



**BAZI NANOPARTİKÜLLERİN (SiO<sub>2</sub>, CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) *IN VITRO* PERİFERAL İNSAN  
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

**Yasemin SAYGILI**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2015**

## 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.

Yasemin SAYGILI

11.12.2015

# BAZI NANOPARTİKÜLLERİN (SiO<sub>2</sub>, CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) *IN VITRO* PERİFERAL İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Yasemin SAYGILI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2015

## ÖZET

Bu çalışmada silika oksit (SiO<sub>2</sub>), bakır oksit (CuO) ve demir oksit (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanopartiküllerinin (NP) insan lenfositlerinde *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir. Öncelikle NP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyeli kullanılarak analiz edilmiştir. SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin TEM'deki ortalama boyutlarının sırasıyla 98±5, 34±2 ve 21±1 nm, ortalama hidrodinamik çaplarının 709±9, 612±4 ve 202±7 nm ve zeta potansiyellerinin -31±1, -21±4 ve 37±0,2 mV olduğu belirlenmiştir. NP'lerin genotoksik etkileri kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri ile incelenmiştir. SiO<sub>2</sub> için 10, 50, 250 ve 1000 µg/mL; CuO için 25, 50, 75 ve 100 µg/mL ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> için 39,062; 78,125; 156,25 ve 312,5 µg/mL'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Her üç nanopartikül, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, kromozom anormalliği frekansında artışa sebep olmuştur. Bu artış CuO NP'lerinde tüm konsantrasyonlarda, SiO<sub>2</sub> NP'lerinde yüksek konsantrasyonlarda, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinde en yüksek konsantrasyonda, kontrole kıyasla anlamlı düzeydedir. SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri, kardeş kromatit değişimini (KKD) her iki uygulama süresinde ve tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri ise KKD sayısını genelde en yüksek konsantrasyonda önemli düzeyde artırmıştır. Diğer taraftan tüm NP'ler mitotik indeksi yüksek konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde azaltırken, nükleer bölünme indeksini ve replikasyon indeksini etkilememiştir. SiO<sub>2</sub> NP'leri tüm konsantrasyonlarda (10 µg/mL hariç), CuO NP'leri en yüksek iki konsantrasyonda ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri en yüksek konsantrasyonda MN frekansını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri, comet testi ile değerlendirilen DNA kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunu, hem 2 ve hem de 3 saatlik uygulama süresinde, tüm konsantrasyonlarda anlamlı derecede artırmıştır. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri 2 saatlik uygulamada, kuyruk uzunluğunu tüm konsantrasyonlarda, kuyruk yoğunluğunu ise en yüksek konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada hem kuyruk yoğunluğu ve hem de kuyruk uzunluğunu önemli derecede artırmıştır. Bu sonuçlar SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin *in vitro* insan lenfositlerinde klastojenik, anojenik ve sitotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir. Toksisite sıralaması CuO > SiO<sub>2</sub> > Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> şeklindedir.

Bilim Kodu : 203.1.048  
Sayfa Adedi : 108  
Anahtar Kelimeler : Silika oksit, Bakır oksit, Demir oksit, Nanopartikül, Kromozom anormalliği (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, Mikronükleus testi (MN), Comet testi  
Danışman : Prof.Dr. Fatma ÜNAL

# GENOTOXIC EFFECTS OF SOME NANOPARTICLES ( $\text{SiO}_2$ , $\text{CuO}$ , $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) IN *HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN VITRO*

(Ph. D. Thesis)

Yasemin SAYGILI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2015

## ABSTRACT

In this study, genotoxic effects of silica dioxide ( $\text{SiO}_2$ ), copper oxide ( $\text{CuO}$ ) and iron oxide ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) nanoparticles (NPs) were investigated in human lymphocytes *in vitro*. First of all, NPs were characterized by physically and chemically using transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and zetasizer. The mean TEM diameters were  $98 \pm 5$ ,  $34 \pm 2$  and  $21 \pm 1$  nm, hydrodynamic diameters were  $709 \pm 9$ ,  $612 \pm 4$  and  $202 \pm 7$  nm, zeta potentials were  $-31 \pm 1$ ,  $-21 \pm 4$  and  $37 \pm 0,2$  mV for  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CuO}$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs, respectively. Genotoxic effects of NPs were investigated by chromosome aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN), and comet assays. Four different concentrations of NPs were used in assays (10, 50, 250 and 1000  $\mu\text{g/mL}$  for  $\text{SiO}_2$ ; 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{g/mL}$  for  $\text{CuO}$  and 39,062; 78,125; 156,25 and 312,5  $\mu\text{g/mL}$  for  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs). All of the NPs increased the frequency of chromosome aberrations at both 24 h and 48 h exposure times. These increases were significant compared to the control for all the concentrations of  $\text{CuO}$  NPs, high concentrations of  $\text{SiO}_2$  and the highest concentration of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs.  $\text{SiO}_2$  and  $\text{CuO}$  NPs significantly increased SCEs at all the concentrations for both treatment times compared to the control.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs significantly increased SCEs at high concentrations, in general. While all the NPs significantly decreased the mitotic index, they did not effect nuclear division and replication indices. All the concentrations (except 10  $\mu\text{g/mL}$ ) of  $\text{SiO}_2$  NPs, two higher concentrations of  $\text{CuO}$  NPs and the highest concentration of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs significantly increased the frequency of MN compared to the control.  $\text{SiO}_2$  and  $\text{CuO}$  NPs significantly increased the comet tail intensity and tail length at both 2 and 3 h treatments at all the concentrations.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs significantly increased the comet tail length at all the concentrations and the tail intensity at the highest concentration at 2 h treatment. At 3 h treatment, all the concentrations of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs significantly increased the comet tail length and the comet tail intensity. These results indicated that  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CuO}$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs have clastogenic, aneugenic and cytotoxic effects in human lymphocytes *in vitro*. Their toxicity sequence is  $\text{CuO} > \text{SiO}_2 > \text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Science Code : 203.1.048

Key Words : Silica oxide, Copper oxide, Iron oxide, Nanoparticles, Chromosome aberration (CA) assay, Sister chromatid exchange (SCE) assay, Micronucleus (MN) assay, Comet assay

Page Number : 108

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini bana aktarmaya çalışan, her zaman desteğini hissettiğim, araştırmanın yürütülmesi sırasında gereken çaba ve hoşgörüyü fazlasıyla gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez izleme komitesinde yer alması nedeniyle bilgi ve görüşlerinden yararlandığım ve aynı zamanda elektron mikroskobu çalışmalarında katkı sağlayan Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye de çok teşekkür ederim. Tez izleme komitesinde görev yapan ve görüşleriyle tezime destek veren Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a da teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmada kullandığım nanopartiküllerin kimyasal analizlerindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL'a ve Dr. Özlem EROL'a da çok teşekkür ederim. Bilgi ve görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm lisansüstü arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın karakterizasyon aşamasının bir bölümünde emeği geçen Prof. Dr. Süleyman ÖZÇELİK'e ve Araş. Gör. Dr. Saime Şebnem ÇETİN'e de çok teşekkür ederim. Bu yoğun eğitim süreci boyunca, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2011-74 No'lu projesiyle kısmen desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                     | iv    |
| ABSTRACT.....                                                  | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                  | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                              | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                      | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                        | xi    |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                       | xiii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                   | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                  | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                         | 3     |
| 2.1. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları .....                | 3     |
| 2.1.1. Metal oksit nanopartikülleri .....                      | 5     |
| 2.2. Nanopartiküllerin Toksisitesi .....                       | 8     |
| 2.3. Nanopartiküllerin Toksisitesini Etkileyen Faktörler ..... | 9     |
| 2.3.1. Boyut, şekil ve kaplama durumu.....                     | 9     |
| 2.3.2. Çözünürlük ve agregat oluşumu.....                      | 10    |
| 2.3.3. Ortamın özelliği .....                                  | 11    |
| 2.3.4. Yüzey yükü ve zeta potansiyeli.....                     | 11    |
| 2.4. NP'lerin Genotoksik Mekanizmaları .....                   | 12    |
| 2.4.1. Primer genotoksisite.....                               | 12    |
| 2.4.2. Sekonder genotoksisite .....                            | 13    |
| 2.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri .....               | 13    |
| 2.5.1. SiO <sub>2</sub> nanopartikülleri.....                  | 15    |

|                                                                                | <b>sayfa</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.5.2. CuO nanopartikülleri.....                                               | 17           |
| 2.5.3. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartikülleri .....                   | 18           |
| 2.6. Genotoksisite Testleri.....                                               | 19           |
| 2.6.1. Kromozomal anormallik testi.....                                        | 19           |
| 2.6.2. Kardeş kromatit değişimi testi .....                                    | 20           |
| 2.6.3. Mikronükleus testi.....                                                 | 22           |
| 2.6.4. Comet testi .....                                                       | 23           |
| <b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>                                              | <b>25</b>    |
| 3.1. Materyal .....                                                            | 25           |
| 3.1.1. Kromozom incelenmesi için materyal .....                                | 25           |
| 3.1.2. Test materyalleri ve kullanılan kimyasallar .....                       | 25           |
| 3.2. Metot .....                                                               | 26           |
| 3.2.1. Test materyallerinin karakterizasyonu .....                             | 26           |
| 3.2.2. Test materyallerinin hazırlanması .....                                 | 27           |
| 3.3. Preparatların Hazırlanması.....                                           | 27           |
| 3.3.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar.....                 | 27           |
| 3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar .....                  | 30           |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                            | <b>33</b>    |
| 4.1. Karakterizasyon Çalışmaları .....                                         | 33           |
| 4.1.1. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin X ışını kırınımı ile analizi ..... | 33           |
| 4.1.2. Dinamik ışık saçılımı analizi.....                                      | 33           |
| 4.1.3. Geçirimli elektron mikroskobu analizleri .....                          | 34           |
| 4.2. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri .....                               | 36           |

|                                                                                     | <b>sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.2.1. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin genotoksik etkileri.....                | 36           |
| 4.2.2. CuO nanopartiküllerinin genotoksik etkileri.....                             | 46           |
| 4.2.3. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin genotoksik etkileri ..... | 55           |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                   | 65           |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                          | 87           |
| KAYNAKLAR .....                                                                     | 93           |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                      | 107          |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                      | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri.....                                                              | 34    |
| Çizelge 4.2. Test materyallerinin TEM karakterizasyonu .....                                                                                 | 34    |
| Çizelge 4.3. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi .....                                                     | 37    |
| Çizelge 4.4. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi.....                | 40    |
| Çizelge 4.5. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....                       | 42    |
| Çizelge 4.6. SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi .....                                        | 44    |
| Çizelge 4.7. CuO nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi.....                                                                   | 46    |
| Çizelge 4.8. CuO nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi .....                            | 49    |
| Çizelge 4.9. CuO nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....                                    | 51    |
| Çizelge 4.10. CuO nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi.....                                                     | 53    |
| Çizelge 4.11. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi .....                                      | 55    |
| Çizelge 4.12. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi..... | 58    |
| Çizelge 4.13. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi .....       | 60    |
| Çizelge 4.14. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi.....                          | 62    |
| Çizelge 6.1. SiO <sub>2</sub> , CuO ve Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin insan lenfositlerindeki genotoksik etkileri.....   | 90    |
| Çizelge 6.2. Test materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....                                                                      | 91    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                 | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Kategorilerine göre nanoteknolojik tüketici ürünleri ve oranları .....                                     | 4     |
| Şekil 2.2. Nanoteknolojik alanda sıklıkla kullanılan nanopartiküller.....                                             | 4     |
| Şekil 2.3. KKD oluşumu .....                                                                                          | 21    |
| Şekil 2.4. Mikronükleus içeren binükleat hücrenin oluşumu .....                                                       | 23    |
| Şekil 2.5. DNA'sı hasarlı bir hücre.....                                                                              | 24    |
| Şekil 4.1. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin XRD analizi.....                                                               | 33    |
| Şekil 4.2. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi .....                                          | 37    |
| Şekil 4.3. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi .....                            | 38    |
| Şekil 4.4. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi .....                                        | 41    |
| Şekil 4.5. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi .....                                           | 42    |
| Şekil 4.6. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi..                    | 44    |
| Şekil 4.7. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi ....                  | 45    |
| Şekil 4.8. CuO NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi .....                                                       | 47    |
| Şekil 4.9. CuO NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi .....                                         | 47    |
| Şekil 4.10. CuO NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi .....                                                    | 50    |
| Şekil 4.11. CuO NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi .....                                                       | 51    |
| Şekil 4.12. CuO NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi                                  | 53    |
| Şekil 4.13. CuO NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi..                                 | 54    |
| Şekil 4.14. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi .....                           | 56    |
| Şekil 4.15. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi.....              | 56    |
| Şekil 4.16. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi .....                         | 59    |
| Şekil 4.17. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi .....                            | 60    |
| Şekil 4.18. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi ..... | 62    |

**Şekil****Sayfa**

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.19. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi ..... | 63 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                               | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 4.1. SiO <sub>2</sub> NP'lerinin TEM görüntüsü .....                                          | 35    |
| Resim 4.2. CuO NP'lerinin TEM görüntüsü .....                                                       | 35    |
| Resim 4.3. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'lerinin TEM görüntüsü .....                            | 35    |
| Resim 4.4. SiO <sub>2</sub> NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri .....                        | 39    |
| Resim 4.5. SiO <sub>2</sub> NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri .....                    | 41    |
| Resim 4.6. SiO <sub>2</sub> NP'leri ile oluşan mikronükleuslar .....                                | 43    |
| Resim 4.7. SiO <sub>2</sub> NP'leri ile oluşan DNA hasarı .....                                     | 45    |
| Resim 4.8. CuO NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri .....                                     | 48    |
| Resim 4.9. CuO NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri .....                                 | 50    |
| Resim 4.10. CuO NP'leri ile oluşan bir mikronükleuslu binükleat .....                               | 52    |
| Resim 4.11. CuO NP'leri ile oluşan DNA hasarı .....                                                 | 54    |
| Resim 4.12. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri .....         | 57    |
| Resim 4.13. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri .....     | 59    |
| Resim 4.14. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'leri ile oluşan bir mikronükleuslu binükleatlar ..... | 61    |
| Resim 4.15. Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'leri ile oluşan DNA hasarı .....                      | 63    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

### Simgeler

### Açıklamalar

|       |                      |
|-------|----------------------|
| %     | Yüzde                |
| °C    | Santigrat derece     |
| µg/mL | Mikrogram/ mililitre |
| µl    | Mikrolitre           |
| mA    | Miliamper            |
| mg    | Miligram             |
| mg/kg | Miligram/kilogram    |
| mL    | Mililitre            |
| rpm   | Devir sayısı         |
| V     | Volt                 |
| ζ     | Zeta                 |
| nm    | Nanometre            |

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

|                                |                                    |
|--------------------------------|------------------------------------|
| A549                           | Akciğer epitel karsinoma hücreleri |
| Ag                             | Gümüş                              |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Alüminyum oksit                    |
| ATP                            | Adenozin trifosfat,                |
| BBB                            | Kan beyin bariyeri                 |
| BEAS-2B                        | İnsan bronşial epitel hücreleri    |
| BrdU                           | Bromodeoksiüridin                  |
| CB                             | Siyah karbon                       |
| CeO <sub>2</sub>               | Seryum oksit                       |
| CHL                            | Çin hamster akciğer hücreleri      |
| CNT                            | Karbon nanotüp                     |
| CuO                            | Bakır oksit                        |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                                    |                                         |
|------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>DLS</b>                         | Dinamik ışık saçılımı                   |
| <b>DNA</b>                         | Deoksiribonükleik asit                  |
| <b>EFSA</b>                        | Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu            |
| <b>FBS</b>                         | Fetal bovine serum                      |
| <b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> | Demir oksit                             |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b> | Manyetik demir oksit                    |
| <b>FISH</b>                        | Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon   |
| <b>GSH</b>                         | Glutasyon                               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>  | Hidrojen peroksit                       |
| <b>HaCaT</b>                       | İnsan epidermal keratinosit hücreleri   |
| <b>Hep2</b>                        | İnsan larinks epitel hücreleri          |
| <b>HepG2</b>                       | Çok farklılaşmış hepatoselüler hücreler |
| <b>IL-6</b>                        | İnterlökin-6                            |
| <b>IMR-90</b>                      | İnsan akciğer fibroblast hücreleri      |
| <b>KA</b>                          | Kromozomal anormallik                   |
| <b>KCl</b>                         | Potasyum klorür                         |
| <b>KKD</b>                         | Kardeş kromatit değişimi                |
| <b>L5178Y</b>                      | Fare lenfoma hücre hattı                |
| <b>L-929</b>                       | Fare fibroblast hücre kültürü           |
| <b>LDH</b>                         | Laktat dehidrogenaz                     |
| <b>MCF7</b>                        | İnsan göğüs kanseri hücreleri           |
| <b>MH-S</b>                        | Fare alveol makrofaj hücreleri          |
| <b>Mİ</b>                          | Mitotik indeks                          |
| <b>MMC</b>                         | Mitomisin-C                             |
| <b>MWCNT</b>                       | Çok duvarlı karbon nanotüp              |
| <b>MN</b>                          | Mikronükleus                            |
| <b>NaCl</b>                        | Sodyum klorür                           |
| <b>NBI</b>                         | Nükleer bölünme indeksi                 |
| <b>Neuro-2A</b>                    | Fare nöroblastoma hücre kültürü         |
| <b>NM</b>                          | Nanomateriyal                           |
| <b>NO</b>                          | Nitrik oksit                            |
| <b>NP</b>                          | Nanopartiküller                         |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                                    |                                        |
|------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>O<sub>2</sub></b>               | Süperoksit                             |
| <b>OECD</b>                        | Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü  |
| <b>OH</b>                          | Hidroksil                              |
| <b>PBS</b>                         | Fosfat tamponu                         |
| <b>PMEF</b>                        | Fare embriyo fibroblast hücreleri      |
| <b>RAW 264.7</b>                   | Fare makrofaj hücre hattı              |
| <b>Rİ</b>                          | Replikasyon indeksi                    |
| <b>ROT</b>                         | Reaktif oksijen türleri                |
| <b>SCGE</b>                        | Tek hücre jel elektroforezi            |
| <b>SHE</b>                         | Suriye hamster embriyo hücreleri       |
| <b>Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub></b> | Silikon nitrit                         |
| <b>SiO<sub>2</sub></b>             | Silika oksit                           |
| <b>SK-Hep-1</b>                    | Az farklılaşmış hepatoselüler hücreler |
| <b>SSC</b>                         | Salin sitrat tamponu                   |
| <b>TEM</b>                         | Geçirimli elektron mikroskobu          |
| <b>TiO<sub>2</sub></b>             | Titanyum dioksit                       |
| <b>TNF</b>                         | Tümör nekroz faktör                    |
| <b>UFP</b>                         | Ultrafine partikül                     |
| <b>XRD</b>                         | X ışını kırınım yöntemi                |
| <b>ZrO<sub>2</sub></b>             | Zirkonyum oksit                        |
| <b>ZS</b>                          | Zeta-sizer                             |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde, teknolojik gelişmelerle birlikte üretilen yeni malzemeler ile birlikte bu malzemelerde kullanılan kimyasal maddelerin sayısı da hızla artmaktadır. Ancak bu kimyasalların çoğu, olası toksik etkileri hakkında yeteri kadar araştırma yapılmadan insanlığın hizmetine sunulmakta ve yaygın kullanımlarının çevre ve canlılar üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkiler genellikle göz ardı edilmektedir. Teknoloji, insanlığa birçok alanda rahatlık ve kolaylık sağlarken, bazı sorunları da beraberinde getirebilmektedir. Örneğin, son yıllarda yeni ürünlerin geliştirilmesinde kullanılan nanoteknolojinin bazı açılardan tehlikeli olabileceği yönünde veriler mevcuttur.

Nanoteknoloji, atom ve molekül düzeyinde işlevsel sistemler mühendisliğidir. Atom ve moleküllerin tek tek işlenip düzenlenmesi ile kullanışlı materyal, araç ve sistemler üretilmektedir. Nano boyuttaki yapıların değişen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin dikkate alındığı bu alanda, 100 nm'den küçük nanopartiküller (NP) kullanılmaktadır. Bu partiküllerin tarihi, 1959'lara Fizikçi Richard Feynman'ın görüşlerine dayanmaktadır.

Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller, ebatlarına bağlı olarak farklı özellikler göstermektedir. Örneğin altın, makroskobik boyutta sarı renkte iken, nano boyutta kırmızı renktedir.  $\text{TiO}_2$  (titanyum dioksit) nanopartikülleri de 50 nm'den küçük boyutlarda renksiz iken, daha büyük boyutlarda beyaz renkte görünürler. Nano boyuttaki materyaller, yüzey alanlarında meydana gelen değişim ve kuantum etkileri sebebi ile aynı maddenin daha büyük boyutta olanlarına göre farklı kimyasal özellikler gösterirler. Maddenin boyutu azaldıkça yüzey alanı ve kuantum etkisi artış göstermekte ve böylece optik, elektrik ve manyetik özellikleri de değişmektedir. Bilim insanları nanopartiküllerin bu özelliklerinden yararlanarak günümüzde tıp, tekstil, gıda, kozmetik, elektronik, otomotiv, savunma sanayi ve biyoteknoloji gibi birçok alanda nanopartikülleri yaygın olarak kullanmaya başlamışlardır.

Nanoteknolojide meydana gelen güzel gelişmelerle birlikte nanomateryal kullanımında meydana gelen artış, insan sağlığı konusunda çalışan bilim insanları arasında bu partiküllerin olası toksik etkileri konusunda kaygıların artmasına neden olmuştur.

Nanopartiküllerden özellikle metal oksit NP'leri, en yaygın kullanım alanı bulmasına rağmen, bunların toksisitesine özellikle genotoksitesine yönelik veriler hem kısıtlı düzeyde ve hem de birbiriyle çelişir niteliktedir. Yapılan araştırmalar, nanomateriyallerin şekil, büyüklük, zeta potansiyeli, elektrik yükü ve aglomerasyon durumu gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı genotoksik etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Nanopartiküllerin kazandıkları yeni ve olağanüstü özellikleri nedeni ile hücre ile etkileşimleri de değişmekte ve hücreye giriş yolları ile hızı değişerek, oksidatif stresi arttırmakta, hücrede inflamasyon oluşturabilmekte, genetik materyalde hasara ve gen ekspresyonunda değişime sebep olabilmektedir. Nanopartiküllerin yaptığı hasar onarılamadığında, uygun gen ve gen ürünleri mevcut olduğunda hücre apoptozise yönlendirilmektedir. Hasar uygun bir şekilde tamir edilemez veya apoptozis de gerçekleşemez ise, genomik kararsızlık ortaya çıkmakta ve kanserogenez işlemi başlayarak sonuçta kanser gelişebilmektedir. Genetik hasar üreme hücrelerinde de meydana gelebilir. Bu durumda hasar, sadece o bireyi değil, gelecek tüm nesilleri de tehdit edecektir. Bu nedenle yaygın kullanım alanı olan nanopartiküllerin genotoksik risk taşıyıp taşımadığının ortaya çıkarılması ve bu risklerin hangi fiziksel ve kimyasal şartlarda ortaya çıktığının belirlenmesi, hem bireyin kendisi ve hem de gelecek nesiller açısından büyük önem taşımaktadır.

Yukarıda değinilen gerçekler ve görüşler dikkate alınarak, bu tez çalışması, nanoteknolojide sıklıkla kullanılan metal oksitlerden bakır oksit-CuO, demir oksit-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve silika oksit-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ve insan periferik lenfositlerinde genotoksik risk taşıyıp taşımadığının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Genotoksik risklerin belirlenmesinde OECD tarafından yönergeleri yayınlanan ve uluslararası makalelerde kullanılan mikronükleus (MN), kardeş kromatit değişimi (KKD/SCE), kromozom anormallikleri (KA/CA) ve tek hücre jel elektroforez (SCGE)-comet testleri kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesinde geçirimli elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyeli kullanılmıştır.

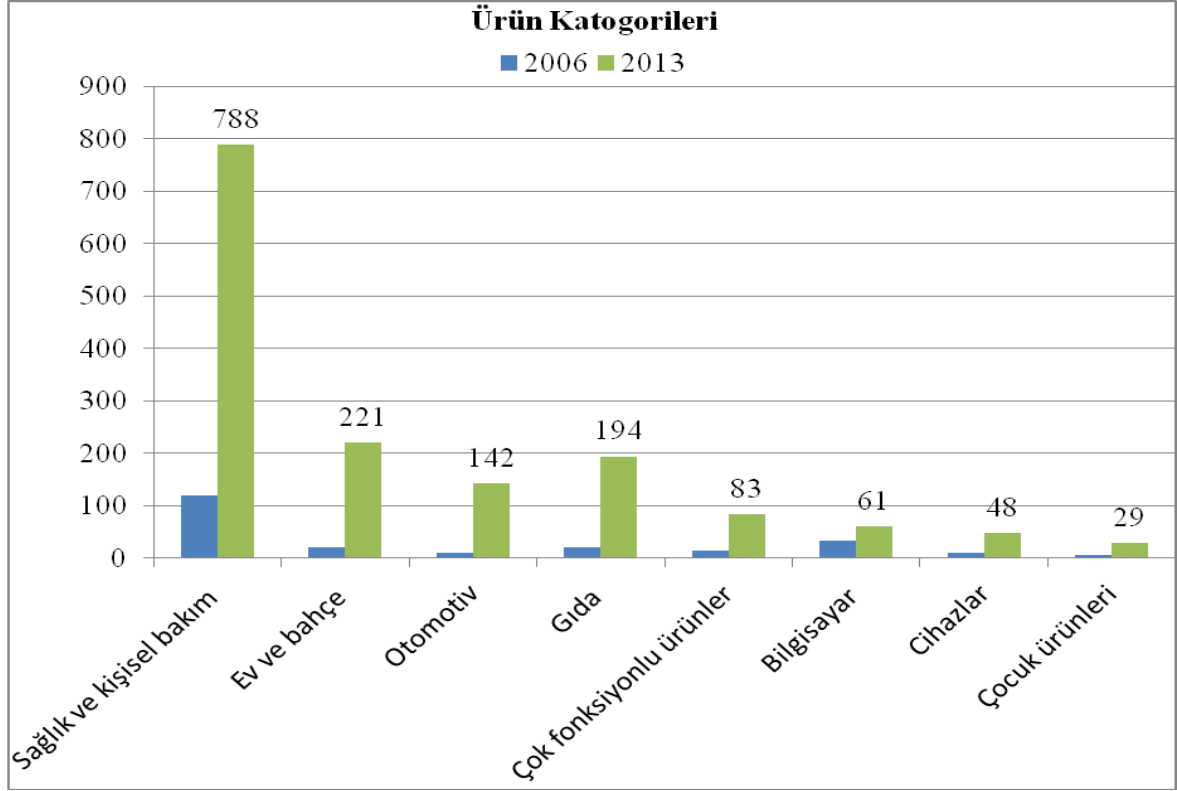
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları

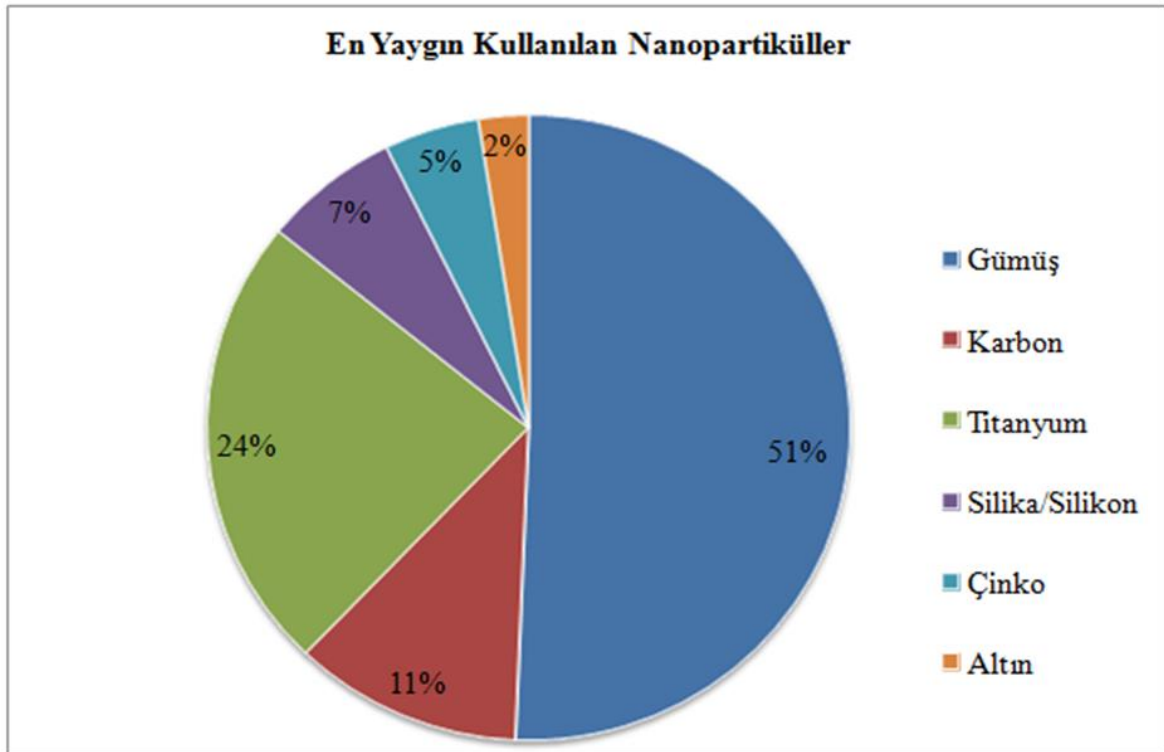
Nanoteknoloji alanında ölçü birimi olarak metrenin milyarda biri anlamına gelen nanometre (nm) terimi kullanılmakta olup, genellikle 100 nm'nin altındaki nanopartiküller (NP, NM-Nanomateriyal) ile çalışılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2009). NP'ler bazen ultrafine partikül (UFP) olarak da isimlendirilmektedirler. UFP'ler yapısal olarak NP'ler ile aynı olmakla beraber, sadece üretimleri farklıdır. UFP'ler oksitlenme ve kaynak işlemi sırasında kontrolsüz olarak kendiliğinden oluşurken, NP'ler endüstriyel amaçlı kullanılmak üzere, fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkate alınarak özel olarak sentezlenmektedir (Oberdörster, Oberdörster ve Oberdörster, 2005).

NP'lerin kullanım alanının artışına bağlı olarak, nanoteknolojik tüketici ürünlerinin sayısı da her geçen gün artmaktadır. Ekim 2013 verilerine göre, piyasada 1628 nanoteknolojik ürün bulunmaktadır. Bu ürünler arasında en büyük katogoriyi 788 çeşiti ile kozmetik, güneş kremi ve spor malzemeleri gibi kişisel bakım ve sağlık ürünleri oluşturmaktadır (Şekil 2.1).

