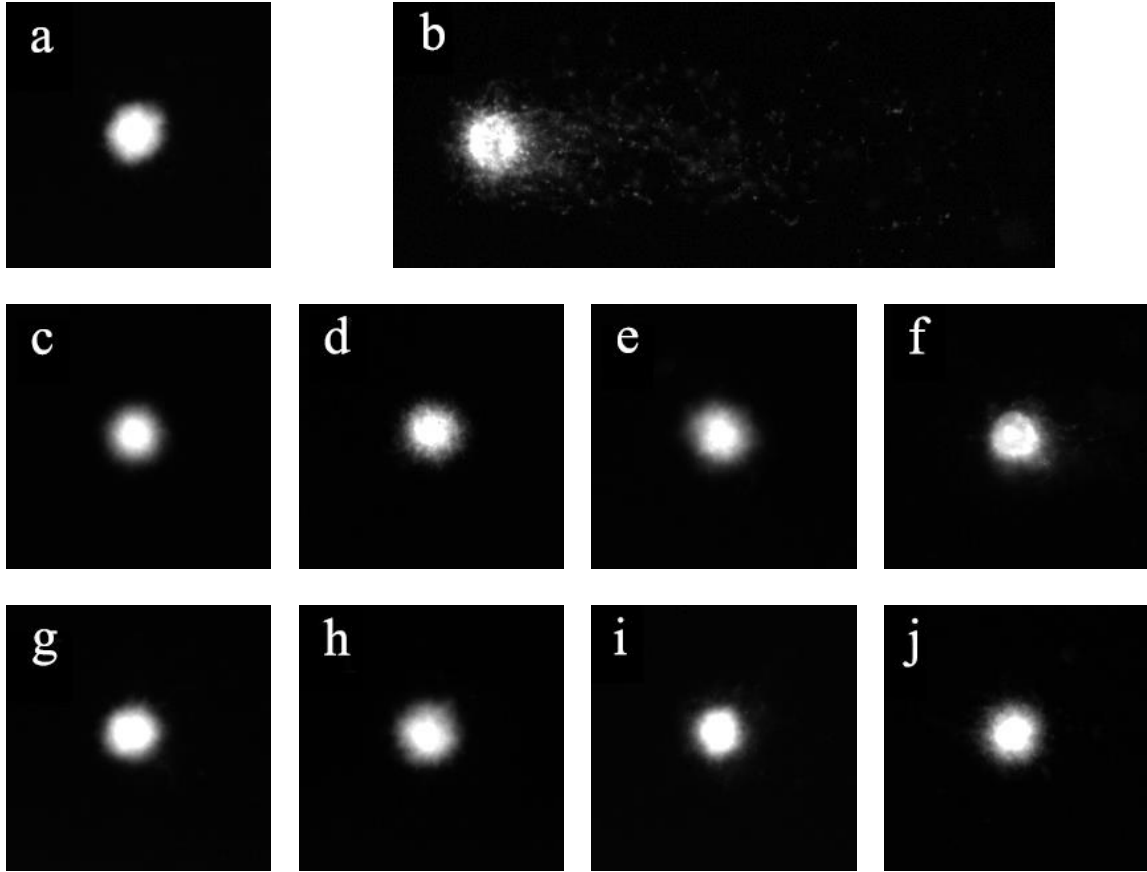


Şekil 4.9. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk yoğunluğuna etkisi. PK: pozitif kontrol (H_2O_2), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p<0,05$; *** $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (t-testi).



Şekil 4.10. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin üç saatlik uygulamasının komet kuyruk momentine etkisi. PK: pozitif kontrol (H_2O_2), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerindeki genotoksitesini değerlendirmek amacıyla floresan mikroskopunda tespit edilen bazı hücre örnekleri Resim 4.2'de gösterilmiştir.



Resim 4.2. İzole lenfositlerde komet testi görsel değerlendirmesi. a) negatif kontrol hücresi; b) pozitif kontrol hücresi; c-f) 25-500 µg/mL konsantrasyonlarda NP'lere maruz bırakılmış hücreler; g-j) 25-500 µg/mL konsantrasyonlarda MP'lere maruz bırakılmış hücreler.

4.2.2. Kromozom anormallikleri testi

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki genotoksisiteleri KA testiyle de incelenmiştir. Bunun için lenfositler, her iki partikülün 125, 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Uygulamalar sonucunda elde edilen metafaz hücrelerinde yapısal kromozom anormalliklerinin sayısı ve tipleri, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısı ile sayısal anormallik tipleri ve miktarları tespit edilmiştir.

24 saatlik uygulama

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositlerle 24 saatlik etkileşimlerinin genotoksisite sonuç grafikleri Şekil 4.11'de ve 4.12'de verilmiştir. Uygulamalar sonucunda, lenfositlerde kromatit ve kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozom ve fragment tipinde yapısal anormallikler oluşmuştur. Sayısal anormallik olan poliploidi, NP uygulamasından sonra sadece iki hücrede tespit edilmiştir. Tüm yapısal anormallikler birlikte değerlendirildiğinde, Fe_2O_3 NP'lerinin 125, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları, anormal hücre frekansında ve hücre başına düşen KA sayısında, negatif kontrole kıyasla artışlara sebep olduğu ancak bu artışların anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5) (anormal hücre frekansı $r=0,0374$, hücre başına düşen KA $r=0,0656$). Diğer yandan, Fe_2O_3 MP'lerinin aynı süredeki uygulamaları, anormal hücre frekansında negatif kontrole kıyasla artış oluşturmadıkları gibi, 125, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda, anormal hücre frekansında ufak bir düşüşe sebep olmuştur ($r=0,2427$). Hücre başına düşen KA sayısı da 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda MP'ler için düşüş göstermiştir ($r=0,3989$). Ancak gözlenen değerler anlamlı düzeyde değildir. Pozitif kontrol olan MMC uygulaması sonucunda hem anormal hücre frekansında ve hem de hücre başına düşen KA oranında anlamlı artış görülmüştür. Elde edilen verilere göre, NP'lerin ve MP'lerin hiçbir uygulama konsantrasyonunda anlamlı seviyede genotoksisite gözlenmemiştir.

48 saatlik uygulama

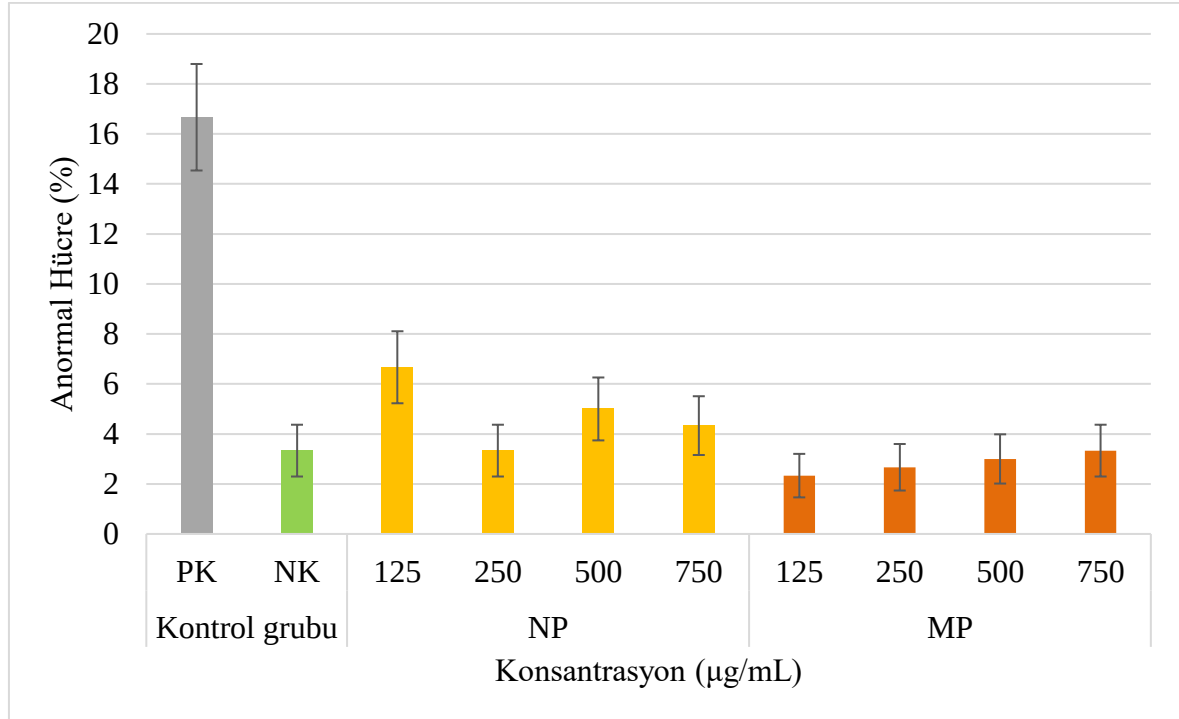
Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositlerle 48 saatlik etkileşimlerinin genotoksisite sonuç grafikleri Şekil 4.13'te ve 4.14'te verilmiştir. Uygulamalar sonucunda, 24 saatlik uygulamadaki gibi yine yapısal anormallik çeşitlerinin tümü gözlenmiştir. Sayısal anormallik olan poliploidi ise her iki partikül uygulamasından sonra sadece bir hücrede tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, NP uygulamalarında, 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu ($p>0,05$) dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda hem anormal hücre frekansını ve hem de hücre başına düşen kromozom anormalliklerini, negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde ($p<0,05$) artırmıştır (anormal hücre frekansı $r=0,7467$, hücre başına düşen KA $r=0,8080$). MP uygulamaları da tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla anormal hücre frekansında ve hücre başına düşen KA sayısında artış göstermekle birlikte, bu artışların

hiçbiri anlamlı düzeyde değildir (anormal hücre frekansı $r=,6065$, hücre başına düşen KA $r=0,6832$).

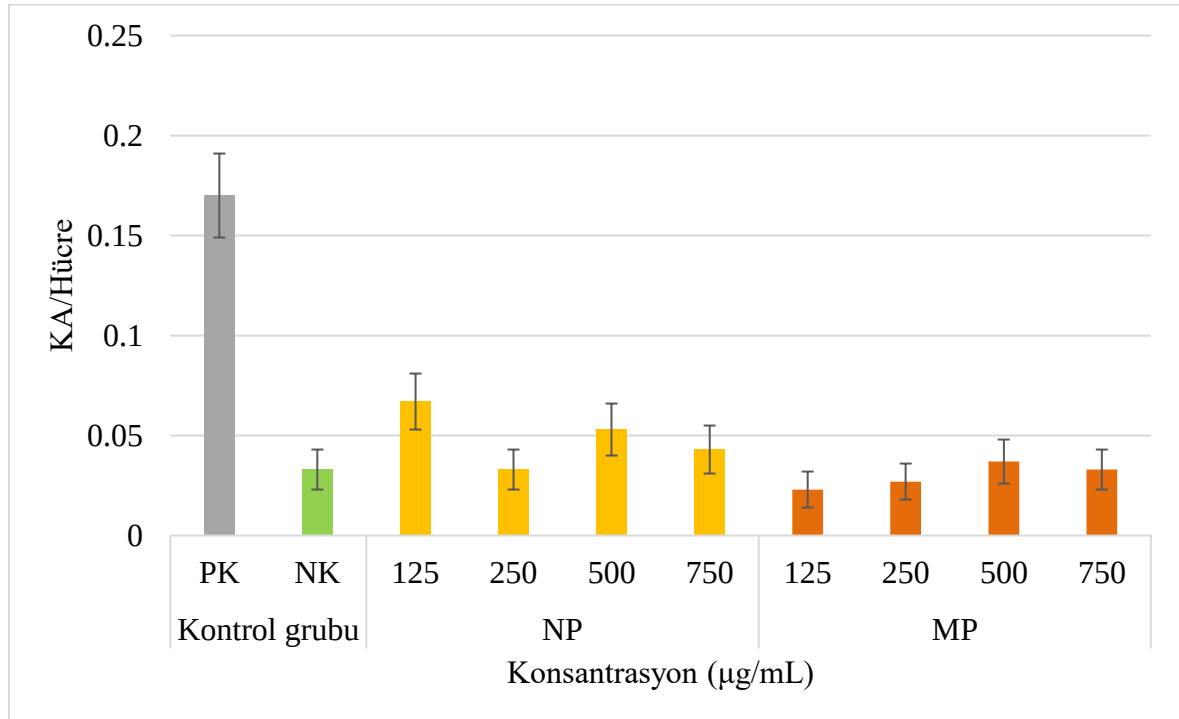
Çizelge 4.5. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin KA testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal hücre ± SH	KA/Hücre ± SH	
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	kkb	ds	f	p			
NK	24	-	3	-	4	1	2	-	3,333 ± 1,036	0,033 ± 0,010	
PK		0,15	14	9	12	5	11	-	16,667 ± 2,130	0,170 ± 0,021	
Fe ₂ O ₃ NP		125	4	3	7	3	3	-	6,667 ± 1,440	0,067 ± 0,014	
		250	3	3	1	2	-	1	3,333 ± 1,036	0,033 ± 0,010	
		500	3	2	6	-	4	1	5,000 ± 1,258	0,053 ± 0,013	
		750	2	3	4	3	1	-	4,333 ± 1,175	0,043 ± 0,012	
Fe ₂ O ₃ MP		125	1	1	2	1	2	-	2,333 ± 0,870	0,023 ± 0,009	
		250	3	1	2	2	-	-	2,667 ± 0,930	0,027 ± 0,009	
		500	3	3	4	1	-	-	3,000 ± 0,985	0,037 ± 0,011	
		750	4	1	2	1	2	-	3,333 ± 1,036	0,033 ± 0,010	
NK		48	-	-	3	2	1	2	-	2,667 ± 0,930	0,027 ± 0,009
PK	0,15		13	6	8	8	8	1	13,333 ± 1,963	0,147 ± 0,020	
Fe ₂ O ₃ NP	125		6	1	6	3	2	-	6,000 ± 1,371*	0,060 ± 0,014*	
	250		2	1	5	1	3	1	4,333 ± 1,175	0,043 ± 0,012	
	500		5	3	7	3	1	-	6,000 ± 1,371*	0,063 ± 0,014*	
	750		4	5	6	3	3	-	6,333 ± 1,400*	0,070 ± 0,015*	
Fe ₂ O ₃ MP	125		3	1	2	2	1	-	3,000 ± 0,985	0,030 ± 0,010	
	250		2	1	3	3	-	-	3,000 ± 0,985	0,030 ± 0,010	
	500		2	2	4	3	3	1	4,667 ± 1,218	0,050 ± 0,013	
	750		3	2	2	3	1	-	3,333 ± 1,036	0,037 ± 0,011	
% KA			23,810	15,714	30,000	16,190	12,381	1,905			
NP % KA			22.308	16.154	32.308	13.846	13.077	2.308			
MP % KA			26.250	15.000	26.250	20.000	11.250	1.250			
ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, f: fragment, p: poliploidi, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), NP: nanopartikül, MP: mikropartikül, SH: standart hata.											
Kontrolle kıyasla *p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)											

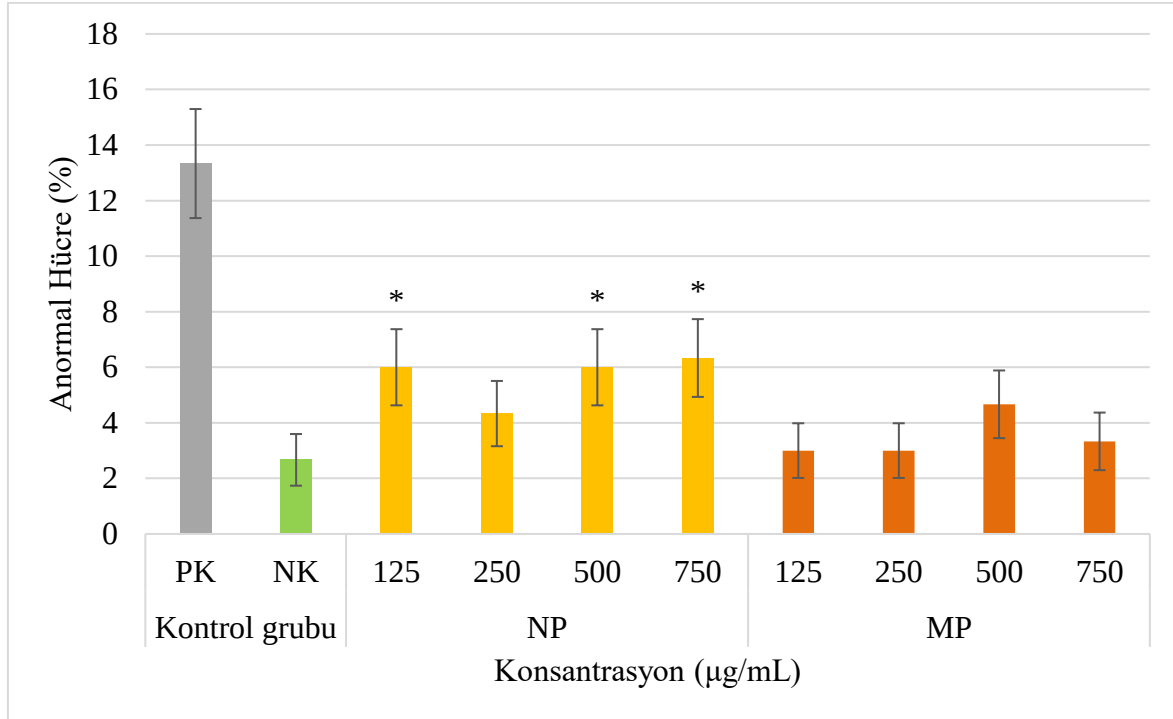
Tüm NP ve MP uygulama konsantrasyonları ve uygulama süreleri birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen KA değerlerine göre, yapısal anormallik %98,095 iken sayısal anormallik %1,905'tir. Ortalamalara bakılarak en çok gözlenen anormallik tipi %30'la kardeş kromatitlerde birleşme (kkb) olmuştur.



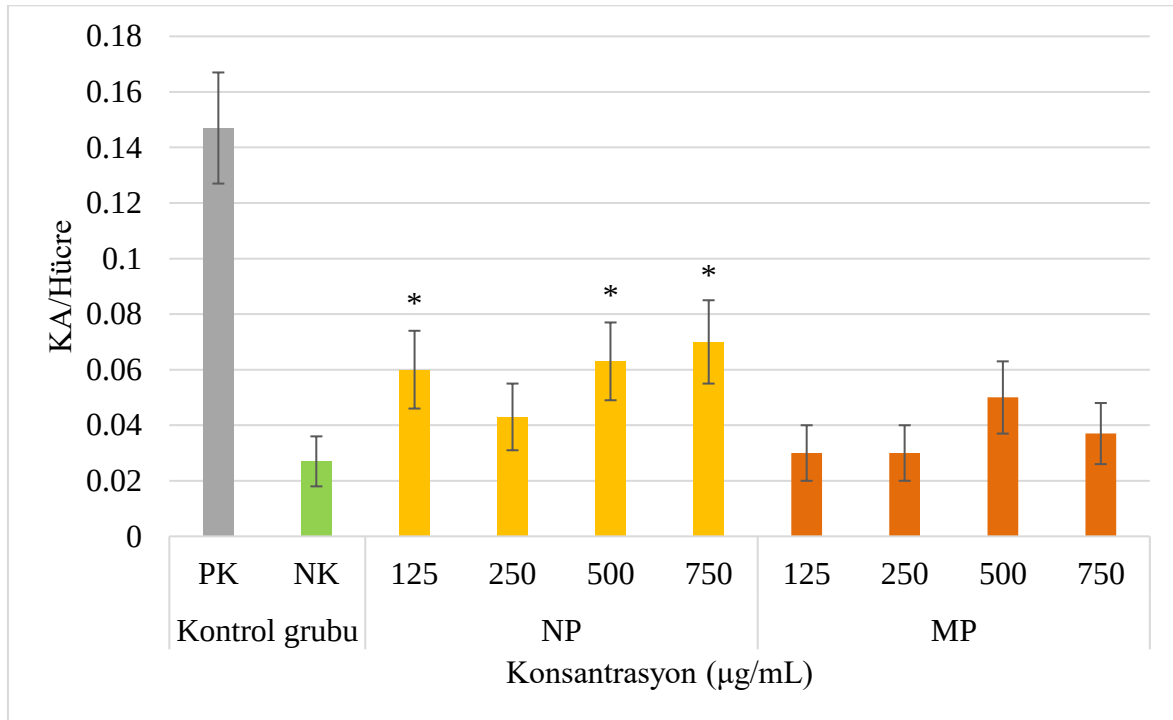
Şekil 4.11. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının anormal hücre frekansına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.



Şekil 4.12. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KA/Hücre oranına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül.