Nanoteknoloji alanında en fazla ürün Amerika Birleşik devletlerinde üretilmekte, bu ülkeyi sırası ile Avrupa ülkeleri ve Doğu Asya ülkeleri izlemektedir. Üretilen nano boyutlu malzemelerin içerikleri dikkate alındığında en yaygın kullanılan materyalin gümüş olduğu, gümüşten sonra ise sırasıyla, titanyum, karbon, silika ve çinko türevi materyallerin kullanıldığı belirlenmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Kategorilerine göre nanoteknolojik tüketici ürünleri ve oranları  
(<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>)



Şekil 2.2. Nanoteknolojik alanda sıklıkla kullanılan nanopartiküller  
(<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>)

Nanopartiküller endüstriyel alanda kullanılma sıklıklarına göre dört gruba ayrılmaktadır (Ju Nam ve Lead, 2008):

- Karbon bazlı nanopartiküller,
- Kuantum noktacıkları,
- Metal nanopartiküller,
- Metal oksit nanopartiküller

### **2.1.1. Metal oksit nanopartikülleri**

Yapısında en az bir oksijen atomu bulunduran metal içerikli bileşiklerdir. Tüketicinin hizmetine sunulmuş nanoteknolojik ürünlerin % 10'luk kısmını metal oksit türevi ürünler oluşturmaktadır. Bu ürünler kendi aralarında kıyaslandığında ilk sırayı titanyum dioksit, ikinci sırayı ise silika dioksit bazlı ürünler almaktadır. Her iki partikül de birçok alanda kullanılmakla birlikte, titanyum dioksit kozmetik endüstrisinde, silika oksit ise boya ve plastik sanayinde daha yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Mitrano, Motellier, Clavaguera ve Nowack, 2015).

#### Silika oksit nanopartikülleri

Silika, silikon dioksit bileşimlerinin genel adıdır. Karbondan sonra yer kabuğunda en bol bulunan materyaldir. Kristal ve amorf olmak üzere iki formu bulunur (Park ve Park, 2009). Kristal formu uzun zincir yapısındadır. Kuartz ve porosil (por içeren kristal silika) olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır. Amorf formu ise uzun zincir içermez, oksijen ve silikon atomları ile tam doludur. Bu formda genellikle por gözlenmez, porlu yapıların gözleendiği durumda ise por çapı 2 nm'den küçüktür. Amorf formunda, X-RAY dağılımında (X-ışını kırınımı-XRD) 20-25 derece aralığında pikler gözlenirken (Music, Vincekovic ve Sekovaniç, 2011; Ficai ve diğerleri, 2011), kristal formunda daha keskin pikler gözlenmektedir. Ayrıca silikanın kristal formu silikozis hastalığına sebep olduğundan kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır (Napierska, Thomassen, Lison, Martens ve Hoet, 2010; Petushkov, Ndiege, Salem ve Larsen, 2010).

Bir metal oksit olan amorf yapıdaki silika nanopartikülü elde edilmesi kolay ve ucuz olduğundan sıkça kullanılmaktadır. Kozmetik, gıda, ilaç, toner ve cila sanayi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda katkı maddesi olarak kullanıldığı gibi, enzim immobilizasyonu,

kanser tedavisi ve ilaç dağıtımı gibi biyoteknoloji ve tıp alanlarında (Chang ve diğerleri, 2007) ve diş hekimliğinde bu NP'den yararlanılmaktadır (Hashimoto ve Imazato, 2015).

Uygulama alanı artıkça, bu NP'lere maruziyet artmakta ve güvenilirlik sorunu oluşmaktadır. SiO<sub>2</sub> NP'leri, E551 kodu ile berraklaştırıcı ve topaklanmayı önleyici gıda katkı maddesi olarak kahve kreması, hazır çorba, puding, kek, vitamin ve meyve suyu gibi birçok üründe kullanılmaktadır (Kesteren ve diğerleri, 2015). Fakat bu madde, gastrointestinal sistemde çözünememekte, vücuttan uzaklaştırılması oldukça zaman almaktadır. Bu nedenle canlı sistemler için risk oluşturma olasılığı vardır.

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin yoğunluğu düşük olduğundan, solunum yolu ile kolayca hücre içine alınabilmektedir (Chen ve diğerleri, 2008). Hücreye kolay penetre olduklarından, özellikle akciğerlerde, insan sağlığı için tehlikelidir. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin toksik olduğu yönünde birçok çalışma bulunmaktadır (Brown ve diğerleri, 2007; Napierska ve diğerleri, 2010; Petushkov ve diğerleri, 2010; Paget, Sergent ve Chevillard, 2011; Lankoff ve diğerleri, 2013). Diğer taraftan silika NP'lerinin insan akciğer epitel hücrelerinde çok düşük toksisite gösterdiği ve hatta biomedikal alanda belirteç (markır) olarak kullanılabileceği yönünde verilerin elde edildiği çalışmalar da (Jin, Kanan, Wu ve Zhao, 2007) mevcut olduğundan, toksisitesinin belirlenmesi açısından daha fazla ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### Bakır oksit nanopartikülleri

Bakır oksit (kuprik oksit, CuO), koyu gri, siyahımsı renkte, amorf yapıdadır. Etanol ve suda çözünmez. Asitte ve amonyumda çözünür. Bakır, homeostazın sağlanması için gerekli bir mikronutrient olduğundan, yetişkinlerin günde 2 mg bakıra ihtiyacı vardır ve bu miktar 2,5 mg bakır oksit ile karşılanabilir (Aguilar ve diğerleri, 2009). Fakat fazlası toksik etki yaparak, sarılık, hemoliz ve hatta siroza bağlı hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Chen ve diğerleri, 2006).

Bakır oksit nanopartikülleri antimikrobiyal alanda (özellikle gıdaların paketlenmesinde), bataryalarda, mürekkep üretiminde, ısı transferinde, gebelik önleyici aletlerin yapımında (Hanagata ve diğerleri, 2011) ve seramiklerin renklendirilmesinde pigment maddesi olarak kullanılmaktadır (Huang, Wu ve Aronstam, 2010). CuO NP'lerinin biyosid özelliği olmakla beraber, memeliler için yüksek toksisite de göstermektedir (Perreault ve diğerleri,

2012). Yapılan çalışmalarda, CuO NP'lerinin bulk formlarından daha toksik olduğu (Karlsson, Gustafsson, Cronholm ve Möller, 2009), hatta pozitif kontrol olarak kullanılabilecek kadar yüksek düzeyde toksisite oluşturduğu belirlenmiştir (Sun ve diğerleri, 2012; Di Bucchianico ve diğerleri, 2013).

Metal oksit NP'leri küçük aerodinamik çapları nedeniyle, insan larinks epitel hücrelerinde (Hep2) reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturmaktadır. Bu etkinin yanında, CuO NP'leri antioksidan savunma sistemini de bloke etmektedir (Fahmy ve Cormier, 2009). Ayrıca CuO NP'leri nükleus ve mitokondriye geçerek, oksidatif stresi arttırmakta, DNA'yı degrede ederek, irreversible DNA hasarı oluşturmakta ve hücrede apoptozise sebep olmaktadır (Karlsson ve diğerleri, 2008; Ahamed ve diğerleri, 2010; Jose, Santra, Mandal ve Sengupta, 2011; Wang ve diğerleri, 2012). Bu nedenle CuO NP'lerinin olası toksik etkileri dikkatli ve detaylı çalışmalar ile belirlenmelidir.

#### Demir oksit nanopartikülleri

Demir oksit (ferrik oksit,  $Fe_2O_3$ ) manyetik özelliğinden dolayı biomedikal, bio mühendislik ve doku tamiri, immün sistem deneyleri, ilaç dağıtımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Naqvi ve diğerleri, 2010). Çeşitli yüzey modifikasyonları ile bu NP'ler kolayca bio uyumlu hale getirilebilmekte ve medikal alanda teşhis ya da tedavi amaçlı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Ying ve Hwang, 2010; Kumar ve Mohammad, 2011). Özellikle tümör hücrelerinde ısıyı kontrol ederek, hasarlı dokuda seçici apoptozis (hipertermia, hyperthermia) yapılmasında demir oksit nanopartiküllerinden yararlanılmaktadır (Figuerola, Corato, Manna ve Pellegrino, 2010).

Demir, memeli ve diğer birçok organizma için temel bir besin maddesi olması nedeniyle, demir oksit nanopartiküllerinin güvenilir olduğu düşünülüp, sağlık sektöründe yaygın kullanılıyor olmasına rağmen,  $Fe_2O_3$  NP'lerinin toksik olabileceklerine dair veriler mevcuttur. ROT'lerini arttırdığı ve buna bağlı toksisite ile hücre ölümü gözleendiği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Naqvi ve diğerleri, 2010; Ying ve Hwang, 2010; Hong ve diğerleri, 2011; Singh ve diğerleri, 2012). Diğer taraftan farelerde  $Fe_2O_3$  nanopartiküllerinin toksisitesinin önemsenmeyecek düzeyde olduğu yönünde çalışmalar da mevcuttur (Liu, Han, Yin, Long ve Liu, 2008; Singh ve diğerleri, 2013). Ratlarda yapılan bir çalışmada genotoksikite gözlenmemekle birlikte, NP'lerin organlarda biriktiği tespit

edilmiştir (Singh ve diğerleri, 2013). Bu birikimin ilerleyen zamanlarda nasıl bir etki yapacağı henüz tam olarak bilinemediğinden, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan kimyasal ajanların insan genomu için olası toksik etkilerinin belirlenmesi son derece önemlidir.

## **2.2. Nanopartiküllerin Toksisitesi**

NP'ler deri, solunum, damar ve oral yollar ile vücuda alınıp, dolaşım sistemine katılarak, çeşitli organ ve dokulara yerleşebilir. Bu durumda organizmada alerji, fibrosis, organlarda birikme ve buna bağlı hasarlı organ oluşumu, inflamasyon, sitotoksikite, doku hasarı, ROT'lerinin oluşumu ve DNA hasarı gibi toksik etkiler gözlenebilir (Rahi, Sattarahmady ve Heli, 2014). Nanopartiküllerin hücre içine alınması ile gözlenen bu toksik etkiler, partiküllerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin bir sonucudur. Bu nedenle NP'lerin toksisitesinin belirlenmesinde, şekil, boyut, yüzey yapısı, yüzey yükü, aglomerasyon, fonksiyonel grupların varlığı, çözünübilirlik gibi birçok özellik önemli rol oynamaktadır. NP'ler küçük boyutlarından dolayı, vücuda kolaylıkla girerek, hücrelere penetre olmakta ve onların normal fonksiyonlarını bloke edebilmekte, vücutta inflamasyona, redoks potansiyelinde değişime ve hatta hücre ölümüne sebep olabilmektedir. NP'lerin yüzey yapısı (yüzey alanı ve herhangi bir madde ile kaplı olma durumu), çevrelerindeki moleküller ile etkileşimini artırabilir. Maruziyeti sırasında kolayca absorbe edilerek, çevredeki organel ve moleküllerin fonksiyonlarını etkilerler. Hücrelere transsitoz ile penetre olup, epitel ve endotel hücrelerden lenfatik sirkülasyon ile sarı kemik iliği, dalak, kalp ve merkezi sinir sistemine (beyin) ulaşabilmektedirler. Bronşit, astım, akciğer ve karaciğer kanseri, parkinson, alzheimer, crohn, kalp ve kolon kanseri gibi rahatsızlıklara da neden olabilmektedirler. Degrede olmayan ya da yavaş parçalanan NP'lerin aşırı kullanımı stres reaksiyonlarını başlatmakta, bu durum inflamasyona sebep olarak, antioksidan sistemi zayıflatmaktadır. Biyolojik prosesler sırasında hücre ile etkileşime girmeleri ya da ilgili reaksiyonu durdurabilmeleri de olasıdır (Dar, Naseem, Gatoo, Arfat ve Qasim, 2014).

## 2.3. Nanopartiküllerin Toksisitesini Etkileyen Faktörler

### 2.3.1. Boyut, şekil ve kaplama durumu

NP'ler bulk formları ile aynı kimyasal yapıda olmalarına rağmen, fizikokimyasal özellikleri açısından farklıdır. Bu nedenle NP'lerin toksik etkileri de bulk formlarından farklılık göstermektedir. Genel olarak, NP'lerin toksisitesi, partikül boyutu azaldıkça artış göstermektedir. Nitekim  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{TiO}_2$  ve  $\text{CuO}$  gibi bazı metal oksit NP'leri ile A549 (akciğer epitel karsinoma) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, NP'lerin mikro boyutlarından daha toksik olduğu tespit edilmiştir (Karlsson ve diğerleri, 2009). Benzer şekilde farklı boyutlardaki (6, 20 ve 50 nm) silika NP'leri kullanılarak *in vitro* insan periferik lenfositlerinde yapılan bir araştırmada, partikül boyutu küçüldükçe toksik etkinin arttığı belirlenmiştir (Battal ve diğerleri, 2015).

Fare makrofaj hücrelerinde (RAW 264.7) 3 farklı demir oksit NP'ü (mikro-boyutta sferik  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  [1000 nm], nano boyutta sferik  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  [36 nm] ve çubuk şeklinde  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  partikülü [50-100 nm genişlik, 500 nm uzunluk]) kullanılarak yapılan bir çalışmada, sitotoksikite testi ile, çubuk ve nano formlarının birbirine benzer etki gösterdiği ve bu sitotoksitenin mikro partiküllerin oluşturduğu etkiden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Genotoksik etkinin ise en fazla çubuk şeklinde olan partikülde, en az ise mikro boyutta olan partikülde olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, sitotoksitenin şekil ve boyutla ilgili olabileceğini kanıtlamaktadır. Çubuk şeklinde olan formun nano formdan daha toksik olması, bu etkinin yüzey alanı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Lee ve diğerleri, 2014). Çünkü NP'lerin yüzey alanı büyüklüğü, hücreye alımını kolaylaştırmakta (daha reaktif olduklarından) ve dolayısıyla partiküller hedef dokuya kolayca ulaşabilmektedir (Choi, Kim, Song, Song ve Ryu, 2011).

10, 20, 30 ve 40 nm boyutunda karboksil kaplı manyetik demir oksit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) NP'leri kullanılarak farelerde *in vivo* koşullarda yapılan bir çalışmada, küçük boyuttaki partiküllerin karaciğer ve böbrekten hızlıca temizlendiği, uterus ve beyine kolaylıkla girdiği gözlenmiş, büyük boyuttaki NP'lerin ise dalakta birikip, kolayca elemine edildiği tespit edilmiştir. Küçük NP'lerin (10 ve 20 nm) daha fazla genotoksik etkiye neden olduğu da belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2015).

Endotel beyin hücre hattında, altın NP'leri (20, 50, 70 ve 110 nm) kullanılarak yapılan bir çalışmada, boyuta bağlı olarak NP'lerin kan beyin bariyerini (BBB) geçebildiği tespit edilmiştir. NP'lerin hücre içine alınması boyutuna bağlı olduğundan, hücrede 20 nm boyutundaki NP'lerin daha çok (%20), büyük NP'lerin ise daha az (%2) bulunduğu gözlenmiştir (Shilo ve diğerleri, 2015). Seçici geçirgen özelliği ile beyni patojen ve toksinlere karşı koruyarak, merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonunun devamlılığı için gerekli olan kan beyin bariyerinden NP'lerin geçebilmesi ve beyin içerisinde birikiyor olması, toksisite açısından oldukça düşündürücüdür.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün bulk ve nanopartikül formlarının birlikte incelendiği bir çalışmada, 500, 1000 ve 2000 mg/kg'lık dozlar, Wistar ratlara oral yoldan verildiğinde, bulk formunun gastrointestinal sistem ile absorbe olduğu ancak organlarda önemli bir birikim yapmadan (0,01-2,3%), feçes yolu ile dışarı atıldığı belirlenmiştir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün nanopartikül formunun ise intestinal bariyeri kolayca aşarak, karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve sarı kemik iliğinde biriktiği (0,2-9,4) tespit edilmiştir (Singh ve diğerleri, 2013).

10 ve 30 nm boyutunda, yüzeyi polietenol glikol (PEG) ile kaplı ve 10 nm boyutunda yüzeyi polieterimid (PEI) ile kaplı manyetik demir oksit NP'lerinin toksisitesinin incelendiği bir araştırmada, PEG ile kaplı NP'lerin toksik olduğu ancak PEI ile kaplı olanların toksik olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca PEG ile kaplı olan partiküllerden küçük boyutta olanların (10 nm) daha toksik olduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlar toksisitenin yüzey kaplaması ve boyutuna bağlı olduğunu desteklemektedir (Liu ve diğerleri, 2014). Amorf yapıdaki silika NP'leri ile yapılan bir başka çalışmada, boyut arttıkça toksisitenin azaldığı ve fibronektinle kaplı olanların PEG ile kaplı olanlardan, küre şeklinde olanların ise çubuk şeklinde olanlardan daha toksik olduğu rapor edilmiştir (Brown ve diğerleri, 2007).

### 2.3.2. Çözünürlük ve agregat oluşumu

Agregasyon, NP'lerin konsantrasyonu, nanopartikül yüzeyi ve süspansiyon ortamının kimyasal yapısına bağlıdır ve toksisiteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Metal ve metal oksit NP'ler, hidrofobik yapılarından dolayı sulu ortamda çoğunlukla çözünemediklerinden agregat oluşturma eğilimindedirler. Agregasyon, NP'ün dağılımını, hücre alımını ve cevabını etkileyebilir. Nitekim, Ag, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> gibi bazı agregat

NP'leri ile yapılan bir araştırmada, kullanılan NP'lerin potansiyel toksik etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Soto, Garza ve Murr, 2007). TiO<sub>2</sub> NP'leri ile yapılan bir başka çalışmada ise büyük NP agregatlarının nükleusu deforme ettiği ve kromozom hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Di Virgilio, Reigosa, Arnal ve Fernández Lorenzo, 2010). Diğer taraftan ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, ZnO, SiO<sub>2</sub> NP'leri ile yapılan bir incelemede, çözünebilir elementlerin daha toksik olduğu gözlenmiştir. özünemeyen maddelerin akut toksik etkisi belirlenemediği için toksisite gözlenmemiş olabileceği, uzun vadede bu maddelerin de toksik etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır (Brunner ve diğerleri, 2006).

### 2.3.3. Ortamın özelliği

NP'lerin dispers edildiği ya da eklendiği ortam da toksisiteyi etkilemektedir. NP'ler biyolojik çevreye bağlı olarak, çeşitli biyomoleküller ile kaplanabilir. Eğer bir NP eklendiği ortamda bulunan protein ile kaplanır ise bu durumda protein korona oluşur. Oluşan protein korona NP'lerin yüzey yükünü etkileyebilir ve biyolojik ortamda agregasyona neden olabilir (Wu ve diğerleri, 2015). SiO<sub>2</sub>, ZnO, TiO<sub>2</sub> NP'leri ve çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT) suda dispers edilip, %10 fetal bovine serum (FBS) bulunan ve bulunmayan ortamlara eklendiğinde, FBS'nin bulunduğu ortamda toksik etkinin azaldığı gözlenmiştir (Corradi ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde A549 hücrelerinde farklı boyutlarda (12-174 nm) amorf silika NP'lerinin etkilerinin incelendiği bir araştırmada da serum bulunmayan ortamda hücre canlılığında düşüş gözlenmiştir. Serum proteinleri NP'lerin yüzeyine bağlanmakta ve protein korona oluşturarak, NP'ün hücre içine alınımını, hücre içerisinde ilerleyişini ve hücre ile etkileşimini etkilemektedir (Gonzalez ve diğerleri, 2015).

### 2.3.4. Yüzey yükü ve zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli, NP'lerin elektrostatik potansiyelini yansıtmakta ve NP'ün süspanse edildiği ortamdaki durumunu etkilemektedir. Bu nedenle zeta potansiyeli NP'ün yüzey yükünün karakterizasyonunda büyük önem taşımakta ve toksisite araştırmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. NP'ün zeta potansiyeli, partiküller arası itme kuvvetini ifade etmektedir. Zeta potansiyeli, yükü (+ veya -) farketmeksizin 30 mV'u geçtiğinde süspansiyon içerisinde bir stabilite gösterir. Yüzey yüküne bağlı olarak oluşan itme kuvveti partikülün aglomera olmasını önlemektedir (Barnes ve diğerleri, 2008; Sun ve diğerleri,

2014). Ayrıca negatif ya da pozitif yükü fark etmeksizin, yüksek yüklü NP'ler makrofajlar tarafından daha kolay sindirilmektedir (Sun ve diğerleri, 2014).

NP'lerin herhangi bir madde ile kaplı olma durumu, bu nanopartikülün yüzey yükünü değiştirdiği için oldukça önemlidir. Çünkü yüzey yükü nanopartikülün stabilitesini belirlediği gibi, NP'nin hücrel alımını da etkilemektedir. *In vitro* insan periferik lenfositlerinde vinil ve aminopropil vinil kaplı ve herhangi bir madde ile modifiye edilmemiş amorf silika NP'leri (10, 25, 50 ve 100 nm) kullanılarak yapılan bir araştırmada, yüzey modifikasyonu yapılmış silika NP'leri ile toksik etki gözlenmez iken, modifiye edilmemiş NP'ler ile yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gözlenmiştir. Aynı boyut ve aynı şekildeki NP'ler arasında gözlenen bu toksisite farkının, NP'lerin kaplandığı maddelere bağlı olarak oluşan yüzey yükü ve zeta potansiyelinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Lankoff ve diğerleri, 2013).

#### **2.4. NP'lerin Genotoksik Mekanizmaları**

NP'lerin genotoksitesi hala tam olarak açıklanamamakla birlikte, NP'ler tarafından indüklenen genotoksik mekanizmalar primer ve sekonder mekanizmalar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Primer genotoksik mekanizmalar da kendi arasında direkt ve indirekt genotoksite olarak ikiye ayrılmaktadır (Golbamaki ve diğerleri, 2015; Magdolenova ve diğerleri, 2014; Doak, Liu ve Chen, 2012).

##### **2.4.1. Primer genotoksite**

###### Direkt primer genotoksite

NP'nin DNA ya da kromozom ile direkt etkileşimi söz konusudur. NP'ler nükleer por kompleksini aşarak çekirdek içine girebilir ya da mitoz sırasında çekirdek zarı kaybolan DNA ile direkt olarak temas edebilir. NP'ler interfaz sırasında DNA ile etkileşime geçtiğinde, DNA'nın yapısını ya da hücrel mekanizmayı bozarak, replikasyon ve transkripsiyonu etkileyebildiği gibi, mitoz sırasında direkt kromozomlar ile etkileşerek, klastojenik etkiye veya iç iplikleri ile etkileşerek anojenik etkilere de neden olabilmektedir.

### İndirekt primer genotoksisite

İndirekt genotoksisitede, nanopartikül DNA ile direkt etkileşime girmeden genotoksik hasar oluşturmaktadır. İndirekt genotoksisitenin başlıca mekanizmaları şöyledir:

- NP'ler, DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ya da tamirinde görev alan nükleer proteinler ile etkileşime geçebilir.
- NP'ler, iğ iplikleri, sentriol ve onların ilişkili olduğu proteinler ile etkileşime geçebilir (anojenik etki).
- NP'ler, hücre döngüsünden sorumlu protein kinazları etkileyerek, hücre döngüsü kontrol noktalarında bozulmalara neden olabilir.
- NP'ler, hücrede ROT'leri meydana getirebilir. Bu durumda DNA'da serbest radikal atakları oluşarak pürin ve pirimidin bazlarda lezyonlar ve DNA zincir kırıkları gibi indirekt oksidatif hasar oluşturabilir.
- NP'lerdeki toksik iyonlar DNA hasarı oluşturabilir.
- NP'ler mitokondri gibi organellere saldırarak, fonksiyonlarında hasara neden olabilmekte, mitokondri de bu duruma bir cevap olarak ROT'leri oluşturarak hasara neden olabilir.
- NP'lerin antioksidan sistemi inaktive etmesi ile ROT'leri artarak hasar oluşturabilir.

#### **2.4.2. Sekonder genotoksisite**

NP'ler fagositleri ( nötrofil, makrofaj) aktive ederek, ROT'lerinin üretimini başlatabilir ve buna bağlı genotoksisite gözlenebilir. Primer ya da sekonder genotoksisite farketmeksizin tüm bu durumların sonucunda DNA hasarı oluşmaktadır.

### **2.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri**

$\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{TiO}_2$  ve  $\text{CuO}$  gibi metal oksit NP'leri ile A549 hücrelerinde yapılan genotoksisite çalışmasında,  $\text{CuO}$  NP'lerinin DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Karlsson ve diğerleri, 2009). Metal oksit nanopartikülleri ( $\text{CuO}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ag}$ ) ile fare periferik eritrosit hücrelerinde yapılan farklı bir çalışmada ise, kullanılan tüm NP'lerin mikronükleus ve DNA hasarında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Song, Li, Kasai ve Kawai, 2012).

İnsan fibroblastlarında yapılan bir araştırmada, kobalt-kromiyum alaşımının nanoboyuttaki formunun, mikro boyutta olanlara göre daha sitotoksik olduğu belirlenmiş ve ayrıca daha fazla anöplöidiye ve DNA hasarına sebep olduğu ifade edilmiştir (Papageorgiou ve diğerleri, 2007). Farklı boyutlardaki kobalt ferrit ile yapılan başka bir çalışmada, 120 µm ve 10 µm'lik materyaller ile sitotoksik etki gözlenmez iken, 6 nm'lik materyal kullanımında sitotoksikite gözlenmiştir. Ayrıca 10 µm ve 6 nm'lik boyuttaki kobalt ferrit mikronükleus frekansında artışa sebep olmuştur (Colognato, Boneli, Bonacchi, Baldi ve Migliore, 2007).

Demir oksit, bakır oksit ve alüminyum oksit NP'leri kullanılarak Ames, mikronükleus ve comet testinin uygulandığı bir araştırmada, demir ve alüminyum oksit NP'leri ile sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmez iken, CuO NP'lerinin MN frekansını ve DNA hasarını arttırdığı rapor edilmiştir (Sadiq, Khan, Mobeen ve Hashmat, 2015). A549 hücrelerinde, seryum oksit NP'lerinin oksidatif stres oluşturarak, glutatyon ve  $\alpha$  tokoferol seviyesinde azalmaya, hücre membranına zarar veren malondialdehit ve LDH seviyesinde ise artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Lin, Huang, Zhou ve Ma, 2006). Seryum oksit ile insan fibroblast hücrelerinde yapılan başka bir çalışma da bu sonuçları destekler niteliktedir. Bu NP'ün toksik etki yaparak, DNA ve kromozom hasarı oluşturduğu vurgulanmıştır (Auffon ve diğerleri, 2009). Farklı boyutlardaki alüminyum oksit NP'leri ile *in vivo* koşullarda yapılan bir çalışmada, bu partiküllerin en fazla böbrekte olmak üzere kan, karaciğer, kalp, beyin ve dalakta biriktiği ve ayrıca genotoksik olduğu belirlenmiştir (Balasubramanyam ve diğerleri, 2009).

Siyah karbon (CB-12 nm), tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), silikon dioksit (SiO<sub>2</sub>, 20 nm) ve çinko oksit (ZnO, 19 nm) NP'leri kullanılarak fare embriyo fibroblast hücrelerinde (PMEF) yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar, sitotoksikitenin temel mekanizmasının oksidatif stresten kaynaklandığı yönündedir. Söz konusu çalışmada, 4 partikül de glutatyon (GSH) seviyesini azaltıp, ROT'lerinin oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır. Biriken süperoksit (O<sub>2</sub>) ve hidroksil (OH) radikalleri, GSH seviyesini ve hücre canlılığını azaltmakta, fonksiyonel bozukluklar oluşturmaktadır. Comet testi sonuçları ile de silika NP'lerinin genotoksik olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan en küçük boyutlu NP olan CB, ZnO'dan daha düşük bir toksisite göstermiştir. Bu sonuç, kullanılan partikülün kimyasal yapısının toksisite açısından (içerdiği metal iyonlarından dolayı) boyuttan daha önemli olabileceğini göstermektedir. Bu durum toksikitenin temel parametresi olabilir.

Kimyasal yapı, farklı NP'lerin toksisitelerinin karşılaştırılmasında birinci rol oynamaktadır. Sonuçlar, partikülün kimyasal yapısının sitotoksikite için anahtar rol oynar iken, genotoksikite için partikül şeklinin daha önemli olduğunu göstermektedir (Yang ve diğerleri, 2009).

### 2.5.1. SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri

Yüksek reaktivitesinden dolayı amorf silika NP'leri (15 ve 55 nm) ve düşük reaktivitesinden dolayı altın nano ve mikro partikülleri (2, 20 ve 200 nm) kullanılarak *in vivo* Wistar ratlar ile, *in vitro* insan periferik lenfositlerinde genotoksikitenin incelendiği bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada, *in vivo* koşullarda comet ve mikronükleus, *in vitro* koşullarda ise sadece MN testi uygulanmıştır. Altın nano ve mikro partikülleri ile kan, karaciğer ve akciğerde MN oluşumunda artış gözlenmezken, DNA hasarında tüm dokularda artış gözlenmiştir (kan, karaciğer ve akciğer). Silika NP'lerinin *in vitro* uygulamasında (kan dokusunda) MN oluşumunda artış gözlenmez iken, *in vivo* koşullarda kan dokusunda MN'de artış gözlenmiştir. Bu nedenle silika NP'lerinin sekonder genotoksikiteyi başlattığı düşünülmektedir. Silika NP'leri inflamatuvar hücre kaynaklı oksidanların serbest bırakılması ile sekonder genotoksikiteyi başlatmaktadır. Artan nötrofilik sızma ile karaciğerde nekroz ve apoptotik hücreler oluşmaktadır (Downs ve diğerleri, 2012).

Vinil ve aminopropil vinil kaplı ve herhangi bir madde ile modifiye edilmemiş 10-50 nm aralığında, küresel formdaki amorf silika NP'lerinin (10, 25, 50 ve 100 nm) genotoksik etkileri *in vitro* insan periferik lenfositlerinde incelenmiştir. Yüzey modifikasyonu yapılmış silika NP'leri ile lenfositlerde sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmez iken, mitotik indekste (Mİ) konsantrasyona bağlı bir azalma tespit edilmiştir. Modifiye edilmemiş NP'ler ise yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmuştur. Her üç tip silika NP'ünün hücre döngüsünü G1-S fazında konsantrasyona bağlı olarak bloke ettiği de belirlenmiştir (Lankoff ve diğerleri, 2013).

50 nm boyutundaki silika partikülleri kullanılarak, akciğer epitel hücrelerinde (A549) yapılan bir çalışmada, düşük genotoksikite ve düşük sitotoksikite belirlenmiştir (Jin ve diğerleri, 2007). Farklı boyutta silika NP'leri (30, 80 ve 400 nm) kullanılarak insan lenfoblastoid fibroblastlarında yapılan incelemede genotoksik etki gözlenmemiş, fakat

küçük boyutlarında sitotoksosite gözlenmiştir (Barnes ve diğerleri, 2008). 16, 60 ve 104 nm boyutundaki silika NP'lerinin A549 hücrelerinde MN, comet ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği ile incelenmesi sonucunda önemli bir toksik etki gözlenmemiştir (Gonzalez ve diğerleri, 2010).

*In vitro* fare lenfoma hücre hattı (L5178Y) ve insan bronşial epitel hücrelerinde (BEAS) 10 nm boyutundaki silika NP'lerinin karaciğer hasarı ve inflamasyon oluşturduğu gözlenmiştir. Bu NP'lerin birincil DNA hasarı ve sitotoksosite oluşturduğu, fakat mutajeniteye neden olmadığı belirlenmiştir (Choi ve diğerleri, 2011). 15, 30 ve 100 nm boyutundaki SiO<sub>2</sub> NP'leri ile mikro boyuttaki SiO<sub>2</sub>'ler kullanılarak insan epidermal keratinosit hücrelerinde (HaCaT) toksik etkiler incelenmiştir. Comet testi ile 2,5; 5 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonların 24 saatlik uygulamasının DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Gong ve diğerleri, 2012).

A549 hücrelerinde farklı boyutlarda (12-174 nm) amorf silika NP'leri kullanılarak, serum varlığı ve yokluğunda MN testinin uygulandığı bir çalışmada, serum yokluğunda hücre canlılığında düşüş gözlenmiş, bu düşüş protein koronanın NP'lerin translokasyon ve lokasyonunu kolaylaştırıyor olması ile açıklanmıştır (Gonzalez ve diğerleri, 2015).