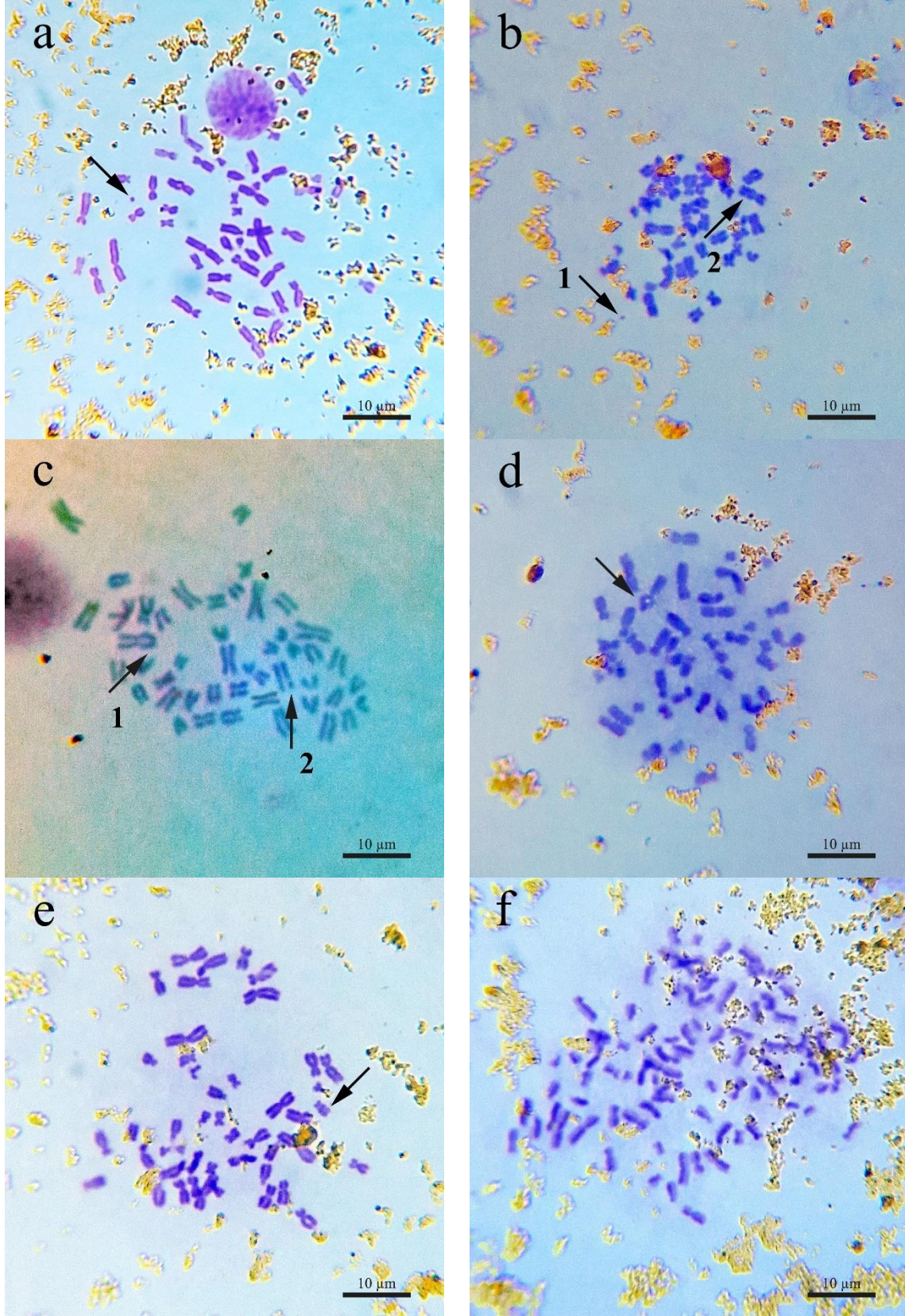


Şekil 4.13. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının anormal hücre frekansına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla $*p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi).



Şekil 4.14. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KA/Hücre oranına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla $*p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi).

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki genotoksisitelerini değerlendirmek amacıyla ışık mikroskobunda tespit edilen bazı metafaz kromozomları ve bu kromozomlarda gözlenen anormallik tipleri Resim 4.3'te gösterilmiştir. Preparatlarda, metafaz kromozomlarının etrafında sarı renkli Fe₂O₃ NP'lerin ve siyah renkli MP'lerin bulunduğu görölmektedir.



Resim 4.3. Lenfosit metafazlarında KA testi görsel değerlendirmesi. a) fragment; b1) fragment ve b2) kromatit kırığı; c1) kardeş kromatitlerde birleşme ve c2) kromatit kırığı; d) kardeş kromatitlerde birleşme; e) kromozom kırığı; f) poliploidi.

4.2.3. Kardeş kromatit değişim testi

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri KKD testi ile belirlenmiştir. Bunun için lenfositler, her iki partikülün 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bu test kapsamında elde edilen metafaz hücrelerinde, M_2 evresinde gözlenen kardeş kromatitler arasındaki değişimler dikkate alınmış ve genotoksisite değerlendirmesi buna göre yapılmıştır. Ayrıca, hücre popülasyonundaki genel bölünebilme potansiyelini belirleyebilmek adına $M\bar{I}$; hücre odaklı bölünebilme potansiyelini belirleyebilmek adına $R\bar{I}$ parametreleriyle de sitotoksisite değerlendirmesi yapılmıştır.

24 saatlik uygulama

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositlerle 24 saatlik etkileşimlerinin genotoksisite ve sitotoksisite sonuç grafikleri sırasıyla Şekil 4.15'te ve 4.16'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre pozitif kontrol olarak kullanılan MMC'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda, hücrelerde 0-35 arasında KKD olduğu, hücre başına düşen KKD düzeyinin 11,75 ve negatif kontrole kıyasla anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. Negatif kontrolde sadece 0-6 KKD gözlenirken, 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik NP uygulamaları sonucunda hücrelerde gözlenen en yüksek KKD sayısının, sırasıyla 7, 9, 11 ve 12 olduğu tespit edilmiştir. Hücre başına düşen KKD sayısının da konsantrasyon arttıkça anlamlı şekilde artış gösterdiği ($p<0,001$) ve sırasıyla 2,45, 2,53, 2,59 ve 3,95 olduğu belirlenmiştir ($r=0,9148$). MP uygulamaları dikkate alındığında, en yüksek KKD sayısı (10), en yüksek konsantrasyon olan 750 $\mu\text{g/mL}$ 'de tespit edilmiştir. Hücre başına düşen KKD sayısı, uygulanan bütün konsantrasyonlarda, konsantrasyon artışından bağımsız olarak ($r=0,5706$), negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir.

Sitotoksisite parametresi olarak değerlendirilen $M\bar{I}$, Fe_2O_3 NP'lerinin bütün konsantrasyonlarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak ($r=0,8801$), negatif kontrole kıyasla düşüş göstermiştir. Bu düşüş, 125 $\mu\text{g/mL}$ haricindeki bütün konsantrasyonlarda (250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$) anlamlı düzeydedir. Fe_2O_3 MP'leri de lenfositlerde, negatif kontrole kıyasla bütün konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağlı olarak ($r=0,8786$), azalmaya sebep olmuştur ancak bunlardan hiçbirisi anlamlı değildir (Çizelge 4.6).

48 saatlik uygulama

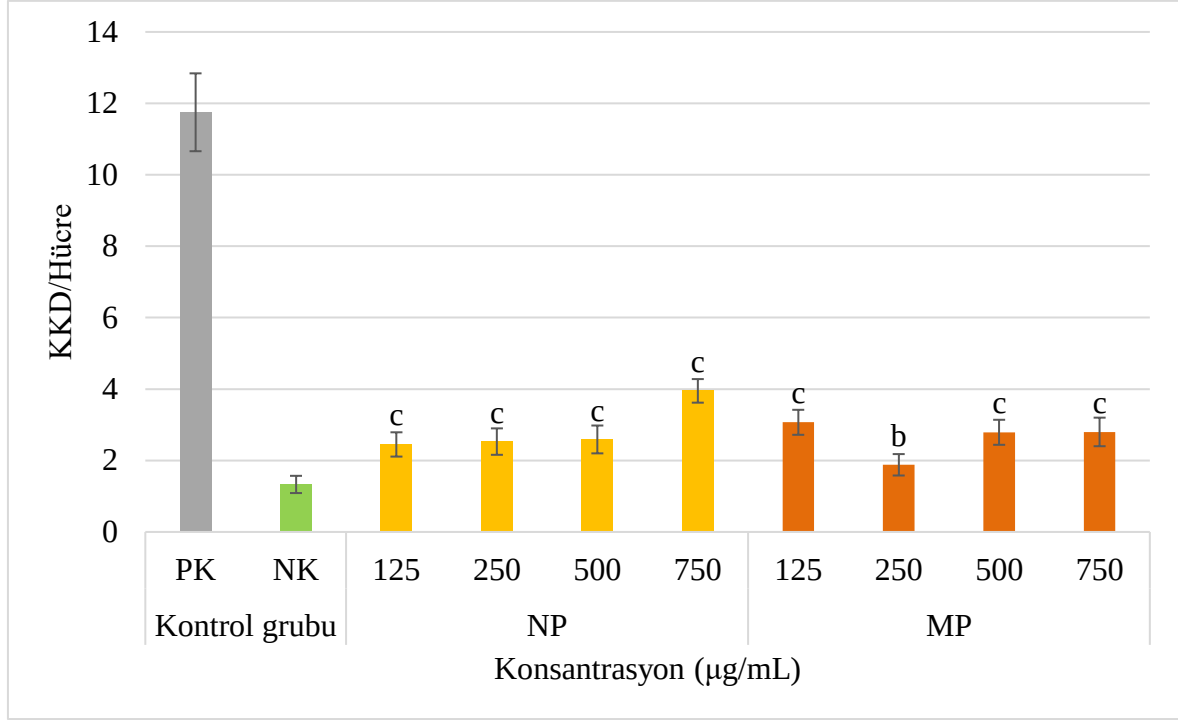
Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositlerle 48 saatlik etkileşimlerinin genotoksisite ve sitotoksisite sonuç grafikleri sırasıyla Şekil 4.17'de ve 4.18'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre hem NP hem de MP uygulamaları, hücre başına düşen KKD sayısını, konsantrasyona bağlı biçimde (NP'ler için $r=0,8044$ ve MP'ler için $r=0,7477$) ve anlamlı düzeyde artırmıştır (NP'lerin ve MP'lerin sırasıyla 500 ve 125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlardaki artışları anlamlı düzeyde değildir). Pozitif kontrol olarak kullanılan MMC, 48 saatlik uygulamada, lenfositlerde 3-29 arasında KKD oluştururken, hücre başına düşen KKD düzeyini 15,75'e çıkarmış ve negatif kontrole kıyasla anlamlı bir artışa sebep olmuştur ($p<0,001$). MP'ler hücre başına en fazla 10 KKD oluştururken, NP'lerde bu sayı 14'e kadar yükselmiştir.

Tespit edilen Mİ, Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasını takiben, kontrole kıyasla bir düşüş göstermiştir. Bu azalma, NP uygulamasında, 125 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda, konsantrasyon artışına bağlı olarak ($r=0,9130$) anlamlı düzeydedir. MP uygulamalarında ise konsantrasyon değişiminden bağımsız olarak ($r=0,0374$) sadece 125 $\mu\text{g/mL}$ 'nin anlamlı artış oluşturduğu belirlenmiştir.

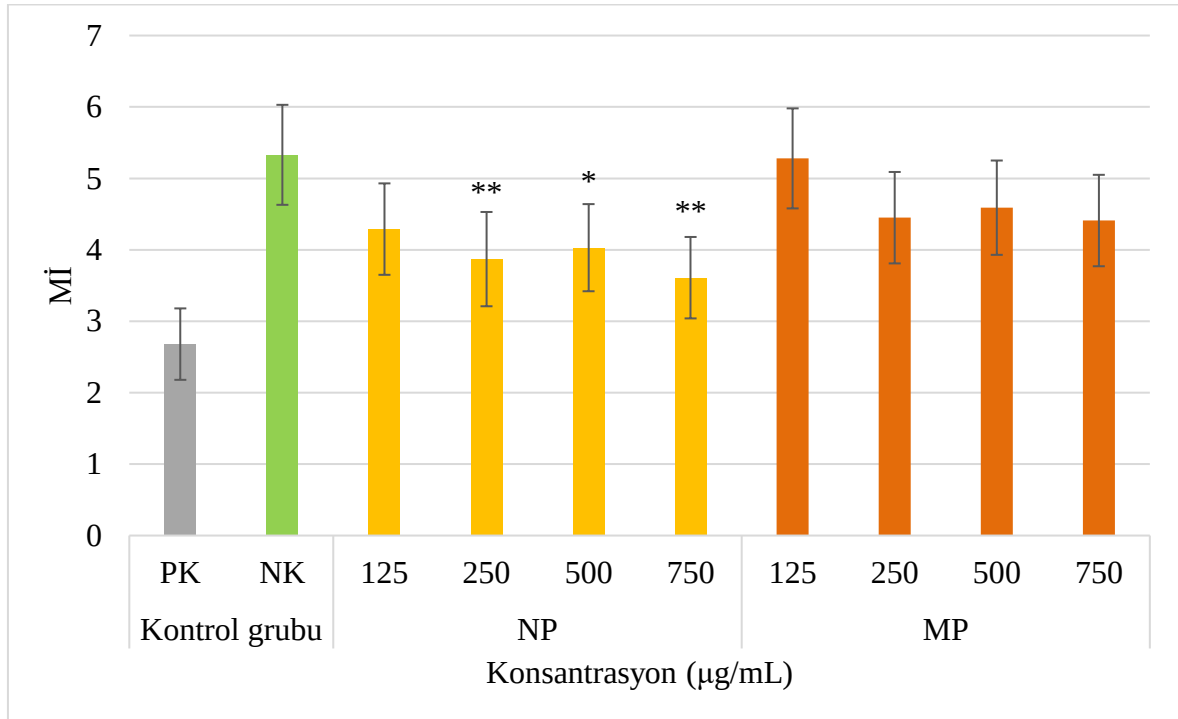
Çizelge 4.6. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin KKD testi sonuçları.

Test Maddesi	Uygulama		Min. Maks. KKD	KKD/Hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)							
NK	24	-	0-6	1,33 ± 0,24	86	98	103	1,97 ± 0,05	5,33 ± 0,70
PK		0,15	1-35	11,75 ± 1,09	91	106	96	1,97 ± 0,05	2,68 ± 0,50
Fe ₂ O ₃ NP		125	0-7	2,45 ± 0,34 ^c	86	90	102	1,91 ± 0,05	4,29 ± 0,64
		250	0-9	2,53 ± 0,37 ^c	79	82	73	1,54 ± 0,05	3,87 ± 0,66**
		500	0-11	2,59 ± 0,39 ^c	92	99	97	1,94 ± 0,05	4,03 ± 0,61*
		750	0-12	3,95 ± 0,33 ^c	74	76	78	1,53 ± 0,05	3,61 ± 0,57**
Fe ₂ O ₃ MP		125	0-9	3,07 ± 0,35 ^c	88	96	96	1,89 ± 0,05	5,28 ± 0,70
		250	0-7	1,88 ± 0,30 ^b	89	100	91	1,87 ± 0,05	4,45 ± 0,64
		500	0-8	2,79 ± 0,35 ^c	93	97	101	1,97 ± 0,05	4,59 ± 0,66
		750	0-10	2,80 ± 0,40 ^c	84	100	101	1,96 ± 0,05	4,41 ± 0,64
NK	48	-	0-9	1,75 ± 0,33	86	105	100	1,99 ± 0,05	5,27 ± 0,70
PK		0,15	3-29	15,15 ± 1,04	88	103	89	1,87 ± 0,05	2,58 ± 0,50
Fe ₂ O ₃ NP		125	0-7	2,95 ± 0,33 ^c	87	97	96	1,90 ± 0,05	4,58 ± 0,66
		250	0-8	2,35 ± 0,33 ^a	94	96	100	1,95 ± 0,05	4,18 ± 0,63*
		500	0-7	2,77 ± 0,31	89	92	103	1,94 ± 0,05	3,69 ± 0,59**
		750	0-14	3,56 ± 0,41 ^c	75	86	79	1,61 ± 0,05	3,92 ± 0,61*
Fe ₂ O ₃ MP		125	0-10	2,01 ± 0,34	85	98	95	1,89 ± 0,05	4,16 ± 0,63*
		250	0-9	3,11 ± 0,41 ^c	87	96	95	1,88 ± 0,05	5,21 ± 0,70
		500	0-7	2,89 ± 0,40 ^c	83	99	98	1,92 ± 0,05	4,44 ± 0,64
		750	0-9	2,69 ± 0,33 ^b	86	98	99	1,93 ± 0,05	5,19 ± 0,69
NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), NP: nanopartikül, MP: mikropartikül, M _{1,2,3} : mitoz evreleri, Mİ: mitotik indeks, Rİ: replikasyon indeksi, SH: standart hata. Kontrole kıyasla ^a p<0,05; ^b p<0,01; ^c p<0,001 düzeyinde anlamlı (t testi). Kontrole kıyasla *p<0,05; **p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi).									

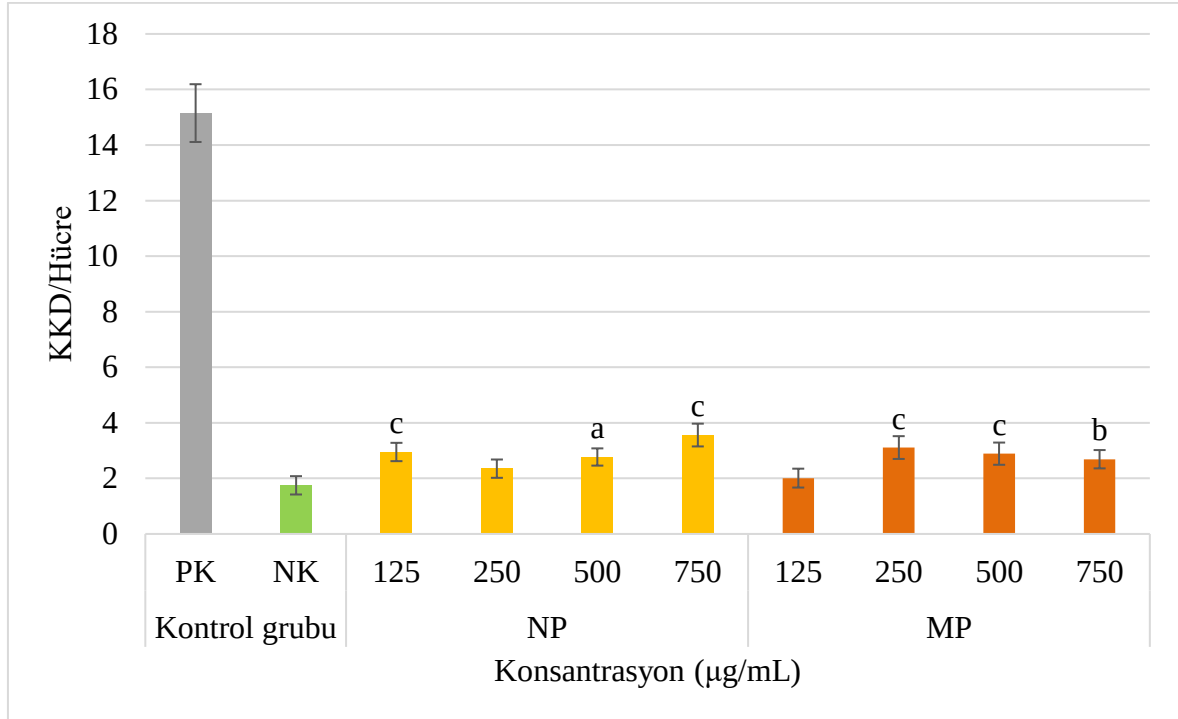
Uygulamalar arasında Rİ sonuçları küçük değişiklikler oluşturmakla beraber, bunlardan hiçbirini kontrole kıyasla anlamlı değildir.



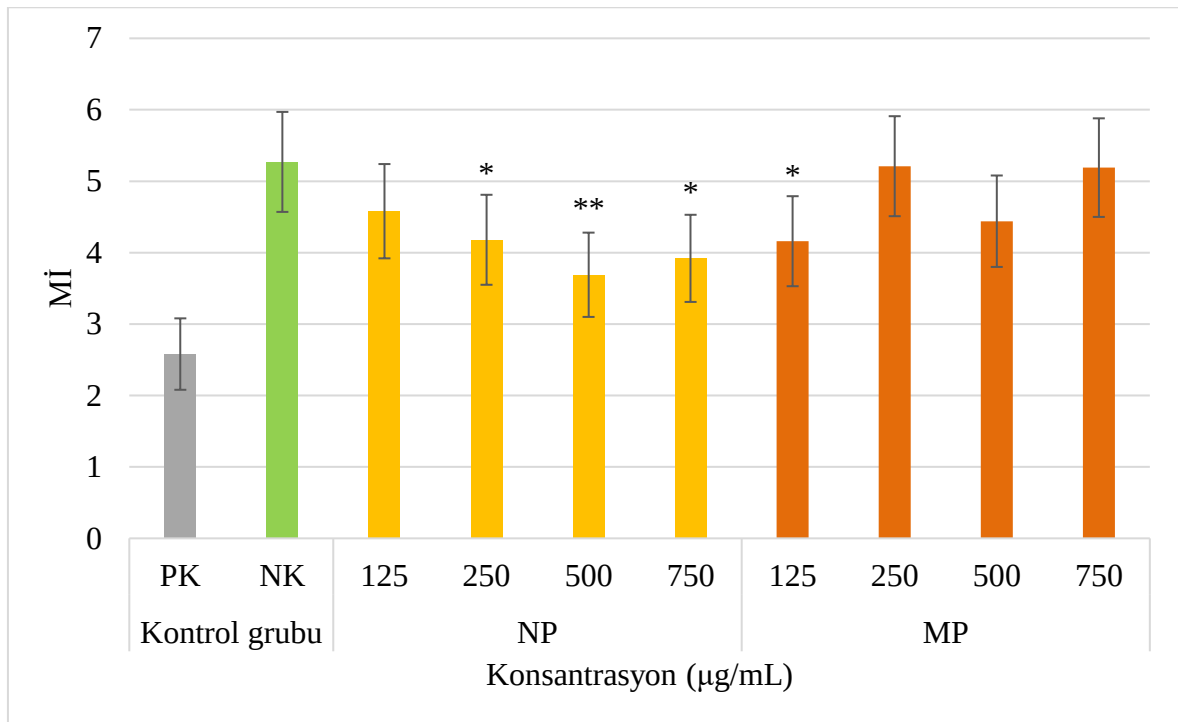
Şekil 4.15. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının KKD/Hücre frekansına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (t testi).



Şekil 4.16. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 24 saatlik uygulamasının mitotik indekse etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla ^{*} $p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi).

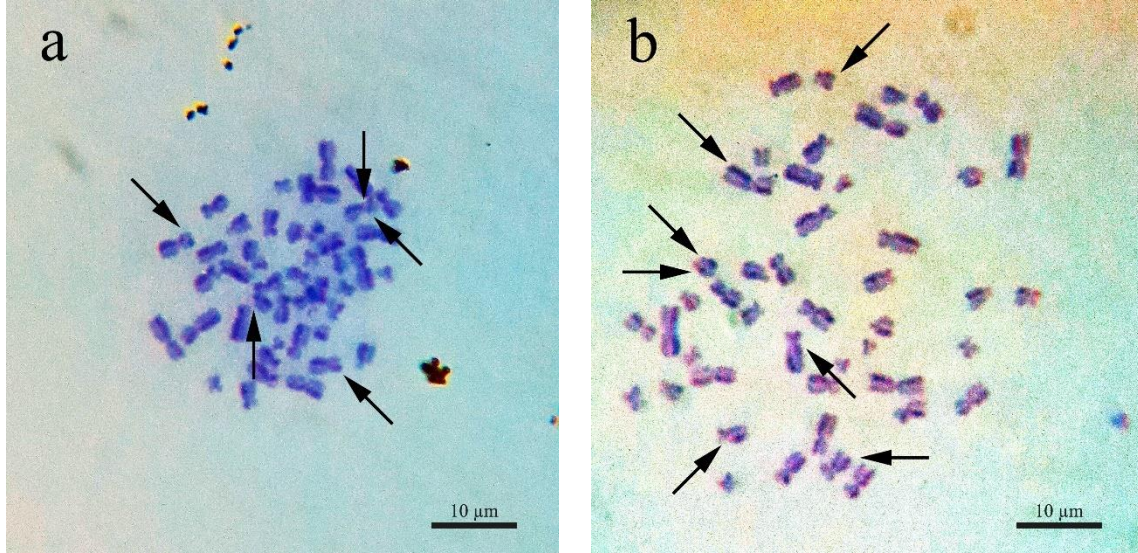


Şekil 4.17. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının KKD/Hücre frekansına etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (t testi).



Şekil 4.18. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin 48 saatlik uygulamasının mitotik indekse etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi).

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki genotoksisitelerini değerlendirmek amacıyla ışık mikroskopunda tespit edilen bazı KKD örnekleri Resim 4.4'te gösterilmiştir. Preparatlarda, metafaz kromozomlarının etrafında sarı renkli Fe_2O_3 NP'lerin ve siyah renkli MP'lerin bulunduğu görülmektedir.

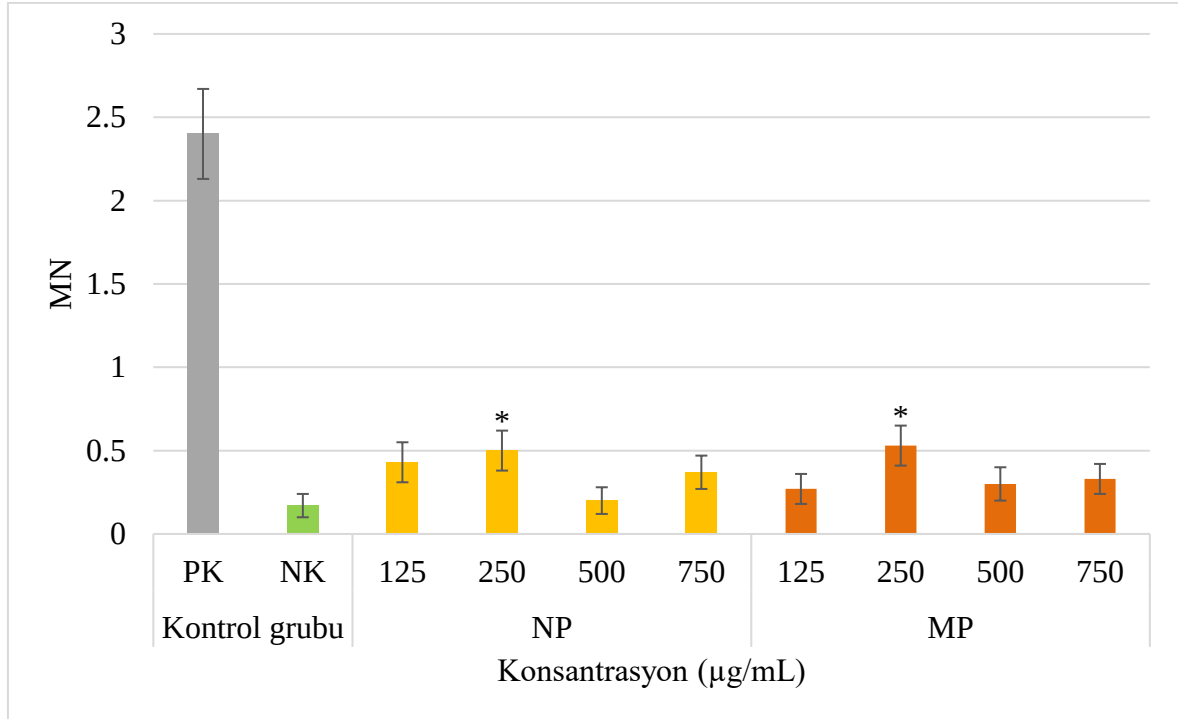


Resim 4.4. Lenfosit metafazlarında KKD testi görsel değerlendirmesi. a) M₂ evresinde bulunan beş kez kromatit değişimi geçirmiş metafaz; b) M₂ evresinde bulunan yedi kez kromatit değişimi geçirmiş metafaz.

4.2.4. Mikronükleus-sitom testi

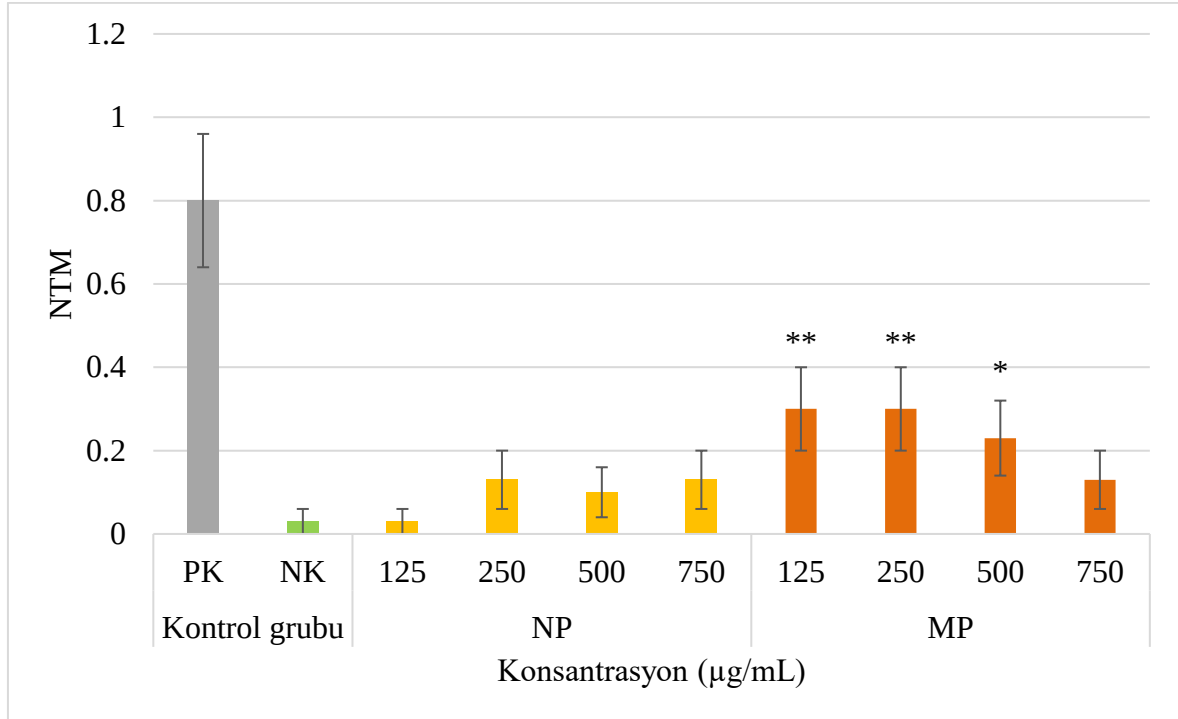
Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri MN testi ile de belirlenmiştir. Bunun için lenfositler, her iki partikülün 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilmiştir. Bu test kapsamında MN oluşumları iki çekirdekli (binükleat) hücrelerde dikkate alınmış ve genotoksisite değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca, hücre odaklı bölünebilme potansiyelini belirleyebilmek adına genel sitotoksisitenin ölçüsü olarak kabul edilen ve kültür ortamında hücre proliferasyonunun göstergesi olan NBİ parametresiyle de sitotoksisite değerlendirme yapılmıştır.

Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin insan lenfositlerle etkileşimlerinin MN, NBİ, NTM ve NKP oluşumları üzerindeki etkileri Çizelge 4.7'da ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Negatif kontrolde 0,17 olan MN frekansı, lenfositlere Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin uygulanması sonucunda bir miktar artış göstermiştir. Ancak uygulamalardan sadece 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik Fe_2O_3

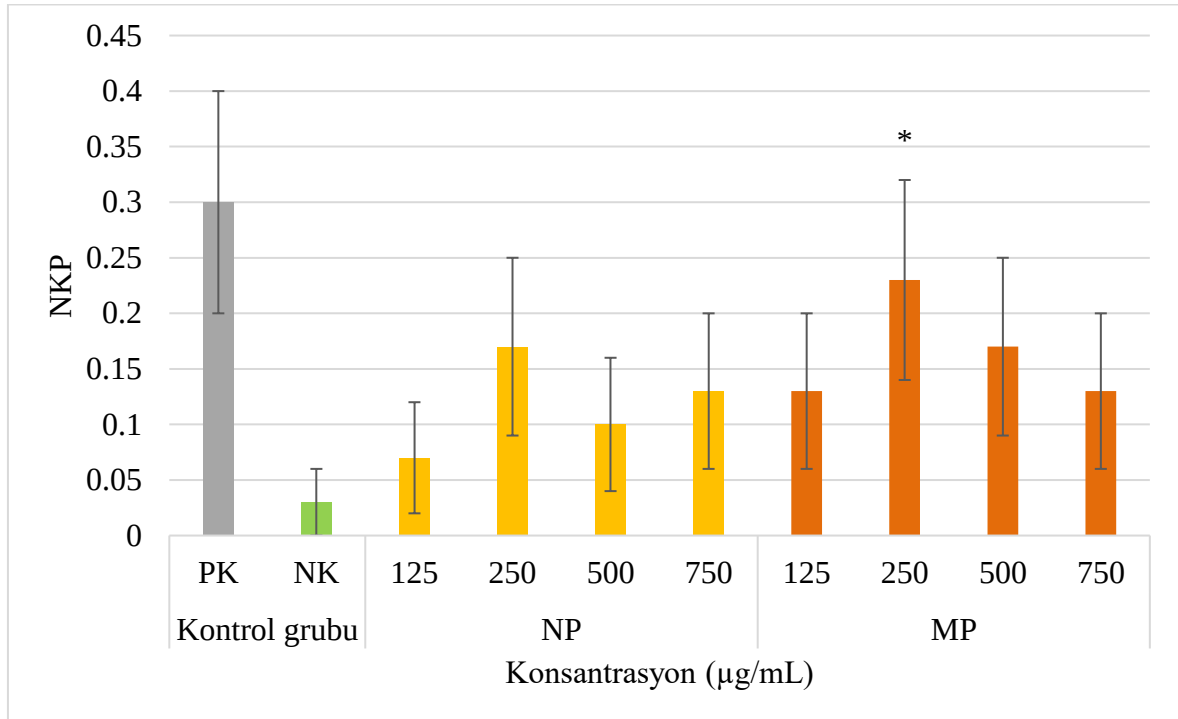


Şekil 4.19. Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin mikronükleus üzerine etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi).

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositlerle etkileşimlerinin MN sitom analizi sonuç grafikleri Şekil 4.20'de ve 4.21'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, NP'lerin, NTM ve NKP oluşumlarını bir miktar artırdığı ancak bu artışların negatif kontrole kıyasla anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. MP'lerin ise orta-düşük (250 µg/mL) konsantrasyonu her iki parametre için de anlamlı artışlar oluşturur iken ($p < 0,05$); 125 ve 500 µg/mL konsantrasyonlu uygulama değerleri yalnızca tomurcuk oluşumu için anlamlı bulunmuştur.

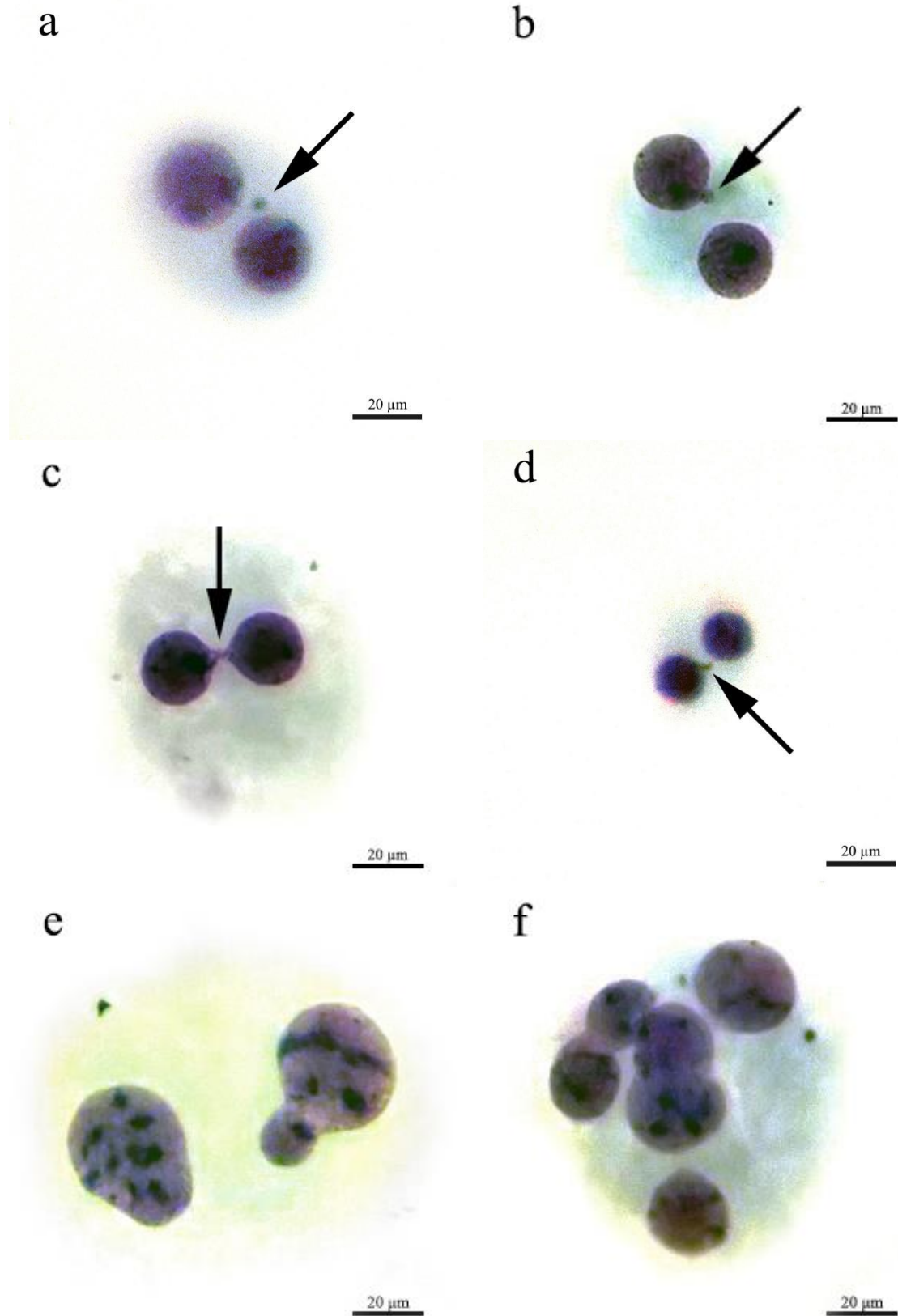


Şekil 4.20. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin nükleer tomurcuk üzerine etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi).



Şekil 4.21. Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin nükleoplazmik köprü üzerine etkisi. PK: pozitif kontrol (MMC), NK: negatif kontrol, NP: nanopartikül, MP: mikropartikül. Kontrole kıyasla * $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi).

Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin lenfositler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla ışık mikroskopunda tespit edilen bazı MN, sitom ve diğer anormallik örnekleri Resim 4.5'te gösterilmiştir.



Resim 4.5. Lenfositlerde MN-sitom testi görsel değerlendirmesi. a) binükleat hücrede bir MN; b) binükleat hücrede nükleer tomurcuk; c) binükleat hücrede nükleoplazmik köprü; d) binükleat hücrede nükleoplazmik bağlantılı nükleer tomurcuk; e) apoptotik hücre; f) multinükleat hücrede iki MN.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, kullanım alanları gün geçtikçe artan, inorganik partikül sınıfı içerisinde yer alan Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri, MCF-7 hücre hattında ve insan lenfositlerinde, çeşitli *in vitro* testlerle araştırılmıştır. Böylece, aynı metal oksidin NP ve MP formlarının hem aynı konsantrasyonlardaki etkilerinin birebir karşılaştırılması yapılabilmiş ve hem de farklı hücre tiplerindeki etkileri kıyaslanabilmektedir. Hücre kültürleriyle yürütülen *in vitro* testlerde, çok hücreli organizmalardan sağlanan çeşitli hücre tiplerinin özel olarak dizayn edilmiş laboratuvar ortamında, kontrollü ve kontaminasyondan korunacak biçimde çalışılabilmektedir. Hem insandan hem de diğer canlılardan alınan hücrelerin suni ortamda kolayca yaşatılabilmesi ve etik kaygıyı da gidermesi, bu tip hücrelerin tercih edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu tez kapsamında kullanılan MCF-7 hücre hattı, çok iyi karakterize edilmiş olması ve diğer meme kanseri hücre hatlarına kıyasla, bilimsel çalışmalarda en fazla sayıda kullanılması gibi yüksek avantajlara sahiptir [212-213]. İnsan lenfositleri ise kolay elde edilebilir olmasıyla, kültür işleminin basit olmasıyla, yapışkan hücre olmamasıyla ve yine birçok çalışmada öncelikli olarak kullanılan hücre kültürü çeşidi olmasıyla öne çıkmaktadır [214]. Gerçekleştirilen bu *in vitro* yaklaşımlarda iki farklı hücre tipinin kullanılma sebebi, farklı hücresel fonksiyonların farklı testlerdeki durumlarını değerlendirerek *in vivo* koşullara daha yakın bir çalışma yürütebilmektir. Ek olarak, çalışmaların gerçekleştirildiği laboratuvarlarda insan lenfosit hücreleriyle ve MCF-7 hücre hattıyla uzun süredir uygulamalar yapılmaktadır ve bu sayede deneysel sapmalar büyük oranda, en baştan itibaren, elimine edilmişlerdir.