*In vitro* insan periferik lenfositlerinde 20 ve 50 nm boyutundaki silika NP'lerinin genotoksik potansiyeli KKD, MN ve comet testi ile incelenmiştir. Bu çalışmada periferik lenfositler izole edilerek mononükleer hücreler kullanılmış, genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkinin partikül boyutuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksinde (NBİ) de önemli bir düşüş gözlenmiştir (Battal ve diğerleri, 2015).

Amorf ve sferik formdaki 13 nm büyüklüğündeki Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri ile, 12 nm uzunluğundaki SiO<sub>2</sub> NP'lerinin fare makrofaj hücre hattındaki genotoksik ve sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ayrıca NP'lerin nükleus ve sitoplazmada agregatlar oluşturduğu belirlenmiştir (Hashimoto ve Imazato, 2015).

Tarantini ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (2015), amorf silika NP'leri, ratlara üç gün boyunca oral yolla 5, 10, 20 mg/kg'lık dozlarda verilmiştir. Yedi dokuda (kan, femur sarı kemik iliği, karaciğer, dalak, böbrek, onikiparmak bağırsağı ve kolon) DNA hasarını,

iki dokuda ise (sarı kemik iliği ve kolon) kromozom hasarını incelemişlerdir. Elde edilen verilere göre, genotoksitede doza bağlı olmayan bir artış gerçekleşmiştir. En anlamlı artışın en düşük konsantrasyonda (5 mg/kg) olduğu belirlenmiştir. Bu sonucun, düşük dozun daha az aglomera olmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Tarantini ve diğerleri, 2015).

### 2.5.2. CuO nanopartikülleri

CuO NP'lerinin (28 nm) A549 hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkisi comet testi ile incelenmiş ve hasarın mikro boyuttaki partiküllerin oluşturduğu hasardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Midander ve diğerleri, 2009). Benzer şekilde A549 hücrelerinde 10-100 mg/mL konsantrasyondaki CuO NP'leri (10 nm) ile bulk formdaki nanopartiküllerin araştırıldığı bir genotoksite çalışmasında da NP'lerin daha toksik olduğu belirlenmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi ile CuO NP'lerinin lizozom, mitokondri ve nükleus içerisinde bulunduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, CuO NP'lerinin endositoz sonucunda mitokondri depolarizasyonunu ve ROT'lerini arttırdığı ve sonuçta DNA hasarı ve buna bağlı olarak p38 ve p53 aktivitesini de arttırdığı düşünülmektedir (Wang ve diğerleri, 2012).

50 nm boyutundaki CuO NP'leri ile insan epidermal hücre hattında yapılan bir çalışmada, oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarında artış ve hücre canlılığında azalış olduğu gözlenmiştir (Alarifi, Ali, Verma, Alakhtani ve Ali, 2013). CuO NP'leri (30 ve 40 nm) ile fare nöroblastoma hücre kültüründe (Neuro-2A) yapılan çalışmada da DNA fragmentasyonunda, MN frekansında ve mitokondri aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Perreault ve diğerleri, 2012).

Küre, çubuk ve iğ şeklinde CuO NP'lerinin fare makrofajlarında ve periferik kandaki etkileri incelendiğinde, şekle ve boyuta bakılmaksızın CuO NP'lerinin pozitif kontrol olarak kullanılacak kadar toksik olduğu rapor edilmiştir (Di Buccianico ve diğerleri, 2013). Hepatoselüler hücrelerin çok farklılaşmış (HepG2) ve az farklılaşmış (SK-Hep-1) kültürlerinde, 50-70 nm boyutundaki CuO NP'lerinin, GSH seviyesinde azalmaya, süperoksit anyon ( $O_2^-$ ) ve nitrik oksit (NO) üretiminde artışa ve DNA hasarında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Farklılaşmış HepG2 hücrelerinin dirençli davranarak antioksidan savunma sistemine hükmettiğini ve oksidatif strese daha toleranslı olduğunu,

fakat SK-Hep-1 hücrelerinin antioksidan sisteme hükmedemeyerek, CuO NP'lerinin biriktiğini ve ROT'lerini arttırdığını göstermiştir (Kung ve diğerler, 2015). Wistar rat nöral hücrelerinde yapılan çalışma ile de ROT'lerinin artışına bağlı olarak toksisitede artış olduğu gözlenmiştir (Bulcke, Thiel ve Dringen, 2014).

### 2.5.3. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin fare fibroblast kültüründe (L-929), hücre canlılığını ve DNA stabilesini konsantrasyona bağlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Genotoksitenin daha ziyade boyut ve hücresel yükten etkilendiği ve hücresel alımın nanopartiküllere yapılan küçük modifikasyonlarla değiştiği tespit edilmiştir. Akut sitotoksitenin hücresel membranın hasarından ziyade, nanopartiküllerin hücre içine alımı sırasında olduğu bildirilmiştir (Hong ve diğerleri, 2011).

TiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (< 100 nm) NP'leri kullanılarak insan akciğer fibroblast (IMR-90) ve insan bronşial epitel hücrelerinde yapılan araştırmada, her iki NP'ün de sitozolde nükleusa yakın yerde bulunduğu gözlenmiş, fakat nükleus ve diğer organellerin içinde gözlenmemiştir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin DNA kırığı oluşturduğu fakat TiO<sub>2</sub> NP'lerinin oluşturmadığı da belirlenmiştir (Bhattacharya ve diğerleri, 2009). Suriye hamster emriyo hücrelerinde (SHE) yapılan farklı bir çalışmada ise TiO<sub>2</sub> NP'lerinin Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinden daha toksik olduğu bildirilmiştir (Guichard ve diğerleri, 2012).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in 30 nm boyutundaki nanopartikül formu ile bulk formunun dişi wistar ratlarda, konsantrasyon ve zaman bağlı olarak organlarda biriktiği gözlenmiştir. NP'lerin daha çok idrar, bulk formlarının ise feçes ile atıldığı belirlenmiştir. Ancak, ne bulk ne de nano formunda genotoksik etkisi gözlenmemiştir (Singh ve diğerleri, 2013).

A549 hücrelerinde, 29 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin etkisinin comet testi ile incelendiği çalışmalarda, DNA hasarında anlamlı bir artış olmadığı bildirilmiştir (Karlsson ve diğerleri, 2008; Karlsson ve diğerleri, 2009). Benzer şekilde 90 nm boyutundaki demir oksit nanopartikülleri kullanılarak A549 ve fare alveol makrofajlarında (MH-S) yapılan comet testinde de DNA hasarı gözlenmemiştir (Freyria ve diğerleri, 2012).

## 2.6. Genotoksisite Testleri

Yapılan araştırmalar, sayıları her geçen gün artan kimyasal maddelerin çoğunun küçük miktarlarının bile genotoksik veya kanserojenik olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Her hangi bir şekilde hücreye alınan yabancı maddeler, başta genetik materyal olan DNA'yı olmak üzere, hücre bölünmesi ve DNA replikasyonu sırasında görev alan hücre bileşenlerini etkileyerek (sentrion, enzim, DNA tamir genleri, hücre kontrol noktasındaki proteinler), organizmada tamiri mümkün olmayan hasarlar oluşturmakta, kanseri başlatabilmekte ve ilerlemesinde etkili olabilmektedir (Singh ve diğerleri, 2009; Doak ve diğerleri, 2012). Bu nedenle, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan kimyasal maddelerin insan genomu için olası toksik etkilerinin belirlenmesi son derece önemlidir.

Maruz kalınan kimyasal maddelerin, genetik materyalde direkt veya indirekt yollarla hasar oluşturup oluşturmadığı ve dolayısıyla genotoksik risk taşıyıp taşımadığı kısa süreli çeşitli genotoksisite testleri ile analiz edilmektedir (Atlı şekeroğlu ve şekeroğlu, 2011a; Zeiger, 2010; Mamur, Yüzbaşıoğlu, nal ve Aksoy, 2012; nal, Taner, Yüzbaşıoğlu ve Yılmaz, 2013; Yüzbaşıoğlu, nal ve Zengin, 2014). Genotoksisite testlerinin yaygınlaşması insan sağlığı ve yaşam kalitesi açısından önemlidir. Bu testlerin kullanılmasıyla, organizmaların herhangi bir kimyasal maddeye verecekleri genetik cevabın önceden belirlenmesi, metabolizma bozuklukları ve kanser gibi hastalıklara yatkın bireylerin, klinik belirtiler ortaya çıkmadan saptanması ve gerekli önlemlerin alınması sağlanabilir (Atlı şekeroğlu ve şekeroğlu, 2011a).

*In vitro* ve *in vivo* koşullarda, farklı organizma ve hücre tiplerinin kullanılabildiği genotoksisite testlerinden günümüzde en yaygın olarak kullanılanları kromozomal anormallik, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve tek hücre jel elektroforez (SCGE)-comet testleridir.

### 2.6.1. Kromozomal anormallik testi

Kromozom anormallikleri testi, genotoksik hasarın belirlenmesi açısından önemli bir testtir. Bu test ile normal kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişiklikler tespit edilir. Kromozomal anormallikler, spontan olarak oluşabildiği gibi, genotoksik bir maddeye maruz kalınması durumunda da oluşabilmektedir. Yeni doğmuş bir bireyde

kromozom anormalliği frekansı yaklaşık %0,6'dır, spontan düşüklerin %50'si kromozom anormalliği kaynaklıdır ve genotoksik maddelere maruziyetler arttıkça bu frekanslar da artmaktadır (Natarajan, 2002). İnsan periferik lenfositleri ile yapılan birçok çalışmada kromozom anormallikleri ile kanser oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kromozomal anormallikler, kanserogenezin erken habercisi olarak değerlendirilmekte ve kanser belirteci olarak kabul edilmektedir (Bonassi ve Hagmar, 2000; Norppa ve diğerleri, 2006; Boffetta ve diğerleri, 2007; Doak ve diğerleri, 2012; Vodenkova ve diğerleri, 2015).

Yapısal KA'lar, doğrudan DNA kırılması ve hasarlı DNA'nın tamirindeki hatalardan kaynaklanırken, sayısal KA'lar kromozom ayrılmaması gibi durumlarda, normal kromozom sayısındaki değişiklikler (anöploidi, poliploidi gibi) sonucu meydana gelmektedir (Mateuca, Lombaert, Decordier ve Kirsch-Volders, 2006). Yapısal kromozom hasarları, kromozom kırıklarından, DNA'daki onarılmamış tek ve çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomların oluşumu ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a). Kromozomal anormalliklerden kromatit kırıkları çoğunlukla S evresinde oluşurken, kromozom tipi kırıklar G<sub>1</sub> evresinde oluşmaktadır (Natarajan, 2002). Dolayısıyla kromozom anormalliklerindeki artış tamir sisteminde bir hasar olduğunu, tamirin yapılamadığını ya da yanlış yapıldığını göstermektedir (Branzei ve Foiani, 2008).

### **2.6.2. Kardeş kromatit değişimi testi**

Kardeş kromatit değişimi, bir kromozomun iki kromatitinin homolog bölgelerinden kırılarak, kırılan parçaların simetrik olarak yer değiştirmesi ve yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır (Soysal, Şahin ve Menevşe, 2008). KKD testi, mutajenler ve kanserojenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede etkili bir yöntem olduğu gibi, homolog rekombinasyon yolu ile gerçekleşen DNA tamirini de yansıtmaktadır (Faed M., 1983; Wilson III ve Thompson, 2007). Bu test çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanıldığı gibi, bazı hastalıkların belirlenebilmesi için tanı amaçlı da kullanılmaktadır (Kontaş, Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Çeşitli genotoksik maddelere maruziyet sonucunda KKD sayısı artmaktadır. Hücrede KKD sayısının yüksek olması, mutajenik ajanların saptanmasında hassas bir gösterge olarak

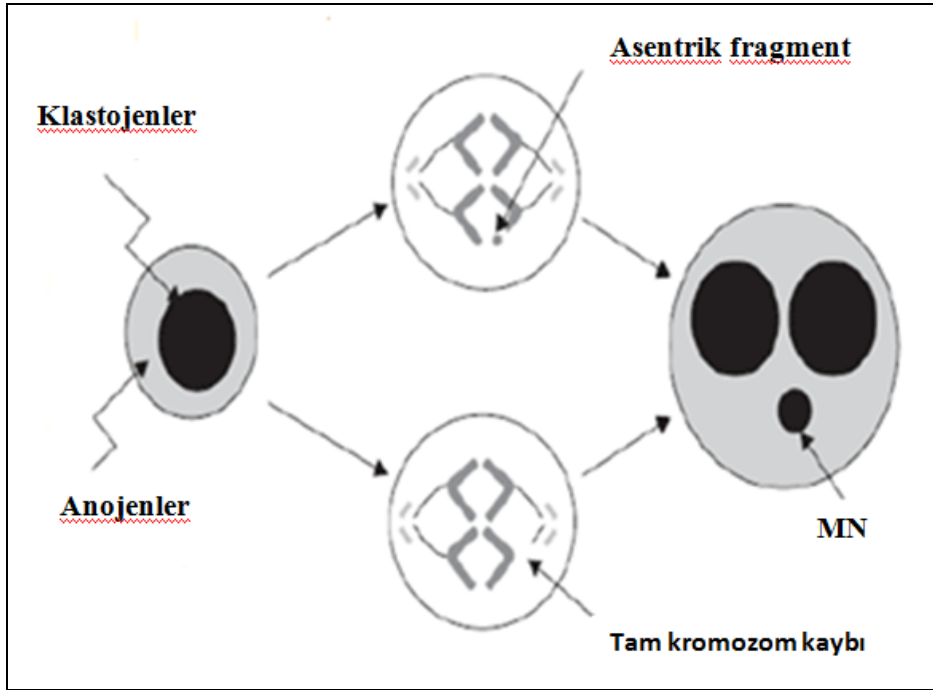


### 2.6.3. Mikronükleus testi

Mikronükleus testi, kromozom kırığı ya da kaybını belirten, mutajenik ve anojenik etkilerin saptanmasında sıklıkla kullanılan, hızlı ve güvenilir bir testtir. MN'ler, kromozom kırıkları veya geri kalmış tam bir kromozomdan oluşabileceği gibi (Şekil 2.4), kromozomların yeniden düzenlenmesi ya da değişmiş gen ekspresyonlarına bağlı olarak da oluşabilir (Fenech, 2000; Fenech, 2007; Bonassi ve diğerleri, 2007; Fenech ve diğerleri 2011).

MN tekniği ile, binükleat hücrelerde, kromozom kırığı ya da kaybını gösteren mikronükleuslar, telomer sonu birleşmesini ya da yanlış DNA tamirini gösteren nükleoplazmik köprüler, çoğalmış DNA ya da DNA tamir kompleksini gösteren nükleer tomurcuklar da tespit edilebilmektedir. Ayrıca sentromerik bölgelere özgü problemler kullanılarak, MN oluşumunun tam bir kromozomdan mı yoksa asentrik kromozom parçalarından mı oluştuğu da belirlenebilir (Fenech ve diğerleri, 2003; Fenech, 2007).

MN'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki hasarların, mitotik iğdeki hataların ya da kromozomal hasarların bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Esas çekirdeğe dahil olmayan bu yapılar, tam bir kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından oluşmaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011a). MN oluşumu genetik kararsızlığa sebep olur, hücre transformasyonunu etkiler ve sonuçta kanser riskini arttırabilir (Kirsch-Volders ve diğerleri, 2011). Bu nedenle MN frekansındaki artış ile kanserogenez arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Fenech, 2002; Bonassi ve diğerleri, 2007).



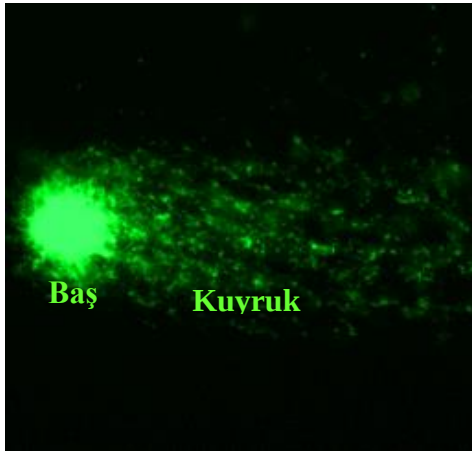
Şekil 2.4. Mikronükleus içeren binükleat hücrenin oluşumu  
(<http://www.lookfordiagnosis.com>)

#### 2.6.4. Comet testi

Comet, alkali PH'da farklı molekül ağırlıklarına sahip DNA moleküllerinin, elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanan, çok az miktarda hücre ile DNA hasarı ve tamir seviyesini belirleyen bir yöntemdir (McArt ve diğerleri, 2010; Atlı Şekeroğlu, Şekeroğlu ve Koloren, 2011b). Comet testi ile hayalet hücre olarak da isimlendirilen oldukça küçük çekirdekli ya da hiç çekirdeği olmayan apoptotik ya da nekrotik hücreler de tespit edilebilmektedir (Brendler-Schwaabs, Hartmann, Stefan Pfuhler ve Speit, 2005).

Comet testinde, hasar görmüş DNA'lar, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve kuyruk oluşturarak, kuyruklu yıldız görünümü almaktadır (Şekil 2.6). Hasarsız DNA'lar ise kuyruk oluşturmamaktadır. Düşük düzeydeki DNA hasarlarının dahi belirlenebiliyor olması, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre ve doku grupları ile çalışılabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilip değerlendirilmesi ve güvenli bir teknik olması nedeniyle, giderek yaygınlaşan bir yöntemdir (Fidan, 2008; Atlı Şekeroğlu ve diğerleri, 2011b).

Bu testte elde edilen verilerin analizinde kuyruk momenti, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmakla birlikte, yüksek DNA hasarına bağlı olarak arttığı ve kırık frekansı ile doğrudan ilişkili olduğundan, kuyruk yoğunluğu en kullanışlı parametre olarak kabul edilmektedir (Collins ve diğerleri, 2008; Kumaravel, Vilhar, Faux ve Jha, 2009). Farklı programların kullanıldığı laboratuvarlarda kuyruk momenti hesaplanması farklılık gösterdiğinden (Kumaravel ve diğerleri, 2009; Durmaz, Dikmen ve Gündüz, 2010; Sunjog ve diğerleri, 2013), kuyruk momenti çok fazla tercih edilen bir parametre değildir.



Şekil 2.5. DNA'sı hasarlı bir hücre

Bu doktora çalışmasının amacı, nanoteknolojide sıkça kullanılmaya başlanan ve metal oksitler içinde yer alan bakır oksit-CuO, demir oksit-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve silika oksit-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin insan periferik lenfositlerindeki olası genotoksik etkilerinin incelenmesidir. Bunun için, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) tarafından da yönergeleri yayınlanmış olan ve uluslararası çalışmalarda kabul edilen kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve comet testleri kullanılmıştır. Nanopartiküllerin toksik etkilerinin, bunların birçok fiziksel ve kimyasal özellikleri ile bağlantılı olabileceğinden hareketle, SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri de incelenmiştir.

### 3. MATERİYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kromozom incelenmesi için materyal

Bu araştırmada, SiO<sub>2</sub> (silika oksit), CuO (bakır oksit) ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (demir oksit) NP'lerinin insan periferik lenfositlerindeki olası genotoksik etkileri incelenmiştir. Periferik kan, sigara ve alkol kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan, gönüllü olur formunu imzalayan 20-30 yaş aralığındaki donörlerden temin edilmiştir. Çalışmada her bir test materyali için 1 erkek ve 2 bayan donör kullanılmış olup, araştırma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 27/06/2012; No: 294).

##### 3.1.2. Test materyalleri ve kullanılan kimyasallar

###### SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri

Test materyali olarak kullanılan SiO<sub>2</sub> NP'leri Sigma-Aldrich'ten temin edilmiş olup, ortalama 12 nm boyutundadır. Sinonimi silikon dioksit, ürün numarası: 718483, katalog no: 7631-86-9'dur.

###### CuO nanopartikülleri

CuO NP'leri Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir, sinonimi kuprik oksit, partikül boyutu <50 nm, ürün numarası: 544868, katalog no: 1317-38-0'dır.

###### Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri

Demir (III) oksit (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) NP'leri Sigma Aldrich'ten temin edilmiş olup, sinonimi ferrik oksit, partikül boyutu <50 nm, ürün numarası: 544884, katalog no: 1309-37-1'dir.

### Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Bromodeoksiüridin (Katalog No: 59-14-3), Mitomisin-C (Katalog No: 200-008-6), Kolkisin (Katalog No: 64-86-8), Sitokalsin-B (Katalog No: 14930-96-2), NaCl (Katalog No: 7647-14-5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Katalog No: A585477452) ve  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Katalog No: K17645732) Sigma'dan, EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1), DMSO (Katalog No: 67-68-5), Düşük erime ısıları agar (LMA) (Katalog No: 9012-36-6), Yüksek erime ısıları agar (NMA) (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog No: 1239-45-8) ve KCl (Katalog No: 7447-40-7) Applichem'den, Metil alkol (Katalog No: I624608208), HCl (Katalog No: K26702514), Glasial asetik asit (Katalog No: K41799956049) ve Giemsa (Katalog No: HX947066) Merck'ten, Chromosome Medium B (Katalog No: F 5023), PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323), Biocoll (Katalog No: L 6115) ve  $\text{PBS-Ca}^{+2} \text{Mg}^{+2}$  free (Katalog No: L1825) Biochrom'dan ve Formaldehit (Katalog No: 50-00-0) Carlo Erba'dan temin edilmiştir.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Test materyallerinin karakterizasyonu**

Ticari olarak temin edilen ve genotoksik etkileri incelenecek  $\text{SiO}_2$ , CuO ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu, dinamik ışık saçılımı ve geçirimli elektron mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca toz halindeki  $\text{SiO}_2$  NP'leri X ışını kırınım yöntemi (XRD) ile APD 2000 PRO XRD cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

### A-Dinamik ışık saçılımı ölçümleri

Nanopartiküllerin hidrodinamik çapları ve zeta ( $\zeta$ ) potansiyelleri dinamik ışık saçılımı kullanılarak belirlenmiştir. DLS ölçümleri, Lazer Doppler Elektroferez tekniği ile çalışan Malvern Nano-ZS (zeta-sizer) ile gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde nanopartiküllerden  $\text{SiO}_2$  için 250  $\mu\text{g/mL}$ , CuO için 75  $\mu\text{g/mL}$  ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  için 156,25  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Deiyonoze su içinde süspanse edilip, ultrasonik banyoda 30 dakika sonike edilerek hazırlanan örnekler, 37°C'deki etüvde 2 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnekte üç ölçüm alınmış ve her ölçümde 100 veri değerlendirilerek ortalamalar belirlenmiştir.

### B-Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri

SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin deiyonize sudaki fiziksel özellikleri TEM ile incelenmiştir. TEM incelemeleri için SiO<sub>2</sub> NP'lerinin 250 µg/mL, CuO NP'lerinin 75 µg/mL ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin 156,25 µg/mL'lik süspansiyonları DLS ölçümlerinde belirtildiği gibi hazırlanmış, süspansiyonlardan alınan bir damla örnek karbon kaplı grid üzerine damlatılarak, JEM (1400) ile farklı kV'lerde incelenmiştir.

#### **3.2.2. Test materyallerinin hazırlanması**

Çalışmada kullanılan SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri PBS (phosphate buffered solution-fosfat tamponu) içinde süspanse edilerek hazırlanırken, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri deiyonize su içersinde süspanse edilerek hazırlanmıştır. Her üç test materyali için hazırlanan ana stok süspansiyonları ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v: 50-60 Hz) 30 dakika sonikasyona tabi tutulmuş, takiben vorteks yardımı ile gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılacak konsantrasyonlar hazırlanmış ve NP'lerinin hazırlanan konsantrasyonları uygulamadan önce 15 dakika daha sonike edilip, vortekslenerek kültür ortamına eklenmiştir.

#### **3.3. Preparatların Hazırlanması**

##### **3.3.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar**

##### Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

İnsan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik testi Evans ve arkadaşlarının (1984) metoduna göre bazı modifikasyonlar ile (Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal ve Aksoy, 2006), kardeş kromatit değişimi testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemine göre bazı değişiklikler (Speit ve Haupter, 1985) yapılarak uygulanmıştır. Bu yöntemlere göre, lenfosit kültürlerinin hazırlanması için gönüllü donörlerden alınan periferik kanın 0,2 mL'si, içerisinde besi ortamı (Chromosome Medium B) bulunan kültür tüplerine ilave edilmiş ve her tüpe 10 µg/mL olacak şekilde BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) eklenerek, 37°C'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra tüplere, SiO<sub>2</sub> NP'lerinin 10, 50, 250 ve 1000 µg/mL'lik, CuO NP'lerinin 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

NP'lerinin 39,062; 78,125; 156,25 ve 312,5 µg/mL'lik konsantrasyonları ilave edilmiştir. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce, hücreler kolkisin (0,06 µg/mL) ile muamele edilmiştir. Deneylerde bir negatif (besiyeri), bir çözücü (SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri için PBS; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri için deiyonize su) ve bir pozitif kontrol (MMC-mitomisin-C; 0,20 µg/mL) grubu da kullanılmıştır. Kültür süresi bitiminde tüpler 1200 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılmış, tüpün dibinde kalan kısma 37°C'deki hipotonik çözelti (0,075M KCL) ilave edilmiştir. Tüpler 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra santrifüj edilip süpernatant atılmış, hücreler 3:1 metanol:asetik asitte tespit edildikten sonra beyaz kan hücrelerini içeren çökelti, pastör pipeti ile lamalar üzerine yayılıp, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

#### Mikronükleus testi

Mikronükleus testinde Fenech ve arkadaşlarının (2000) metodu bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Donörlerden alınan periferik kanın 0,2 mL'si, 2,5 ml'lik kromozom ortamı bulunan tüplere ilave edilip, 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürün 24. saatinde her bir NP'ün belirlenen konsantrasyonları (SiO<sub>2</sub> NP-10, 50, 250 ve 1000 µg/mL; CuO NP-25, 50, 75 ve 100 µg/mL ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP-39,062; 78,125; 156,25 ve 312,5 µg/mL) kültür ortamına eklenerek, 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyonun 44. saatinde ortama sitokalsin-B (5,2 µg/mL) eklenerek, hücrelerin sitokinezde durması sağlanmıştır. Çalışmada pozitif (MMC), negatif (besiyeri) ve çözücü kontrol (SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri için PBS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri için deiyonize su) grubu da kullanılmıştır. Kültür süresi bitiminde tüpler 1000 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılıp, tüpün dibinde kalan kısma hipotonik çözelti (0,075 M KCl) eklenerek, santrifüj edilmiştir. Takiben, hücrelere 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatif çözeltisi ilave edilmiş ve fiksatifle yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Son tespit işleminde, fiksatife %1'lik formaldehit ilave edilmiştir. Tespit işleminden sonra, hücre süspansiyonu pastör pipeti ile lam üzerine yayılıp, hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

### Preparatların boyanması

Preparatlar, kromozom anormallikleri ve mikronükleus oluşumlarının tespiti için, sorensen tamponu ile hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) boyanmıştır. Kardeş kromatit değişimlerinin belirlenmesi için ise, Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta bazı modifikasyonlar yapılarak, floresan+giemsa boyaması uygulanmıştır. Bu yöntemde preparatlar düz bir tepsiye konarak üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu (sorensen tamponu, pH=6,8) ile kaplanıp, 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışınlanmış ve 1xSSC (salin sitrat tamponu) solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda etüvden çıkarılan preparatlar sorensen tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) boyanmıştır. Her iki yöntemde de Giemسادan çıkarılan preparatlar saf suda yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskobik incelemeye alınmıştır.

### Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, her bir uygulama için her bir donörden kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz (toplam 300 metafaz) değerlendirilerek, anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) sayısı belirlenmiştir. Mitotik indeksin saptanmasında ise her bir uygulama için her bir donörden 1 000 hücre (toplam 3 000) değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden değeri olarak hesaplanmıştır.

### Replikasyon indeksi ve kardeş kromatit değişiminin saptanması

Replikasyon indeksi (Rİ), her bir uygulama için, her bir donörde 100 hücre incelenerek (toplam 300), " $Rİ = [1x(M1) + 2x(M2) + 3x(M3)] / N$ " formülüyle belirlenmiştir. Formülde M<sub>1</sub>, birinci; M<sub>2</sub>, ikinci ve M<sub>3</sub>, üçüncü metafaz evresindeki hücreleri, N ise incelenen toplam hücre sayısını göstermektedir. Kardeş kromatit değişimi sayısının belirlenmesinde ise, her uygulama konsantrasyonunda, her bir donör için, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25 hücre (toplam 75) incelenmiştir. KKD sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatitindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatitindeki açık boyanmış parçaların sayılıp, oluşan kırılma sayısına göre değerlendirilerek hesaplanmıştır.

### Nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus frekansının saptanması

Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi için, her bir donörde her bir uygulama için, 500 (toplam 1 500) hücre incelenmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde sayılmış ve nükleer bölünme indeksi " $[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N)+4x(4N)]/N$  (N incelenen toplam hücre sayısı)" formülü ile hesaplanmıştır. Mikronükleus frekansının hesaplanması için ise; çekirdek bölünmesini tamamlamış fakat sitoplazma bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli binükleat hücreler değerlendirilmiştir. Her bir donöre ait her bir uygulamadan 1 000 (toplam 3 000) binükleat hücre incelenmiştir. Binükleat hücreler, taşıdıkları mikronükleus sayısına göre sayılmış ve hücre başına düşen mikronükleus sayısı;

"(MN/hücre)=[1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN)+4x(4MN)]/N (N incelenen toplam hücre sayısı)" formülü kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar**

Comet tekniğinde Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metot bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Donörlerden alınan periferik kanın 100'er µl'si, PBS içinde süspanse edilip, lenfosit ayırıcı solüsyon (biocoll) ile lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositlerin bir kısmı ile trypan blue kullanılarak hücre canlılığı ( $\geq$  % 97) belirlenmiştir. İzole lenfositler, SiO<sub>2</sub> NP'lerinin 10, 50, 250 ve 1000 µg/mL'lik, CuO NP'lerinin 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin 39,062; 78,125; 156,25 ve 312,5 µg/mL'lik konsantrasyonları ile 37°C'de, 2 ve 3 saat muamele edilmiştir. Uygulamalarda bir negatif (besiyeri), bir pozitif (100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hidrojen peroksit) ve bir de çözücü kontrol grubu bulundurulmuştur. Çözücü olarak SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri için PBS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri için deiyonize su kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda ependorflar santrifüj edilip süpernatant atılmış ve PBS ile süspanse edilmiştir. Lenfositler düşük erime ısı agar ile karıştırılarak, önceden agar ile kaplanmış lamaların üzerine damlatılıp, lamel ile kapatılmıştır. Bir süre buzdolabında bekletildikten sonra lameller kaldırılarak, lizing solüsyonu ile bir saat muamele edilmiş, lizing sonrası elektroforez tamponu içersinde bekletilen lamalar, 25 V 300 mA'da 20 dakika yürütülmüş ve nötralizasyon uygulanarak, etidyum bromid ile boyanmıştır. Bu işlemler her iki muamele süresi için de (2 ve 3 saat) iki tekrarlı olarak uygulanmıştır.

### Görüntü analizi ve comet sayımı

Görüntü analizinde, preparatlar Olympus marka floresan mikroskopta (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli, 400X büyütme), "Comet Assay IV Perceptive Instruments Ltd., UK programı" kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir birey için, her uygulamada 100 hücre incelenmiş ve sonuçlar kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) ve % kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

### İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, mitotik indeks, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve kardeş kromatit değişimi sayısı, replikasyon indeksi, mikronükleus frekansı, nükleer bölünme indeksi, % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 programı ile regresyon analizi yapılmıştır.