Araştırmamızda, incelenmesi hedeflenen Fe_2O_3 NPlerinin ve MP'lerinin çalışmalarda kullanılacak optimum konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, deneyin yürütüldüğü laboratuvar da daha önce değerlendirilmiş ve literatürde kullanılmış konsantrasyonlar da dikkate alınarak bazı ön testler uygulanmıştır. İnsan lenfositlerinde komet, KA ve MN testlerinin kullanıldığı ilk uygulamaları takiben kullanılacak asıl konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bu testlerde özellikle hücre canlılığı ve Mİ dikkate alınmıştır. Yapılan uygulamalardan elde edilen verilere dayanarak MCF-7 hücrelerinde 5, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar kullanılır iken insan lenfositlerinde 25, 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

Çeşitli fiziksel/kimyasal etkenlerin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan testlerden biri olan MTT testi, metabolik aktivitenin ölçümüne dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Tekrarlanabilirliği yüksek, basit, güvenilir ve hızlı olması sebepleriyle oldukça yaygın kullanılan bir testtir. Sitotoksiteyi belirleyen testlerin amacı, yeni sentezlenen bileşiklerin, ilâç keşif ve geliştirme araştırmalarının evrelerine geçmeden önce canlı hücre üzerindeki olası toksik etkilerini ve mekanizmasını tespit etmektir. Birçok ilâcın sitotoksik olması tercih edilmez iken, kanser tedavisinde kullanılan ilâçlar gibi bazılarının da sitotoksite yaratarak kanserli hücreleri öldürmeleri istenmektedir. Bu nedenle, sitotoksite bazen etkinlik, bazen de toksisitenin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca *in vitro* sitotoksite testleri sayesinde kısa sürede, yüksek tekrarlanabilirlikle birden fazla deney gerçekleştirilebilmektedir [215]. MCF-7 hücreleri, insan meme kanseri hücre hattı olup, sitotoksite çalışmalarında oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin, kullanılan konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde, insan MCF-7 meme kanseri hücre hattında sitotoksite göstermediği tespit edilmiştir. Hatta her iki partikülün kullanılan tüm konsantrasyonlarının (MP için 5 µg/mL hariç), hücre canlılığı frekansını, kontrole kıyasla anlamlı olmayan biçimde artırdığı gözlenmiştir. NP'lerin, özellikle 125 µg/mL'den itibaren bütün konsantrasyonlarının, hücre canlılığını artırdığı, MP'lerin de özellikle 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarında hücre canlılığını artırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, her iki partikülün de bu hücre hattında hücre döngüsünü bloke ederek proliferasyonu düşürmediğini veya hücre ölümüne sebep olmadığını göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, daha önce yapılan bazı araştırmalarla uygunluk göstermektedir. Örneğin, yaklaşık 10 nm boyutlu Fe₂O₃ NP'lerinin üç farklı konsantrasyonu (10, 20 ve 30 µg/mL) insan rahim ağzı kanseri hücrelerine (HeLa) 12, 24 ve 72 saat sürelerle uygulandığında, MTT testiyle yapılan sitotoksite değerlendirmesinde anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır [216]. Özellikle biyosentez sayesinde üretilen Fe₂O₃ NP'leri bu bağlamda değerlendirilmelidir. Konsantrasyon aralığı 0-200 µg/mL olan 20-60 nm'lik biyosentetik Fe₂O₃ NP'lerin 24 saat süresinde A549 hücre hattına uygulanması sonucunda MTT testi hücre canlılığı sonuçları anlamlı bulunmamıştır [217]. Yine konsantrasyon aralığı 0.1-7,5 mg/mL olan 18-28 nm'lik biyosentetik Fe₂O₃ NP'lerin 24, 48 ve 72 saat sürelerinde MCF-7 ve 3T3 hücre hatlarına uygulanması sonucunda MTT testi hücre canlılığı sonuçları düşüş göstermiş fakat anlamlı bir düzeyde olmadığı belirtilmiştir [218]. Sitotoksite gözlenmeyen bu çalışmalarda partiküllerin inflamasyonu tetiklemedikleri belirtilmiştir. Bunların aksine,

geçmiş bir çalışmada yaklaşık 44 nm boyutlu aynı NP'lerin beş farklı konsantrasyonunun (10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL) insan lenfositlerindeki 24 saatlik etkisi incelendiğinde, MTT ve laktat dehidrogenaz testlerinin sonuçları, bu partiküllerin sitotoksik olduklarını göstermiştir [219]. Aynı şekilde, yaklaşık 20 nm boyutlu polietilen glikol (PEG) modifiyeli Fe₂O₃ NP'lerinin 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL konsantrasyonları, Royan B1 hücrelerine, 12 ve 24 saat uygulandığında, anlamlı sitotoksik sonuçlar gözlenmiştir [220]. Elde edilen bu pozitif sonuçlara da inflamasyon veya direkt olarak partikül kaynaklı ROT artışının sebep olduğu düşünülmektedir [221-223]. Bu tez çalışmasında kullanılan MCF-7 hücrelerinde elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, aynı tip partikülün, farklı konsantrasyon ve uygulama süresine göre ve ayrıca hücre tipine göre benzer etkiler gösterebileceği gibi, farklı sonuçlar gösterebileceği de görülmektedir.

Bu çalışmada, MTT testiyle incelenen Fe₂O₃ NP'leri ve MP'leri opak olup, hızlı bir şekilde kutuplaşma, çabuk çökme gibi özellikler göstermektedir. Kuyucuklar içerisinde uygulaması yapılan partiküller, adherent hücrelerin üzerlerini örterek ya da birbirleriyle olan iletişimlerini engelleyerek sadece sitotoksosite sebebiyle etkiliyor olmayabilir. Bu partiküllerin temas ettikleri tüm yüzeylere yapışabilme nedeniyle, opaklıklarından kaynaklı olarak, spektrofotometrik ölçümleri de yanılabileceği düşünülmektedir [224-225]. Ayrıca özellikle NP'lerin toksisitesi temelde şekillerine, yüzey alanına, yüzey/kütle oranına, partikül ebatları ve bunun dağılımına, yüzey yüklerine, çözünürlüklerine gibi çeşitli fiziko-kimyasal özelliklerine de dayandırılmaktadır [226]. NP'lerin, hidrodinamik boyutlarının da, kültür ortamındaki agregasyonlarından ötürü daha büyük olduğu ve agregasyonun partikül boyutuyla da doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Partikül boyutunun farklılığından/büyükliğünden, hücre içerisine giremeyeceği ve dolayısıyla sitotoksitelerinde farklılıklar gözlenebileceği belirtilmektedir [227].

Mitotik hücrelerde bölünebilme yeteneği, ortam şartlarının ve hücresel fonksiyonların uygunluğuyla doğrudan ilişkilidir. Uygulaması yapılan Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin kültürdeki lenfositlerde olası sitotoksitelerini tespit etmek amacıyla Mİ değerlendirmesi de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, NP'lerin MP'lere kıyasla her iki uygulama süresinde de en düşük konsantrasyon (125 µg/mL) haricindeki tüm konsantrasyonlarda, Mİ'i anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu tez çalışmalarının uygulandığı laboratuvar da daha önce aynı Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin Allium cepa da, dört farklı konsantrasyonunun (125, 250, 500 ve 750 µg/mL) 24, 48 ve 72 saatlik

uygulamalarının Mİ üzerindeki etkileri de incelenmiştir [203]. Sonuçlara bakıldığında, her uygulama süresinde ve konsantrasyonda her iki partikül grubu da Mİ’i düşürmüştür (NP’lerde, 250 µg/mL-24 saat ve MP’lerde 125 µg/mL-48 saat hariç). Benzer Fe₂O₃ NP’lerinin kullanıldığı ve yine aynı laboratuvarında insan lenfositleriyle yapılan bir başka *in vitro* araştırmada ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarda, dört farklı konsantrasyon (39,062, 78,125, 156,250 ve 312,500 µg/mL) çalışılmıştır [228]. Mİ sonuçları 48 saatte 156,250 ve 312,500 µg/mL anlamlı düşüş gösterir iken 24 saatte sadece en yüksek konsantrasyonda anlamlı düşüş bulunmuştur. Çalışma sonuçları, bu tezde gerçekleştirilen Mİ sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. NP’ler, mikron boyutları sebebiyle hücre sitoplazmasından ve hatta çekirdeğinden geçerek hücresel işleyişi bozabilecek, bölünmeyi durdurabilecek potansiyele sahiptirler [229-230]. Benzer şekilde, MP’lerin en düşük konsantrasyonu için de uzun süreli maruziyette aynı sebep geçerli sayılabilir. Konsantrasyona bağlı olarak artan agregasyon, partiküllerin, hücre içerisine difüzyonla girmesinin önüne geçebilmektedir [231-232]. Uzun süreli uygulamada, endositoz mekanizmalarının da işlevleri sayesinde [233-236] Mİ anlamlı bir düşüş göstermiş olabilir.

Bu tez çalışmasında, Fe₂O₃ NP’lerinin ve MP’lerinin insan lenfositlerinde, DNA üzerindeki etkileri komet testiyle değerlendirilmiştir. Komet testi prensipte, hücre çekirdeğinde kırılmış DNA’nın agaroz jel içerisinde elektrik kuvvetiyle artı kutba doğru hareket etmesi prensibine dayanmaktadır. DNA’nın sağlam olarak kaldığı çekirdek kısmı “baş” olarak isimlendirilir iken parçalanmış ve boyutlarına göre göç eden DNA “kuyruk” olarak isimlendirilir. Böylece, DNA’ında hasar olan bir hücre, yıldız kayması/kuyruklu yıldız gibi görünür. Komet testi, geleneksel genotoksisite testlerine göre daha hassas, ucuz, nispeten basit ve farklı parametrelere göre değerlendirme imkânı sağlayan bir testtir [237]. Avantajları ve kalitesi sebebiyle, özellikle genotoksikoloji alanında sıklıkla kullanılmaktadır [138, 238]. Bu çalışmada, komet testinin üç farklı parametresi (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk moment) değerlendirilmiştir.

İzole lenfositlerde uygulanan komet testi sonucunda, Fe₂O₃ NP’lerinin ve MP’lerinin iki saatlik uygulamasında ne kuyruk uzunluğu ne kuyruk yoğunluğu ne de kuyruk momentinde negatif kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer yandan, üç saatlik uygulamada, DNA kırıklarında ve dolayısıyla komet bulgularında artışlar olduğu belirlenmiştir. Her iki partikül de kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunda, konsantrasyona bağlı olmaksızın, anlamlı artışlar oluşturmuştur. Anlamlılık seviyelerine

dikkat edildiğinde, MP'lerin her iki parametrede de daha etkili olduğu görülmektedir. Kuyruk yoğunluğu için, NP'lerden sadece 500 µg/mL konsantrasyon etkili görünür iken ($p<0,05$) MP'lerden 25 ve 500 µg/mL konsantrasyonların etkisi daha anlamlıdır ($p<0,001$). Kuyruk momenti açısından negatif kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu sonuçlarından türetilen bir değer olup, komet testinde oldukça kullanışlı ve tercih edilen bir parametre olmakla beraber [237] farklı laboratuvarlar arasındaki sonuçların karşılaştırılması, bu parametre açısından oldukça zordur [239]. Bu nedenle, laboratuvarlar arası karşılaştırmaların yapılabilmesi açısından özellikle kuyruk yoğunluğunun kullanılması önerilmektedir. Kumaravel ve Jha (2006), bilimsel çalışmalarda hem kuyruk momentinin hem de kuyruk yoğunluğunun kullanılabileceğini rapor etmiştir [240].

Sadece NP'ler değil, MP'ler de endüstriyel ve tıp alanlarında kullanıldıkları gibi, çevresel remediasyonlarda oldukça fazla tercih edilmektedir [31-32]. Ağır metalleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla kullanılan MP'lerin genotoksik riskleri de beraberinde getirebileceklerine yönelik bulgular mevcuttur. Örneğin, gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, NP'lerin yüksek konsantrasyonlarda (200-1000 ppm) anlamlı sitotoksikite göstermedikleri ve oksidatif strese artış oluşturmadıkları, komet testinde de DNA hasarı oluşturmadıkları belirtilir iken, büyük boyutlara sahip MP'lerin hücrelerle etkileşimleri incelendiğinde, hücrelere endositoz mekanizmaları sayesinde daha kolay girebildikleri ve sonuçta daha genotoksik olabilecekleri belirtilmiştir [233-236]. Karlsson ve arkadaşlarının (2009) yürüttüğü *in vitro* bir çalışmada, Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ NP (29 nm) ve MP (<1 µm) uygulamalarını takiben, bu partiküllerin sitotoksikite oluşturmadıkları ve komet testinde düşük seviyede DNA hasarı oluşturdıkları belirlenmiştir [241]. Düşük seviyeli hasarın sebebinin, partiküllerin yüzey özelliklerine ve iyonlara bağlı olabileceği ve yeterli inflamasyon yaratmadıklarından olduğu belirtilmiştir [242-243]. Bu tez çalışmalarının uygulandığı laboratuvar da daha önce aynı Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin Allium cepa üzerinde, dört farklı konsantrasyonun (125, 250, 500 ve 750 µg/mL) 24 ve 48 saatlik etkileri komet testi kullanılarak incelenmiştir [203]. Araştırma sonuçlarına göre, 24 saat için NP'ler 125 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda DNA hasarında artışa sebep olur iken MP'ler 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda DNA hasarında artışa sebep olmuştur. 48 saatlik uygulamalarda ise NP'ler benzer sonuç verir iken MP'lerin 500 ve 750 µg/mL konsantrasyonlarında DNA hasarında artış görülmüştür. Benzer Fe₂O₃ NP'lerinin kullanıldığı ve yine aynı laboratuvar da insan lenfositleriyle yapılan bir başka *in vitro*

araştırmada ise 2 ve 3 saatlik süre ve dört farklı konsantrasyonla (39,062, 78,125, 156,250 ve 312,500 µg/mL) yürütülen komet testi sonucunda, her uygulama için negatif kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu değerlerinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir [228]. Bu tez çalışmasından elde edilen komet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu verilerine dayanarak, uzun süreli maruziyetlerde, özellikle genomik seviyede MP'lerin NP'lere kıyasla potansiyel risklerinin daha fazla olduğu görülmektedir. Dolayısıyla buradaki sonuçlar, daha önce yapılan ve yukarıda özetlenen bazı araştırma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. NP'lerin daha düşük düzeyde DNA hasarı oluşturması; nano ebatla olması nedeniyle agregasyon oluşturmalarından ve hidrodinamik çapının büyümesi nedeniyle hücrelere giriş yapamamasından kaynaklanıyor olabilir. MP'lerin daha fazla DNA hasarı oluşturması, agregasyon düzeylerinin daha düşük ve ayrıca endositoz mekanizmalarıyla hücre içine alınabilmesinden kaynaklanıyor olabilir [233-236, 244]. Ayrıca, komet testiyle genotoksisite değerlendirmesi yapılan Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin bu test için uygunlukları ve uygulama konsantrasyonları da yine ayrıca ele alınmalıdır. Kullanılan partiküller ışığı yansıtabilmek, yüzeyinde kimyasal adsorpsiyonu yapabilmek ve çabuk agregasyon sağlayabilmek gibi özellikler göstermektedirler [245-247]. Floresan mikroskopuyla değerlendirme yapılan bu testte partiküller, boyayı yüzeyinde tutarak ya da özellikle yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin etrafını/üzerlerini kaplayarak yanlış pozitif sonuçlar vermeye sebep olabilmektedirler [204].

Kromozom anormallikleri testi, genotoksikolojide ve birçok genetik tanı merkezinde rutin olarak kullanılan önemli bir kromozomal hasar tespit testidir. Hücre boyutunda inceleme yapılabilmesi, gözleme dayalı olması, çok farklı kromozom hasarlarının kolay tespit edilebilmesi, istatistiksel açıdan yeterince hücre incelenmesi ve sitotoksitenin göstergesi olan Mİ'in tespit edilmesine de imkân vermesi bu tekniğin en önemli avantajlarıdır. Dezavantajları ise yinelenebilir olmaması, tecrübe ve emek gerektirmesi ve kültürlenme adımı içermesi sayılabilir [248-249].

Bu tez çalışmasında, genotoksik açıdan incelenen Fe₂O₃ NP'leri ve MP'leri, 24 saatlik uygulama süresinde, hiçbir uygulama konsantrasyonunda KA frekansında ve KA/Hücre oranında, kontrole kıyasla anlamlı bir artış oluşturmamıştır. 48 saatlik uygulamada ise sadece NP'lerin 125, 500 ve 750 µg/mL konsantrasyonlarında her iki parametrede de anlamlı artışlar gözlenmiştir. Buna göre NP'lerin uzun süreli maruziyetlerde etkili oldukları düşünülebilir. Bütün KA sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, partiküllerin en yüksek

düzeyde oluşturduğu kromozomal hasar, kardeş kromatitlerde birleşmedir. Bu anormallik, ortamdaki partikül artışına ve dolayısıyla stres artışına bağlı olarak telomeraz aktivitesinin azalması ya da partiküllerden kaynaklanan iyonların telomer bölgelerine doğrudan hasar vererek diğer hasarlı zincirlerle birleşmeye açık duruma getirmeleri sebepler arasında gösterilebilir [250-253].

Daha önce yapılan araştırmalar incelendiğinde, yaklaşık 43 nm boyutlardaki, 10-100 µg/mL konsantrasyonlu Fe₂O₃ NP'lerinin 24 saatlik uygulamalarının *in vitro* insan lenfositlerinde MTT ve laktat dehidrogenaz (LDH) testiyle sitotoksik olduğu ve ayrıca komet ve KA testleriyle de genotoksik olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, oksidatif stresin de önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir [219]. Ratlar üzerinde yürütülen *in vivo* bir araştırmada, 100 nm boyutlarından küçük olan Fe₂O₃ NP'lerinin farklı konsantrasyonlarının bir hafta boyunca uygulanmasını takiben, kan ve kemik iliği hücrelerinde KA ve komet testleri gerçekleştirilmiştir. DNA hasarında, NP'lerin düşük konsantrasyonlarında (25 mg/kg vücut ağırlığı) bile anlamlı düzeyde artış gözlenir iken MN frekansının daha yüksek konsantrasyonlarda (50-100 mg/kg vücut ağırlığı) anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bu artış yine oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir [127]. Bu tez çalışmalarının uygulandığı laboratuvar da daha önce aynı Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin *Allium cepa* üzerinde, dört farklı konsantrasyonunun (125, 250, 500 ve 750 µg/mL), 24, 48 ve 72 saatlik etkileri KA testi ile incelenmiştir [203]. Araştırma bulgularına göre, NP'ler tüm uygulamalarda (72 saatlik 125 µg/mL hariç) negatif kontrole kıyasla sonuçlar anlamlı artış gösterir iken MP'lerin sadece yüksek konsantrasyonda sonuçların anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer Fe₂O₃ NP'lerinin kullanıldığı ve yine aynı laboratuvar da insan lenfositleriyle yapılan bir başka *in vitro* araştırmada ise dört farklı konsantrasyonun (39,062, 78,125, 156,250 ve 312,500 µg/mL) 24 ve 48 saatlik etkileri çalışılmıştır [228]. KA sonuçlarına göre, 24 saatlik uygulamalarda yüksek olan iki konsantrasyon anlamlı artış gösterir iken 48 saatlik uygulamada, ek olarak 78,125 µg/mL konsantrasyon da anlamlı artış göstermiştir. Diğer yandan bazı *in vivo* araştırmalarda, partiküllerin genotoksik olmadığı yönünde bulgular da tespit edilmektedir. Ratlarda gerçekleştirilen bir çalışmada Fe₂O₃ NP (30 nm) ve bulk formlarının oral yoldan (0,5-2 g/kg vücut ağırlığı) 6-72 saat verilmelerini takiben uygulanan komet, KA ve MN testlerinin hiçbirinde, genetik hasarda anlamlı bir artış tespit edilmemiştir [102]. Genotoksisitenin oluşmaması, demir partiküllerinin ratlarda oksidatif stres artışına sebep olmamasıyla açıklanmıştır [254].

Doğaya salınan Fe₂O₃ NP'lerinin, çevresindeki canlılarla bir şekilde etkileştikleri ve zarar verdikleri de yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Suların arıtılmasında kullanılan ve bu yolla karasal/sucul çevrelere yayılan nano ebatlı Fe₂O₃ partiküllerinin tütün BY-2 hücrelerinde, 5-500 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 24 saatlik tetrazolium ve Evans mavisi uygulamaları ile yapılan sitotoksikite değerlendirmesinde, en düşük konsantrasyonun (5 µg/mL) hücre canlılığında anlamlı düşüş gösterdiği bulunmuştur. Komet testinde de düşük konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 µg/mL) daha yüksek DNA hasarı gözlemlendiği ve bu etkinin, partiküllerin düşük konsantrasyonlarda hücre içerisine daha yoğun seviyede alınabilmesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir [255]. Turplar üzerinde uygulanan bir başka çalışmada, partiküllerin yüksek konsantrasyonlarında (1-2 mg/L) kök uzunluğu ve tohum üretimi gibi biyolojik faaliyetlerin zarar gördüğü, düşük konsantrasyonlarda (0,25-0,5 mg/L), komet testiyle tespit edilen genotoksik etki ve ayrıca oksidatif stres seviyelerinde anlamlı artışlar olduğu rapor edilmiştir [25]. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen komet ve KA testlerinin sonuçlarının ortak noktası, NP'lerin, düşük konsantrasyonlarda genetik hasarda anlamlı artışlar oluşturur iken, orta-düşük (komet için 125 ve KA için 250 µg/mL) konsantrasyonlarda anlamlı etki göstermemiş olmalarıdır. Bu sonuçlar, Fe₂O₃ NP'leri ve MP'lerinin lenfositlerde oluşturduğu etkilerin, literatürdeki verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kardeş kromatit değişimi, kromatitler arasında homolog lokuslardaki DNA değiş tokuşunun bir sonucudur. DNA'nın kırılıp yeniden birleşmesiyle oluştuğu düşünülmekte ve memeli hücrelerinde çeşitli fiziksel/kimyasal klastojenler tarafından indüklenmektedir [256]. KKD ve KA testleri, genotoksikitenin tespitinde kullanılan en etkin sitogenetik tekniklerdir. KKD testi, DNA üzerindeki toksik aktivitenin belli bir açıdan hassas biçimde analiz edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu testle tespit edilen hasarların, tespit edildiği canlı için uzun ömürlü etkileri olduğu vurgulanmaktadır. İlgili husus, Wolff (1977) tarafından şu şekilde açıklanmıştır, "KA testiyle tespit edilen bazı anormallikler (çoğu durumda) hücre ölümüne sebep olmaktadır, oysa KKD'lerde durum farklıdır." Başka bir deyişle canlı hücre, yaşamaya devam etmek adına gerekli tamir mekanizmalarını kullanmıştır lakin canlının gelecek zamanlardaki sağlık durumu bundan ciddi şekilde etkileniyor olabilir. KKD oluşumunun kimi zaman DNA üzerinde delesyon, insersiyon veya çerçeve kayması mutasyonları yaratabileceği düşünülmektedir [257].

Kardeş kromatitlerde değişim testi, genotoksisite tespitinde kullanılmasına karşın, bu testle ilgili tartışmalar da mevcuttur. KKD testi, sadece KKD oluşumuna yol açan DNA hasarlarının tespiti için uygundur. Geçmiş çalışmalarda, hafif genotoksik etkileri tespit edebildiği vurgulandığı gibi [258-260] yanlış pozitif sonuçlar verdiği de belirtilmiştir [261-262]. Tartışmalar, yalnızca KKD'nin hücrede yarattığı biyolojik etkilerin hala bilinmediği gerçeğiyle değil, çoğu zaman KA testiyle gösterdiği DNA hasarı sonuçlarındaki farklılıklarla da desteklenmektedir. Yine de bu test, genotoksisitenin moleküler mekanizmaları hakkında ek bilgi ve anlayış elde etmek amacıyla özel bir yere sahiptir [263]. Bir toksisite çalışmasında KKD testinin kullanımı, klastojenlerin tespiti için güvenilir bir yöntemdir. Çünkü KKD analizi, KA tespitinden çok daha hassastır [207, 264]. Ayrıca, pestisitlerin, endüstriyel kontaminasyonun ve ağır metallerin oluşturduğu tehlikelerin tespiti için kullanılan etkili KA ve MN testleriyle birlikte sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [155, 265].

Bu tez çalışmasında uygulanan KKD testi sonuçları, MTT, komet, KA ve MN testleri sonuçlarından çok daha farklı bir tablo oluşturmaktadır. 24 saatlik uygulamalarda, hem NP'lerin hem de MP'lerin uygulanmasından sonra, hücre başına düşen KKD sayısı, her konsantrasyonda anlamlı artışlar göstermiştir. 48 saatlik uygulamalarda da hem NP'lerin hem de MP'lerin bir konsantrasyonu dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda (NP için 500 µg/mL, MP için 125 µg/mL), KKD/Hücre sayısı negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamalar 24 saatlik uygulamalarla kıyaslandığında ise MP 250 µg/mL konsantrasyonu hariç genel hasar ve anlamlılık düşüş göstermiştir. Literatürde, Fe₂O₃ NP'lerinin genotoksisitesinin KKD testiyle incelendiği bir çalışma tespit edilememiştir. Yalnızca, bu tez çalışmasının uygulandığı laboratuvar da daha önce benzer Fe₂O₃ NP'lerinin insan lenfositleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkileri, dört farklı konsantrasyon (39,062, 78,125, 156,250 ve 312,500 µg/mL) kullanılarak KKD testi ile incelenmiştir [228]. Elde edilen sonuçlara göre, 24 saatlik uygulamada 312,500 µg/mL konsantrasyonu ve 48 saatlik uygulamada da 156,250 ve 312,500 µg/mL konsantrasyonları negatif kontrole kıyasla anlamlı artış oluşturmuştur. Bir başka araştırmada, insan lenfositleri üzerinde 100 nm'den küçük ve 10 µm boyutlarındaki TiO₂ partiküllerinin 1-10 µM konsantrasyonlarındaki genotoksisitesi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, KKD artışının konsantrasyona bağlı ve anlamlı düzeyde olduğu gösterilmiştir [266-267]. Benzer şekilde, 6, 20 ve 50 nm boyutlarındaki SiO₂ partikülleriyle yürütülen bir çalışmada, partikül boyutunun artmasıyla artış gösteren KKD verileri elde edilmiştir [129]. Farklı hücre kültürü

çalışmalarında ise TiO_2 ve Al_2O_3 (sırasıyla yaklaşık 20 ve 28 nm boyutlarında) partikülleri, Çin hamsteri over hücrelerine (CHO-K1) uygulanmıştır. TiO_2 partikülleri 1 ve 5 g/mL konsantrasyonlarında KKD sayısını anlamlı düzeyde artırırken, Al_2O_3 partikülleri, 1-25 g/mL'lik konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermemiştir [268]. Elde edilen pozitif sonuçların partikül boyutundaki artıştan ve oksidatif stresten kaynaklandığı belirtilmektedir [269]. Birçok araştırma, TiO_2 maruziyetinin neden olduğu hasarın hidroksil radikallerinin oluşumu ile ilişkili olabileceğini bildirilmiştir [270-272]. Ayrıca, TiO_2 'nin serbest radikal oluşumunu fotokatalize ettiği ve DNA hasarına sebep olduğu da rapor edilmiştir [273-274]. Magrez ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada [275], karbon bazlı NP'lerin akciğer kanseri hücreleri üzerindeki toksisitesi değerlendirilmiş ve NP boyutu azaldıkça, sitotoksik etkinin arttığını öne süren bulgular bildirilmiştir. NP'lerin toksisitesinin, NP bileşimi, boyutu, yüzey fonksiyonu, kristallliği ve agregasyonu gibi faktörlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir [276]. Ayrıca, NP'lerin bireyde yaratabileceği toksisite, bireyin toksik maddelere uyum sağlayabilme yeteneğinin ve tepki verme biçiminin de o bireyin genetik yapısına bağlı olduğu belirtilmiştir [29].

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen KKD testi için NP'lerden elde edilen değerlere sebep olarak, düşük konsantrasyonlardaki yoğun olmayan agregasyon ve yüksek konsantrasyonlardaki partikül maruziyeti gösterilebilir iken; MP uygulama sonuçlarına sebep olarak da düşük konsantrasyonlardaki partikül azlığının avantajı, tamir mekanizmalarının artışı ve yüksek konsantrasyonlardaki aşırı agregasyon gösterilebilir [231-232, 245-247].

Bu tezde uygulanan KA testi için hazırlanan preparatlardan elde edilen Mİ sonuçlarına dayanarak, NP'lerin her iki uygulama süresinde, yüksek konsantrasyonlarda hücre bölünmesinin anlamlı seviyede azaldığı gözlenmiştir. Aynı uygulama konsantrasyonlarında, uygulama süresi uzadıkça, 48 saatlik uygulamalarda hem Mİ değerlerinin hem de KKD değerlerinin azaldığı da göz önüne alınırsa, hücrelerdeki DNA tamir mekanizmalarının çalıştığı söylenebilir [277].

Programlanmış hücre ölümü, hücrenin kendisi tarafından organize edilen hücre ölümü şeklidir [278-279]. Bu organizasyon apoptoz olarak tanımlanmakta ve canlının normal gelişimi ve homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. Programlanmış hücre ölümü, apoptozla gerçekleşebileceği gibi apoptotik olmayan hücre ölümü yollarından biri olan

ferroptozla yoluyla da gerçekleşebilir. Ferroptoz, apoptoz, klasik nekroz, otofaji ve diğer hücre ölümü biçimlerinden farklı olarak yüksek demir seviyesinden kaynaklanan bir hücre ölümü biçimidir [280-281]. Lipid peroksidasyonu (lipidin serbest radikaller tarafından oksidatif bozunma süreci), ferroptozu tetikleyen ana biyokimyasal olaydır [282-283]. Bu tez çalışmasında elde edilen Mİ sonuçları da hücrelerin ferroptozuyla ilişkilendirilebilir.

Bu tez çalışmasında uygulanan son genotoksisite testi olan mikronükleus testinde gözlenen MN'ler, mitoz bölünmenin sonunda, anafazdan telofaza geçiş evresinde ve mitoz tamamlandığında oluşmaktadır. MN'ler, iğ ipliklerine düzgün bağlanamayan bütün bir kromozomdan veya kromozomlarda meydana gelen kırıklar sonucunda oluşan asentrik bir kromozom parçasından köken alan ve telofaz sonunda yeni oluşan çekirdeklere katılamayan, ana çekirdeklerden daha küçük olan çekirdeklerdir [284-286]. Bu metotta uygulanan bazı basamaklar nedeniyle, tespiti, gözlemi ve değerlendirmesi kolay, güvenilir, istatistiksel değerlendirmelere elverişli ve ayrıca testte uygulanabilen farklı modifikasyonlar sayesinde de etkili bir genotoksikoloji testidir [180, 287].

Mikronükleus testinde kullanılan kimyasallar, hücrelere, prosedür gereği 48 saat uygulanmaktadır. Bu tez çalışmasında, Fe₂O₃ NP'lerinin ve MP'lerinin kullanılan bütün konsantrasyonları, lenfositlerde MN frekansında artışa sebep olmuştur. Ancak bu artış, her iki partikül için de sadece 250 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı düzeydedir. NKP frekansında da kontrole kıyasla küçük artışlar gözlenmekle birlikte, bunlardan sadece orta-düşük konsantrasyondaki (250 µg/mL) MP uygulamasında anlamlı artış belirlenmiştir. NTM frekansı da MP uygulamasında en yüksek konsantrasyon (750 µg/mL) dışındaki diğer uygulamalarda anlamlı artış göstermiştir. Bu tez çalışmalarının uygulandığı laboratuvar da daha önce benzer Fe₂O₃ NP'lerinin insan lenfositleri üzerindeki 48 saatlik etkileri dört farklı konsantrasyon (39,062, 78,125, 156,250 ve 312,500 µg/mL) uygulaması ve MN testinde incelenmiştir [228]. Sonuçta sadece en yüksek konsantrasyonun negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde MN oluşturduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan farklı *in vivo* çalışmalarda, bu partiküllerin hem MN oluşumunu anlamlı düzeyde artırdığına ve hem de bu şekilde bir artış oluşturmadığına yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Zebra balıklarında gerçekleştirilen bir araştırmada Fe₂O₃ NP'lerinin 96 saatlik uygulamalarını takiben yapılan çeşitli görüntüleme teknikleri, MN testi ve biyoakümülyasyon testleri sonucunda, kimyasal yollarla üretildikten sonra çevreye salınmış olan NP'lerin, yeşil sentez yoluyla üretilen NP'lere kıyasla daha zararlı oldukları kanıtlanmıştır [28]. Farelerde gerçekleştirilen bir

başka çalışmada, Fe_2O_3 (4-8 nm) ve Al_2O_3 (40 nm) partiküllerinin farklı konsantrasyonlarının (0-300 mg/kg vücut ağırlığı) uygulanması sonucunda anlamlı bir MN artışı gözlenmemiştir. DNA hasarının, maruz kalınan partikül kaynaklı oksidatif stres artışıyla veya stres oluşmamasıyla ilişkili olduğu yine çalışmalar içerisinde belirtilmiştir. [288].

Klastojenlerin kromatit kırığı ya da kromozom kırığı oluşturmaları, hücre döngüsünün hangi fazında etkili olduğuyula ilişkilidir. Hücre döngüsünün G0/G1 fazında etkili olanlar kromozom kırığı oluşturmakta; S/G2 fazında etkili olanlar ise kromatit kırığı oluşturmaktadır. Tekrar birleşmeyen kırıklar, delesyonlu bir kromozom ve bir fragment oluşumuna sebep olmaktadır. Ortaya çıkan fragmentler ise metafazda kaybolabilir ya da anafazda MN'leri oluşturabilir [289-290]. MN testinde ek olarak, KA testiyle tespit edilemeyen iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar da tespit edilebilmektedir. KA sonuçlarına tekrar bakıldığında, yüzdesi en düşük yapısal anormalliğin fragment olduğu görülmektedir. Ancak, tekrar bağlanmayan bu parçaların kaybolabildikleri ve %15,714'le kromozom kırığı tipi hücre hasarının %23,81'lik kromatit kırığı tipi hücre hasarıyla arasındaki fark göz önüne alındığında kromozom kırıklarının tekrar birleşemedikleri düşünülebilir. Uygulanan partiküllerin hücre döngüsünün her fazında etkili olabilecekleri de varsayıldığında, elde edilen MN ve KA test sonuçlarının birbirlerini tamamlayıcı oldukları ifade edilebilir.

Bu tez çalışmasında uygulanan MTT testi ve Mİ sayımı hücre popülasyonu bazında gerçekleştirilen incelemelerdir. MTT testi, Mİ ile karşılaştırıldığında düşüş gözlenmemesi, bu testin MCF-7 hücrelerinde gerçekleştirilmiş olmasından, oysa Mİ'te düşüşlerin gözlenmesinin, bu testin lenfositlerde gerçekleştirilmiş olmasından, kısaca iki farklı hücre tipinde çalışılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. Genotoksisite için komet testi değerlendirmelerinde kısa süreli maruziyetlerin potansiyel etkileri olabileceği fakat anlamlı olmadığı görülmektedir. Bu durum, oluşan DNA hasarlarının tamir mekanizmalarıyla düzeltilmesinden kaynaklanıyor olabilir [291]. Genotoksik maddeler, ilk aşamada KKD sayısında artışa neden olabilmekte lâkin önemli bir kromozom kırılması oluşturmamaktadır [292]. Dolayısıyla diğer yapısal ve sayısal bozukluklar KA testinde incelemeye devam edilmektedir. Yeniden birleşmeyen parçaların birçoğu ve kırıklar burada tespit edilmektedir. Son olarak MN testi, tüm kromatit ve kromozom kırıklarını tespit etmek içindir. KKD sonuçlarına göre hemen her uygulamada (48 saatlik uygulamalardan 500

$\mu\text{g/mL}$ NP ve $125 \mu\text{g/mL}$ MP konsantrasyonu sonuçları hariç) partiküllerin klastojenik etkiye sahip olabileceği fakat bu etkinin KA veya MN oluşumu için çok zayıf olduğu anlaşılabilmektedir.

Konsantrasyon-etki seviyelerini belirleyebilmek için uygulanan regresyon analizi sonuçları da Fe_2O_3 NP'lerinin ve MP'lerinin toksisiteleri hakkında bazı önemli bilgiler sağlamaktadır. MTT testi sonuçlarında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmemiştir fakat 24 saatlik NP uygulamaları dışındaki tüm uygulamalarda konsantrasyon artışına bağlı pozitif yönde bir korelasyon tespit edilmiştir. Mİ sayımlarında hem NP'ler için hem de MP'ler için konsantrasyon artışına bağlı bir düşüş görülmüştür. Yalnızca 48 saatlik MP uygulamalarında korelasyon tespit edilmemiştir ($r=0,0374$). Buna sebep olarak, düşük konsantrasyonda düşük agregasyonla negatif kontrole kıyasla Mİ'de anlamlı düşüş olması; yüksek konsantrasyonlarda ise yüksek agregasyonun negatif kontrole kıyasla Mİ'de anlamlı olmayan artış/azalış göstermesi sayılabilir. Regresyon analizi için özellikle komet sonuçları incelendiğinde, üç saatlik uygulamaların kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu parametrelerinde negatif kontrole kıyasla anlamlı artışlar saptanır iken kuyruk momentinde etkili bir konsantrasyon görülmemiştir. Ancak, kuyruk momenti parametresi için uygulanan regresyon analiziyle hem NP'lerin ($r=0,8467$) hem de MP'lerin ($r=0,8709$) konsantrasyon artışına bağlı pozitif yönde korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple, kuyruk momenti değerleri de kullanılan partiküllerin potansiyel toksik etkili olduğunu göstermektedir. KA testi için, 48 saatlik NP uygulamalarında negatif kontrole kıyasla anlamlı sonuçlar bulunsa da ($125, 500$ ve $750 \mu\text{g/mL}$), $250 \mu\text{g/mL}$ uygulamasında anlamlı değişim olmamıştır fakat konsantrasyon artışıyla doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür (KA/Hücre için $r=0,8080$). Diğer KA uygulamalarında da sadece 48 saatlik NP uygulamalarının anormal hücre frekansında pozitif yönde hafif bir konsantrasyon-etki korelasyonu görülmüştür ($r=0,7467$). KKD testinde, 24 saatlik NP uygulamaları her konsantrasyonda negatif kontrole kıyasla KKD sayısında anlamlı artış oluşturmuş ve bu artış, konsantrasyon artışına bağlı şekilde gerçekleşmiştir ($r=0,9148$). Diğer uygulamalar da negatif kontrole kıyasla anlamlı artış vermiş ve sadece 24 saatlik MP uygulamalarında konsantrasyon artışına bağlı bir artış göstermemişlerdir. Son olarak MN-sitom testiyle, NP uygulamalarında tespit edilen nükleer tomurcuk miktarında konsantrasyon artışına bağlı bir artış görülmüştür ($r=0,8405$). Elde edilen bütün bu gözlemler, partiküllerin, kullanımlarında tercih edilmesine sebep olan birçok fiziksel/kimyasal özelliğinin yanı sıra, özellikle nano boyutlu partiküllerin kuantum özelliklerinin tahmin edilemez davranış modellerinden de

kaynaklanıyor olabilir [293]. Bu sonuçlar, partiküllerin, çok sayıda mekanizmayla hücre fonksiyonlarını etkileyebileceğini göstermektedir [294-295].

Nanopartiküllerin, biyolojik sistemlerde meydana getirdikleri toksik etkilerin en önemli sebepleri arasında, oluşturdukları ROT olduğu belirtilmektedir [38]. Yüksek ROT seviyesinin sonucunda hücrede oksidatif stres artışı gerçekleşmektedir. Artan oksidasyon seviyeleri, lipid peroksidasyonuna, hücre ve çekirdek zarlarında tahribata, DNA'da oksidasyona ve kırıklara sebep olabildiği gibi; gen transkripsiyonunu engelleyerek, gen ürünü olan proteinleri okside ederek, sinyal yollarını engelleyerek birçok hücre fonksiyonu da bozabilmektedir. Oksidatif stresin daha da fazla artış gösterdiği durumlarda ise hücrelerde nekrotik ve apoptotik süreçlerin başlatıldığı gözlenmektedir [40-41].