Kontrol ve uygulama gruplarının karşılaştırılması amacıyla, mitotik indeks, replikasyon indeksi, nükleer bölünme indeksi, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus frekansı z-testi ile, kardeş kromatit değişimleri ve comet testi sonuçları ise t-testi ile analiz edilmiştir.

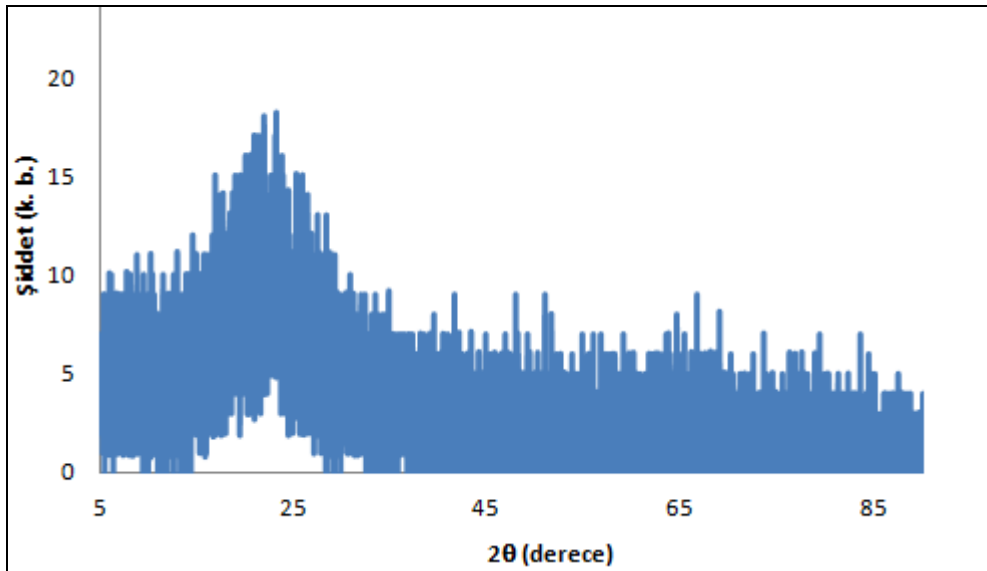


## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

#### 4.1.1. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin X ışını kırınımı ile analizi

Silika NP'lerinin kristal ve amorf formları arasında genotoksisite açısından önemli farklılıklar olduğundan (silikanın kristal formu kanserojen), kullanılan silika NP'lerinin kristal mi yoksa amorf formda mı olduğunu belirlemek amacı ile XRD analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda SiO<sub>2</sub> NP'lerinin 20-25 derece aralığında pikler oluşturması nedeni ile amorf yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin XRD analizi

#### 4.1.2. Dinamik ışık saçılımı analizi

Nanopartiküllerin deiyonize sudaki hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri DLS tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan incelemeler ile Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO ve SiO<sub>2</sub> NP'lerinin hidrodinamik çaplarının sırasıyla 202±7, 612±4 ve 709±9 nm olduğu belirlenmiştir. SiO<sub>2</sub> (-31±1 mV) ve CuO (-21±4 mV) NP'lerinin negatif yüklü olduğu, en büyük zeta potansiyele sahip olan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin ise pozitif yüklü ve 37±0,2 mV olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri

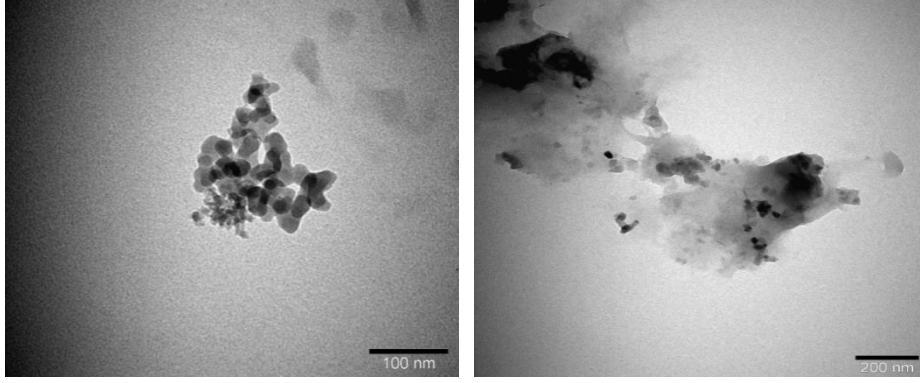
| Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )      | Hidrodinamik çap (nm) | Zeta potansiyeli (mV) |
|-----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| SiO <sub>2</sub> (250)                  | 709 $\pm$ 9           | -31 $\pm$ 1,0         |
| CuO (75)                                | 612 $\pm$ 4           | -21 $\pm$ 4,0         |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (156,25) | 202 $\pm$ 7           | 37 $\pm$ 0,2          |

#### 4.1.3. Geçirimli elektron mikroskobu analizleri

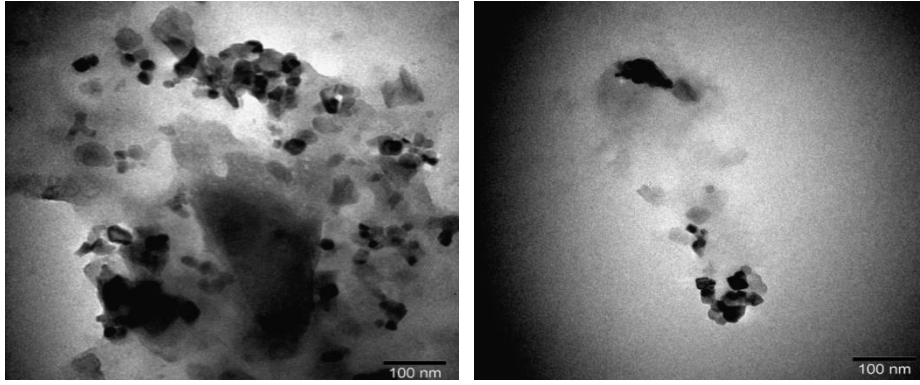
Bu çalışmada kullanılan ve TEM’de incelenen üç ayrı nanopartikülün ortalama partikül boyutu ile, bu partiküllerin en büyük ve en küçük boyutları belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Ortalama partikül boyutuna göre, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP’leri 21 $\pm$ 1 nm ebadında olup, en küçük partikül boyutuna sahiptir. SiO<sub>2</sub> NP’leri, 98 $\pm$ 5 nm ile en yüksek ortalama boyuta sahiptir. CuO NP’leri ise diğer ikisi arasında olup 34 $\pm$ 2 nm ebadındadır. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP’leri, 4,9-55,7 nm arasında, CuO NP’leri 9,7-87 nm arasında ve SiO<sub>2</sub> NP’leri ise 11,6-208,3 nm arasında dağılışı göstermiştir. SiO<sub>2</sub> NP’lerinin 1155,50 nm (1,156  $\mu\text{m}$ ), CuO NP’lerinin 1833,31 nm (1,833  $\mu\text{m}$ ) ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP’lerinin ise 149,97 nm (0,149  $\mu\text{m}$ ) büyüklüğünde aglomeratlar oluşturduğu da gözlenmiştir. TEM analizi ile silika ve bakır oksit NP’lerinin, genel olarak küresel ve kübiğimsi yapıda olmalarına rağmen, şekilsiz yapıların da bulunduğu gözlenmiştir (Resim 4.1, Resim 4.2). Demir oksit nanopartiküllerinin daha ziyade küresel yapıda olduğu gözlenmiştir (Resim 4.3).

Çizelge 4.2. Test materyallerinin TEM karakterizasyonu

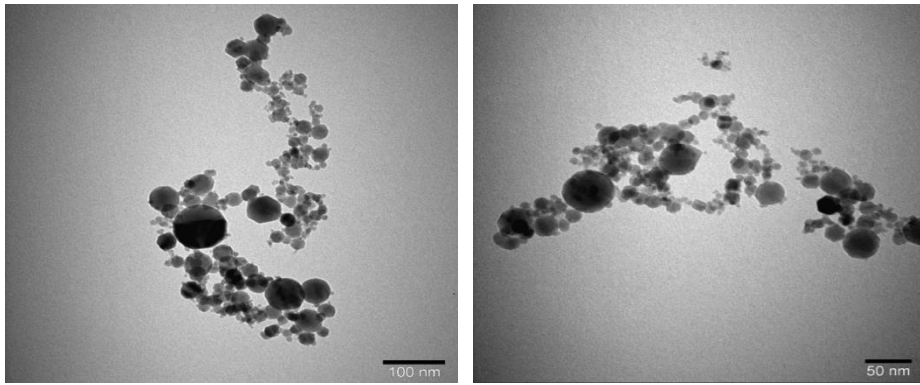
|                | SiO <sub>2</sub> (nm) | CuO(nm)      | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (nm) |
|----------------|-----------------------|--------------|-------------------------------------|
| Ortalama boyut | 98 $\pm$ 5            | 34,0 $\pm$ 2 | 21 $\pm$ 1                          |
| En küçük boyut | 11,6                  | 9,7          | 4,9                                 |
| En büyük boyut | 208,3                 | 87,0         | 55,7                                |



Resim 4.1. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin TEM görüntüsü



Resim 4.2. CuO NP'lerinin TEM görüntüsü



Resim 4.3. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin TEM görüntüsü

## 4.2. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

### 4.2.1. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin genotoksik etkileri

#### SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin kromozomal anormallikler üzerine etkisi

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun insan periferik lenfositlerinde oluşturduğu kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri insan lenfositlerinde kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kardeş kromatitlerde birleşme olmak üzere beş farklı tip yapısal anormallik ile poliploidi şeklinde bir tip sayısal kromozom anormalliği oluşturmuştur (Resim 4.4). En sık görülen yapısal anormallik tipi kromatit kırığıdır. İkinci derecede en sık gözlenen anormallik tipi ise fragmenttir.

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarında, anormal hücre yüzdesi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır (24 saatlik uygulamada  $r=0,91$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,98$ ). Bu artış 24 saatlik uygulamada en yüksek iki konsantrasyonda (250 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (50, 250 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), çözücü kontrole göre ise en yüksek konsantrasyonda (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) istatistiksel açıdan anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.2). SiO<sub>2</sub> NP'leri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısında da, her iki uygulama süresinde konsantrasyona bağlı bir artış oluşturmuştur (24 saatlik uygulamada  $r=0,89$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,99$ ). Gözlenen bu artış, 24 saatlik uygulamada en yüksek iki konsantrasyonda (250 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (50, 250 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), çözücü kontrole göre ise en yüksek iki konsantrasyonda (250 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi

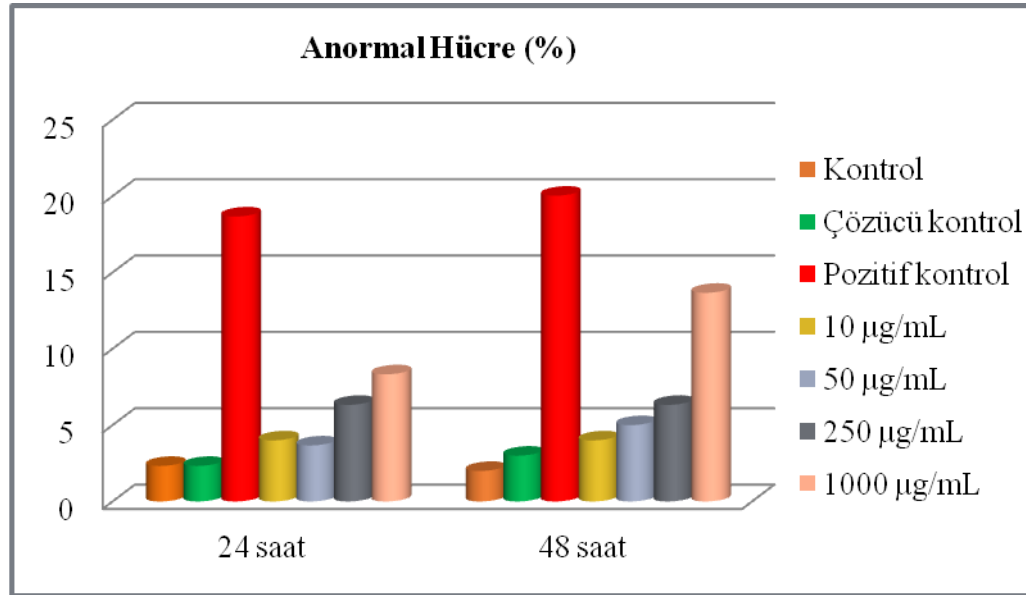
| Test Maddesi     | Uygulama    |                       | Anormallikler |         |         |         |         |         |         | Sayısal p | Anormal hücre±SH (%)      | KA/Hücre ±SH             |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------------------------|--------------------------|
|                  | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) | Yapısal       | Yapısal | Yapısal | Yapısal | Yapısal | Yapısal | Yapısal |           |                           |                          |
| Kontrol          | 24          | -                     | 3             | 2       | -       | -       | -       | -       | 2       | 2         | 2,33±0,87                 | 0,02±0,01                |
| Ç. K.            | 24          | -                     | 1             | -       | 4       | -       | -       | -       | 2       | 2         | 2,33±0,87                 | 0,02±0,01                |
| P. K.            | 24          | 0,2                   | 32            | 7       | 14      | 1       | 3       | 2       | 2       | 2         | 18,67±2,25                | 0,20±0,02                |
| SiO <sub>2</sub> | 24          | 10                    | 6             | 1       | 1       | -       | -       | -       | 4       | 4         | 4,00±1,13                 | 0,04±0,01                |
|                  | 24          | 50                    | 5             | -       | 3       | -       | 1       | -       | 2       | 2         | 3,67±1,08                 | 0,04±0,01                |
|                  | 24          | 250                   | 6             | 1       | 9       | -       | 2       | -       | 2       | 2         | 6,33±1,40 <sup>a</sup>    | 0,07±0,01 <sup>ab</sup>  |
|                  | 24          | 1000                  | 13            | 2       | 5       | -       | 3       | -       | 3       | 3         | 8,33±1,59 <sup>ab</sup>   | 0,09±0,01 <sup>abc</sup> |
| Kontrol          | 48          | -                     | 4             | 1       | 2       | -       | -       | -       | -       | -         | 2,00±0,81                 | 0,02±0,01                |
| Ç. K.            | 48          | -                     | 4             | -       | 4       | -       | -       | -       | 1       | 1         | 3,00±0,98                 | 0,03±0,01                |
| P. K.            | 48          | 0,2                   | 40            | 9       | 24      | 1       | 2       | 5       | 2       | 2         | 20,03±2,32                | 0,28±0,02                |
| SiO <sub>2</sub> | 48          | 10                    | 6             | 1       | 2       | -       | 1       | -       | 2       | 2         | 4,00±1,13                 | 0,04±0,01                |
|                  | 48          | 50                    | 6             | 1       | 3       | -       | 3       | -       | 2       | 2         | 5,00±1,26 <sup>*</sup>    | 0,05±0,01 <sup>*</sup>   |
|                  | 48          | 250                   | 9             | 3       | 4       | -       | 1       | -       | 5       | 5         | 6,33±1,40 <sup>**</sup>   | 0,07±0,01 <sup>ab</sup>  |
|                  | 48          | 1000                  | 27            | 1       | 9       | 1       | 6       | -       | 3       | 3         | 13,67±1,98 <sup>abc</sup> | 0,16±0,02 <sup>abc</sup> |

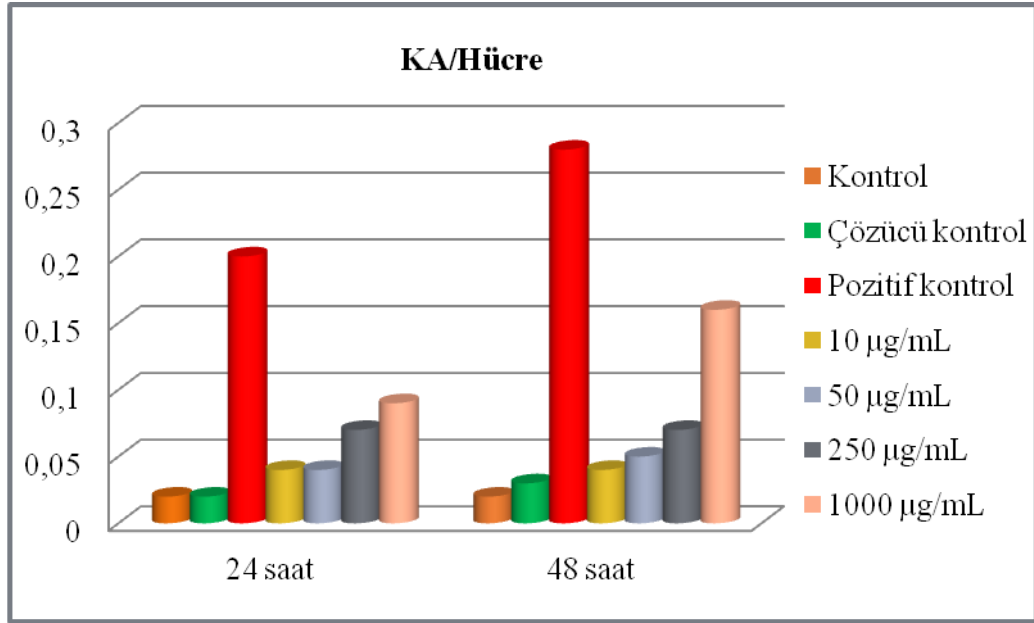
ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, ds: disentrik, kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, kkd: kromatit değişimi, p: poliploidi, SH: standart hata, Ç.K.: çözücü kontrol, P.K.: pozitif kontrol-MMC

\*Kontrolle göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>a</sup>Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z-testi)

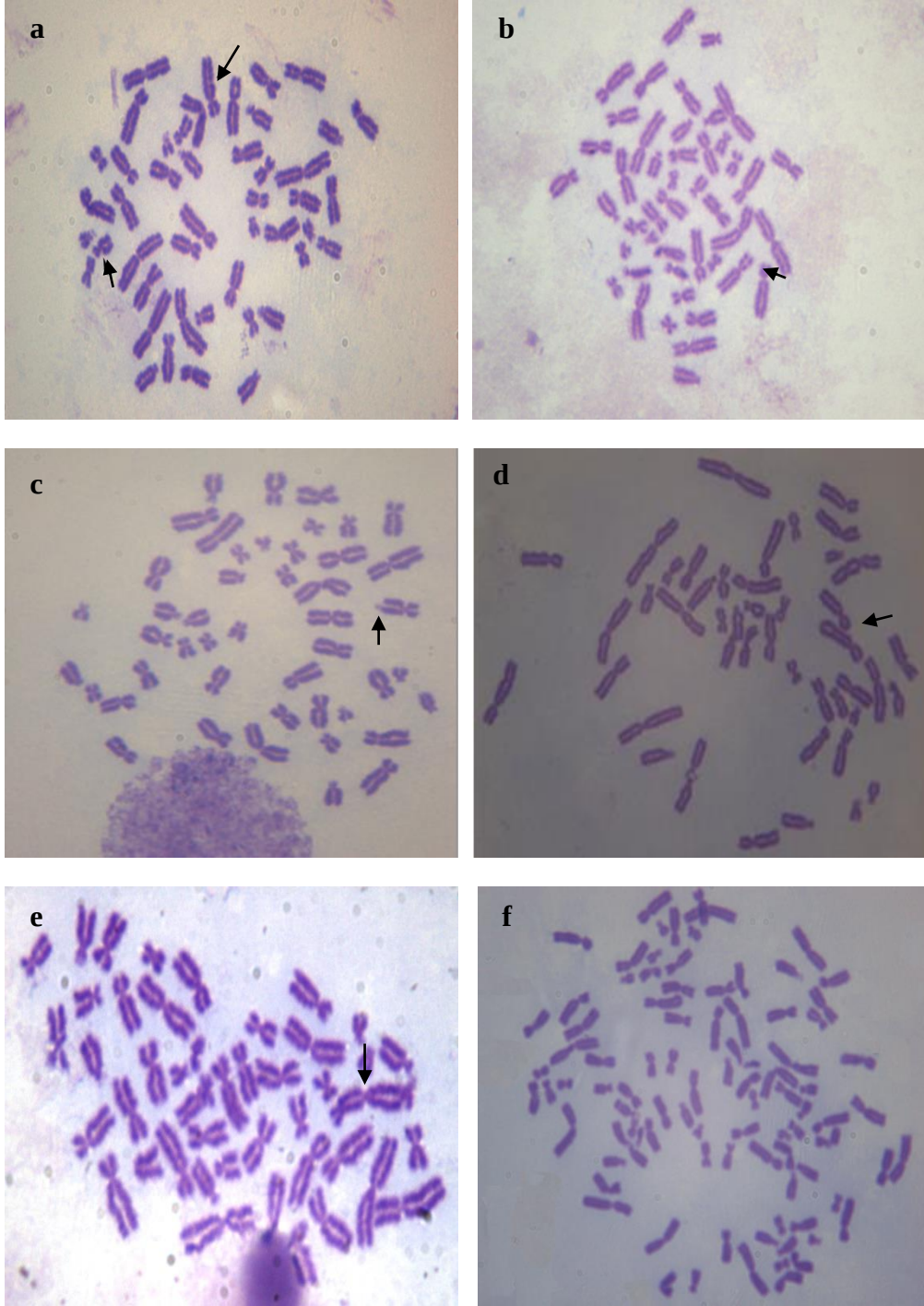
\*\*Kontrolle göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>b</sup>Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-testi)

\*\*\*Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>c</sup>Çözücü kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)

Şekil 4.2. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi



Şekil 4.3. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi



Resim 4.4. SiO<sub>2</sub> NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı, b) kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatitlerde birleşme, e) disentrik, f) poliploidi

### SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi

SiO<sub>2</sub> NP'leri, insan lenfositlerinde 0-22 arasında KKD oluşturmuştur. KKD oluşumu, tüm uygulama konsantrasyonlarında, negatif ve çözücü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.4, Resim 4.5). Bu artışın, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarda konsantrasyona bağlı olduğu (24 saatte  $r=0,93$ ; 48 saatte  $r=0,91$ ) belirlenmiştir. Diğer yandan SiO<sub>2</sub> NP'lerinin replikasyon indeksinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir (24 saatte  $r=0,65$ ; 48 saatte  $r=0,67$ ).

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin tüm konsantrasyonlarının hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarda, mitotik indekste bir azalma meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu azalma, 24 saatlik uygulamada sadece en yüksek konsantrasyonda (1000 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlıdır. 48 saatlik uygulamada ise kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (50, 250 ve 1000 µg/mL), çözücü kontrole göre ise sadece en yüksek konsantrasyonda (1000 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlıdır (24 saat için  $r=-0,93$ ; 48 saat için  $r=-0,92$ ).

Çizelge 4.4. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi

| Test maddesi        | Uygulama    |                       | Min.-maks. KKD | KKD/hücre ±SH          | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>3</sub> | Rİ±SH     | Mİ±SH                  |
|---------------------|-------------|-----------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|------------------------|
|                     | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                |                        |                |                |                |           |                        |
| Kontrol             | 24          | -                     | 0-7            | 3,45±0,19              | 79             | 77             | 144            | 2,22±0,05 | 8,17±0,50              |
| Ç. K.               | 24          | -                     | 0-10           | 3,53±1,16              | 83             | 75             | 142            | 2,20±0,05 | 7,83±0,49              |
| P. K.               | 24          | 0,2                   | 16-57          | 36,45±1,01             | 125            | 80             | 95             | 1,90±0,05 | 5,90±0,43              |
| SiO <sub>2</sub> NP | 24          | 10                    | 0-10           | 4,21±0,21 <sup>+</sup> | 84             | 75             | 141            | 2,19±0,05 | 7,47±0,48              |
|                     | 24          | 50                    | 1-18           | 5,64±0,31 <sup>+</sup> | 63             | 77             | 160            | 2,32±0,05 | 7,20±0,47              |
|                     | 24          | 250                   | 2-18           | 5,65±0,31 <sup>+</sup> | 85             | 81             | 134            | 2,16±0,05 | 7,13±0,47              |
|                     | 24          | 1000                  | 0-22           | 8,03±0,43 <sup>+</sup> | 107            | 79             | 114            | 2,02±0,05 | 6,50±0,45 <sup>a</sup> |
| Kontrol             | 48          | -                     | 0-8            | 4,45±0,19              | 71             | 80             | 149            | 2,26±0,05 | 8,03±0,50              |
| Ç. K.               | 48          | -                     | 0-15           | 4,04±0,24              | 77             | 75             | 148            | 2,24±0,05 | 7,63±0,48              |
| P. K.               | 48          | 0,2                   | 24-85          | 51,64±1,54             | 184            | 87             | 29             | 1,48±0,04 | 5,47±0,41              |
| SiO <sub>2</sub> NP | 48          | 10                    | 0-13           | 5,28±0,24 <sup>+</sup> | 85             | 75             | 140            | 2,18±0,05 | 7,13±0,47              |
|                     | 48          | 50                    | 2-13           | 5,56±0,28 <sup>+</sup> | 73             | 78             | 149            | 2,25±0,05 | 6,67±0,45 <sup>*</sup> |
|                     | 48          | 250                   | 2-15           | 6,57±0,28 <sup>+</sup> | 92             | 75             | 133            | 2,14±0,05 | 6,40±0,45 <sup>*</sup> |
|                     | 48          | 1000                  | 4-17           | 8,47±0,37 <sup>+</sup> | 103            | 75             | 122            | 2,06±0,05 | 5,73±0,42 <sup>a</sup> |

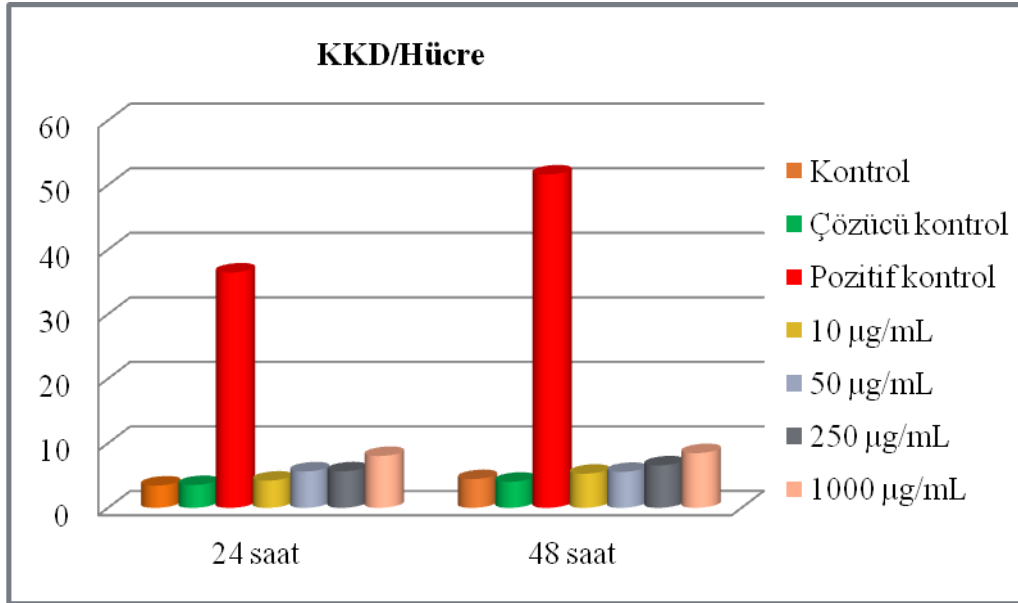
KKD: kardeş kromatit değişimi; M<sub>1</sub>: mitoz 1; M<sub>2</sub>: mitoz 2; M<sub>3</sub>: mitoz 3; Rİ: replikasyon indeksi; Mİ: Mitotik indeks, SH: standart hata, Ç.K: çözücü kontrol, P.K: pozitif kontrol-MMC

<sup>+</sup>Kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (t-testi)

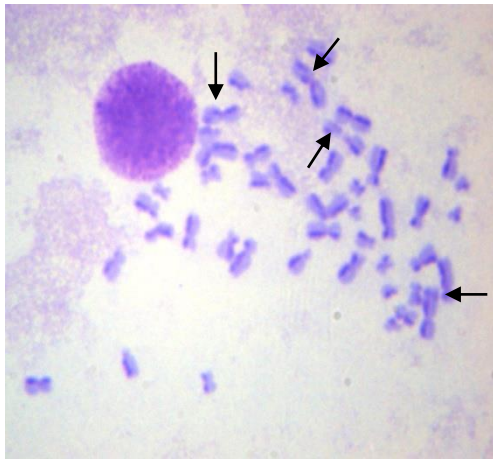
<sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (t-testi)

<sup>\*</sup>Kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.4. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi



Resim 4.5. SiO<sub>2</sub> NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri

#### SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin kültürdeki insan periferik lenfositlerine uygulanmasıyla, mikronükleus frekansında konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Bu artışın en yüksek üç konsantrasyonda (50, 250 ve 1000 µg/mL) her iki kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel açıdan anlamlı ve konsantrasyona bağlı güçlü bir korelasyon ( $r=0,95$ ) gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde, çoğunlukla bir, daha az sayıda olmak üzere iki mikronükleuslu binükleat hücrelere de rastlanmıştır (Resim 4.6). Diğer yandan,

SiO<sub>2</sub> NP'lerinin, nükleer bölünme indeksi üzerinde önemli bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir (r=0,61).