Nanopartiküllerin etki mekanizmaları konusunda çeşitli görüşler ileri sürülmekle birlikte, Donaldson ve arkadaşları (2010) tarafından ileri sürülen mekanizmaya göre, nanopartiküller primer ve sekonder olmak üzere iki farklı yolla etkili olmaktadır. Primer etki de, doğrudan ve dolaylı olarak ikiye ayrılmaktadır [68]. Doğrudan etki; partiküllerin hücre çekirdeğinden geçerek doğrudan DNA'yla veya hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrışmasında görev alan hücre bileşenlerle, örneğin iğ iplikleriyle (anöjenik etki) etkileşime girmesi olarak tanımlanmaktadır. Dolaylı etki; hücrelerin NP'lere karşı oluşturduğu antioksidan moleküllerin yetersiz kalması ve endojen kaynaklı ROT'un DNA'da oksidatif hasar yaratması [296-298] olarak açıklanmaktadır. NP'lerin sekonder genotoksik etkisi de yine oksidatif stres kaynaklı bir etkidir, ancak bu etkide oksidanların, partiküllerin etkileştiği alanlardaki lökositlerden kaynaklandığı belirtilmektedir. NP'ler gibi yabancı maddelere karşı immün yanıtla birlikte fagositlerin aktivasyonu, hücre oksijen tüketiminde artışa yol açabilmektedir. Buna bağlı olarak, NADPH-oksidaz sisteminin aktivasyonu da $O^{\cdot -}$, H_2O_2 gibi çeşitli oksidanlar ortama salınabilmektedir [299]. NP kaynaklı olarak ortaya çıkan ROT, MAPK veya IKK gibi strese bağlı sinyal yollarının da aktivasyonuna yol açmaktadır, bu da transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF-kB veya Nrf2 gibi) aktivasyonuna ve antioksidanlar sayesinde gen ekspresyonunda regülasyona neden olabilmektedir. Oksidatif stres ayrıca mitokondride, çekirdekte ve lizozom gibi farklı organellerde hasara neden olabilmektedir. Bu hasarlar stres sinyalini giderek yükseltmekte, DNA'da fragmentasyonlar oluşturmakta ve apoptozu tetikleyecek yolları (kaspazlar, kalpainler, katepsinler) harekete geçirebilmektedir. Hücre içerisindeki kalsiyum seviyesinin artışı da bu mekanizmaların

indüklenmesi ve partiküllerin kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre içerisine alınabilmesi için alternatif bir mekanizma olarak gösterilmektedir [52].

Nanopartiküllerin hücrelerde ve canlılarda oluşturabileceği hasarlar epigenetik düzeyde de olabilir [300-301]. Hücre çekirdeğinden geçebilen partiküller, hücresel fonksiyonları regüle edebilmekte ve hücre fizyolojisi, etkilenen kromatin yüzünden bozulabilmektedir. Heterokromatin (kromozomda kromatin yoğun bölgelerdir, gen sayısı azdır ve transkripsiyon bu bölgede zayıftır [302]) yapısındaki bozulmalar ise, çekirdeğin yapısında bozulmaya ve dayanıklılığının düşmesine neden olabilmektedir. NP'ler, DNA metilasyon mekanizmalarını etkileyebilmekte ve/veya histon proteinlerinin modifikasyonlarını da değiştirebilmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi, bu partiküller ROT miktarında artış yaratarak oksidatif DNA hasarına yol açabilmekte ve metiltransferazların DNA'yla etkileşime girerek DNA hipometilasyonuna da sebep olabilmektedir [303]. DNA metilasyonu da ROT kaynaklı olarak hatalı çalışabilmekte ve gen ifadelerini değiştirebilmektedir [301, 304]. En sık çalışılan epigenetik mekanizmalardan biri miRNA ifadesidir [305]. miRNA'lar endojen kaynaklı, kısa (~22 nükleotit), kodlanmayan RNA'lardır ve ilgili mRNA'yla etkileşerek transkripsiyon sonrası ve translasyon aşamalarında gen ifadesini düzenlemektedir. miRNA'lar, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, stres tepkisi ve apoptoz dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel fonksiyonlarda önemli roller oynamaktadır [306]. Li ve arkadaşları (2011) NIH/3T3 hücrelerinde Fe₂O₃ NP'lerinin, çeşitli miRNA ifadelerini etkilediğini bildirmiştir [307]. Aynı şekilde gümüş NP'lerinin insan dermal fibroblastlarında [308], Jurkat hücrelerinde [309] ve nöral hücrelerde [310]; altın NP'lerinin de yine insan dermal fibroblastlarında [311] ve akciğer fibroblastlarında [312] miRNA ifadelerini etkiledikleri bildirilmiştir.

Yapılan araştırmalar, partiküllerin üretiminde kullanılan malzemeler kadar, bu partiküllerin boyutlarının ve yüzey modifikasyonlarının da toksik etkilerinde önemli rol oynadığını göstermektedir [43]. Özellikle, yürütülen karşılaştırmalı çalışmalardan anlaşılabileceği üzere kimyasal ya da doğal yollarla üretilen NP'lerin/MP'lerin karakterizasyonlarının da iyi bilinmesi gerekmektedir [45]. Bu nedenle NP'ler, kullanım alanları dikkate alınarak farklı ebatlarda, farklı biçimlerde ve farklı yüzey modifikasyonlarıyla üretilmekte ve daha sonra karakterizasyonları yapılmaktadır. Sonuçta, farklı özelliklere sahip olan bu partiküllerin hem toksik etkileri hem de toksisite mekanizmaları farklılıklar gösterebilmektedir [46-47]. Tez

kapsamında yapılan tüm çalışmaların sonuçları Çizelge 5.1’de ve Çizelge 5.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Fe₂O₃ NP’lerinin ve MP’lerinin DNA hasarı üzerine etkileri.

Test Maddesi	Uygulama		Komet Kuyruk		
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Uzunluğu	Yoğunluğu	Momenti
Fe ₂ O ₃ NP	2	25	—	—	—
		125	—	—	—
		250	—	—	—
		500	—	—	—
	3	25	▲	—	—
		125	▲	—	—
		250	▲	—	—
		500	▲	▲	—
Fe ₂ O ₃ MP	2	25	—	—	—
		125	—	—	—
		250	—	—	—
		500	—	—	—
	3	25	▲	▲	—
		125	▲	—	—
		250	▲	—	—
		500	▲	▲	—
Kontrole göre anlamlı artış var: ▲ Anlamlı fark yok: —					

6. SONUÇ & ÖNERİLER

Nanoteknoloji, gün geçtikçe hayatımızın daha büyük bir parçası olmaya devam etmektedir. Artık kullandığımız cihazlar, giydiğimiz kıyafetler ve hatta aldığımız bazı ilâçlar bile NM ürünleridir. Bu ürünler, fizik, kimya, biyoloji, mühendislik alanları veya beşerî/sosyal bilimler gibi çok sayıda multidisipliner çalışmanın konusu olmuştur. Hemen her yerde karşımıza çıkabilecek bu nanomateriyallerin yaygın bir sınıfı nanopartiküllerdir.

Çok çeşitli nanopartiküllerin etkili fiziksel/kimyasal özellikleri, mümkün olan her yolla modifikasyon imkânları ve neredeyse her alanda kullanım amacına hizmet eden bu partiküllerin kullanımını giderek artırmaktadır. Aynı şekilde, daha büyük boyutlara sahip mikropartiküller de remediasyon gibi makro boyuttaki çalışmalar için yoğun biçimde kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin üretimleri, takipleri ve modifikasyonları; modellenmeleri ve sistemlere entegrasyonu kontrollü biçimde çok sayıda uygulama gerektirmektedir. Bu partiküllerin kullanımlarındaki artışa kıyasla, canlı sağlığına olan etkileri konusunda yapılan çalışmalar geride kalmaktadır. Dahası, birçok çalışma sonucu birbirleriyle çelişkilidir.

İnorganik partiküller arasında yer alan Fe_2O_3 , özellikle manyetik ve sağlam yapılarından ötürü sağlık alanında çokça kullanılmaktadır. Canlıyla teması çoğunlukla doğrudan olan bu partiküllerin toksisite potansiyelleri detaylı olarak değerlendirilmelidir. Yapılan bu çalışmada, Fe_2O_3 nano- ve mikropartiküllerinin, MCF-7 hücre hattında sitotoksik etkileri MTT testiyle; insan lenfositlerinde *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri komet, kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus testleriyle gerçekleştirilmiştir. Aynı partikülün hem nano- ve hem de mikrobeyutlarının kullanılması, aynı zamanda iki farklı hücrede farklı genotoksisite testlerinin de kullanılması açısından bu araştırma bir ilk olma özelliğindedir.

Gerçekleştirilen bu araştırma sonuçlarına göre, Fe_2O_3 partikülleri, farklı konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde, komet, kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus testlerinde, anlamlı düzeyde normallikler oluşturduğundan, genotoksik etki oluşturabilecek özelliktedir. Daha önceki araştırmalarda, Fe_2O_3 nano- ve mikropartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkiler oluşturabileceklerine dair bulgular

olduğu gibi, herhangi bir toksik etki oluşturmadağını belirten çalışmalar da mevcuttur. Bu şekilde, birbiriyle çelişir sonuçların tespit edilmesinin, nanopartiküllerin şekil, boyut, yüzey yükü, yüzey alanı, yüzey/hacim oranı ve aglomerasyon-agregat oluşturma durumu gibi fiziko-kimyasal özelliklerinin çok farklı tiplerde olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Bazı araştırmalarda da nano boyuttaki bu özelliklerinden ötürü tahmin edilemeyen etkileri olabileceği rapor edilmiştir. Bunların dışında, süspansiyonlarının hazırlandığı ortamlara, çalışıldıkları hücre kültürü ortamlarına, incelendikleri hücre tiplerine, konsantrasyonlarına ve uygulama sürelerine göre de etkilerinin birbirinden farklılıklar gösterebileceği vurgulanmaktadır. Bu fiziko-kimyasal özellikler, nano- ve mikropartiküllerin sağlıktan tarıma, gıdadan tekstil ve kozmetik uygulamalara kadar hayatımızın birçok alanında tercih edilmelerinde önemli rol oynarken, toksik ve genotoksik etkilerinin farklı düzeylerde olmasında da etkili olduğu görülmektedir.

Bu çalışma ile Fe_2O_3 partiküllerinin, günlük hayatta maruz kaldığımız düşük konsantrasyonlarda olduğu gibi yüksek konsantrasyonlarda da potansiyel hasar verebilecekleri ve bu nedenle dikkatli kullanılması gerektiği bir kez daha tespit edilmiştir. Özellikle nanopartiküllerin, mikropartiküllere kıyasla uzun süreli maruziyetlerde daha etkili olabilecekleri, özellikle mitotik indeks ve kromozom anormallikleri sonuçlarıyla da desteklenmektedir. Nanopartiküllerin, içerisine girdiği hücrede reseptörlerle, proteinlerle, lipidlerle, organellerle etkileşerek, direkt olarak genetik materyale hasar vererek veya dolaylı olarak ROT üretimini artırarak, hücre yolaklarını aktiveleştirerek/engelleyerek, epigenetik regülasyonları etkileyebileceği ve Fe_2O_3 nanopartiküllerinin hücrede ferroptoz etkisi de yaratabildiği göz önüne alındığında sitotoksik ve genotoksik etkilerinin mikropartiküllere kıyasla daha yüksek olabileceği anlaşılmaktadır. Diğer yandan, nanopartiküllerin toksik etkisinin, birçok uygulamada, hem konsantrasyon artışına bağlı bir korelasyon göstermeyerek hem bazı benzer araştırma sonuçlarından da farklılık göstererek tahmin edilemez davranışları olduğu bu çalışmayla bir kez daha gösterilmiştir.

Bu araştırmayla elde edilen sonuçlar, nanopartikül ve mikropartikül toksisitelerine dair gelecek çalışmalar ve ilgili partiküllerin kullanımları konusunda önemli veriler içermektedir. Literatürdeki karışıklıkların çözülebilmesi ve nanopartikül davranışlarının daha net anlaşılabilmesi adına gelecek çalışmalarda uygulama süre aralığının ve konsantrasyon aralığının genişletilmesi, özellikle düşük konsantrasyonlarının farklı hücre tiplerinde ve özellikle *in vivo* şartlarda sitotoksik ve genotoksik etkilerinin, epigenetik mekanizmaların ve

oksidatif stres faktörlerinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu sayede, nanopartikül ve mikropartikül kullanımları daha güvenli hâle gelebilecek, uygulama alanları artırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Roco, M. C., Williams, R. S. and Alivisatos, P. (Eds.) (2000). *Nanotechnology research directions: IWGN workshop report: vision for nanotechnology in the next decade*. Dordrecht: Springer, 28.
2. Chong, K. P. (2004). Nanoscience and engineering in mechanics and materials. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65(8-9), 1501-1506.
3. Kirtane, A. R., Verma, M., Karandikar, P., Furin, J., Langer, R., and Traverso, G. (2021). Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nature Nanotechnology*, 16(4), 369-384.
4. Malik, S., Muhammad, K., and Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661.
5. Drexler, K. E. (1981). Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5275-5278.
6. Kandru, A. (2020). Nanotechnology: Application in Biology and Medicine. In B. Siddhardha, M. Dyavaiah and K. Kasinathan (Eds.), *Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles*. Singapore: Springer, 1-18.
7. Gajanan, K., and Tijare, S. (2018). Applications of nanomaterials. *Materials Today: Proceedings*, 5(1), 1093-1096.
8. Xu, B., Zhang, C., Chen, Z., Yang, Y., and Cao, Q. (2021). Investigation of nano-droplet wetting states on array micro-structured surfaces with different gravity. *Computers and Fluids*, 222, 104936.
9. Ramesh, K. (2009). Nanomaterials. In *Nanomaterials*. Boston: Springer, 1-20.
10. Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., and Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 6.
11. Asha, A. B., and Narain, R. (2020). Nanomaterials properties. In R. Narain (Ed.), *Polymer science and nanotechnology*. Netherlands: Elsevier, 343-359.
12. Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., and Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611-13614.
13. Konishi, Y., Ohno, K., Saitoh, N., Nomura, T., Nagamine, S., Hishida, H., Takahashi, Y., and Uruga, T. (2007). Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella* algae. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 648-653.

14. Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., Tarrahimofrad, H., Mirbagheri, V. S., Easton, A. J., and Ahmadian, G. (2021). Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 86.
15. Mustapha, T., Misni, N., Ithnin, N. R., Daskum, A. M., and Unyah, N. Z. (2022). A Review on Plants and Microorganisms Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles, Role of Plants Metabolites and Applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), 674.
16. Willner, I., Baron, R., and Willner, B. (2006). Growing metal nanoparticles by enzymes. *Advanced Materials*, 18(9), 1109-1120.
17. Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N. M., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., Paralikar, K. M., and Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*, 61(6), 1413-1418.
18. Santos, T. S., Silva, T. M., Cardoso, J. C., Albuquerque-Júnior, R. L. C., Zielinska, A., Souto, E. B., Severino, P., and Mendonça, M. D. C. (2021). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Entomopathogenic Fungi: Antimicrobial Resistance, Nanopesticides, and Toxicity. *Antibiotics*, 10(7), 852.
19. Shankar, S. S., Rai, A., Ankamwar, B., Singh, A., Ahmad, A., and Sastry, M. (2004). Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Materials*, 3(7), 482-488.
20. Ahmad, N., Sharma, S., Singh, V. N., Shamsi, S. F., Fatma, A., and Mehta, B. R. (2011). Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Desmodium triflorum*: A Novel Approach Towards Weed Utilization. *Biotechnology Research International*, 2011, 454090.
21. Gottschalk, F., Sun, T., and Nowack, B. (2013). Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution*, 181, 287-300.
22. Markus, A. A., Parsons, J. R., Roex, E. W. M., de Voogt, P., and Laane, R. W. P. M. (2017). Modelling the Release, Transport and Fate of Engineered Nanoparticles in the Aquatic Environment - A Review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 243, 53-87.
23. Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. A., and Lynch, I. (2013). Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6(6), 2295-2350.
24. Rajput, V., Minkina, T., Mazarji, M., Shende, S., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Burachevskaya, M., Chaplygin, V., Singh, A., and Jatav, H. (2020). Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 137-143.
25. Cigerci, İ. H., Ali, M. M., Kaygısız, Ş. Y., Kaya, B., and Liman, R. (2018). Genotoxic Assessment of Different Sizes of Iron Oxide Nanoparticles and Ionic Iron in Earthworm (*Eisenia hortensis*) Coelomocytes by Comet Assay and Micronucleus Test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(1), 105-109.

26. Kumar, A., Pandey, A. K., Singh, S. S., Shanker, R., and Dhawan, A. (2011). Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*, 83(8), 1124-1132.
27. Saquib, Q., Faisal, M., Alatar, A. A., Al-Khedhairi, A. A., Ahmed, M., Ansari, S. M., Alwathnani, H. A., Okla, M. K., Dwivedi, S., Musarrat, J., Praveen, S., Khan, S. T., Wahab, R., Siddiqui, M. A., and Ahmad, J. (2016). Genotoxicity of ferric oxide nanoparticles in *Raphanus sativus*: Deciphering the role of signaling factors, oxidative stress and cell death. *Journal of Environmental Sciences*, 47, 49-62.
28. Suganya, D., Ramakritinan, C., and Rajan, M. (2018). Adverse effects of genotoxicity, bioaccumulation and ionoregulatory modulation of two differently synthesized iron oxide nanoparticles on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28, 2603-2611.
29. Kumah, E. A., Fopa, R. D., Harati, S., Boadu, P., Zohoori, F. V., and Pak, T. (2023). Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. *BMC Public Health*, 23(1), 1059.
30. Adebayo, O.A., Akinloye, O., and Adaramoye, O. A. (2020). Cerium oxide nanoparticles attenuate oxidative stress and inflammation in the liver of diethylnitrosamine-treated mice. *Biological Trace Element Research*, 193, 214-225.
31. de Vicente, I., Merino-Martos, A., Cruz-Pizarro, L., and de Vicente, J. (2010). On the use of magnetic nano and microparticles for lake restoration. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 375-381.
32. Gutierrez, A. M., Bhandari, R., Weng, J., Stromberg, A., Dziubla, T. D., and Hilt, J. Z. (2020). Synthesis of magnetic nanocomposite microparticles for binding of chlorinated organics in contaminated water sources. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(37), 49109.
33. Balmuri, S. R., Keck, N. C., and Niepa, T. H. (2021). Assessing the performance of wax-based microsorbents for oil remediation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 627, 127227.
34. Samimi, K., Ahmadi, A., Torangzar, H., Shavandi, M. (in Press). study on the application of activated carbon microparticles and calcium peroxide (CaO₂) nanoparticles in cyclic hydrocarbon remediation from groundwater. *Hydrogeology*.
35. Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., and Lead, J. R. (2012). Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science and Technology*, 46(13), 6893-6899.
36. Amde, M., Liu, J. F., Tan, Z. Q., and Bekana, D. (2017). Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution*, 230, 250-267.
37. Liu, Y., Workalemahu, B., and Jiang, X. (2017). The effects of physicochemical properties of nanomaterials on their cellular uptake in vitro and in vivo. *Small*, 13(43), 1701815.

38. Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L. O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., and Schins, R. P. (2007). Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1), 52-71.
39. Canaparo, R., Foglietta, F., Limongi, T., and Serpe, L. (2020). Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Materials*, 14(1), 53.
40. Sayes, C. M., Gobin, A. M., Ausman, K. D., Mendez, J., West, J. L., and Colvin, V. L. (2005). Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26(36), 7587-7595.
41. Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823-839.
42. Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., and Li, P. (2020). Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 115.
43. Yang, X., Gondikas, A. P., Marinakos, S. M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., and Meyer, J. N. (2012). Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science and Technology*, 46(2), 1119-1127.
44. Egbuna, C., Parmar, V. K., Jeevanandam, J., Ezzat, S. M., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Adetunji, C. O., Khan, J., Onyeike, E. N., Uche, C. Z., Akram, M., Ibrahim, M. S., El Mahdy, N. M., Awuchi, C. G., Saravanan, K., Tijjani, H., Odoh, U. E., Messaoudi, M., Ifemeje, J. C., Olisah, M. C., Ezeofor, N. J., Chikwendu, C. J., and Ibeabuchi, C. G. (2021). Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *Journal of Toxicology*, 2021, 9954443.
45. Al Faraj, A., Shaik, A. P., and Shaik, A. S. (2015). Effect of surface coating on the biocompatibility and in vivo MRI detection of iron oxide nanoparticles after intrapulmonary administration. *Nanotoxicology*, 9(7), 825-834.
46. Aghebati-Maleki, A., Dolati, S., Ahmadi, M., Baghbanzhadeh, A., Asadi, M., Fotouhi, A., Yousefi, M., and Aghebati-Maleki, L. (2020). Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1962-1972.
47. Derman, S., Kızılbey, K., and Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*. 31(1), 107-120.
48. Rana, A., Yadav, K., and Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122880.
49. Shang, L., Nienhaus, K., and Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*. 12(1), 1-11.
50. Li, Y., and Cummins, E. (2020). Hazard characterization of silver nanoparticles for human exposure routes. *Journal of Environmental Science and Health*, 55(6), 704-725.