Çizelge 4.5. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

| Test Maddesi     | Uygulama    |                       | İncelenen binükleat hücre sayısı | Binükleat hücrelerdeki mikronükleus sayısı |     | MN±SH %                   | NBİ±SH    |
|------------------|-------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----|---------------------------|-----------|
|                  | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                                  | (1)                                        | (2) |                           |           |
| Kontrol          | 48          | -                     | 3000                             | 4                                          | -   | 0,13±0,06                 | 1,89±0,35 |
| Ç. K.            | 48          | -                     | 3000                             | 3                                          | -   | 0,10±0,06                 | 1,89±0,35 |
| P. K.            | 48          | 0,20                  | 3000                             | 54                                         | 1   | 1,87±0,25                 | 1,61±0,32 |
| SiO <sub>2</sub> | 48          | 10                    | 3000                             | 5                                          | -   | 0,17±0,07                 | 1,85±0,35 |
|                  | 48          | 50                    | 3000                             | 13                                         | 1   | 0,50±0,13 <sup>*b</sup>   | 1,80±0,34 |
|                  | 48          | 250                   | 3000                             | 12                                         | 2   | 0,47±0,12 <sup>*b</sup>   | 1,74±0,34 |
|                  | 48          | 1000                  | 3000                             | 29                                         | -   | 0,97±0,18 <sup>***c</sup> | 1,59±0,32 |

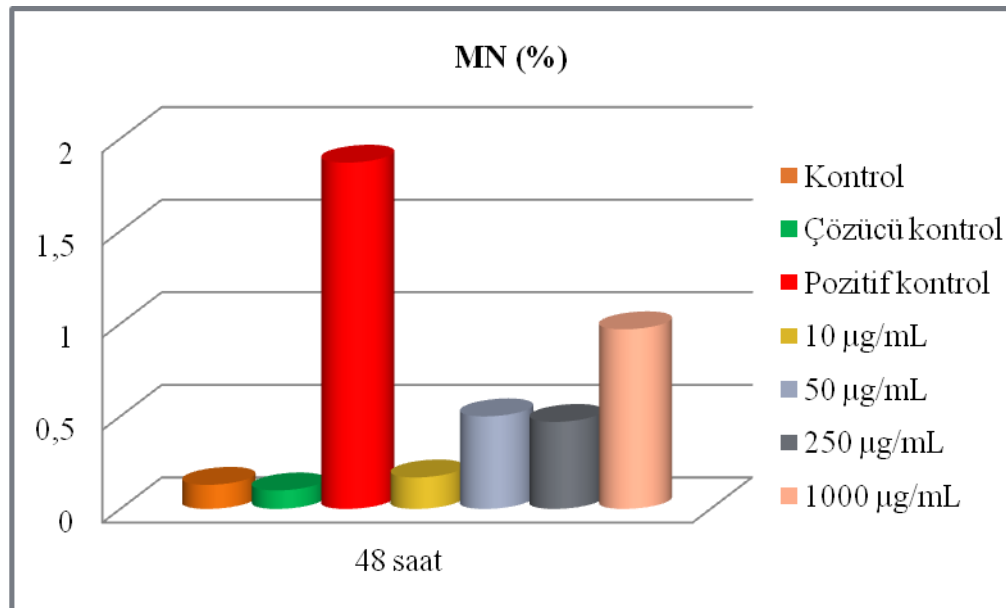
NBİ: nükleer bölünme indeksi, SH: standart hata, Ç.K.: çözücü kontrol, P.K.: pozitif kontrol-MMC

<sup>\*</sup>Kontrolle göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

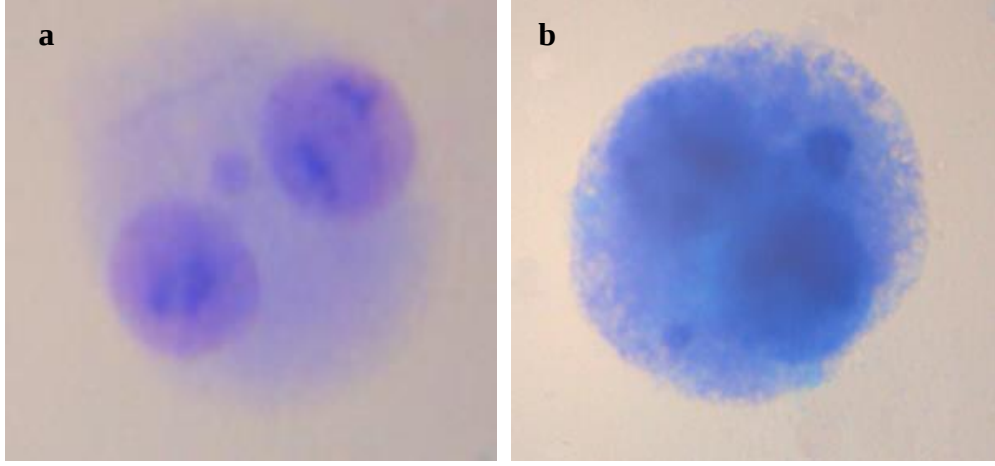
<sup>b</sup>Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

<sup>\*\*\*</sup>Kontrolle göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

<sup>c</sup>Çözücü kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.5. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi



Resim 4.6. SiO<sub>2</sub> NP'leri ile oluşan mikronükleuslar a) Bir mikronükleuslu binükleat, b) İki mikronükleuslu binükleat

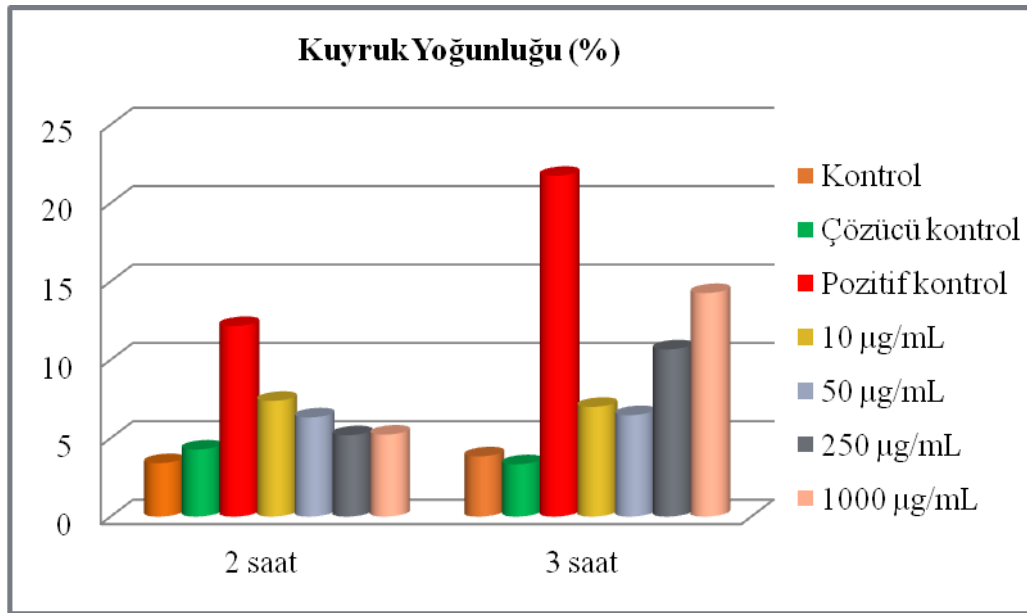
#### SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin DNA hasarı üzerine etkisi

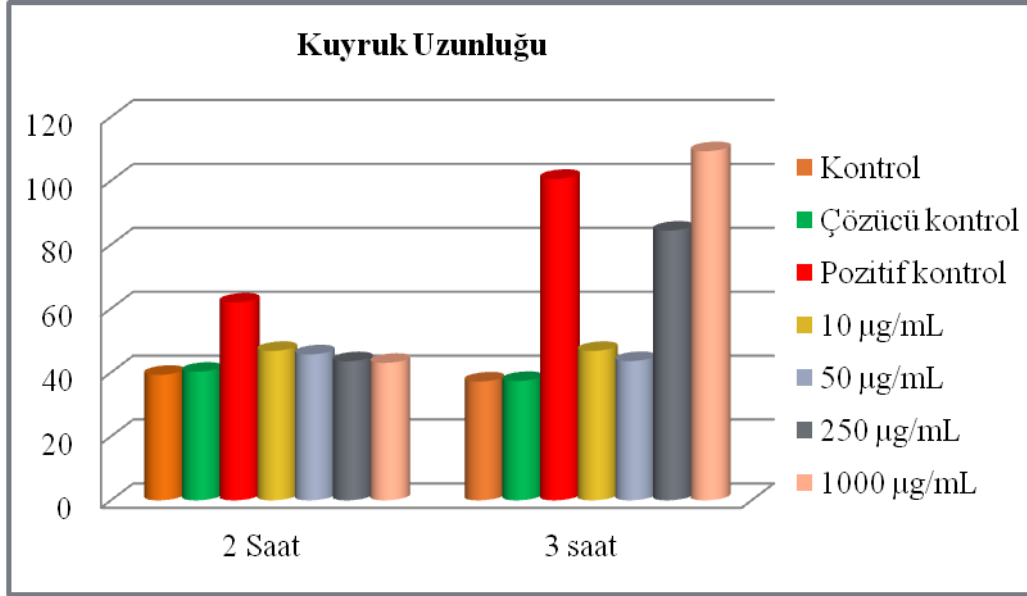
SiO<sub>2</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde 2 ve 3 saatlik uygulaması sonucunda DNA'da meydana getirdiği hasarlar comet testi ile değerlendirilmiştir. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin 2 saatlik muamelesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda, tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında ise, kuyruk yoğunluğunun en düşük iki konsantrasyonda (10 ve 50 µg/mL), kuyruk uzunluğunun ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin 3 saatlik uygulamasında, hem kuyruk yoğunluğu ve hem de kuyruk uzunluğunda hem kontrol ve hem de çözücü kontrole kıyasla, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6-7, Resim 4.7). 3 saatlik uygulamada gözlenen bu artışların konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (kuyruk yoğunluğunda  $r=0,96$ ; kuyruk uzunluğunda  $r=0,97$ ).

Çizelge 4.6. SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi

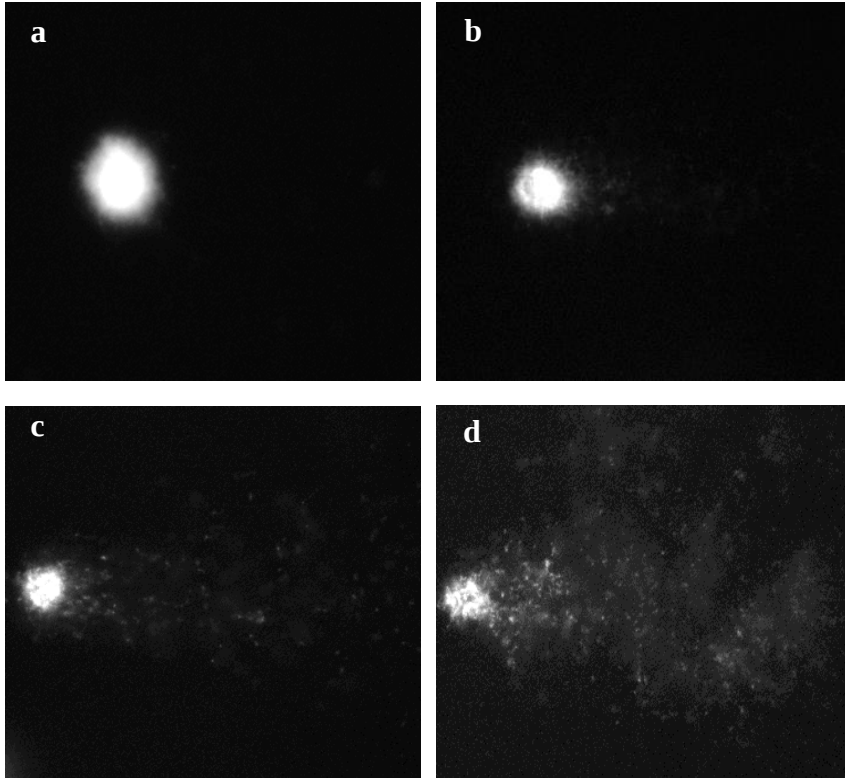
| Test Maddesi                                     | Uygulama    |                       | Kuyruk Yoğunluğu %      | Kuyruk Uzunluğu (µm)     |
|--------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
|                                                  | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                         |                          |
| Kontrol                                          | 2 saat      | -                     | 3,41±0,31               | 39,28±0,45               |
| Çözücü Kontrol                                   | 2 saat      | -                     | 4,28±0,39               | 40,25±0,49               |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 2 saat      | 100 µM                | 12,16±1,32              | 61,92±1,38               |
| SiO <sub>2</sub>                                 | 2 saat      | 10                    | 7,38±0,56 <sup>a</sup>  | 46,77±0,73 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 50                    | 6,33±0,57 <sup>a</sup>  | 45,69±0,66 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 250                   | 5,19±0,58 <sup>a</sup>  | 43,53±0,78 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 1000                  | 5,23±0,74 <sup>a</sup>  | 43,03±0,87 <sup>a</sup>  |
| Kontrol                                          | 3 saat      | -                     | 3,84±0,42               | 37,19±0,45               |
| Çözücü Kontrol                                   | 3 saat      | -                     | 3,34±0,35               | 37,35±0,38               |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 3 saat      | 100 µM                | 21,74±1,74              | 100,64±5,53              |
| SiO <sub>2</sub>                                 | 3 saat      | 10                    | 7,00±0,75 <sup>a</sup>  | 46,77±0,77 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 3 saat      | 50                    | 6,47±0,73 <sup>a</sup>  | 43,60±0,81 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 3 saat      | 250                   | 10,67±0,86 <sup>a</sup> | 84,40±4,72 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 3 saat      | 1000                  | 14,26±1,13 <sup>a</sup> | 109,30±6,73 <sup>a</sup> |

\*Kontrole göre p&lt;0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

<sup>a</sup>Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)Şekil 4.6. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.7. SiO<sub>2</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Resim 4.7. SiO<sub>2</sub> NP'leri ile oluşan DNA hasarı a) hasarsız hücre (2 saat, 50 µg/mL), b) az hasarlı hücre (2 saat, 250 µg/mL), c) orta hasarlı hücre (3 saat, 1000 µg/mL), d) çok hasarlı hücre (3 saat, 250 µg/mL)

#### 4.2.2. CuO nanopartiküllerinin genotoksik etkileri

##### CuO nanopartiküllerinin kromozomal anormallikler üzerine etkisi

CuO NP'lerinin 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarının uygulandığı insan periferik lenfositlerinde, 6 tip yapısal (kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatitlerde birleşme ve kromatit değişimi) ve 1 tip sayısal (poliploidi) anormallik gözlenmiştir (Çizelge 4.7, Resim 4.8). En sık gözlenen anormallik tipi kromatit kırığıdır. Bunu sırasıyla, fragment ve kromozom kırığı oluşumları takip etmektedir. Yapılan analizlerde, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormalliklerin sayısında, her iki uygulama süresinde (24 ve 48 saat), konsantrasyona bağlı bir artış olduğu belirlenmiştir (anormal hücre frekansında, 24 saatlik uygulamada  $r=0,98$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,94$ ; hücre başına düşen anormallik sayısında, 24 saatlik uygulamada  $r=0,98$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,96$ ) (Şekil 4.8, Şekil 4.9). CuO NP'lerinin, anormal hücre frekansında ve hücre başına düşen anormallik sayısında meydana getirdiği artışın, 24 saatlik uygulamada en yüksek üç konsantrasyonda (50, 75 ve 100 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda her iki kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. CuO nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi

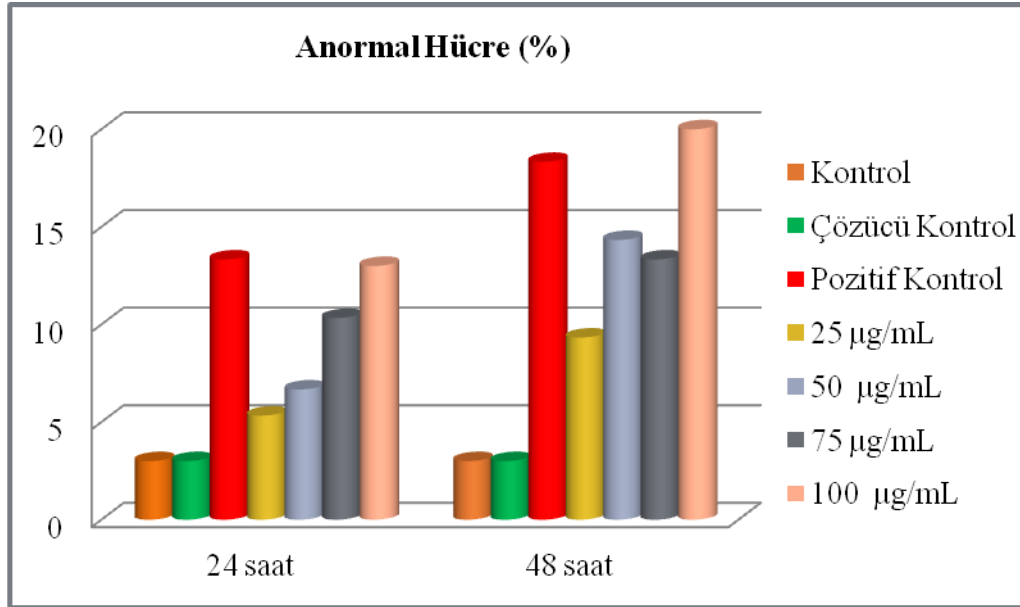
| Test maddesi | Uygulama    |                       | Anormallikler Yapısal |     |    |    |     |     | Sayısal p | Anormal hücre±SH (%)       | KA/Hücre ±SH              |
|--------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----|----|----|-----|-----|-----------|----------------------------|---------------------------|
|              | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) | ktk                   | kzk | f  | ds | kkb | kkd |           |                            |                           |
| Kontrol      | 24          | -                     | 6                     | 2   | 1  | -  | -   | -   | -         | 3,00±0,98                  | 0,03±0,01                 |
| Ç. K.        | 24          | -                     | 4                     | 2   | 4  | -  | -   | -   | -         | 3,00±0,98                  | 0,03±0,01                 |
| P. K.        | 24          | 0,2                   | 24                    | 11  | 5  | 2  | 1   | 2   | -         | 13,33±1,96                 | 0,15±0,02                 |
| CuO          | 24          | 25                    | 11                    | 3   | 1  | -  | 2   | -   | -         | 5,33±1,30                  | 0,06±0,01                 |
|              | 24          | 50                    | 10                    | 4   | 6  | 1  | -   | -   | 1         | 6,67±1,44 <sup>a</sup>     | 0,07±0,01 <sup>a</sup>    |
|              | 24          | 75                    | 27                    | 6   | 1  | -  | -   | -   | -         | 10,33±1,76 <sup>***c</sup> | 0,11±0,02 <sup>***c</sup> |
|              | 24          | 100                   | 19                    | 5   | 16 | -  | 1   | -   | -         | 13,00±1,94 <sup>***c</sup> | 0,14±0,02 <sup>***c</sup> |
| Kontrol      | 48          | -                     | 5                     | 2   | 2  | -  | -   | -   | -         | 3,00±0,98                  | 0,03±0,01                 |
| Ç. K.        | 48          | -                     | 7                     | -   | 2  | -  | -   | -   | -         | 3,00±0,98                  | 0,03±0,01                 |
| P. K.        | 48          | 0,2                   | 33                    | 9   | 15 | 1  | 3   | 1   | -         | 18,33±2,23                 | 0,21±0,02                 |
| CuO          | 48          | 25                    | 17                    | 2   | 8  | 1  | -   | -   | -         | 9,33±1,68 <sup>**b</sup>   | 0,09±0,02 <sup>**b</sup>  |
|              | 48          | 50                    | 29                    | 5   | 11 | -  | -   | 1   | -         | 14,33±2,02 <sup>***c</sup> | 0,15±0,02 <sup>***c</sup> |
|              | 48          | 75                    | 28                    | 10  | 5  | -  | -   | 1   | -         | 13,33±1,96 <sup>***c</sup> | 0,15±0,02 <sup>***c</sup> |
|              | 48          | 100                   | 49                    | 12  | 18 | -  | -   | 1   | -         | 20,00±2,31 <sup>***c</sup> | 0,27±0,02 <sup>***c</sup> |

ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, ds: disentrik kromozom; kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, kkd: kromatit değişimi, p: poliploidi, SH: standart hata, Ç.K.: çözücü kontrol, P.K.: pozitif kontrol-MMC

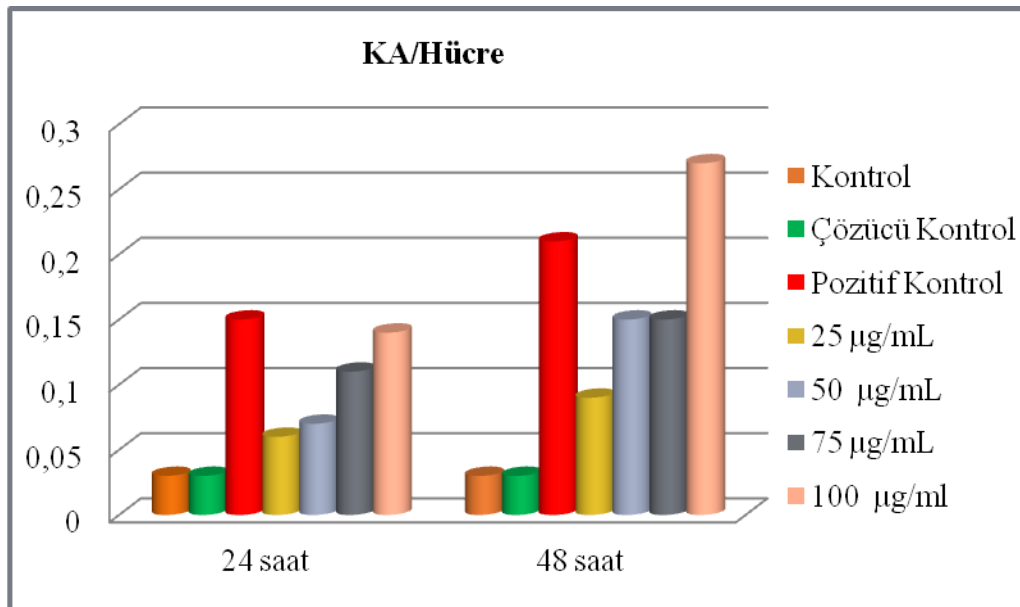
\*Kontrolle göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

\*\*Kontrolle göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>b</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

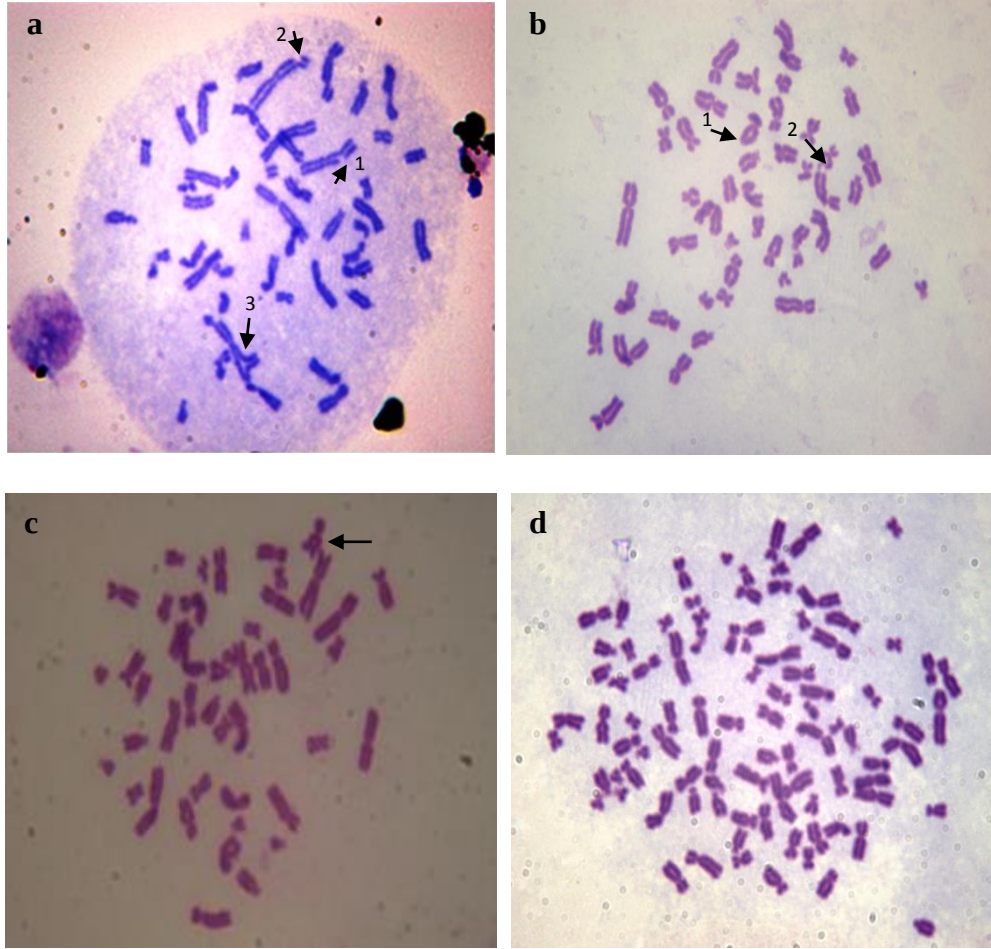
\*\*\*Kontrolle göre  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı (z-testi) <sup>c</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.8. CuO NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi



Şekil 4.9. CuO NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi



Resim 4.8. CuO NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri a-1) kromatit kırığı, 2) kromozom kırığı, 3) kromatit değişimi, b-1) kardeş kromatitlerde birleşme, 2) fragment, c) disentrik, d) poliploidi

#### CuO nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi

İnsan lenfositlerinin CuO NP'leri ile muamelesi sonucunda, tüm konsantrasyonlarda, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, hem kontrol hem de çözücü kontrole kıyasla, kardeş kromatit değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.10, Resim 4.9). Bütün bu artışların konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (24 saatlik uygulamada  $r=0,95$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,93$ ). CuO NP'leri ile 24 saatlik uygulamada 2-17, 48 saatlik uygulamada ise 6-32 arasında KKD gözlenmiştir. CuO NP'lerinin etkisi ile insan lenfositlerinde, hem replikasyon indeksinde ve hem de mitotik indekste (24 saat, 25  $\mu\text{g/mL}$  hariç) bir azalma tespit edilmiştir. Mitotik indekste azalmanın konsantrasyon artışına paralel olduğu belirlenmiştir (24 saat için  $r= -0,90$ ; 48 saat için  $r= -0,88$ ). Mitotik indekste gözlenen düşüş, 24 saatlik uygulamada sadece en

yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (75 ve 100 µg/mL) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, sadece 48 saatlik uygulamada en yüksek konsantrasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Replikasyon indeksindeki değişimlerin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. CuO nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi

| Test maddesi | Uygulama    |                       | Min.-maks. KKD | KKD/hücre ±SH            | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>3</sub> | Rİ±SH     | Mİ±SH                     |
|--------------|-------------|-----------------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|---------------------------|
|              | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                |                          |                |                |                |           |                           |
| Kontrol      | 24          | -                     | 1-10           | 3,99±0,22                | 76             | 75             | 149            | 2,24±0,05 | 6,83±0,46                 |
| Ç. K.        | 24          | -                     | 1-11           | 3,95±0,20                | 66             | 80             | 154            | 2,29±0,05 | 6,03±0,43                 |
| P. K.        | 24          | 0,2                   | 8-26           | 11,17±0,30               | 81             | 91             | 128            | 2,16±0,05 | 4,77±0,39                 |
| CuO NP       | 24          | 25                    | 2-11           | 5,51±0,23 <sup>i+</sup>  | 63             | 79             | 158            | 2,32±0,05 | 7,17±0,47                 |
|              | 24          | 50                    | 4-17           | 7,69±0,33 <sup>i+</sup>  | 76             | 83             | 141            | 2,22±0,05 | 6,33±0,44                 |
|              | 24          | 75                    | 5-15           | 9,29±0,31 <sup>i+</sup>  | 89             | 75             | 136            | 2,16±0,05 | 6,10±0,44                 |
|              | 24          | 100                   | 5-17           | 10,83±0,34 <sup>i+</sup> | 101            | 87             | 112            | 2,04±0,05 | 5,03±0,40 <sup>**</sup>   |
| Kontrol      | 48          | -                     | 2-7            | 3,91±0,16                | 59             | 78             | 163            | 2,35±0,04 | 6,83±0,46                 |
| Ç. K.        | 48          | -                     | 2-8            | 4,25±0,20                | 84             | 76             | 140            | 2,19±0,05 | 6,10±0,44                 |
| P. K.        | 48          | 0,2                   | 12-33          | 19,61±0,67               | 93             | 76             | 131            | 2,13±0,05 | 4,50±0,38                 |
| CuO NP       | 48          | 25                    | 6-17           | 9,96±0,35 <sup>i+</sup>  | 94             | 75             | 131            | 2,12±0,05 | 6,17±0,44                 |
|              | 48          | 50                    | 6-26           | 13,57±0,44 <sup>i+</sup> | 134            | 81             | 85             | 1,84±0,05 | 6,10±0,44                 |
|              | 48          | 75                    | 6-27           | 14,24±0,50 <sup>i+</sup> | 127            | 93             | 80             | 1,84±0,05 | 4,97±0,40 <sup>**</sup>   |
|              | 48          | 100                   | 11-32          | 18,29±0,60 <sup>i+</sup> | 139            | 80             | 81             | 1,81±0,05 | 4,00±0,36 <sup>***c</sup> |

KKD: kardeş kromatit değişimi; M<sub>1</sub>: mitoz 1; M<sub>2</sub>: mitoz 2; M<sub>3</sub>: mitoz 3; Rİ: replikasyon indeksi; Mİ: Mitotik indeks, SH: standart hata, Ç. K: çözücü kontrol, P. K: pozitif kontrol-MMC

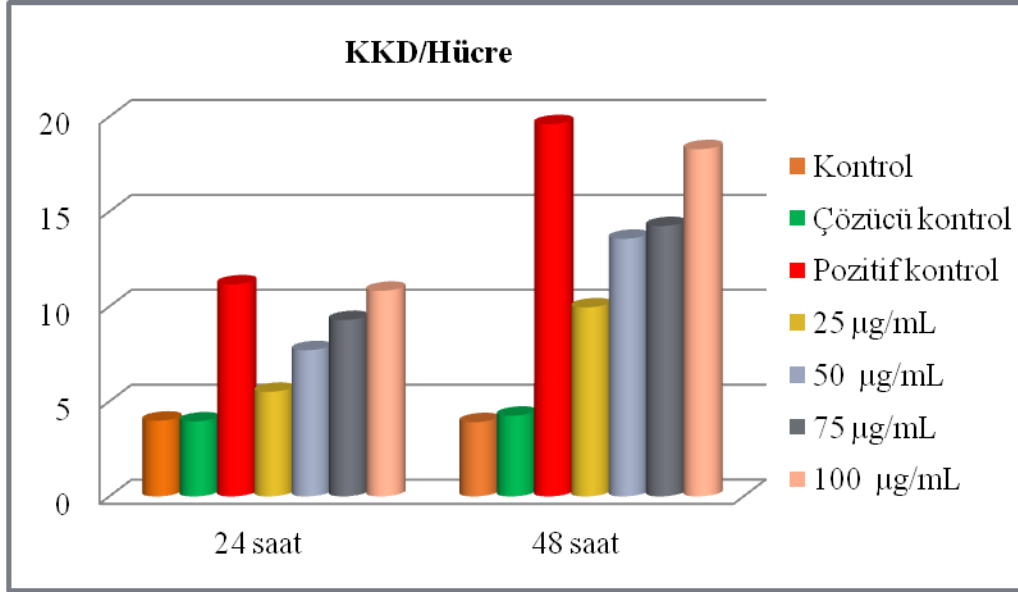
<sup>i</sup>Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

<sup>\*</sup>Çözücü kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

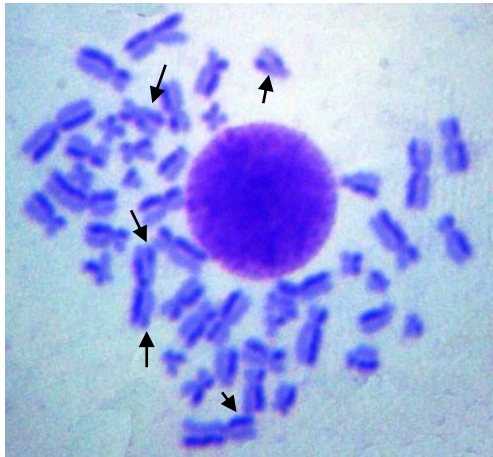
<sup>\*\*</sup>Kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>\*\*\*</sup>Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>c</sup>Çözücü kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.10. CuO NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi



Resim 4.9. CuO NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri

#### CuO nanopartiküllerinin mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

CuO NP'lerinin kullanılan tüm konsantrasyonları, kültürdeki insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumunda konsantrasyona bağlı bir artışa sebep olmuştur ( $r=0,97$ ). Ancak bu artışın sadece en yüksek iki konsantrasyonda (75 ve 100  $\mu\text{g/mL}$ ) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.11). CuO NP'leri, binükleat hücrelerde sadece bir mikronükleus oluşturmuştur (Resim 4.10). Diğer taraftan, CuO NP'lerinin nükleer bölünme indeksi üzerine önemli olmayan küçük bir düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir ( $r=0,61$ ).