51. Baranowska-Wójcik, E., Sz wajgier, D., Oleszczuk, P., and Winiarska-Mieczan, A. (2020). Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review. *Biological Trace Element Research*. 193, 118-129.
52. Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., and Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Archives of Toxicology*, 85(7), 733-741.
53. Frtús, A., Smolková, B., Uzhytchak, M., Lunova, M., Jirsa, M., Kubinová, Š., Dejneka, A., and Lunov, O. (2020). Analyzing the mechanisms of iron oxide nanoparticles interactions with cells: A road from failure to success in clinical applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 328, 59-77.
54. Dawson, K.A., Salvati, A., vand Lynch, I. (2009). Nanoparticles reconstruct lipids. *Nature Nanotechnology*, 4(2), 84-85.
55. De, M., and Rotello, V. M. (2008). Synthetic “chaperones”: nanoparticle-mediated refolding of thermally denatured proteins. *Chemical Communications*, (30), 3504-3506.
56. Shang, W., Nuffer, J. H., Dordick, J. S., and Siegel, R. W. (2007). Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces. *Nano Letters*, 7(7), 1991-1995.
57. Elsaesser, A., and Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129-137.
58. Barnes, C. A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Leśniak, A., Salvati, A., Hanrahan, J. P., Jong, W. H., Dziubałtowska, E., Stepnik, M., Rydzyński, K., McKerr, G., Lynch, I., Dawson, K. A., and Howard, C. V. (2008). Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. *Nano Letters*, 8(9), 3069-3074.
59. Karlsson, H. L. (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398, 651-666.
60. Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S., and Kevadiya, B. D. (2020). Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*, 25, 101692.
61. Xie, W., Wang, L., Zhang, Y., Su, L., Shen, A., Tan, J., and Hu, J. (2009). Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced Raman scattering. *Bioconjugate Chemistry*, 20(4), 768-773.
62. Mehrabi, M., and Wilson, R. (2007). Intercalating gold nanoparticles as universal labels for DNA detection. *Small*, 3(9), 1491-1495.
63. Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W. H., Surprenant, A., Lopez-Castejon, G., Mann, S., Davis, S. A., Hails, L. A., Ingham, E., Verkade, P., Lane, J., Heesom, K., Newson, R., and Case, C. P. (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nature Nanotechnology*, 4(12), 876-883.

64. Myllynen, P. (2009). Damaging DNA from a distance. *Nature Nanotechnology*. 4(12), 795-796.
65. Singh, R., Cheng, S., and Singh, S. (2020). Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles on *Deinococcus radiodurans*. 3 *Biotech*, 10, 1-13.
66. Buzea, C., Pacheco, I. I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2(4), MR17-MR71.
67. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). (2022). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, V-VII.
68. Donaldson, K., Poland, C. A., and Schins, R. P. (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 4(4), 414-420.
69. Kramer, P. (1998). Genetic toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 50(4), 395-405.
70. Peluso, M., Russo, V., Mello, T., and Galli, A. (2020). Oxidative stress and DNA damage in chronic disease and environmental studies. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6936.
71. Nersesyan, A., Fenech, M., Bolognesi, C., Mišík, M., Setayesh, T., Wultsch, G., Bonassi, S., Thomas, P., and Knasmüller, S. (2016). Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutation research. Reviews in Mutation Research*, 770(Pt A), 1-11.
72. Annangi, B., Bonassi, S., Marcos, R., and Hernández, A. (2016). Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 140-161.
73. Gonzalez, L., and Kirsch-Volders, M. (2016). Biomonitoring of genotoxic effects for human exposure to nanomaterials: the challenge ahead. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 768, 14-26.
74. Dybdahl, M., Risom, L., Bornholdt, J., Autrup, H., Loft, S., and Wallin, H. (2004). Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 562(1-2), 119-131.
75. Jacobsen, N. R., Møller, P., Jensen, K. A., Vogel, U., Ladefoged, O., Loft, S., and Wallin, H. (2009). Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 2.
76. Di Ianni, E., Møller, P., Cholakova, T., Wolff, H., Jacobsen, N. R., and Vogel, U. (2022). Assessment of primary and inflammation-driven genotoxicity of carbon black nanoparticles in vitro and in vivo. *Nanotoxicology*, 16(4), 526-546.

77. Türkez, H., Geyikoglu, F., and Yousef, M. I. (2012). Ameliorative effect of docosahexaenoic acid on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damage in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, 28(8), 687-696.
78. Turkez, H., Aydin, E., and Aslan, A. (2012). Xanthoria elegans (Link)(lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64, 679-686.
79. Horie, M., and Tabei, Y. (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*. 55(4), 331-342.
80. Turkez, H., Arslan, M. E., and Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 13(10), 1089-1098.
81. Balls, M., and Fentem, J. H. (1994). The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME): 23 years of campaigning for the Three Rs. In C. A Reinhardt (Ed.), *Alternatives to Animal Testing: New Ways in the Biomedical Sciences, Trends and Progress*. Weinheim: VCH, 45-55.
82. Russell, W. M. S., and Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*, Wheathampstead: Universities Federation for Animal Welfare, xiv-238.
83. Vinken, M. (2020). 3Rs toxicity testing and disease modeling projects in the European Horizon 2020 research and innovation program. *EXCLI Journal*, 19, 775.
84. Sivagourounadin, K. (2022). Mutagenic Toxicity Testing. In M. Lakshmanan, D. G. Shewade and G. M. Raj (Eds.), *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology*. Singapore: Springer, 549-571.
85. Mamur, S., Ünal, F., Yılmaz, S., Erikel, E., and Yüzbaşıoğlu, D. (2020). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 149-157.
86. Ferin, J., Oberdörster, G., Penney, D. P., Soderholm, S. C., Gelein, R., and Piper, H. C. (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. *Journal of Aerosol Science*, 21(3), 381-384.
87. Oberdörster, G., Ferin, J., Finkelstein, G., Wade, P., and Corson, N. (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *Journal of Aerosol Science*, 21(3), 384-387.
88. Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., and ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8.

89. Doak, S. H., Griffiths, S. M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P. M., Brown, A. P., and Jenkins, G. J. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, 24(4), 285-293.
90. 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. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2-3), 241-258.
91. Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., Wright, C. J., and Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23-24), 3891-3914.
92. Ealia, S. A. M., and Saravanakumar. M. (2017, May). *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*, IOP conference series: materials science and engineering. 14th International Conference on Science, Engineering and Technology, India, Vellore.
93. Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., and Devoisselle, J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Future Medicine*, 1(2), 157-168.
94. Khan, S., and Hossain, M. K. (2022). Classification and properties of nanoparticles, In S. M. Rangappa, J. Parameswaranpillai, T. G. Y. Gowda, S. Siengchin and M. O. Seydibeyoglu (Eds.), *Nanoparticle-based polymer composites*. Sawston: Elsevier, 15-54.
95. Wydra, R. J., Rychahou, P. G., Evers, B. M., Anderson, K. W., Dziubla, T. D., and Hilt, J. Z. (2015). The role of ROS generation from magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field on cytotoxicity. *Acta Biomaterialia*, 25, 284-290.
96. Zhao, J., Bowman, L., Magaye, R., Leonard, S. S., Castranova, V., and Ding, M. (2013). Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *International Journal of Oncology*, 42(4), 1349-1359.
97. Fernández-Acosta, R., Iriarte-Mesa, C., Alvarez-Alminaque, D., Hassannia, B., Wiernicki, B., Díaz-García, A. M., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., and Pardo Andreu, G. L. (2022). Novel Iron Oxide Nanoparticles Induce Ferroptosis in a Panel of Cancer Cell Lines. *Molecules*, 27(13), 3970.
98. Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., He, H., and Zhuang, Z. (2012). The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. *Molecular Biology Reports*, 39, 4915-4925.
99. Toduka, Y., Toyooka, T., and Ibuki, Y. (2012). Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. *Environmental Science and Technology*, 46(14), 7629-7636.

100. Jarockyte, G., Daugelaite, E., Stasys, M., Statkute, U., Poderys, V., Tseng, T. C., Hsu, S. H., Karabanovas, V., and Rotomskis, R. (2016). Accumulation and Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Cells and Experimental Animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1193.
101. Raji, M. A., Amara, M., Amoabediny, G., Tajik, P., Barin, A., Magierowski, S., and Ghafar-Zadeh, E. (2014, August). *Cytotoxicity of synthesized Iron Oxide nanoparticles: toward novel biomarkers of colon cancer*. 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Chicago, 6179-6182.
102. Singh, S. P., Rahman, M. F., Murty, U. S., Mahboob, M., and Grover, P. (2013). Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(1), 56-66.
103. Giorgetti, L. (2019). Effects of nanoparticles in plants: Phytotoxicity and genotoxicity assessment. In D. K. Tripathi, P. Ahmad, S. Sharma, D. K. Chauhan, and N. K. Dubey (Eds.), *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. London: Elsevier, 65-87.
104. Li, X., Sloat, B. R., Yanasarn, N., and Cui, Z. (2011). Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: data from a study with an improved experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 107-116.
105. Valdiglesias, V., Kiliç, G., Costa, C., Fernández-Bertólez, N., Pásaro, E., Teixeira, J. P., and Laffon, B. (2015). Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 125-148.
106. Djurišić, A. B., Leung, Y. H., Ng, A. M., Xu, X. Y., Lee, P. K., Degger, N., and Wu, R. S. (2015). Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*, 11(1), 26-44.
107. Huang, C. C., Liao, Z. X., Lu, H. M., Pan, W. Y., Wan, W. L., Chen, C. C., and Sung, H. W. (2016). Cellular organelle-dependent cytotoxicity of iron oxide nanoparticles and its implications for cancer diagnosis and treatment: a mechanistic investigation. *Chemistry of Materials*, 28(24), 9017-9025.
108. Soenen, S. J., De Cuyper, M., De Smedt, S. C., and Braeckmans, K. (2012). Investigating the toxic effects of iron oxide nanoparticles. *Methods Enzymol*, 509, 195-224.
109. Mostafalou, S., and Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-177.
110. Greaves, L. C., Reeve, A. K., Taylor, R. W., and Turnbull, D. M. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *The Journal of Pathology*, 226(2), 274-286.
111. Bickers, D. R., and Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2565-2575.

112. Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L. A., and Prosperi, E. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21 CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*, 89, 155-178.
113. Bode, A. M., and Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Letters*, 247(1), 26-39.
114. Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced?. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 600-608.
115. Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D., and Musee, N. (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 134-160.
116. PJ, J. C., Saigeetha, S., Samrot, A. V., Ponniah, P., and Chakravarthi, S. (2021). Overview on toxicity of nanoparticles, it's mechanism, models used in toxicity studies and disposal methods-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102117.
117. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en, Son Erişim Tarihi 01.07.2023
118. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264264649-en, Son Erişim Tarihi 01.07.2023
119. Mohamed, S., Upreti, S., Rajendra, S., and Dang, R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 133-138.
120. Organisation for Economic Co-operation and Development. (2010). Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en, Son Erişim Tarihi 01.07.2023
121. The European Food Safety Authority Scientific Committee. (2011) Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2379.
122. Food and Drug Administration, HHS (2012). International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. *Federal register*, 77(110), 33748-33749.
123. Stronati, L., Testa, A., Villani, P., Marino, C., Lovisolo, G. A., Conti, D., Russo, F., Fresegna, A. M., and Cordelli, E. (2004). Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses. *Bioelectromagnetics*, 25(1), 41-48.

124. Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H. J., Monien, B., Rietjens, I. M. C. M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P., and Eisenbrand, G. (2020). Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology*, 94(6), 1787-1877.
125. Rodgers, K. M., Udesky, J. O., Rudel, R. A., and Brody, J. G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental Research*. 160, 152-182.
126. Farkas, G., Kocsis, Z. S., Székely, G., Dobozi, M., Kenessey, I., Polgár, C., and Jurányi, Z. (2021). Smoking, chromosomal aberrations, and cancer incidence in healthy subjects. *Mutation research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 867, 503373.
127. Ansari, M. O., Parveen, N., Ahmad, M. F., Wani, A. L., Afrin, S., Rahman, Y., Jameel, S., Khan, Y. A., Siddique, H. R., Tabish, M., and Shadab, G. G. H. A. (2019). Evaluation of DNA interaction, genotoxicity and oxidative stress induced by iron oxide nanoparticles both in vitro and in vivo: attenuation by thymoquinone. *Scientific Reports*, 9(1), 6912.
128. Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2020). In vitro genotoxicity assessment of monopotassium glutamate and magnesium diglutamate. *Toxicology in Vitro*, 65, 104780.
129. Battal, D., Celik, A., Güler, G., Aktaş, A., Yildirimcan, S., Ocakoglu, K., and Çömelekoğlu, Ü. (2015). SiO₂ Nanoparticle-induced size-dependent genotoxicity—an in vitro study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*. 38(2), 196-204.
130. Çelik, A., Ekinci, S. Y., Güler, G., and Yildirim, S. (2014). In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA and Cell Biology*, 33(3), 148-154.
131. Sommer, S., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(4), 1534.
132. Huang, H., Gu, Y., Liu, S., Hu, S., Zhong, X., Huang, Y., Peng, J., and Huang, X. (2023). The meta-analysis of cytogenetic biomarkers as an assessment of occupational risk for healthcare workers exposed to antineoplastic drugs. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 96(6), 785-796.
133. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
134. Dyakova, L., Zhivkova, T., Khairallah, R., Culita, D., Marinescu, G., Patron, L., and Alexandrova, R. (2016). Effects of disulfiram, metal complexes of meloxicam and their combinations on viability and proliferation of human non-small cell lung cancer cells. *Scripta Scientifica Medica*, 48.

135. Mamur, S. (2022). Sitotoksikite Testleri. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Editörler). *Genetik Toksikoloji*. (Birinci Baskı). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık, 31-61.
136. Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 237-245.
137. Langie, S. A., Azqueta, A., and Collins, A.R., (2015) The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6, 266.
138. Ünal, F., ve Saygılı, Y. (2022). Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Editörler). *Genetik Toksikoloji*. (Birinci Baskı). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık, 313-335.
139. Møller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 33(1), 1-7.
140. Rydberg, B., and Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, In P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg and C. F. Fox (Eds.), *DNA repair mechanisms*. New York: Elsevier, 465-468.
141. Ostling, O., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
142. Widziewicz, K., Kalka, J., Skonieczna, M., and Madej, P. (2012). The comet assay for the evaluation of genotoxic potential of landfill leachate. *The Scientific World Journal*, 2012, 435239.
143. Gunasekarana, V., Raj, G. V., and Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 9(3), GE01.
144. Hovhannisyan, G. G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*, 3(1), 17.
145. Maluf, S. W., Passos, D. F., Bacelar, A., Speit, G., and Erdtmann, B. (2001). Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(4), 311-315.
146. Erikel, E., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2020). Genotoxic and antigenotoxic potential of amygdalin on isolated human lymphocytes by the comet assay. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13436.
147. Özkul, M., Özel, Ç. A., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2016). Does 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots?. *Cytotechnology*, 68, 2395-2405.
148. Sekihashi, K., Yamamoto, A., Matsumura, Y., Ueno, S., Watanabe-Akanuma, M., Kassie, F., Knasmüller, S., Tsuda, S., and Sasaki, Y. F. (2002). Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research*, 517(1-2), 53-75.

149. Møller, P., Stopper, H., and Collins, A. R. (2020). Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis*, 35(1), 5-18.
150. Buckton, K., Evans, H.J., and World Health Organization. (1973). Methods for the analysis of human chromosome aberrations. *World Health Organization*, 1-66
151. Lücke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during. cap alpha.-radiation induced G2 arrest. *Mutation research*, 119(3), 407-413.
152. Evans, H. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, In B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of mutagenicity test procedures*. Amsterdam: Elsevier, 405-428
153. İla, H. B., ve Hüsnet, M. T. (2022). Kromozom Anormallikleri Testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Editörler). *Genetik Toksikoloji*. (Birinci Baskı). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık, 153-179.
154. Yüzbaşıoğlu, D., Mahmoud, J. H., Mamur, S., and Ünal, F. (2022). Cytogenetic effects of antidiabetic drug metformin. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 955-962.
155. Erikel, E., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2019). In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal of Ethnopharmacology*, 237, 171-181.
156. Avuloğlu Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2023). Investigation of genotoxic effect of octyl gallate used as an antioxidant food additive in in vitro test systems. *Mutagenesis*, 38(3), 151-159.
157. Yıldız, B. M., Yüzbaşıoğlu, D., Yüksekdağ, Z., Çetin, D., Ünal, F., and Suludere, Z. (2023). In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus salivarius* KC27L. *Toxicology in Vitro*. 86, 105507.
158. Council, N. R. (1989). Markers for Measuring Germinal Genetic Toxicity and Heritable Mutations in People. In National Research Council Subcommittee on Reproductive and Neurodevelopmental Toxicology (Ed.), *Biologic Markers in Reproductive Toxicology*. Washington: National Academies Press, 119-141.
159. Shukla, V., Høffding, M. K., and Hoffmann. E. R. (2021). Genome diversity and instability in human germ cells and preimplantation embryos. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 113, 132-147.
160. İnternet: Liu, G. (June, 2023). Chromosomal Aberration Analysis: Novel Noninvasive Techniques for Early Stage Cancer Screening A hypothesis for cancer screening. *Research Square*, URL: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-3039053/v1/2d858598-052d-4a86-b2ee-de8d31dbb0f1.pdf?c=1690294057>, Son Erişim Tarihi: 01.07.2023
161. Farkas, G., Székely, G., Goda, V., Kállay, K. M., Kocsis, Z. S., Szakszon, K., Benyó, G., Erdélyi, D., Liptai, Z., and Csordás, K. (2023). Chromosomal breakage tests in the differential diagnosis of Fanconi anemia and aplastic anemia. *European journal of haematology*, 111(2), 254-262.

162. Wolff, S., Rodin, B., and Cleaver, J. (1977). Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and xeroderma pigmentosum cells. *Nature*, 265, 347-349.
163. Kato, H. (1973) Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Experimental Cell Research*, 82(2), 383-390.
164. Mäki-Paakkanen, J., Sorsa, M., and Vainio, H. (1981). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in lead-exposed workers. *Hereditas*, 94(2), 269-275.
165. Kurvink, K., Bloomfield, C. D., and Cervenka, J. (1978). Sister chromatid exchange in patients with viral disease. *Experimental Cell Research*, 113(2), 450-453.
166. Otter, M., Palmer, C. G., and Baehner, R. L. (1979). Sister chromatid exchange in lymphocytes from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Human Genetics*. 52(2), 185-192.
167. Chaganti, R., Schonberg, S., and German, J. (1974). A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11), 4508-4512.
168. Latt, S. A., Stetten, G., Juergens, L. A., Buchanan, G. R., and Gerald, P. S. (1975). Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(10), 4066-4070.
169. Çelik, M. (2022). Kardeş Kromatit Değişimi Testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Editörler). *Genetik Toksikoloji*. (Birinci Baskı). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık, 185-210.
170. Lee, M. Y., Seo, C. S., Kim, J. Y., and Shin, H. K. (2015). Genotoxicity evaluation of Oryeong-san water extract using in vitro and in vivo tests. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-8.
171. Ünal, F., Tülek, N. D. H., Yüzbaşıoğlu, D., ve Çelik, M. (2020). Methidathion İnsektisit/Akarisitinin Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin Allium Testi ile İncelenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 1-12.
172. Medves, S., Auchter, M., Chambeau, L., Gazzo, S., Poncet, D., Grangier, B., Verney, A., Moussay, E., Ammerlaan, W., Brisou, G., Morjani, H., Géli, V., Palissot, V., Berchem, G., Salles, G., and Wenner, T. (2016). A high rate of telomeric sister chromatid exchange occurs in chronic lymphocytic leukaemia B-cells. *British Journal of Haematology*, 174(1), 57-70.
173. Akyl, D., and Konuk, M. (2015). Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. *Environmental Toxicology*, 30(8), 937-945.
174. Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., ve Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.

175. Algarni, A. A. (2021) In vitro effects of Sunset Yellow on Chromosomal Damage and Sister Chromatid Exchanges in Human Peripheral Lymphocytes. *Annual Research and Review in Biology*, 88-94.
176. Halıcı, A., Seyrek, A., Aykan, K., Ünal, F., ve Yüzbaşıoğlu, D. (2021). Nanopartiküllerin genotoksik etkileri. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 2(2), 19-38.
177. Perry, P., and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251(5471), 156-158.
178. Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., and Ünal, F. (2016). Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*. 91, 8-18.
179. Yüzbaşıoğlu, D., Engüzel-Alperen, C., and Ünal, F. (2018). Investigation of in vitro genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 235-241.
180. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
181. Wilson III, D. M., and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23.
182. Yüzbaşıoğlu, D., ve Avuloğlu-Yılmaz, E. (2022). Mikronukleus Testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Editörler). *Genetik Toksikoloji*. (Birinci Baskı). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık, 219-241.
183. Fenech, M., and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.
184. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
185. Yılmaz, E. A., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2022). Investigating In Vitro Genotoxic Effects of Sweetener Xylitol. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(6), 1315-1325.
186. 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 4-10.
187. Di Bucchianico, S., Cappellini, F., Le Bihanic, F., Zhang, Y., Dreij, K., and Karlsson, H. L. (2017). Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 32(1), 127-137.