Çizelge 4.9. CuO nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

| Test maddesi | Uygulama    |                       | İncelenen binükleat hücre sayısı | Binükleat hücrelerdeki mikronükleus sayısı |     | MN±SH (%)                 | NBİ±SH    |
|--------------|-------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----|---------------------------|-----------|
|              | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                                  | (1)                                        | (2) |                           |           |
| Kontrol      | 48          | -                     | 3000                             | 5                                          | -   | 0,17±0,07                 | 2,12±0,37 |
| Ç. K.        | 48          | -                     | 3000                             | 5                                          | -   | 0,17±0,07                 | 2,07±0,37 |
| P. K.        | 48          | 0,2                   | 3000                             | 36                                         | 1   | 1,27±0,20                 | 1,94±0,36 |
| CuO NP       | 48          | 25                    | 3000                             | 7                                          | -   | 0,23±0,09                 | 1,98±0,36 |
|              | 48          | 50                    | 3000                             | 10                                         | -   | 0,33±0,10                 | 1,81±0,34 |
|              | 48          | 75                    | 3000                             | 14                                         | -   | 0,47±0,12 <sup>a</sup>    | 1,81±0,34 |
|              | 48          | 100                   | 3000                             | 26                                         | -   | 0,87±0,17 <sup>***c</sup> | 1,57±0,32 |

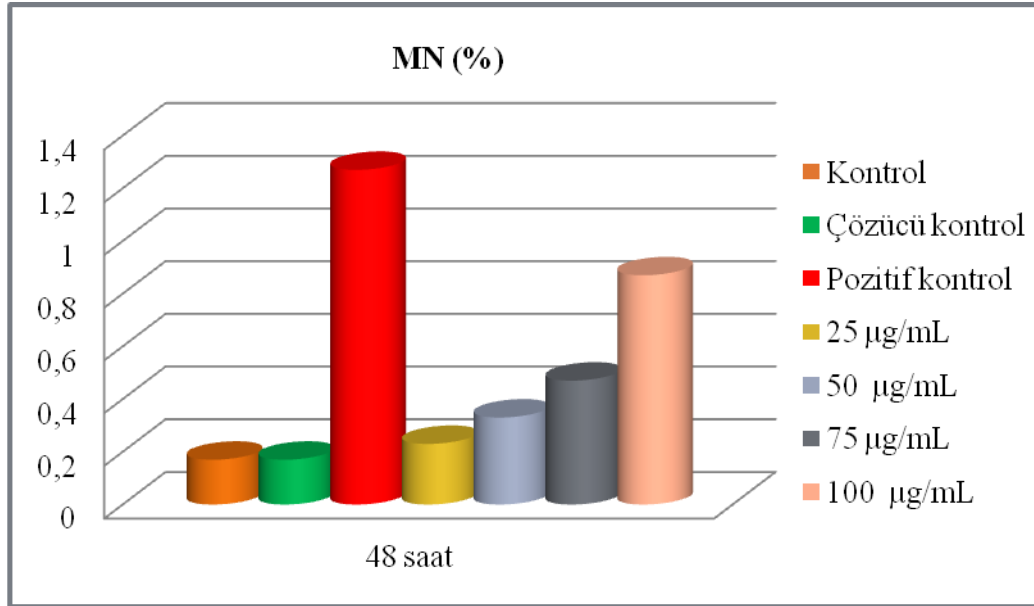
NBİ: nükleer bölünme indeksi, SH: standart hata, Ç. K.: çözücü kontrol, P. K.: pozitif kontrol-MMC

\*Kontrolle göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (z-testi)

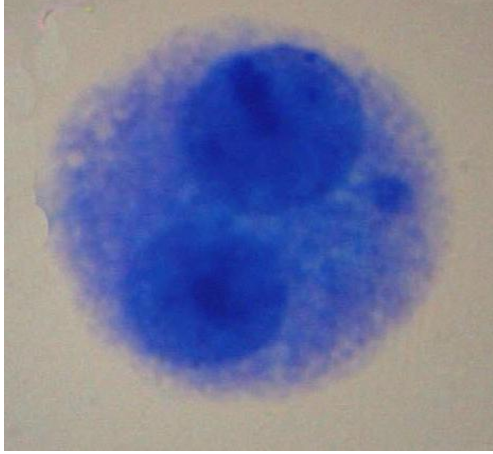
<sup>a</sup> Çözücü kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z-testi)

\*\*\*Kontrolle göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>c</sup> Çözücü kontrole göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.11. CuO NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi



Resim 4.10. CuO NP'leri ile oluşan bir mikronükleuslu binükleat

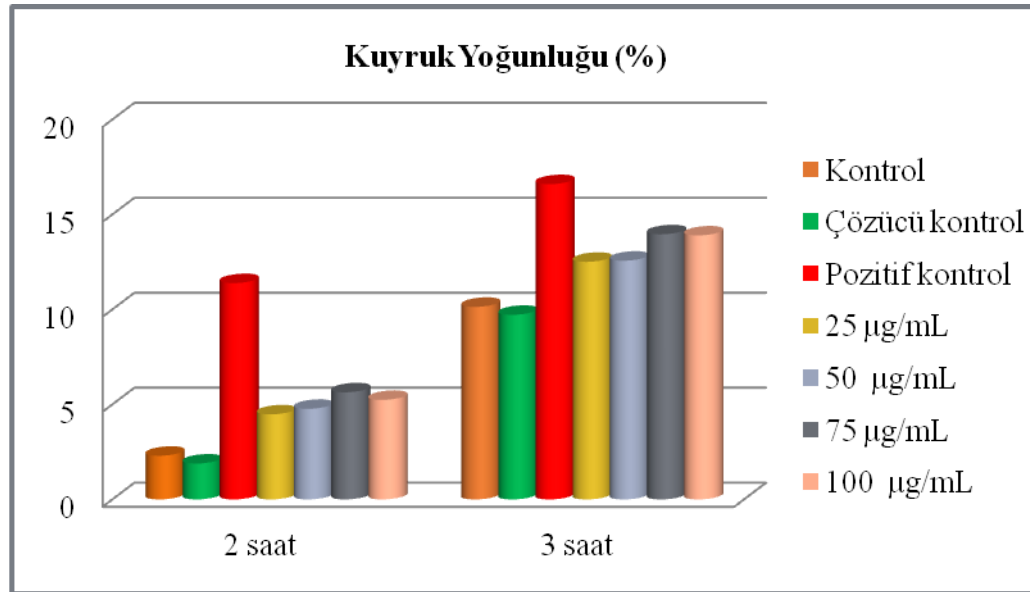
#### CuO nanopartiküllerinin DNA hasarı üzerine etkisi

CuO NP'lerinin izole lenfositlerde 2 ve 3 saatlik uygulamaları sonucunda DNA'da meydana getirdiği hasarların comet testi ile incelenmesi ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. CuO NP'leri hem 2 ve hem de 3 saatlik muamele süresinde, tüm konsantrasyonlarda, hem kuyruk yoğunluğu ve hem de kuyruk uzunluğunda önemli bir artış oluşturmıştır (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Resim 4.11). Bu artış, kontrol ve çözücü kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır. Yapılan regresyon analizi ile 2 saatlik uygulamada gözlenen kuyruk uzunluğu artışının konsantrasyon ile orta derecede korelasyon gösterdiği ( $r=0,69$ ) belirlenmiştir. Ancak 2 saatlik uygulamada kuyruk yoğunluğu ( $r=0,80$ ) ile 3 saatlik uygulamada hem kuyruk uzunluğu ( $r=0,77$ ) ve hem de kuyruk yoğunluğundaki artışın ( $r=0,79$ ) konsantrasyon artışı ile güçlü korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

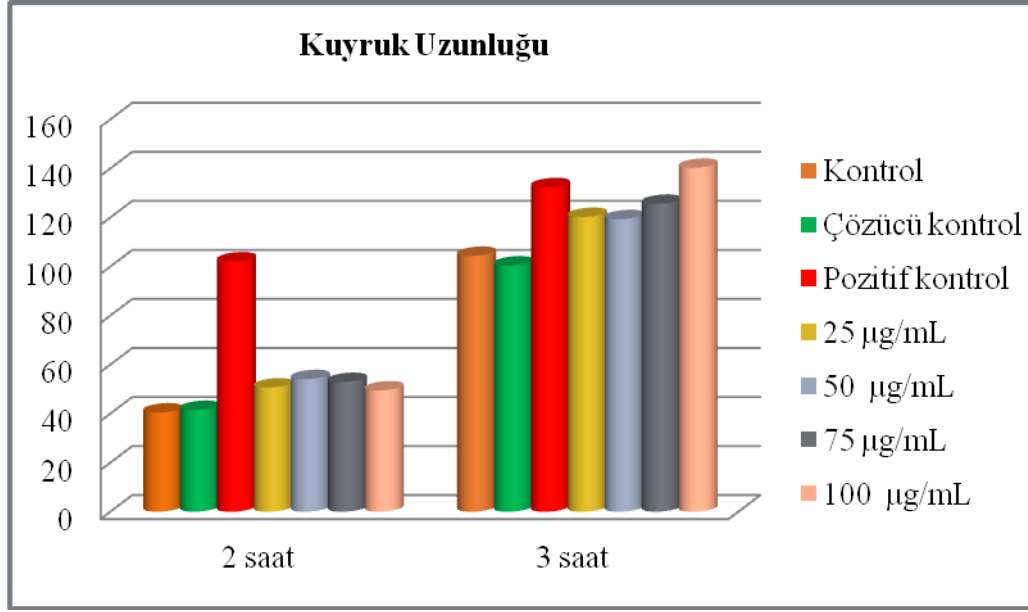
Çizelge 4.10. CuO nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi

| Test Maddesi                                     | Uygulama    |                     | Kuyruk Yoğunluğu %      | Kuyruk Uzunluğu (µm)     |
|--------------------------------------------------|-------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|
|                                                  | Süre (saat) | Konsantrasyon µg/mL |                         |                          |
| Kontrol                                          | 2 saat      | -                   | 2,30±0,19               | 40,48±0,42               |
| Çözücü Kontrol                                   | 2 saat      | -                   | 1,89±0,19               | 41,51±0,42               |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 2 saat      | 100 µM              | 11,39±0,88              | 102,08±5,94              |
| CuO                                              | 2 saat      | 25                  | 4,48±0,45 <sup>a</sup>  | 50,65±0,84 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 50                  | 4,77±0,50 <sup>a</sup>  | 54,10±1,22 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 75                  | 5,64±0,53 <sup>a</sup>  | 52,92±1,21 <sup>a</sup>  |
|                                                  | 2 saat      | 100                 | 5,24±0,56 <sup>a</sup>  | 49,47±0,87 <sup>a</sup>  |
| Kontrol                                          | 3 saat      | -                   | 10,14±0,86              | 104,38±6,11              |
| Çözücü Kontrol                                   | 3 saat      | -                   | 9,72±0,86               | 100,44±6,03              |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 3 saat      | 100 µM              | 16,60±1,02              | 132,36±6,81              |
| CuO                                              | 3 saat      | 25                  | 12,51±0,99 <sup>a</sup> | 120,23±8,05 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 50                  | 12,57±0,97 <sup>a</sup> | 119,34±7,21 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 75                  | 13,96±0,96 <sup>a</sup> | 125,58±7,63 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 100                 | 13,90±1,07 <sup>a</sup> | 140,29±9,16 <sup>a</sup> |

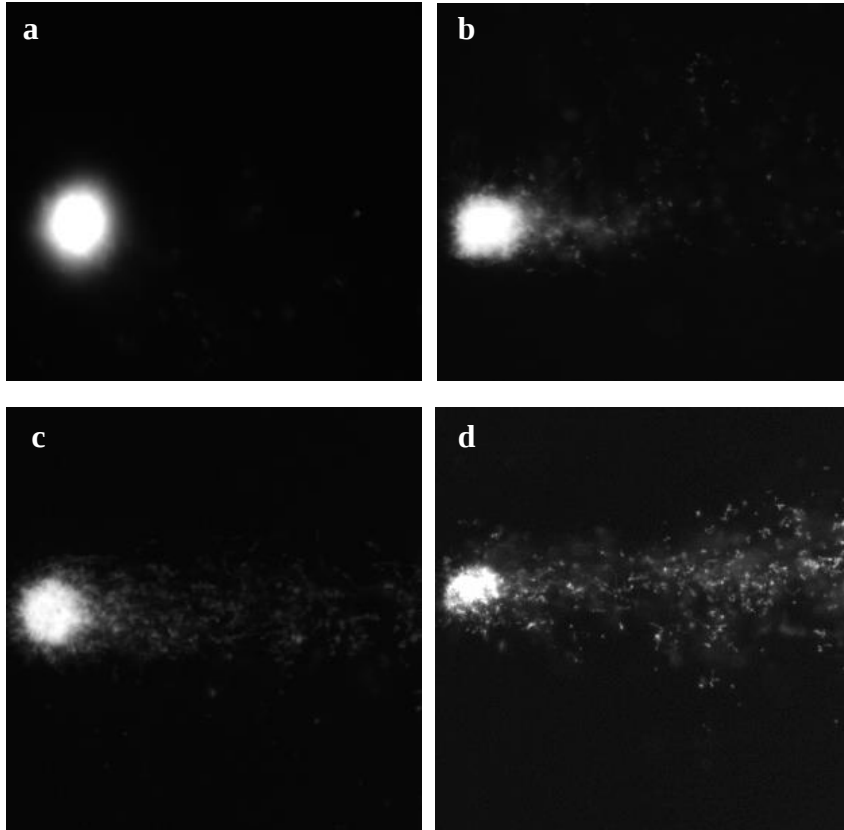
\*Kontrolle göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi) <sup>a</sup>Çözücü kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)



Şekil 4.12. CuO NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.13. CuO NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Resim 4.11. CuO NP'leri ile oluşan DNA hasarı a) hasarsız hücre (2 saat, 25 µg/mL), b) az hasarlı hücre (2 saat, 25 µg/mL), c) orta hasarlı hücre (3 saat, 50 µg/mL), d) çok hasarlı hücre (3 saat, 100 µg/mL)

### 4.2.3. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin genotoksik etkileri

#### Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin kromozomal anormallikler üzerine etkisi

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin 39,062; 78,125; 156,250 ve 312,500 µg/mL'lik konsantrasyonlarının insan periferik lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda, kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme ve kromatit değişimi olmak üzere beş farklı yapısal kromozom anormalliği gözlenmiştir (Çizelge 4.11, Resim 4.12). En sık rastlanan anormallik tipinin kromatit kırığı olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla fragment ve kromozom kırığı takip etmektedir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin, anormal hücre frekansını hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarda konsantrasyona bağlı olarak arttığı (24 saatlik uygulamada  $r=0,90$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,94$ ) ve bu artışın her iki kontrol grubuna kıyasla, en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı ise 24 saatlik uygulamada ( $r=0,88$ ) her iki kontrol grubuna kıyasla en yüksek iki konsantrasyonda (156,250 ve 312,500 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada ( $r=0,94$ ) kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (78,125; 156,250 ve 312,500 µg/mL), çözücü kontrole göre ise en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Çizelge 4.11. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin kromozom anormalliklerine etkisi

| Test maddesi                   | Uygulama    |                       | Anormallikler |         |    |     |    |     | Anormal hücre±SH (%)    | KA/Hücre ±SH              |
|--------------------------------|-------------|-----------------------|---------------|---------|----|-----|----|-----|-------------------------|---------------------------|
|                                | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) | Yapısal       | Yapısal | f  | kkb | ds | ktd |                         |                           |
| Kontrol                        | 24          | -                     | 5             | -       | 1  | -   | -  | -   | 2,00±0,81               | 0,02±0,01                 |
| Ç. K.                          | 24          | -                     | 4             | 2       | 1  | -   | -  | -   | 2,33±0,87               | 0,02±0,01                 |
| P. K.                          | 24          | 0,2                   | 34            | 10      | 4  | 3   | -  | 1   | 16,67±2,15              | 0,17±0,02                 |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 24          | 39,062                | 6             | 2       | 3  | -   | -  | -   | 3,66±1,08               | 0,04±0,01                 |
|                                | 24          | 78,125                | 8             | 2       | 2  | -   | -  | -   | 4,00±1,13               | 0,04±0,01                 |
|                                | 24          | 156,250               | 9             | 1       | 4  | -   | -  | -   | 4,33±1,17               | 0,05±0,01 <sup>a</sup>    |
|                                | 24          | 312,500               | 13            | -       | 4  | 1   | -  | -   | 5,67±1,33 <sup>a</sup>  | 0,06±0,01 <sup>ab</sup>   |
| Kontrol                        | 48          | -                     | 5             | 1       | 1  | -   | -  | -   | 2,33±0,87               | 0,02±0,01                 |
| Ç. K.                          | 48          | -                     | 5             | 2       | 2  | -   | -  | -   | 2,67±0,93               | 0,03±0,01                 |
| P. K.                          | 48          | 0,2                   | 34            | 10      | 14 | 3   | 2  | 2   | 18,0±2,22               | 0,22±0,02                 |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 48          | 39,062                | 8             | -       | 4  | 1   | -  | -   | 4,00±1,13               | 0,04±0,01                 |
|                                | 48          | 78,125                | 10            | 1       | 3  | -   | -  | -   | 4,33±1,17               | 0,05±0,01 <sup>*</sup>    |
|                                | 48          | 156,250               | 8             | 2       | 4  | 1   | -  | -   | 5,00±1,26               | 0,05±0,01 <sup>*</sup>    |
|                                | 48          | 312,500               | 17            | 3       | 3  | 2   | -  | 1   | 8,00±1,57 <sup>ab</sup> | 0,09±0,02 <sup>***b</sup> |

ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, ktd: kromatit değişimi, SH: standart hata, Ç.K.: çözücü kontrol, P.K.: pozitif kontrol-MMC

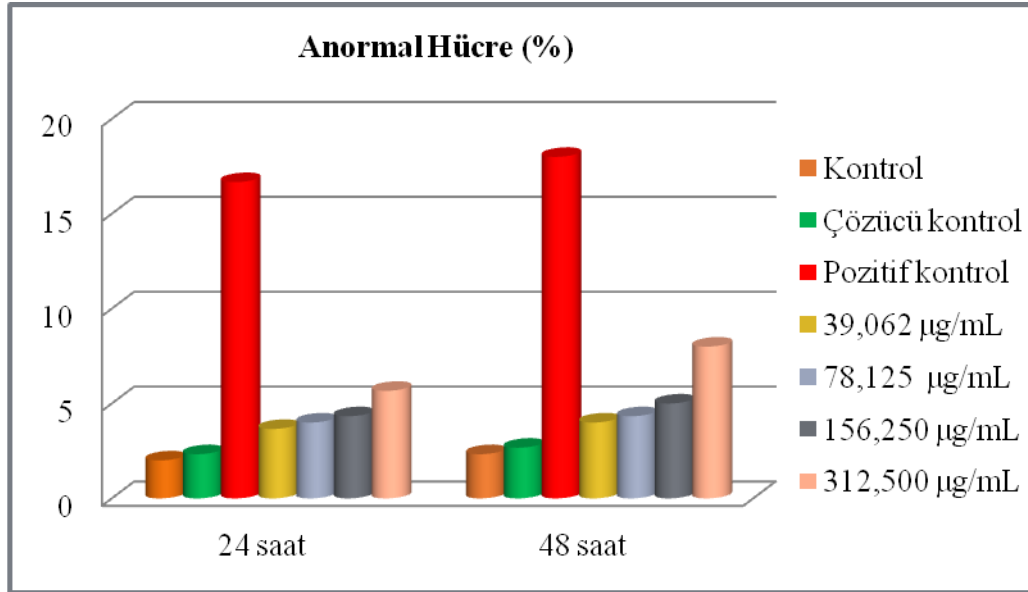
<sup>\*</sup>Kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

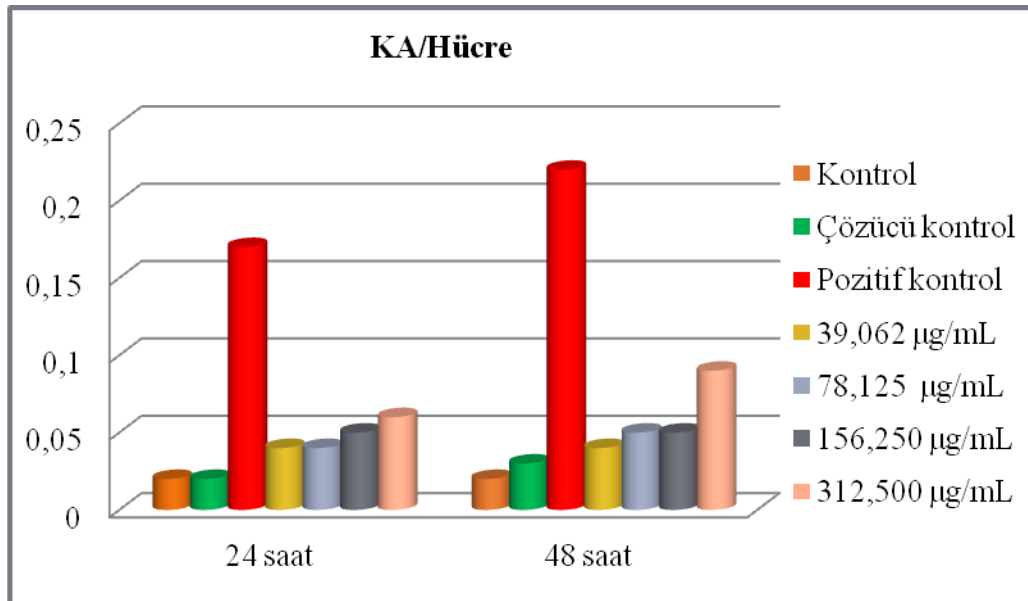
<sup>\*\*</sup>Kontrole göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>b</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

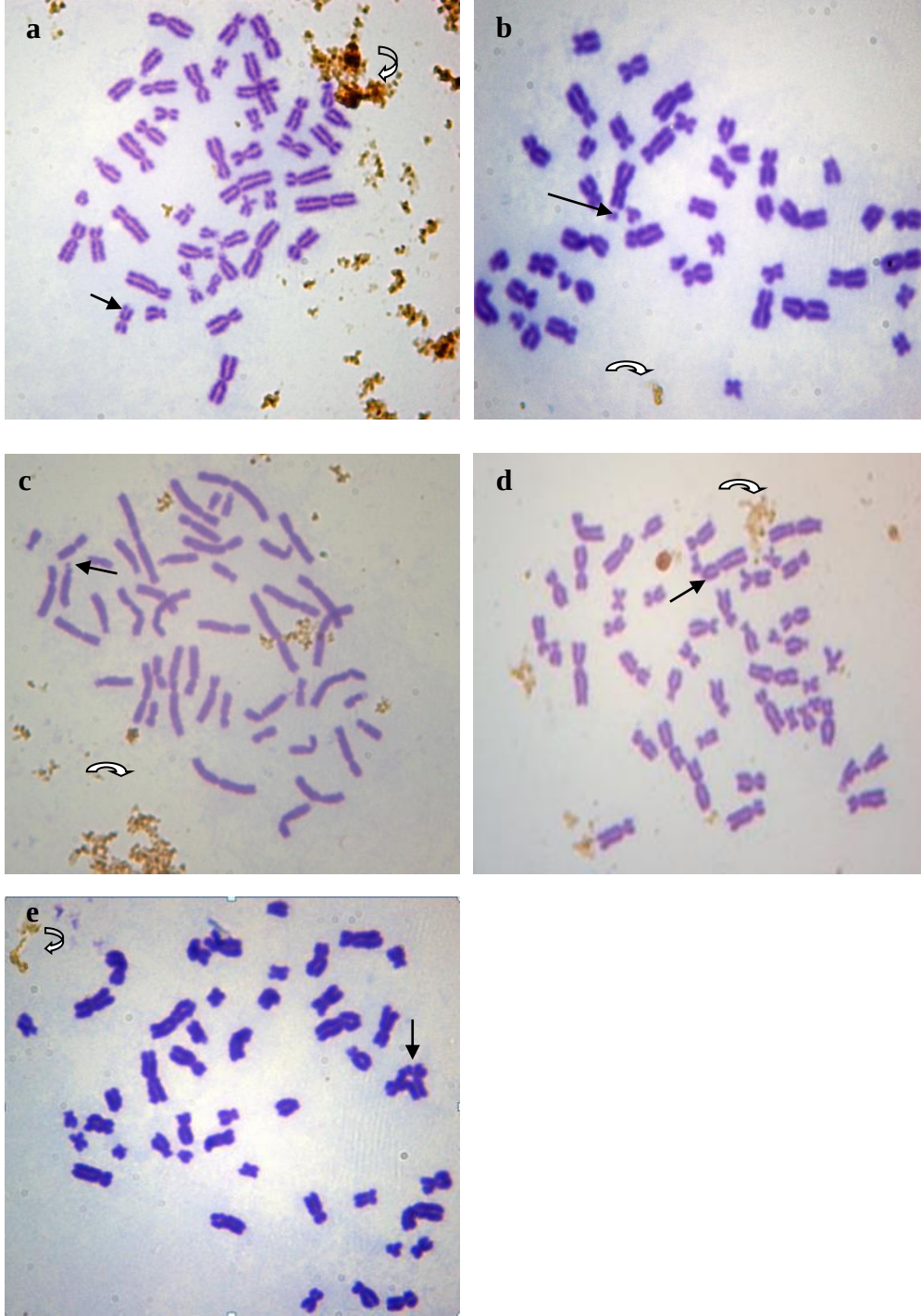
<sup>\*\*\*</sup>Kontrole göre  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.14. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin anormal hücre frekansına etkisi



Şekil 4.15. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin hücre başına düşen anormallik sayısına etkisi



Resim 4.12.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri ile oluşan kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı, b) kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatitlerde birleşme, e) kromatit değişimi  
 ↪: lamaların üstünde görülen nanopartiküller

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin insan lenfositlerinde, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarının KKD oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı gözlenmiştir (24 saatlik uygulamada  $r=0,85$ ; 48 saatlik uygulamada  $r=0,86$ ). Ancak gözlenen bu artışın 24 saatlik uygulamada sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (312,500 ve 156,250 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.16, Resim 4.13). Diğer taraftan, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin mitotik indekste düşüslere sebep olduğu ve bu düşüşlerin 24 saatlik uygulamada sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (156,250; 312,500 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (24 saat için  $r= -0,92$ ; 48 saat için  $r= -0,89$ ). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin insan lenfositlerinde replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin kardeş kromatit değişimi, replikasyon ve mitotik indeks üzerine etkisi

| Test maddesi                      | Uygulama    |                       | Min.-maks. KKD | KKD/hücre ± SH          | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>3</sub> | Rİ±SH      | Mİ±SH                     |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|------------|---------------------------|
|                                   | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                |                         |                |                |                |            |                           |
| Kontrol                           | 24          | -                     | 1-7            | 4,01±0,18               | 62             | 92             | 146            | 2,28±0,04  | 6,77±0,46                 |
| Ç. K.                             | 24          | -                     | 1-8            | 4,08±0,19               | 64             | 81             | 155            | 2,30±0,05  | 6,93±0,46                 |
| P. K.                             | 24          | 0,20                  | 10-31          | 17,23±0,53              | 137            | 76             | 87             | 1,83±0,05  | 4,77±0,39                 |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP | 24          | 39,062                | 2-11           | 4,48±0,24               | 90             | 78             | 132            | 2,14±0,05  | 6,70±0,46                 |
|                                   | 24          | 78,125                | 1-9            | 4,57±0,21               | 71             | 78             | 151            | 2,27±0,05  | 6,60±0,45                 |
|                                   | 24          | 156,250               | 2-9            | 4,60±0,20               | 93             | 76             | 131            | 2,13±0,05  | 6,10±0,44                 |
|                                   | 24          | 312,500               | 2-13           | 6,26±0,26 <sup>††</sup> | 77             | 75             | 148            | 2,24±0,05  | 5,37±0,41 <sup>*a</sup>   |
| Kontrol                           | 48          | -                     | 1-7            | 4,00±0,16               | 70             | 75             | 155            | 2,28±0,05  | 7,80±0,49                 |
| Ç. K.                             | 48          | -                     | 1-9            | 4,31±0,20               | 73             | 76             | 151            | 2,26±0,05  | 7,83±0,49                 |
| P. K.                             | 48          | 0,20                  | 14-63          | 29,00±1,46              | 127            | 89             | 84             | 1,86±0,05  | 4,63±0,38                 |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP | 48          | 39,062                | 1-10           | 4,41±0,20               | 87             | 75             | 138            | 2,17 ±0,05 | 7,07±0,47                 |
|                                   | 48          | 78,125                | 1-10           | 4,63±0,22               | 90             | 75             | 135            | 2,15±0,05  | 6,80±0,46                 |
|                                   | 48          | 156,250               | 1-10           | 5,08±0,22 <sup>††</sup> | 81             | 75             | 144            | 2,21±0,05  | 5,93±0,43 <sup>**b</sup>  |
|                                   | 48          | 312,500               | 1-13           | 6,08±0,29 <sup>††</sup> | 79             | 75             | 146            | 2,22±0,05  | 4,83±0,39 <sup>***c</sup> |

KKD: kardeş kromatit değişimi; M<sub>1</sub>: mitoz 1; M<sub>2</sub>: mitoz 2; M<sub>3</sub>: mitoz 3; Rİ: replikasyon indeksi; Mİ: Mitotik indeks, SH: standart hata, Ç.K: çözücü kontrol, P.K: pozitif kontrol-MMC

<sup>†</sup>Kontrolle göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (t-testi)

<sup>\*</sup>Kontrolle göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>\*\*</sup>Kontrolle göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

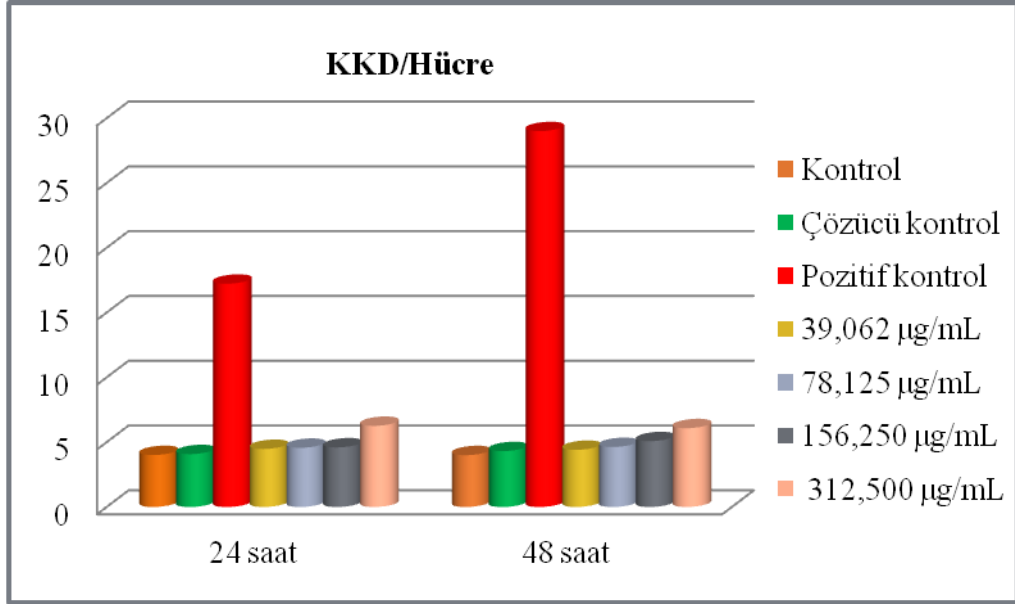
<sup>\*\*\*</sup>Kontrolle göre  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>†</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (t-testi)

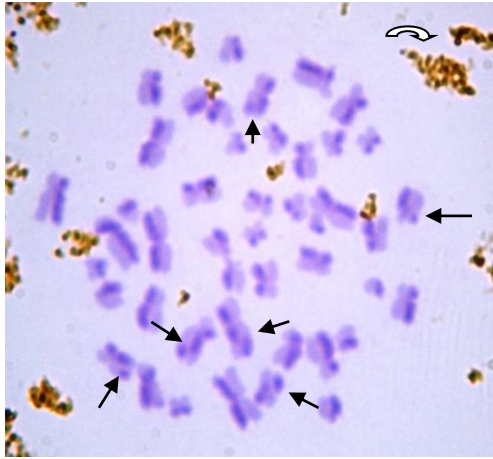
<sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>b</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)

<sup>c</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.16. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin kardeş kromatit değişimine etkisi



Resim 4.13. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri ile oluşan kardeş kromatit değişimleri  
 ↷: lamaların üstünde görülen nanopartiküller

### Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

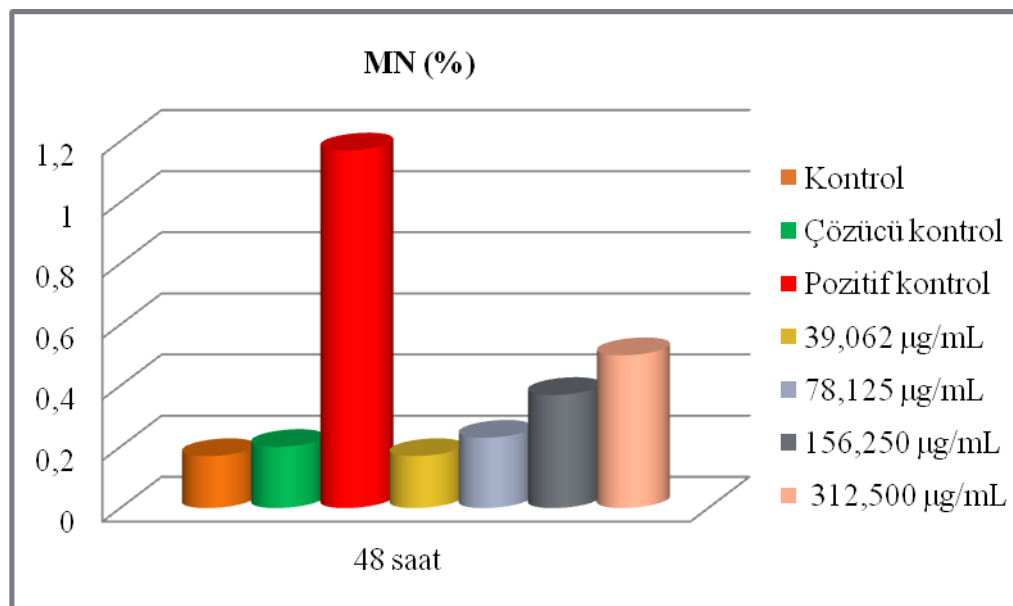
Binükleat hücrelerde yapılan incelemeler sonucunda, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin insan periferallenfositlerinde, MN frekansını konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı ( $r=0,99$ ), fakat bu artışın sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.17, Resim 4.14). Diğer yandan, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ( $r=0,69$ ). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri, binükleatlarda sadece 1 adet mikronükleus oluşturmuştur.