188. Park, M. V., Verharen, H. W., Zwart, E., Hernandez, L. G., van Benthem, J., Elsaesser, A., Barnes, C., McKerr, G., Howard, C. V., Salvati, A., Lynch, I., Dawson, K. A., and de Jong, W. H. (2011). Genotoxicity evaluation of amorphous silica nanoparticles of different sizes using the micronucleus and the plasmid lacZ gene mutation assay. *Nanotoxicology*, 5(2), 168-181.
189. Balmus, G., Karp, N. A., Ng, B. L., Jackson, S. P., Adams, D. J., and McIntyre, R. E. (2015). A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nature Protocols*, 10(1), 205-215.
190. Yılmaz, S., Ünal, F., and Yüzbaşıoğlu, D. (2009). The in vitro genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 60, 55-61.
191. Platel, A., Dusautoir, R., Kervoeze, G., Dourdin, G., Gateau, E., Talahari, S., Huot, L., Simar, S., Ollivier, A., Laine, W., Kluza, J., Gosset, P., Garçon, G., Anthérieu, S., Guidice, J. L., and Nessler, F. (2022). Comparison of the in vivo genotoxicity of electronic and conventional cigarettes aerosols after subacute, subchronic and chronic exposures. *Journal of Hazardous Materials*, 423(Pt B), 127246.
192. Sandoval-Herrera, N., Paz Castillo, J., Herrera Montalvo, L. G., and Welch Jr, K. C. (2021). Micronucleus test reveals genotoxic effects in bats associated with agricultural activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(1), 202-207.
193. Wu, Y., Qiang, Y., Zhang, G., and Zhou, M. (2021). Acute toxicity and micronucleus test of conotoxin It14a in mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 129(1), 52-60.
194. Claudio, S. R., Simas, J. M. M., Souza, A. C. F., de Alencar, M. d. C. B., Yamauchi, L. Y., and Ribeiro, D. A. (2019). Genomic instability and cytotoxicity in buccal mucosal cells of workers in banana farming evaluated by micronucleus test. *Anticancer Research*, 39(3), 1283-1286.
195. Kirsch-Volders, M., Bolognesi, C., Ceppi, M., Bruzzone, M., and Fenech, M. (2020). Micronuclei, inflammation and auto-immune disease. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 786, 108335.
196. Fenech, M., Knasmueller, S., Knudsen, L. E., Kirsch-Volders, M., Deo, P., Franzke, B., Stopper, H., Andreassi, M. G., Bolognesi, C., Dhillon, V. S., Laffon, B., Wagner, K. H., and Bonassi, S. (2021). "Micronuclei and Disease" special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 788, 108384.
197. Bonassi, S., and Fenech, M. (2019). Micronuclei and their association with infertility, pregnancy complications, developmental defects, anaemias, inflammation, diabetes, chronic kidney disease, obesity, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and cancer. In S. Knasmüller and M. Fenech (Eds.), *The Micronucleus Assay in Toxicology*. Croydon: The Royal Society of Chemistry, 38-78.

198. Fenech, M., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Knudsen, L. E., Wagner, K. H., Stopper, H., Knasmueller, S., Bolognesi, C., El-Zein, R., and Bonassi, S. (2020). Micronuclei and disease - Report of HUMN project workshop at Rennes 2019 EEMGS conference. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 850-851, 503133.
199. Hayashi, M. (2016). The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(1), 18.
200. Kirsch-Volders, M., Fenech, M., and Bolognesi, C. (2018). Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 47-52.
201. Javed, M., Ahmad, I., Ahmad, A., Usmani, N., and Ahmad, M. (2016). Studies on the alterations in haematological indices, micronuclei induction and pathological marker enzyme activities in *Channa punctatus* (spotted snakehead) perciformes, channidae exposed to thermal power plant effluent. *SpringerPlus*, 5, 1-9.
202. Wagner, K. H., Schwingshackl, L., Draxler, A., and Franzke, B. (2021). Impact of dietary and lifestyle interventions in elderly or people diagnosed with diabetes, metabolic disorders, cardiovascular disease, cancer and micronutrient deficiency on micronuclei frequency—A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, 108367.
203. Kızılkaya, D., (2021). *Demir oksit (Fe₂O₃) nanopartiküllerinin Allium cepa'daki genotoksik etkisi*, Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-29
204. Rajapakse, K., Drobne, D., Kastelec, D., and Marinsek-Logar, R. (2013). Experimental evidence of false-positive Comet test results due to TiO₂ particle–assay interactions. *Nanotoxicology*, 7(5), 1043-1051.
205. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
206. Ünal, F., Korkmaz, F. D., Suludere, Z., Özlem, E., and Yüzbaşıoğlu, D. (2021). Genotoxicity of two nanoparticles: titanium dioxide and zinc oxide. *Gazi University Journal of Science*, 34(4), 948-958.
207. Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2), 53-59.
208. Speit, G., and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes: II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Human Genetics*, 70, 126-129.

209. Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., and Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 85, 873-899.
210. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner Jr, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., and Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540(2), 153-163.
211. Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., and Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 341(3), 169-184.
212. Sweeney, E. E., McDaniel, R. E., Maximov, P. Y., Fan, P., and Jordan, V. C. (2012). Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 9(2), 143-163.
213. Comşa, Ş., Cimpean, A. M., and Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147-3154.
214. Güzel, D. (2015). *Paraben ve türevlerinin klastojenik etkilerinin insan periferik lenfositlerinde in vitro sitogenetik yöntemlerle araştırılması*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Eskişehir, 9-10.
215. Bácskay, I., Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M., and Ujhelyi, Z. (2018). Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. In T. A. Çelik (Ed.), *Cytotoxicity*. London: InTech, 131-146.
216. Prodan, A. M., Iconaru, S. L., Ciobanu, C. S., Chifiriuc, M. C., Stoicea, M., and Predoi, D. (2013). Iron oxide magnetic nanoparticles: characterization and toxicity evaluation by in vitro and in vivo assays. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 5-5.
217. Miri, A., Najafzadeh, H., Darroudi, M., Miri, M. J., Kouhbanani, M. A. J., and Sarani, M. (2021). Iron oxide nanoparticles: biosynthesis, magnetic behavior, cytotoxic effect. *ChemistryOpen*, 10(3), 327-333.
218. Fatemi, M., Mollania, N., Momeni-Moghaddam, M., and Sadeghifar, F. (2018). Extracellular biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by *Bacillus cereus* strain HMH1: Characterization and in vitro cytotoxicity analysis on MCF-7 and 3T3 cell lines. *Journal of Biotechnology*, 270, 1-11.
219. Rajiv, S., Jerobin, J., Saranya, V., Nainawat, M., Sharma, A., Makwana, P., Gayathri, C., Bharath, L., Singh, M., Kumar, M., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Human and Experimental Toxicology*, 35(2), 170-183.
220. Mohseni Kouchesfehiani, H., Kiani, S., Rostami, A. A., and Fakheri, R. (2013). Cytotoxic effect of iron oxide nanoparticles on mouse embryonic stem cells by MTT assay. *Iranian Journal of Toxicology*, 7(21), 849-853.

221. Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., and Liu, M. (2012). Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 7, 1-7.
222. Barillet, S., Jugan, M. L., Laye, M., Leconte, Y., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., and Carrière, M. (2010). In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicology Letters*, 198(3), 324-330.
223. AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3(2), 279-290.
224. Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., and Schnekenburger, J. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of Toxicology*, 86, 1123-1136.
225. Regiel-Futyra, A., Kus-Liśkiewicz, M., Sebastian, V., Irusta, S., Arruebo, M., Stochel, G. Y., and Kyzioł, A. (2015). Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(2), 1087-1099.
226. Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., and Anwar, A. (2012). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology*, 6(7), 713-723.
227. Vujačić, A., Vodnik, V., Joksić, G., Petrović, S., Leskovac, A., Nastasijević, B., and Vasić, V. (2011). Particle size and concentration dependent cytotoxicity of citrate capped gold nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures (DJNB)*, 6(3), 1367-1376.
228. Saygılı, Y. (2015). *Bazı Nanopartiküllerin (SiO₂, CuO, Fe₂O₃) in vitro Periferal İnsan Lenfositlerinde Genotoksik Etkileri/Genotoxic Effects of Some Nanoparticles (SiO₂, CuO, Fe₂O₃) In Human Peripheral Lymphocytes in vitro*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 33-65
229. Kang, B., Mackey, M. A., and El-Sayed, M. A. (2010). Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), 1517-1519.
230. Asharani, P., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10, 1-14.
231. Zucker, R., Massaro, E., Sanders, K., Degn, L., and Boyes, W. (2010). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77(7), 677-685.
232. Buyukhatipoglu, K., and Clyne, A. M. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96(1), 186-195.

233. Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44.
234. Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L., and Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, 13, 1838-1845.
235. Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J., Lee, J., and Han, D. W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3219-3231.
236. Win, K. Y., and Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722.
237. Lu, Y., Liu, Y., and Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (128), e56450.
238. Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M. S., Costa, C., Costa, S., Dhawan, A., de Lapuente, J., Bo', C. D., Dubus, J., Dusinska, M., Duthie, S. J., Yamani N. E., Engelward B., Gaivão I., Giovannelli L., Godschalk R., Guilherme S., Gutzkow K. B., Habas K., Hernández A., Herrero O., Isidori M., Jha A. N., Knasmüller S., Kooter I. M., Koppen G., Kruszewski M., Ladeira C., Laffon B., Larramendy M., Hégarat L. L., Lewies A., Lewinska A., Liwszyc G. E., de Cerain A. L., Manjanatha M., Marcos R., Milić M., de Andrade V. M., Moretti M., Muruzabal D., Novak M., Oliveira R., Olsen A. K., Owiti N., Pacheco M., Pandey A. K., Pfuhler S., Pourrut B., Reisinger K., Rojas E., Rundén-Pran E., Sanz-Serrano J., Shaposhnikov S., Sipinen V., Smeets K., Stopper H., Teixeira J. P., Valdiglesias V., Valverde M., van Acker F., van Schooten F. J., Vasquez M., Wentzel J. F., Wnuk M., Wouters A., Žegura B., Zikmund T., Langie S. A. S., and Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929-989.
239. Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickeböller, H., Wichmann, H. E., and Gomolka, M. (2011). Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair*, 10(3), 322-337.
240. Kumaravel, T., and Jha, A. N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 605(1-2), 7-16.
241. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., and Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano-and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188(2), 112-118.

242. Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., and Colvin, V. L. (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 92(1), 174-185.
243. Warheit, D. B., Webb, T. R., Sayes, C. M., Colvin, V. L., and Reed, K. L. (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological Sciences*, 91(1), 227-236.
244. He, Y., and Park, K. (2016), Effects of the microparticle shape on cellular uptake. *Molecular Pharmaceutics*, 13(7), 2164-2171.
245. Grimes, P. E. (2020). Impact of iron-oxide containing formulations against visible light-induced skin pigmentation in skin of color individuals. *Journal of Drugs in Dermatology*, 19(7), 712-717.
246. Kim, D., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K., and Muhammed, M. (2001). Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225(1-2), 30-36.
247. Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., and Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, 49-67.
248. Weissbein, U., Schachter, M., Egli, D., and Benvenisty, N. (2016). Analysis of chromosomal aberrations and recombination by allelic bias in RNA-Seq. *Nature Communications*, 7(1), 12144.
249. İnternet: Paul, S. F., Venkatachalam, P., and Jeevanram, R. Chromosome aberration analysis for biological dosimetry: a review. URL: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/29/018/29018456.pdf, Son Erişim Tarihi: 01.07.2023.
250. Feldser, D. M., Hackett, J. A., and Greider, C. W. (2003). Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nature Reviews Cancer*, 3(8), 623-627.
251. Artandi, S. E., Chang, S., Lee, S. L., Alson, S., Gottlieb, G. J., Chin, L., and DePinho, R. A. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, 406(6796), 641-645.
252. Gisselsson, D., Jonson, T., Petersén, A., Strömbeck, B., Dal Cin, P., Höglund, M., Mitelman, F., Mertens, F., and Mandahl, N. (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12683-12688.
253. Chen, B., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, S., Xu, A., Wu, L., and Xu, S. (2018). Involvement of telomerase activity inhibition and telomere dysfunction in silver nanoparticles anticancer effects. *Nanomedicine*, 13(16), 2067-2082.

254. Zhou, Y. M., Zhong, C. Y., Kennedy, I. M., Leppert, V. J., and Pinkerton, K. E. (2003). Oxidative stress and NF κ B activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190(2), 157-169.
255. Ghosh, I., Sadhu, A., Moriyasu, Y., Bandyopadhyay, M., and Mukherjee, A. (2019). Genotoxicity of nanoscale zerovalent iron particles in tobacco BY-2 cells. *The Nucleus*, 62, 211-219.
256. Tsai, C. C., Huang, R. N., Sung, H. W., and Liang, H. C. (2000). In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(1), 58-65.
257. Wolff, S. (1977). Sister chromatid exchange. *Annual Review of Genetics*, 11(1), 183-201.
258. Nakanishi, Y., and Schneider, E. L. (1979). In vivo sister-chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 60(3), 329-337.
259. Hool, G., and Müller, D. (1980). Sister-chromatid exchange: studies with various mutagens and comparison with other test systems using bone marrow of Chinese hamster. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 74(3), 247-248.
260. Sieber, S., Whang-Peng, J., Botkin, C., and Knutsen, T. (1978). Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology*, 18(1), 31-47.
261. Obe, G., Natarajan, A., Meyers, M., and Den Hertog, A. (1979). Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 68(3), 291-294.
262. Wolff, S., and Carrano, A. V. (1979). Report of the workshop on the utility of sister-chromatid exchange: Lake Yamanaka, Japan July 16–17, 1978. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 64(1), 53-56.
263. Gebhart, E. (1981). Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genetics*, 58, 235-254.
264. Palitti, F., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricordy, R., Vitagliano, E., and Fiore, M. (1982). Comparison of the frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow, spleen and spermatogonial cells of mice. *Mutation Research Letters*, 103(2), 191-195.
265. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., and Sancak, C. (2009). Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology*, 33(4), 283-290.

266. Turkez, H. (2011). The role of ascorbic acid on titanium dioxide-induced genetic damage assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(5), 453-457.
267. Turkez, H. (2008). Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 28(5), 658-664.
268. Di Virgilio, A. L., Reigosa, M., Arnal, P. M., and De Mele, M. F. L. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 711-718.
269. Lu, P. J., Ho, I. C., and Lee, T. C. (1998). Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 414(1-3), 15-20.
270. Driscoll, K. E., and Maurer, J. K. (1991). Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity. *Toxicologic pathology*, 19(4 Pt 1), 398-405.
271. Schapira, R. M., Ghio, A. J., Effros, R. M., Morrissey, J., Almagro, U. A., Dawson, C. A., and Hacker, A. D. (1995). Hydroxyl radical production and lung injury in the rat following silica or titanium dioxide instillation in vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12(2), 220-226.
272. Bernard, B. K., Osheroff, M. R., Hofmann, A., and Mennear, J. H. (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of dietary titanium dioxide-coated mica in male and female Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 29(4), 417-429.
273. Wamer, W. G., Yin, J. J., and Wei, R. R. (1997). Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(6), 851-858.
274. Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H., and Knowland, J. (1997). Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, 418(1-2), 87-90.
275. Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., and Forró, L. (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Letters*, 6(6), 1121-1125.
276. Mancuso, L., and Cao, G. (2014). Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human mesenchymal stem cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24(7), 449-454.
277. Carriere, M., Sauvaigo, S., Douki, T., and Ravanat, J. L. (2017). Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. *Mutagenesis*, 32(1), 203-213.
278. Lawen, A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays*, 25(9), 888-896.

279. Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415-1430.
280. Li, J., Cao, F., Yin, H. L., Huang, Z. J., Lin, Z. T., Mao, N., Sun, B., and Wang, G. (2020)ç Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2), 88.
281. Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., and Tang, D. (2016). Ferroptosis: process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 369-379.
282. Tang, D., and Kroemer, G. (2020). Ferroptosis. *Current Biology*, 30(21), R1292-R1297.
283. Cao, J. Y., and Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2195-2209.
284. Garaj-Vrhovac, V., Fučić, A., and Horvat, D. (1992). The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vitro. *Mutation Research Letters*, 281(3), 181-186.
285. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 65-75.
286. Kirsch-Volders, M., and Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1), 51-58.
287. Wilkins, R. C., Rodrigues, M., and Beaton-Green, L. A. (2023). The Imaging Flow Cytometry-Based Cytokinesis-Block MicroNucleus (CBMN) Assay. In N. S. Barteneva and I. A. Vorobjev (Eds.), *Spectral and Imaging Cytometry: Methods and Protocols*. New York: Springer, 103-122.
288. Sadiq, R., Khan, Q. M., Mobeen, A., and Shah, A. (2021). Genotoxicity of aluminium oxide, iron oxide, and copper nanoparticles in mouse bone marrow cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 72(4), 315-325.
289. McKinlay Gardner, R. and Sutherland, G. R. (Eds.). (1996). *Chromosome abnormalities and genetic counseling 4edn*, Oxford, Oxford University Press, 29.
290. Başaran, N. (1999). *Tıbbi Genetik* (Yedinci Baskı). Bursa, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, 180-195.
291. Branham, M. A. T., Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M. A., ve Ciocca, D. R. (2004). DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(1), 11-17.

292. He, L., Yang, L., Zhang, Z. R., Gong, T., Deng, L., Gu, Z., and Sun, X. (2009). In vitro evaluation of the genotoxicity of a family of novel MeO-PEG-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer and PLGA nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(45), 455102.
293. Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L., and Ding, M. (2012). Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel-and copper-based nanoparticles. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4), 551-561.
294. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A. C., Cravo, A., and Bebianno, M. J. (2013). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 84, 51-59.
295. Kim, S., and Ryu, D. Y. (2013). Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*, 33(2), 78-89.
296. Park, E. J., Yi, J., Chung, K. H., Ryu, D. Y., Choi, J., and Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180(3), 222-229.
297. Li, K. G., Chen, J. T., Bai, S. S., Wen, X., Song, S. Y., Yu, Q., Li, J., and Wang, Y. Q. (2009). Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(6), 1007-1013.
298. Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y., and Liu, J. (2009). Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 808-815.
299. Robinson, J. M. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 130, 281-297.
300. Cavallo, D., Chiarella, P., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Del Frate, V., and Ursini, C. L. (2023). Metal Oxide Nanoparticles and Graphene-Based Nanomaterials: Genotoxic, Oxidative, and Epigenetic Effects. In S. C. Sahu (Ed.), *Impact of Engineered Nanomaterials in Genomics and Epigenomics*, Hoboken: Wiley, 99-143.
301. Jennifer, M., and Maciej, W. (2013). Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 53-63.
302. Huisinga, K. L., Brower-Toland, B., and Elgin, S. C. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*, 115, 110-122.
303. Mazumder, A., and Shivashankar, G. (2007). Gold-nanoparticle-assisted laser perturbation of chromatin assembly reveals unusual aspects of nuclear architecture within living cells. *Biophysical Journal*, 93(6), 2209-2216.

304. İnternet: Simkó, M., Gázsó, A., Fiedeler, U., and Nentwich, M. (2011) Nanoparticles, free radicals and oxidative stress. URL: <https://epub.oeaw.ac.at/0xc1aa5576%200x00252206.pdf>, Son Erişim Tarihi: 01.07.2023.
305. Brzóska, K., Grądzka, I., and Kruszewski, M. (2019). Silver, gold, and iron oxide nanoparticles alter miRNA expression but do not affect DNA methylation in HepG2 cells. *Materials*, 12(7), 1038.
306. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
307. Li, S., Wang, H., Qi, Y., Tu, J., Bai, Y., Tian, T., Huang, N., Wang, Y., Xiong, F., Lu, Z., and Xiao, Z. (2011). Assessment of nanomaterial cytotoxicity with SOLiD sequencing-based microRNA expression profiling. *Biomaterials*, 32(34), 9021-9030.
308. Huang, Y., Lü, X., and Ma, J. (2014). Toxicity of silver nanoparticles to human dermal fibroblasts on microRNA level. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(11), 3304-3317.
309. Eom, H. J., Chatterjee, N., Lee, J., and Choi, J. (2014). Integrated mRNA and micro RNA profiling reveals epigenetic mechanism of differential sensitivity of Jurkat T cells to AgNPs and Ag ions. *Toxicology Letters*, 229(1), 311-318.
310. Oh, J. H., Son, M. Y., Choi, M. S., Kim, S., Choi, A. Y., Lee, H. A., Kim, K. S., Kim, J., Song, C. W., and Yoon, S. (2016). Integrative analysis of genes and miRNA alterations in human embryonic stem cells-derived neural cells after exposure to silver nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 8-23.
311. Huang, Y., Lü, X., Qu, Y., Yang, Y., and Wu, S. (2015). MicroRNA sequencing and molecular mechanisms analysis of the effects of gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 37, 13-24.
312. Ng, C. T., Dheen, S. T., Yip, W. C., Ong, C. N., Bay, B. H., and Lanry Yung, L. Y. (2011). The induction of epigenetic regulation of PROS1 gene in lung fibroblasts by gold nanoparticles and implications for potential lung injury. *Biomaterials*, 32(30), 7609-7615.



Gazili olmak ayrıcalıktır