Çizelge 4.13. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

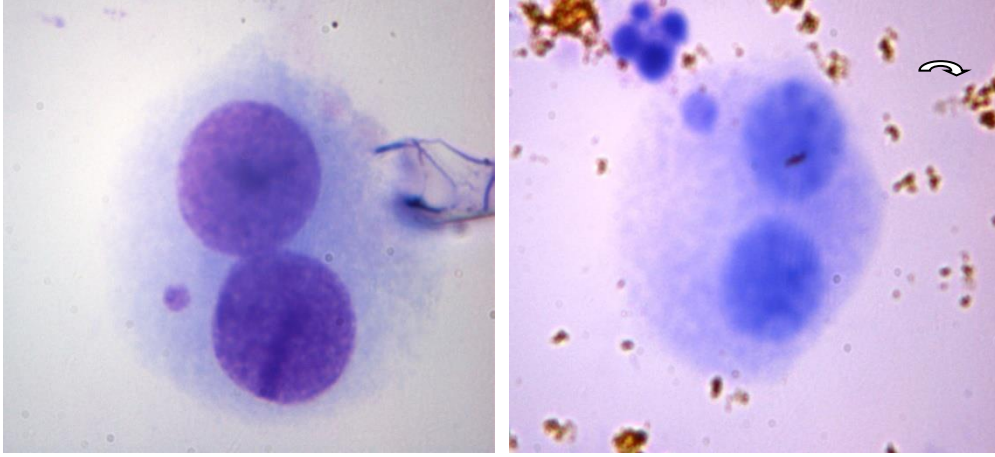
| Test Maddesi                   | Uygulama    |                       | İncelenen binükleat hücre sayısı | Binükleat hücrelerdeki mikronükleus sayısı |     | MN±SH %                | NBİ±SH    |
|--------------------------------|-------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----|------------------------|-----------|
|                                | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                                  | (1)                                        | (2) |                        |           |
| Kontrol                        | 48          | -                     | 3000                             | 5                                          | -   | 0,17±0,07              | 2,27±0,38 |
| Ç. K.                          | 48          | -                     | 3000                             | 6                                          | -   | 0,20±0,08              | 1,95±0,36 |
| P. K.                          | 48          | 0,20                  | 3000                             | 29                                         | 3   | 1,17±0,20              | 1,74±0,34 |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 48          | 39,062                | 3000                             | 5                                          | -   | 0,17±0,07              | 2,02±0,36 |
|                                | 48          | 78,125                | 3000                             | 7                                          | -   | 0,23±0,09              | 2,09±0,37 |
|                                | 48          | 156,250               | 3000                             | 11                                         | -   | 0,37±0,11              | 2,14±0,37 |
|                                | 48          | 312,500               | 3000                             | 15                                         | -   | 0,50±0,13 <sup>a</sup> | 1,93±0,35 |

NBİ: nükleer bölünme indeksi, SH: standart hata, Ç. K.: çözücü kontrol, P. K.: pozitif kontrol-MMC

\*Kontrolle göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z- testi) <sup>a</sup>Çözücü kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (z- testi)



Şekil 4.17. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin mikronükleus frekansına etkisi



Resim 4.14.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri ile oluşan bir mikronükleuslu binükleatlar  
 ↷: lamaların üstünde görülen nanopartiküller

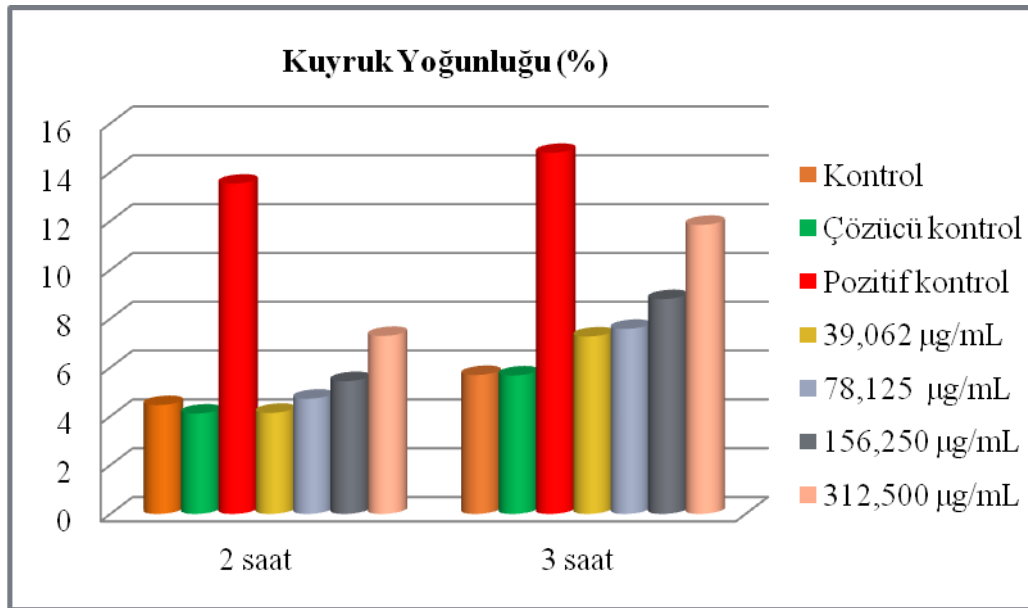
#### $\text{Fe}_2\text{O}_3$ nanopartiküllerinin DNA hasarı üzerine etkisi

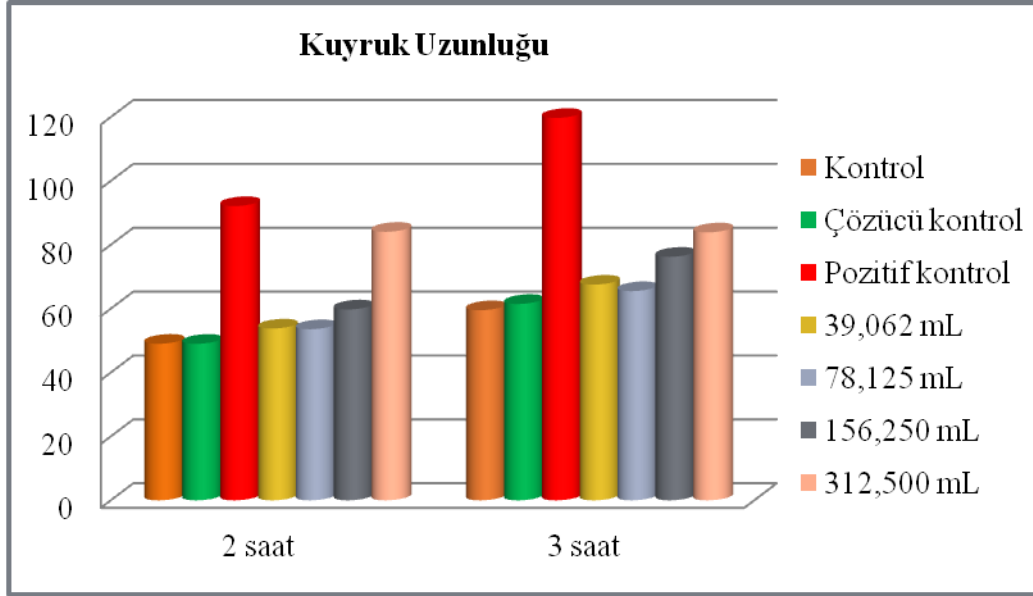
$\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin insan lenfositlerinde primer DNA hasarı üzerindeki etkileri comet testi ile incelenmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Resim 4.15).  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin, 2 ve 3 saatlik muamele süresinde, hem kuyruk yoğunluğu (2 saatlik uygulamada  $r=0,93$ ; 3 saatlik uygulamada  $r=0,92$ ) ve hem de kuyruk uzunluğunda (2 saatlik uygulama  $r=0,89$ ; 3 saatlik uygulamada  $r=0,83$ ) konsantrasyona bağlı artışlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Kuyruk uzunluğunda gözlenen artışların tüm konsantrasyonlarda ve her iki uygulama süresinde, her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Kuyruk yoğunluğundaki artışın ise, 2 saatlik uygulamada sadece en yüksek konsantrasyonda ( $312,500 \mu\text{g/mL}$ ) her iki kontrol grubuna göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 3 saatlik uygulamada, kontrole kıyasla en yüksek üç konsantrasyonda ( $78,125$ ;  $156,250$  ve  $312,500 \mu\text{g/mL}$ ), çözücü kontrole kıyasla en yüksek iki konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.14. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin izole lenfositlerde DNA hasarı üzerine etkisi

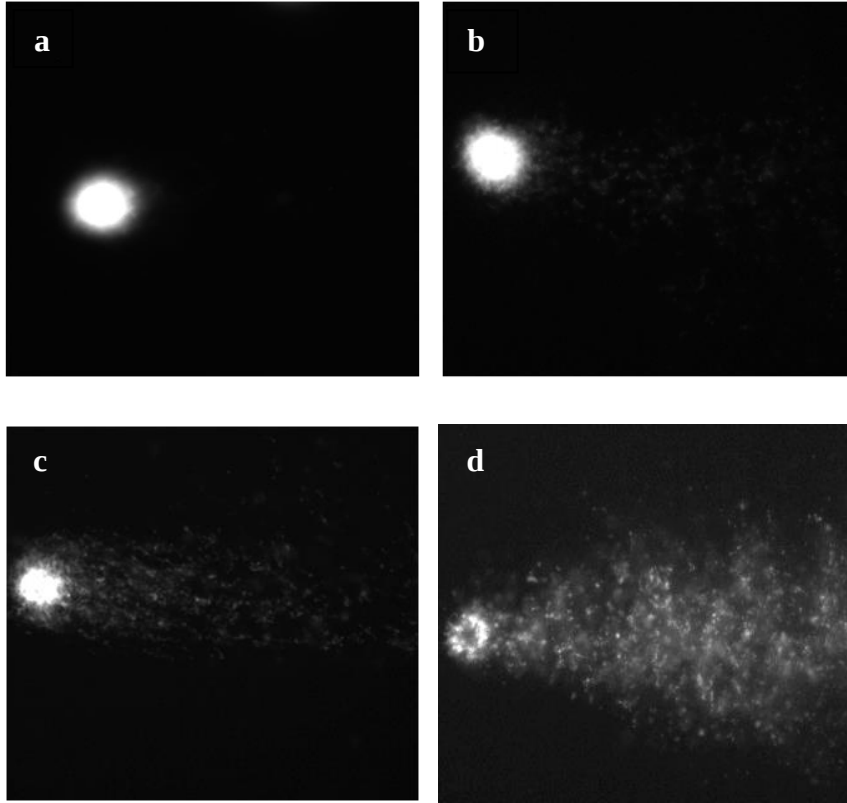
| Test Maddesi                                     | Uygulama    |                       | Kuyruk Yoğunluğu %      | Kuyruk Uzunluğu (µm)    |
|--------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                                  | Süre (saat) | Konsantrasyon (µg/mL) |                         |                         |
| Kontrol                                          | 2 saat      | -                     | 4,46±0,34               | 49,03±0,93              |
| Çözücü Kontrol                                   | 2 saat      | -                     | 4,11±0,61               | 49,02±0,65              |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 2 saat      | 100 µM                | 13,53±1,06              | 92,14±3,09              |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                   | 2 saat      | 39,062                | 4,14±0,43               | 53,79±0,82 <sup>a</sup> |
|                                                  | 2 saat      | 78,125                | 4,72±0,35               | 53,58±0,88 <sup>a</sup> |
|                                                  | 2 saat      | 156,250               | 5,44±0,40               | 59,77±1,27 <sup>a</sup> |
|                                                  | 2 saat      | 312,500               | 7,29±0,59 <sup>a</sup>  | 84,08±2,25 <sup>a</sup> |
| Kontrol                                          | 3 saat      | -                     | 5,69±0,47               | 59,53±1,34              |
| Çözücü Kontrol                                   | 3 saat      | -                     | 5,67±0,41               | 61,49±1,12              |
| Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 3 saat      | 100 µM                | 14,79±0,93              | 119,75±4,88             |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                   | 3 saat      | 39,062                | 7,27±0,66               | 67,54±1,12 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 78,125                | 7,58±0,76 <sup>*</sup>  | 65,51±1,66 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 156,250               | 8,80±0,60 <sup>a</sup>  | 76,27±1,73 <sup>a</sup> |
|                                                  | 3 saat      | 312,500               | 11,84±0,92 <sup>a</sup> | 83,90±3,35 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)    <sup>\*</sup>Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

Şekil 4.18. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.19.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin izole lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Resim 4.15.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri ile oluşan DNA hasarı a) hasarsız hücre (2 saat, 156,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), b) az hasarlı hücre (2 saat, 312,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), c) orta hasarlı hücre (3 saat, 156,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), d) çok hasarlı hücre (3 saat, 312,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )



## 5. TARTIŞMA

Günümüzde, teknolojik gelişmelere paralel olarak insanlar giderek doğal hayattan uzaklaşmakta, doğal maddelerin yerini, biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen, yeni kimyasal maddeler almaktadır. Nanopartiküller (NP) de teknolojik alanda kullanılan önemli maddelerden biridir. Nanoteknoloji endüstrisindeki hızlı gelişmelerle birlikte, nanopartiküllerin kullanım alanları da özellikle son 10 yılda giderek artış göstermiş ve hayatımızın her alanında yer almaya başlamıştır. Nanopartiküllerin kullanımı büyük artış göstermesine rağmen, toksik etkileri konusunda henüz yeterli araştırma ve bilgi mevcut değildir. Diğer yandan, NP'lerin toksik etkileri konusundaki mevcut sonuçlar da birbiri ile çelişmektedir. Nanopartiküllerin oldukça toksik olduğunu ve hatta tümör oluşumunu arttırdığını belirten birçok çalışma bulunmakla birlikte (Di Bucchianico ve diğerleri, 2013; Sun ve diğerleri, 2012; Singh ve diğerleri, 2012), bazı çalışmalar bu sonuçları desteklememekte, hatta fazla toksik olmadığını vurgulamaktadır (Jin ve diğerleri, 2007; Xia ve diğerleri, 2008; Piercione ve diğerleri, 2010; Figuerola ve diğerleri, 2010; Singh ve diğerleri, 2013). Nanopartiküllerin toksisitesi ile ilgili çelişkili verilerin bulunması nedeniyle, bu konuda daha fazla araştırmanın yapılması, nanopartiküllerin toksik etkilerinin farklı türlerde, farklı hücrelerde, farklı test teknikleri ile detaylı bir şekilde incelenmesi ve böylece bu partiküllerin risk analizlerinin yapılması, hem bu partiküllerin ve hem de bunlardan üretilen birçok ürünün daha güvenli bir şekilde kullanılması ve sonuçta insan sağlığı ve diğer tüm canlılar ve ekosistem açısından büyük önem taşımaktadır.

NP'lerin genotoksik bir ajan gibi davranarak insanlarda tamiri mümkün olmayan kalıtsal DNA hasarları oluşturabilmeleri mümkündür. Yapılan çalışmalar, birçok kimyasal maddenin düşük konsantrasyonlarda kullanımının dahi genotoksik etkiler oluşturabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan kimyasal maddelerin insan genomu için olası toksik etkilerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Nitekim ABD'de NP'lerin kullanımına bağlı bazı güvenlik sorunları nedeniyle 11 Şubat 2009 tarihinde kabul edilen yasa ile nanoteknolojik ürünlerin tehlikelerinin saptanması ve NP kullanımının düzenlenmesi (H.R. 554) için çalışmalar başlatılmıştır (Kayır ve Başçıl, 2010). Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) tarafından yayınlanan bir raporda, gıda sanayinde kullanılan nanopartiküllere oral yolla maruziyet sonucunda oluşan

toksik etkilerin tam olarak belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2015).

Nanopartiküllerin aşırı kullanımı stres reaksiyonlarını başlatmaktadır. NP'ler genel olarak parçalanmamakta ya da çok yavaş parçalanmakta ve vücutta birikerek, biyolojik moleküller ile etkileşime girmekte ya da çeşitli reaksiyonları durdurabilmektedir (Dar ve diğerleri, 2014). Bu nedenle nanoteknolojideki ve nanopartikül üretimindeki gelişmeler ile birlikte, nanotoksikolojik çalışmalar da artış göstermeye başlamıştır. 1997-2014 yılları arasında NP'ler ile ilgili 600'den fazla genotoksisite çalışması yapılmıştır. Yıllara göre analiz yapıldığında, her geçen yıl bu çalışmaların sayısının arttığı görülmektedir. Genotoksisite çalışmalarında ilk sırayı comet, 2. sırayı MN testi ile yapılan çalışmalar almaktadır (Golbamaki ve diğerleri, 2015; Magdolenova ve diğerleri, 2014).

Nanoteknolojide yaygın kullanım alanlarının bulunmasına rağmen, toksik olabileceği yönünde verilerin olması sebebiyle, bu tez çalışmasında metal oksitlerden bakır oksit-CuO, demir oksit-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve silika oksit-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin insan periferik lenfositlerinde genotoksik risk taşıyıp taşımadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Genotoksik risklerin belirlenmesinde OECD tarafından yönergeleri yayınlanan ve uluslararası makalelerde de sıkça kullanılan kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve tek hücre jel elektroforezi-comet testleri kullanılmıştır. Ayrıca, bu nanopartiküllerin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla geçirimli elektron mikroskobu, dinamik ışık saçılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri de yapılmıştır. Ayrıca silika NP'lerinin atom dizilişlerinin belirlenerek, sınıflandırılmasının yapılabilmesi amacıyla XRD analizi de yapılmıştır.

Genotoksisite çalışmaları birçok memeli hücresinde yapılabilmektedir. Bu çalışmada, *in vitro* model olması, bütün organizmayı dolaşan ve aynı zamanda vücudun önemli savunma mekanizmalarından olması nedeniyle insan periferik lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Elde edilmesinin kolay olması, az bir miktar periferik kan ile deneyin yapılabilmesi ve herhangi bir genotoksik ajanın oluşturduğu etkiye diğer dokulardan daha hassas olması da lenfositlerin tercih edilmesinde etkili olmuştur (Rajakariar ve diğerleri, 2008).

Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, bunların toksisitesini etkilemektedir. Çözünürlük, şekil, büyüklük, yüzey yükü ve stabilitesine bağlı olarak toksik etkileri de

değişebilmektedir (Brown ve diğerleri, 2007; Brunner ve diğerleri, 2006; Misra ve diğerleri, 2014). Genel olarak, NP'lerin toksisitesi, partikül boyutu azaldıkça, artış göstermektedir (Liu ve diğerleri, 2014; Yang ve diğerleri, 2015).  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{TiO}_2$  ve  $\text{CuO}$  gibi bazı metal oksit NP'leri ile akciğer epitel karsinoma hücrelerinde (Karlsson ve diğerleri, 2009) ve farklı boyutlardaki (6, 20 ve 50 nm) silika NP'leri kullanılarak *in vitro* insan periferik lenfositlerinde yapılan çalışmalarda (Battal ve diğerleri, 2015), nanopartiküllerin boyutları küçüldükçe toksisitede artış gerçekleştiği belirlenmiştir. Genotoksisitede nanopartiküllerin boyut, hücresel yük ve yüzey modifikasyonları gibi karakteristik özelliklerinin etkili olduğu ifade edilmekle birlikte, Hong ve arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada, akut sitotoksitenin hücresel membran hasarından çok, nanopartiküllerin hücre içine alımı sırasında olduğu vurgulanmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan metal oksit NP'leri sulu çözeltilerde çözünmemekte, süspansiyon halinde kalmaktadır. Süspansiyondaki bu partiküller, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre, çeşitli düzeylerde aglomerasyon oluşturmaktadır. Bu nedenle NP'lerin genotoksik etkilerini incelerken, aynı zamanda bunların bazı fiziksel ve kimyasal karakterizasyonunun yapılması da büyük önem taşımaktadır. Çünkü aynı nanopartikülün farklı şekilleri, büyüklükleri, yüzey alanları, yüzey modifikasyonları, elektriksel yükleri ve hidrodinamik çapları, NP'lerin hem kendi aralarında ve hem de hücreler ile etkileşiminde ve toksik etkilerinde önemli rol oynamaktadır (Warheit, 2008; Liu ve diğerleri, 2014; Yang ve diğerleri, 2015; Corradi ve diğerleri, 2012; Gonzalez ve diğerleri, 2015). Bu durum göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında kullanılan nanopartiküllerin şekilleri, büyüklükleri, aglomerasyon durumları, zeta potansiyelleri ve hidrodinamik çaplarının belirlenmesi amacı ile geçirimli elektron mikroskobu, dinamik ışık saçılımı ve zeta sizer kullanılarak çeşitli analizler ve ölçümler de yapılmıştır.

Nanopartiküllerin TEM analizi için, her bir test materyalinin deiyonize sudaki süspansiyonundan elde edilen en az yüz örnek incelenerek ortalama partikül boyutu tespit edilmiştir. Bu ölçümlere göre,  $\text{SiO}_2$  NP'lerinin  $98 \pm 5$  nm,  $\text{CuO}$  NP'lerinin  $34 \pm 2$  nm ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin ise  $21 \pm 1$  nm ebadında ortalama partikül boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca silika ve bakır oksit NP'lerinin, genel olarak küresel ve kübiğimsi yapıda, demir oksit nanopartiküllerinin ise genellikle küresel yapıda olduğu tespit edilmiştir.

NP'lerin deiyonize sudaki hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri, DLS ve zeta sizer kullanılarak belirlenmiştir. DLS tekniğı ile silika NP'lerinin  $709 \pm 9$  nm ile en büyük,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin ise  $202 \pm 7$  nm ile en küçük hidrodinamik çapa sahip olduğı, CuO NP'lerinin ise  $612 \pm 4$  nm ile ara değere sahip olduğı belirlenmiştir. Zeta potansiyellerinin  $\text{SiO}_2$  NP'leri için  $-31 \pm 1$  mV, CuO NP'leri için  $-21 \pm 4$  mV ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri için  $+37 \pm 0,2$  mV olduğı tespit edilmiştir. Zeta potansiyelleri en düşük olan  $\text{SiO}_2$  ve CuO NP'leri eksi yüklü iken,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri pozitif yüklüdür. Zeta potansiyeli, yükü fark etmeksizin, partiküller arası itme gücünün büyüklüğünü göstermektedir. Bu nedenle zeta potansiyelinin yüksek çıkması, partiküllerin daha iyi dağılmış olduğunu ve dolayısı ile aglomerasyonun az olduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli değerinin  $-30 \text{ mV} \leq \zeta \leq +30 \text{ mV}$  arasında olması durumunda, nanopartikülün aglomerasyon oluşturma potansiyeli daha yüksektir. Aglomerasyon, hem nanopartiküllerin daha büyük kütleler oluşturmaya ve hem de hücre ile etkileşimlerinin, monodispers partiküllere nazaran daha farklı etki göstermesine sebep olmaktadır (Barnes ve diğerleri, 2008; Sun ve diğerleri, 2014). Van der Waals bağlarının sonucunda oluşan aglomerasyon, yüzey alanını artırmakta ve bunun sonucu olarak toksisite değişebilmektedir (Kwon, Koedrith ve Seo, 2014). Bu çalışmada elde edilen karakterizasyon verilerine göre CuO NP'lerinin aglomerasyona daha yatkın olduğı,  $\text{SiO}_2$  ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin ise aglomerasyon oluşturma potansiyelinin daha az olduğı söylenebilir. Zeta potansiyelinin daha yüksek olmasına rağmen silika NP'lerinin hidrodinamik çapının, CuO'dan daha yüksek çıkması, partiküllerin kullanılan konsantrasyonlarıyla ilgili olabilir. Bu çalışmada DLS ölçümlerinde, silika NP'leri için 250, CuO NP'leri için 75 ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri için ise 156,25  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Çözünemeyen ve süspansiyonu daha yoğun olan NP'lerin aglomerasyonu da fazla olacağından hidrodinamik çapın da daha fazla olması olasıdır.

Genel olarak, NP'lerin toksisitesi, aynı partikülün farklı boyut ve şekline göre değişkenlik göstermektedir. Birçok araştırmada nanopartiküllerin boyutları azaldıkça, gerek sitotoksik ve gerekse genotoksik etkilerinin arttığı belirlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2014; Yang ve diğerleri, 2015; Karlsson ve diğerleri, 2009; Battal ve diğerleri, 2015; Barnes ve diğerleri, 2008; Colognato ve diğerleri, 2007; Yang ve diğerleri, 2015). Nanopartiküllerin şekli söz konusu olduğunda, bu günkü verilere göre böyle bir genelleme yapmak zordur. Şekle bağlı olarak toksisitenin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Fare makrofaj hücrelerinde üç farklı formdaki (1000 nm ( $=1 \mu\text{m}$ ) küresel, 36 nm küresel ve  $50 \times 100 \times 500$  nm boyutunda çubuk)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri kullanılarak yapılan bir

çalışmada, sitotoksik etkinin en az çubuk boyutunda gözlemlendiği, küresel formlarının da benzer sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Genotoksik etkinin ise en fazla çubuk şeklinde olan partikülde, en az ise mikro boyutta olan partikülde olduğu gözlemlenmiştir. Genotoksik etkinin en fazla çubuk formunda gözlenmesi, yüzey alanının büyük olması nedeniyle daha reaktif olmasına bağlanmıştır (Lee ve diğerleri, 2014). Amorf yapıdaki küresel (100 nm) ve çubuk şeklinde olan (100x10 nm) silika NP'leri ile yapılan bir başka araştırmada, boyut arttıkça toksisitenin azaldığı ve küre şeklinde olanların, çubuk şeklinde olanlardan daha toksik olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum büyük aglomerat oluşturan yapıların daha az toksite oluşturduğu şeklinde açıklanmıştır. Çünkü çubuk şeklinde olan NP'ler 91 µm boyutunda aglomeratlar oluştururken, küresel formdaki NP'ler 260 nm boyutunda aglomeratlar oluşturmuştur (Brown ve diğerleri, 2007). Küre (7 nm), çubuk (7x40 nm) ve mil şeklinde (1200x270x30 nm) CuO NP'leri kullanılarak fare makrofajları ve periferik kanda yapılan diğer bir araştırmada, her iki hücre kültüründe de küresel formun daha sitotoksik olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, CuO NP'lerinin, şekli ve boyutu dikkate alınmaksızın, pozitif kontrol olarak kullanılacak kadar toksik olduğu bildirilmiştir (Di Bucchianico ve diğerleri, 2013).

NP'lerin yüzey karakteristiğinin, NP'lerin hem hücre içerisine alımını, hem de hücredeki aktivitesini etkilediği bilinmektedir. NP'lerin yüzey yükü karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan zeta potansiyeli değeri 15 mV'un (+/- fark etmeksizin) altında olduğunda, NP'lerin fagositoza uğramadan hücreye daha rahat alındığı (He, Hu, Yin, Tang ve Yin, 2010), yüksek değerli olanların ise fagositoza uğradığı ve hücre alımının daha kısıtlı olduğu (Sun ve diğerleri, 2014) belirtilmektedir. Diğer yandan, pozitif yüklü parçacıkların negatif yüklü parçacıklara nazaran hücre içine daha kolay alındığı yönünde raporlar da mevcuttur (Barnes ve diğerleri, 2008; Lankoff ve diğerleri, 2013; Sun ve diğerleri, 2014).

Nanopartiküllerin oluşturduğu aglomerasyonun toksisiteye olan etkileri konusunda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Büyük aglomeratlar oluşturan partiküllerin küçük olanlara göre hücreler tarafından daha az alındığı ve buna bağlı olarak, büyük aglomeratların hücreler üzerinde daha az etkiye sahip olduğu yönünde bulgular olduğu gibi (Brunner ve diğerleri, 2006; Lindberg ve diğerleri, 2009), büyük NP aglomeratlarının nükleusu deforme ederek, mitozu etkilediği ve kromozom hasarına neden olduğuna yönelik bulgular da mevcuttur (Di Virgilio ve diğerleri, 2010). ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, ZnO ve SiO<sub>2</sub> NP'leri ile yapılan çalışmalarda çözünebilir elementlerin daha toksik olduğu, çözünemeyen maddelerin ise

toksisite oluşturmadağı rapor edilmiştir. Çözünemeyen maddelerin toksik etki oluşturmamasının, bu maddelerin akut toksik etkisinin belirlenememesinden kaynaklandığı, bu maddelerin aslında uzun vadede toksik etkilerinin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Brunner ve diğerleri, 2006). Perreault ve grubunun (2012) CuO NP'leri ile nöron hücrelerinde yaptığı çalışmada, aglomerasyonun sitotoksisite ve genotoksisiteyi arttırdığı belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada yapılan genotoksisite testleri ile her üç nanopartikülün, büyük aglomeratlar oluşturmamasına rağmen, genelde konsantrasyona bağlı olarak toksisiteyi artırdığı belirlenmiştir. Bu durum, konsantrasyon arttıkça, hücre içine girebilecek nanopartikül sayısında da artış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Silika NP'lerinin kristal ve amorf olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. Bu tez çalışması için ticari olarak temin edilen silika NP'lerinin hangi formda olduğu ürünün etiket bilgileri üzerinde yer almadığından, XRD analizi kullanılarak partiküllerin karakterizasyonu yapılarak atomik yapısı belirlenmiştir. NP'lerin toksik etkilerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için kullanılan silika NP'lerinin hangi formda olduğunun bilinmesi de büyük önem taşımaktadır. Çünkü iki formun toksik etkisi birbirinden çok farklıdır. Kristal formu 1. sınıf insan kanserojeni olarak sınıflandırılırken (Durnev ve diğerleri, 2010; Napierska ve diğerleri, 2010; Petushkov ve diğerleri, 2010), amorf formunda böyle bir etki gözlenmemekte, daha zararsız olduğu düşünülmekte, hatta bazı çalışmalarda belirteç olarak dahi kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Jin ve diğerleri, 2007). Bu amaçla toz halindeki kuru silika NP'leri kullanılarak XRD analizi yapılmış ve 20-25 derece aralığında pikler gözlenmiş olması nedeniyle (Music ve diğerleri, 2011; Ficai ve diğerleri, 2011), bu çalışmada kullanılan nanopartiküllerin amorf formda olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları dışında özellikle genotoksik etkileri konusunda detaylı bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Bunun için çeşitli genotoksisite testleri kullanılmıştır. Bunlardan biri kromozom anormallikleri testi olup, bu test, hasarlı kromozomların onarılamaması, yanlış onarılması veya hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanan ve mikroskopik olarak gözlenebilen genetik değişiklikleri belirlemek amacı ile kullanılmaktadır (Mateuca ve diğerleri, 2006; Branzei ve Foiani, 2008). KA testi ile hem yapısal ve hem de sayısal kromozom anormallikleri tespit edilebilmektedir. Kromozomal anormallikler, genom kararsızlığının biyo-göstergesi olarak kullanılmakta olup, kanserin erken habercisi olarak

bilgi vermesi sebebiyle, KA testi kanser belirtici olarak da kullanılmaktadır (Bonassi ve diğerleri, 2000; Doak ve diğerleri, 2012; Vodenkova ve diğerleri, 2015). Bu tez çalışmasına konu olan CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri ile yapılan analizler sonucunda, KA frekansının tüm nanopartikül muamelerinde ve her iki uygulama süresinde (24 ve 48 saat) konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. KA frekansında gözlenen bu artış, SiO<sub>2</sub> NP'leri için, 24 saatlik uygulamada en yüksek iki konsantrasyonda (250 ve 1000 µg/mL), her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada, kontrole kıyasla en düşük konsantrasyon hariç (10 µg/mL) diğer tüm konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre ise en yüksek iki konsantrasyonda (250 ve 1000 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlıdır. CuO NP'lerinin KA frekansında meydana getirdiği artışın, 24 saatlik uygulamada en yüksek üç konsantrasyonda (50, 75 ve 100 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin de, KA frekansını 24 saatlik uygulamada ve her iki kontrol grubunda, en yüksek iki konsantrasyonda (156,250; 312,500 µg/mL), 48 saatlik uygulamada ise kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (78,125; 156,250 ve 312,500 µg/mL), çözücü kontrole göre ise en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL) istatistiksel olarak önemli bir düzeyde arttırdığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen 3 farklı nanopartikülün insan periferik lenfositlerinde yapısal anormalliklerden en çok kromatit kırığı ve takiben fragment oluşturduğu belirlenmiştir. Bu anormallikleri, sıklıklarına göre sırasıyla kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, kardeş kromatit değişimi ve disentrik kromozomlar takip etmektedir. CuO nanopartikülleri kromozom anormallikleri açısından en toksik etkiyi gösterirken, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri en az etkiyi göstermiştir. SiO<sub>2</sub> NP'leri ise bu iki NP arasında yer almaktadır. Bu sonuçlara göre NP'ler klastojenik etkileri bakımından CuO>SiO<sub>2</sub>>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri şeklinde sıralanabilir. Bu çalışmada yüksek frekansta kromatit kırığı ve fragment oluşması, nanopartiküllerin S fazı klastojenleri olması ile açıklanabilir (Natarajan, 2002). Fragmentler kromozom kırıklarından da kaynaklanmakla beraber, bu çalışmada kromozom kırıkları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi ile oluşan disentrik, kardeş kromatitlerde birleşme, kardeş kromatit değişimi gibi anormalliklerin az gözleniyor olması, yukarıdaki durumu desteklemektedir. Bu çalışmadaki fragment oluşumlarının genel olarak S fazı mutajenlerince oluşturulan tek zincir kırıkları sonunda olduğu düşünülmektedir. İnsan genomu sürekli olarak dış uyaranlara karşı tehdit altında olmakla beraber, hücre döngüsü esnasında belirli DNA tamir mekanizmalarının varlığı nedeniyle, bu hasarlar

kontrol noktalarında görev yapan moleküller tarafından tespit edilerek onarımı gerçekleştirilmektedir. Bu hasarlar onarılamadığında, ortaya çıkan anormallikler çeşitli genotoksisite testleri ile belirlenebilmektedir. Kromozom anormallikleri, DNA onarım sistemindeki hatalar sonucunda oluşmaktadır. Onarım engellendiğinde ya da yanlış bir şekilde yapıldığında kromozom anormalliklerinin frekansında artış gerçekleşir (Branzei ve Foiani, 2008). Özellikle mitoz öncesi son kontrol noktası olan G<sub>2</sub> fazındaki hatalar, kromozom anormalliklerinin artışına sebep olur. Bu nedenle kromozomal anormalliklerin oluşmasında hücre siklusunun G<sub>2</sub> fazı ve buradaki tamir mekanizmaları da çok önemlidir.

KA testi uygulaması ile insan lenfositlerinde sayısal kromozom anormalliklerinden poliploidi de gözlenmiştir. İnsan lenfositlerinde en fazla poliploidi oluşturan nanopartikülün SiO<sub>2</sub> olduğu belirlenmiştir. CuO NP'leri sadece bir hücrede poliploidi oluşturmıştır. Demir oksit nanopartiküllerinin uygulandığı lenfositlerde poliploidi hiç gözlenmemiştir. Poliploidi oluşmasında iğ ipliklerinin bozulması ve DNA'da meydana gelen hasarlar önemli rol oynamakla birlikte, mitoz bölünme esnasında anafazda kromatit ayrılmasında görev yapan DNA topoizomerazlarda meydana gelen anormallikler de büyük önem taşımaktadır (Clarke, Johnson ve Downes, 1993). Canlı sistemlerde genetik materyalin yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunarak, tümör oluşumunun engellenmesi ve sağlıklı bireylerin devamlılığı için çeşitli DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Topoizomeraz II enzimi de DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında görev yapan bir proteindir. Organizmanın herhangi bir topoizomeraz enzim inhibitörü ile karşılaşması ve onarım sisteminde bir anormallik olması durumunda topoizomeraz II inhibitörleri, topoizomeraz II'ye bağlanarak DNA'nın yeniden birleşmesini engeller ve DNA çift zincir kırıkları oluşturmak suretiyle hücre döngüsünü durdurur (Doğan ve diğerleri, 2013). Genellikle G<sub>2</sub>/M safhasını etkileyen kimyasallar, topoizomeraz inhibisyonuna neden olarak, poliploidiyi arttırmaktadır (Zucker, Adams, Bairj ve Elstein, 1991). Bu çalışmada özellikle silika NP'lerinin uygulandığı gruplarda (kontrol grupları da dahil) fazla miktarda poliploidi gözlenmiştir. Özellikle hiç bir nanopartikülün uygulanmadığı negatif ve çözücü kontrol gruplarında poliploidinin gözlenmiş olması, bu anormalliğin oluşmasında silikanın etkisi ile birlikte, donör kaynaklı olabileceğini de akla getirmekle birlikte, silika ile muamele edilmiş hücrelerde daha fazla gözlenmiş olması, silikanın poliploidi oluşumunu tetiklediğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, silikanın mikrotübülleri etkilediği yönünde raporlar bulunmaktadır (Gonzalez ve diğerleri, 2010; Gonzalez ve diğerleri,

2015). SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin yukarıda sözü edilen etkilerden biri veya bir kaçı ile poliploidi oluşturduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada incelenen nanopartiküllerin genotoksik etkileri kardeş kromatit değişimi testi ile de değerlendirilmiştir. KKD, DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatitlerin karşılıklı olarak yer değiştirmesidir. KKD, çeşitli ajanların genetik materyalde oluşturduğu, mikroskopik olarak tanımlanabilen yapısal düzensizliklerin göstergesi olarak değerlendirilmekte ve aynı zamanda DNA onarımındaki anormallikleri de yansıtmaktadır. KKD testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek amacıyla kullanıldığı gibi, kanser ve bazı genetik hastalıkların tanı ve takibi için yapılabilecek tarama çalışmalarında da güvenle kullanılmaktadır. DNA'nın zarar gördüğü durumlarda, kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmadan, hücrede KKD oranı artmaktadır (Faed, 1983; Wilson III ve Thompson, 2007). Bu çalışmada her üç nanopartikülün de KKD oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. KKD oluşumunda gözlenen artışların hem SiO<sub>2</sub>, hem de CuO NP'leri için, tüm uygulama konsantrasyonlarında, negatif ve çözücü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. KKD frekansında gözlenen artışın, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri'nin 24 saatlik uygulamasında sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL), 48 saatlik uygulamasında ise en yüksek iki konsantrasyonda (312,500 ve 156,250 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bu çalışmada kullanılan SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin KKD frekansını arttırdığını göstermektedir. KKD, replike olmuş genetik materyalde, mutajenlerin oluşturduğu hasarı ve S fazında homolog rekombinasyon yolu ile gerçekleşen DNA onarımını yansıtmaktadır (Kontaş ve diğerleri, 2011). Dolayısı ile bu çalışmada test materyali olarak kullanılan NP'lerin S fazını etkilediği düşünülmektedir. Kromozom anormalliklerinde en fazla kromatit kırığının gözlenmiş olması da bu etkiyi desteklemektedir.

KKD testi kullanılarak, kardeş kromatitlerde meydana gelen değişimler belirlendiği gibi, hücre döngüsü ilerlemesinin indirekt göstergesi olan replikasyon indeksi de belirlenebilmektedir. DNA sentezinin inhibe edildiği durumlarda sitokinetik indeksin bir belirteci olan Rİ değeri azalmaktadır (Lazutka ve Margolin, 1991; M'Bemba-Meka ve diğerleri, 2007). Replikasyon indeksine ek olarak, sitotoksiteyi belirleyen bir diğer parametre de mitotik indekstir (Rojas ve diğerleri, 1993). Mitotik indeks, hücre proliferasyonunun ve sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan önemli göstergelerden biri

olup, sitogenetik bir test olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Eroğlu, Eroğlu ve İlbas, 2007; Battal ve diğerleri, 2015). Mitotik indeksteki değişiklikler, hücre proliferasyonunun etkilendiğini göstermektedir. Mitotik indeksteki azalmanın, hücrelerin mitotik girmesini sağlayan G<sub>2</sub> safhasının engellenmesinden dolayı ya da ATP seviyesinde azalmadan ve enerji üretim merkezindeki bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir. DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iş oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması gibi durumlarda da mitotik indekste düşüş gözlenmektedir (Hidalgo, Gonzalez-Reyes, Navas ve Garcia-Herdugo, 1989; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006). Bu tez çalışmasında incelenen SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri replikasyon indeksinde önemli bir değişikliğe neden olmaz iken, mitotik indekste bir azalmaya sebep olmuştur. CuO NP'lerinin, hem replikasyon indeksinde, hem de mitotik indekste (24 saatlik uygulamada 25 µg/mL hariç) bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Mitotik indekste gözlenen azalmalar, her üç test materyali için de, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, uygulama süresine bağlı olarak önemli derecede artmaktadır. Bu sonuçlar CuO NP'leri başta olmak üzere her üç NP'ün de sitotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Mİ'te gözlenen azalmalar, bu nanopartiküllerin hücre proliferasyonu için gerekli enzimleri ve proteinleri inhibe etmesinden ya da mitokondriyal disfonksiyona yol açmasından kaynaklanmış olabilir (Hidalgo ve diğerleri, 1989; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006).

Kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimi testi, genotoksisitenin tespitinde kullanılan hassas testlerdir. Her ne kadar KKD testi KA testi gibi kanser riskini ortaya koyabilecek hassasiyette olmasa da, genotoksisitenin bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu iki testin uygulanması ve elde edilen preparatların taranarak verilerin değerlendirilmesi, çok fazla zaman almakta ve çok fazla emek gerektirmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin olası toksik etkilerini belirlemede bu testlerin uygulandığı oldukça az sayıda çalışma mevcuttur. *In vitro* insan periferik lenfositlerinde 10-50 nm aralığında küresel formdaki 3 farklı (vinil ve aminopropil vinil kaplı ve herhangi bir madde ile kaplı olmayan) amorf silika NP'leri (10, 25, 50 ve 100 µg/mL) kullanılarak yapılan bir çalışmada olası genotoksik etki belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey modifikasyonu yapılmış silika NP'leri ile herhangi bir sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmez iken, modifiye edilmemiş silika NP'leri ile toksik etki gözlenmiştir. Aynı boyut ve şekilde olmalarına rağmen farklı toksik etki göstermelerinin, NP'lerin kaplı oldukları maddelere bağlı olarak hücresel bağlanma durumlarının farklı olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Ayrıca her üç silika NP'ünün de mitotik indekste konsantrasyona bağlı bir

azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Mitotik indekste gözlenen düşüşlerin, silika NP'lerinin hücre döngüsünün ilerleyişini G<sub>1</sub>-S fazında konsantrasyona bağlı olarak bloke etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lankoff ve diğerleri, 2013). 6, 20 ve 50 nm boyutundaki silika NP'leri (150 µg/mL) kullanılarak *in vitro* insan periferik lenfositlerinden izole edilen mononükleer hücrelerde KKD testinin yapıldığı bir çalışmada, nanopartikül boyutuna bağlı olarak KKD frekansının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca mitotik indeks ve replikasyon indeksinde de kontrole kıyasla düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak, silika NP'lerinin mononükleer hücrelerde boyuta bağlı olarak değişkenlik gösteren genotoksik ve sitotoksik etki yaptığı rapor edilmiştir (Battal ve diğerleri, 2015). TiO<sub>2</sub> ve Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin genotoksik etkilerinin Çin hamster ovaryum hücrelerinde KKD testi ile araştırıldığı bir çalışmada, TiO<sub>2</sub> NP'lerinin KKD frekansını önemli ölçüde arttırdığı, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin ise KKD frekansını etkilemediği bildirilmiştir (Di Virgilio ve diğerleri, 2010). Seryum oksit (CeO<sub>2</sub>) NP'lerinin insan lens epitel hücrelerinde KKD frekansını etkilemediği, hatta bu nanopartiküllerin antioksidan özellik göstermesi nedeniyle katarakt tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Piercione ve diğerleri, 2010).

Yüzeyi PEG (10-30 nm) ve PEI (10 nm) ile kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerinin *in vitro* Çin hamster akciğer hücrelerinde (CHL) 2 ve 24 saatlik uygulaması sonucunda KA frekansında bir artış gözlenmediğinden, bu partiküllerin klastojenik etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Fakat, PEG ile kaplı olan NP'lerin (10 ve 30 nm) Ames testi sonucunda mutajenik oldukları ve mutajenik etkinin küçük boyutlu NP'lerde (10 nm) daha güçlü olduğu belirlenmiş, bu nanopartiküllerin mutajenik etkisinin boyuta ve yüzey kaplamasına göre değiştiği vurgulanmıştır. Bu veriler NP'lerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, onların genotoksitesinin belirlenmesi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Bu tür sonuçlara dayanarak demir oksit nanopartikülleri farklı maddeler ile kaplanarak, teşhis ve tedavide kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin toksik potansiyeli de oldukça azdır, bunun sebebi, kullanılan konsantrasyonların lethal dozdan oldukça düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir. Fakat yine de nanopartiküllerin çözünemedikleri ve zamanla vücutta birikebileceği dikkate alındığında, medikal alanda çokça kullanılmaları, tartışmaya açık bir durum arz etmektedir. Gerek bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ve gerekse literatürde mevcut olan araştırma sonuçlarında, nanopartiküllerin kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimlerine neden olabileceğini gösteren ve genotoksik risk taşıdığını ifade eden araştırmaların yanında, bunun tam tersine, nanopartiküllerin genotoksik risk taşımadığını

ve hatta antioksidan etkili olması nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini gösteren çalışmaların olduğu da görülmektedir.

Güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği yüksek olması nedeniyle, genotoksik etkilerin tespitinde kullanılan ve bu tez çalışmasında da tercih edilen bir diğer metot mikronükleus testidir. Binükleat hücrelerde ana çekirdekten bağımsız olarak sitoplazmada gözlenen küçük ekstra yapıların (mikronükleus) tespit edildiği bu teknik, kanser belirtici olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Fenech, 2002; Bonassi ve diğerleri, 2007). Yapılan bilimsel bir araştırmada, amorf silika NP'lerinin farklı ebatlarının (15 ve 55 nm) *in vitro* insan periferallenfositlerinde ve *in vivo* Wistar ratlardaki etkileri MN testi ile değerlendirilmiştir. *In vitro* koşullarda MN frekansında bir artış gözlenmez iken, *in vivo* koşullarda MN frekansında artış gözlenmiştir. Silika NP'lerinin inflamatuvar hücre kaynaklı oksidanların serbest bırakılması ile sekonder genotoksisiteyi başlattığı düşünülmektedir. Yangıya bağlı olarak artan nötrofilik sızma ile karaciğerde nekroz ve apoptotik hücreler oluşarak, inflamatuvar belirtici olan TNF (tümör nekrozu faktör) ve IL-6'nın (interlökin-6) plazmada artış gösterdiği ve böylece genetik hasarlar oluşturduğu düşünülmektedir (Downs ve diğerleri, 2012). 20 ve 50 nm boyutundaki silika NP'leri kullanılarak *in vitro* insan periferallenfositlerinden izole edilen mononükleer hücrelerde MN frekansının boyuta bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. En küçük boyuttaki (6 nm) NP'lerin diğer NP'lere göre (20 ve 50 nm) daha toksik olduğu tespit edilmiş ve boyut azaldıkça yüzey alanının artışına bağlı olarak genotoksisitenin arttığı ifade edilmiştir (Battal ve diğerleri, 2015). 16, 60 ve 104 nm boyutundaki silika NP'leri kullanılarak, A549 hücrelerinde yapılan çalışmada ise MN tekniği ile önemli bir toksik etki gözlenmemiştir (Gonzalez ve diğerleri, 2010). A549 akciğer karsinoma hücrelerinde farklı boyutlarda (12-174 nm) amorf silika NP'leri kullanılarak, serum varlığı ve yokluğunda MN testinin uygulandığı bir çalışmada, MN frekansında artış olduğu rapor edilmiştir (Gonzalez ve diğerleri, 2015). Ratlarda *in vivo* koşullarda 5, 10, 20 mg/kg'lık SiO<sub>2</sub> NP'lerinin uygulandığı çalışmada sarı kemik iliği ve kolonda MN testi uygulanmış fakat her iki dokuda da önemli bir artış gözlenmemiştir. Sadece kolonda en düşük dozda (5 mg/kg) önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu sonucun, düşük dozun daha az aglomera olmasına bağlı olarak hücreye rahat alınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tarantini ve diğerleri, 2015). Yine fare nöral hücre kültüründe (N2A), 30 ve 40 nm boyutundaki CuO NP'lerinin farklı konsantrasyonları (12,5, 25, 50 ve 100 µg/mL) ile yapılan bir çalışmada, MN frekansında artış tespit edilmiştir. Araştırmacılar CuO NP'lerinin genotoksisitesinin oksidatif stres ve lipid

peroksidasyonu yolu ile oluştuğunu ifade etmişlerdir (Perreault ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde maymun böbrek hücrelerinin kullanıldığı bir araştırmada da demir oksit, alüminyum oksit ve bakır NP'lerinin genotoksik etkileri MN testi ile incelenmiştir. Demir ve alüminyum oksit NP'leri ile sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmez iken, Cu NP'lerinin MN frekansında artış oluşturduğu tespit edilmiştir. Cu NP'lerinin ROT (reaktif oksijen türleri) üretimine bağlı olarak genotoksik hasarı arttırdığı ifade edilmiştir (Sadiq ve diğerleri, 2015). 10 ve 30 nm boyutundaki yüzeyi PEG ve 10 nm yüzeyi PEI ile kaplı olan demir oksit nanopartiküllerinin toksisitesi *in vivo* koşullarda MN testi kullanılarak incelendiğinde, PEG ile kaplı olanların küçük boyutlularının daha genotoksik olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar mutajenitenin yüzey kaplaması ve boyutuna bağlı olduğunu desteklemektedir (Liu ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında, SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin kültürdeki insan periferik lenfositlerine uygulanması ile mikronükleus frekansında konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir. Mikronükleus frekansında gözlenen bu artışların, silika NP'lerinde en yüksek üç konsantrasyonda (50, 250 ve 1000 µg/mL), CuO NP'lerinde en yüksek iki konsantrasyonda (75 ve 100 µg/mL), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinde ise sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500 µg/mL) her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler bir bütün halinde değerlendirildiğinde, SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin genotoksikite test sonuçları (KA, KKD ve MN) kendi arasında paralellik göstermektedir. Dolayısıyla, bu nanopartiküller hem klastojenik ve hem de klastojenik/anojenik etkiler göstermişlerdir. Diğer yandan, CuO NP'lerinin toksik etkileri biraz daha farklı bir durum sergilemektedir. CuO NP'lerinin uygulandığı lenfositlerde tüm konsantrasyonların ve uygulama sürelerinin KA ve KKD frekansında anlamlı artışlar göstermesi fakat MN frekansında sadece en yüksek iki konsantrasyonda (75 ve 100 µg/mL) anlamlı düzeyde artmış olması, bu partiküllerin daha ziyade klastojenik etkili olduğunu desteklemektedir.

Lenfositlerde sitotoksikite belirlenmesinde indikatör olarak kullanılan bir diğer belirteç nükleer bölünme indeksidir. Fazla kromozom hasarı taşıyan hücrelerin hücre bölünmesi geçirmeden apoptoza uğraması ya da daha az hücre bölünmesi geçirmesi olasıdır. Sitokinezin engellendiği durumda, hücreler bölünme geçirmez ise tek çekirdekli (mononükleat) olarak kalırlar ve NBİ değeri 1.0 olur. Eğer tüm canlı hücreler bir kez bölünürse iki çekirdekli (binükleat) hücreler meydana gelir ve NBİ değeri 2.0 olur. NBİ 2.0'den büyük olduğu durumda ise hücrelerin birden fazla nükleer bölünme geçirdiği ve 2'den fazla çekirdeklerinin bulunduğu belirlenmiş olur (Fenech, 2007; Ionescu ve

diğerleri, 2011). Bu çalışmada, SiO<sub>2</sub> ve CuO NP'leri ile nükleer bölünme indeksinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlenirken, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin nükleer bölünme indeksini etkilemediği belirlenmiştir.

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Bu nedenle canlılarda spesifik onarım sistemleri bulunmaktadır. Hücrelerde meydana gelen DNA hasarı düşük seviyede olduğunda tamir sistemleri tarafından onarılırken, ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur (Choi ve diğerleri, 2008; Marano ve diğerleri, 2011; Wang ve diğerleri, 2012; Lanone ve Boczkowski, 2006; AshaRani ve diğerleri, 2009; Doak ve diğerleri, 2012). Bu nedenle DNA'nın bütünlüğünün korunması açısından, kimyasalların oluşturduğu DNA hasarını hassas bir şekilde belirleyen teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. DNA hasarını saptayıp, oluşan hasarın düzeyini belirlemekte son yıllarda sıkça kullanılan tekniklerden biri de comet testidir (Dinçer ve Kankaya, 2010; Mamur ve diğerleri, 2012; Ünal ve diğerleri, 2013; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2014). Comet testi, tekrarlanabilir olması, doğru ve hızlı sonuçlar vermesi nedeniyle, NP'lerin toksisitesinin belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin insan lenfositlerinde primer DNA hasarı üzerindeki etkileri comet testi ile belirlenmiş ve sonuçlar kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri ile değerlendirilmiştir. İzole lenfositler, üç farklı nanopartikül ile 2 ve 3 saat muamele edilmiştir.

Comet testi sonucunda, SiO<sub>2</sub> NP'lerinin tüm konsantrasyonlarının 2 ve 3 saatlik uygulamasının, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, 2 saatlik uygulamada kuyruk yoğunluğunun en düşük iki konsantrasyonda (10 ve 50 µg/mL), kuyruk uzunluğunun ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. 3 saatlik uygulamada, her iki parametrede de istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir. CuO NP'leri de izole insan lenfositlerinde hem 2 ve hem de 3 saatlik uygulama süresinde, tüm konsantrasyonlarda, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda, kontrol ve çözücü kontrole kıyasla anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri de tüm konsantrasyonlarda, hem 2 ve hem de 3 saatlik muamele süresinde, kuyruk uzunluğunda ve kuyruk yoğunluğunda artışlara neden olmuştur. Bu artış, kuyruk uzunluğunda, 2 ve 3 saatlik muamele süresinde, tüm konsantrasyonlarda her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Kuyruk yoğunluğunda ise, 2 saatlik

uygulamada sadece en yüksek konsantrasyonda (312,500  $\mu\text{g/mL}$ ) her iki kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken, 3 saatlik uygulamada kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (78,125; 156,250 ve 312, 500  $\mu\text{g/mL}$ ), çözücü kontrole göre ise en yüksek iki konsantrasyonda (156,250 ve 312, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan nanopartiküller ile, daha önce farklı türlerden elde edilen çeşitli hücre tiplerinde çok sayıda comet çalışması yapılmıştır (Bhattacharya ve diğerleri, 2009; Downs ve diğerleri, 2012; Lankoff ve diğerleri, 2013; Gonzalez ve diğerleri 2010; Gong ve diğerleri, 2012; Choi ve diğerleri, 2011; Barnes ve diğerleri, 2008; Midander ve diğerleri, 2009; Karlsson ve diğerleri, 2008; Karlsson ve diğerleri, 2009; Wang ve diğerleri, 2012; Alarifi ve diğerleri, 2013; Di Bucchianico ve diğerleri, 2013; Freyria ve diğerleri, 2012; Guichard ve diğerleri, 2012; Sing ve diğerleri, 2013; Auffon ve diğerleri, 2009; Battal ve diğerleri, 2015; Sadiq ve diğerleri, 2015; Tarantini ve diğerleri, 2015). Bütün bu çalışmalar, comet testinin nanopartiküllerin genotoksik etkilerini belirlemede çokça kullanıldığını ve cometin güvenilir bir test olduğunu desteklemektedir. Literatür verilerine göre farklı organizmalarda, değişik doku ve organlarda uygulanan comet testi ile CuO NP'lerinin genel olarak DNA hasarı oluşturduğu, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin uygulanması ile DNA hasarı gözlenmediği, SiO<sub>2</sub> NP'lerinin uygulanması ile DNA hasarının az miktarda gözlemlendiği belirlenmiştir (Karlsson, 2010; Golbamaki ve diğerleri, 2015).

15, 30 ve 100 nm boyutundaki SiO<sub>2</sub> NP'leri ile mikro boyuttaki SiO<sub>2</sub>'ler kullanılarak insan epidermal keratinosit hücrelerinde bir toksisite çalışması yapılmıştır. Comet testi ile 2,5; 5 ve 10  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonların 24 saatlik uygulamasının ROT artışına bağlı olarak DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Gong ve diğerleri, 2012). *In vitro* fare lenfoma hücre hattı ve insan bronşial epitel hücrelerinde, 10 nm boyutundaki silika nanopartikülleri kullanılarak yapılan çalışmada, karaciğer hasarı ve inflamasyon gözlenmiştir. Bu NP'lerin birincil DNA hasarı ve sitotoksik etki oluşturduğu, fakat mutajeniteye neden olmadığı vurgulanmıştır (Choi ve diğerleri, 2011).

*In vitro* insan periferik lenfositlerinde 3 farklı formdaki silika nanopartikülü ile (vinil kaplı, aminopropil vinil kaplı ve herhangi bir madde ile kaplanmamış), 10-50 nm aralığında, küresel formdaki amorf silika NP'lerinin 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının lenfositlerde DNA hasarı oluşturmadığı belirlenmiştir (Lankoff ve diğerleri, 2013). Bu

negatif sonuçların, deneysel koşulların farklılığından (boyut, konsantrasyon ve yüzey yapısı vb.) kaynaklanabileceği ifade edilmiştir.

CuO NP'lerinin 10-100 nm arasındaki boyutlarının, A549 hücrelerinde, DNA hasarını indüklediği comet testi ile belirlenmiştir. CuO NP'lerinin oksidatif stresi ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerini arttırdığı ve oluşan serbest radikallerin DNA'ya bağlanarak hasar oluşturduğu vurgulanmıştır. Maruziyet süresinin artışına bağlı olarak, oluşan hasarın şiddetinin arttığı da tespit edilmiştir. Ayrıca CuO NP'lerinin nükleus ve mitokondride bulunduğu da gözlenmiştir. Bu nedenle, CuO NP'lerinin endositoz sonucunda mitokondri depolarizasyonunu ve ROT'u arttırdığı, takiben p38 ve p53 aktivitesini arttırarak, DNA hasarı oluşturduğu düşünülmektedir (Wang ve diğerleri, 2012).

Fare makrofajlarında ve insan periferik lenfositlerinde, dört farklı formdaki (şekilsiz, küre, çubuk ve iğ şeklinde) CuO NP'lerinin farklı (0,1; 1 ve 10 µg/mL) konsantrasyonları kullanılarak, 2 ve 24 saatlik uygulamaları yapılmıştır. Comet testi ile, CuO NP'lerinin uygulama süresine ve konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarını arttırdığı belirlenmiş ve bu durumun oksidatif stresten kaynaklandığı ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen sonuçlar, kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak değerlendirildiğinde, CuO NP'lerinin ne kadar toksik olduğu daha iyi anlaşılmaktadır (Di Bucchianico ve diğerleri, 2013). 50 nm boyutundaki CuO NP'leri ile insan epidermal keratinosit hücre hattında yapılan bir çalışmada, DNA hasarında artış ve hücre canlılığında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu etkilerin, oksidatif strese bağlı olarak oluştuğu vurgulanmıştır (Alarifi ve diğerleri, 2013).

TiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (< 100 nm) NP'lerinin insan akciğer fibroblast ve insan bronşial epitel hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir araştırmada, her iki nanopartikülün de sitozolde nükleusa yakın yerlerde bulunduğu, fakat nükleus ve diğer organellerde bulunmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çalışmada kullanılan NP'lerin direkt DNA ile etkileşime girmediğini göstermektedir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin DNA kırığı oluşturduğu, fakat TiO<sub>2</sub> NP'lerinin böyle bir anormallik oluşturmadığı rapor edilmiştir. TiO<sub>2</sub> NP'lerinin Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerine kıyasla daha az genotoksik risk oluşturmasının, yüzey yükleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Bhattacharya ve diğerleri, 2009). Fakat genotoksik etkide birincil etken kimyasal yapıdır (Yang ve diğerleri, 2009), dolayısıyla bu farklılığın temel sebebi iki farklı madde olmalarından kaynaklanabilir.

Amorf ve küresel formda ve 13 nm uzunluğundaki Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri ile, 12 nm uzunluğundaki SiO<sub>2</sub> NP'leri (200 ve 400 µg/mL) kullanılarak fare makrofaj hücre hattında bir genotoksisite çalışması yapılmıştır. Hücre canlılığı, MN ve comet testlerinin uygulandığı bu çalışmada, nükleus ve DNA hasarı gözlenmiştir. Nükleusta az miktarda, sitoplazmada ise çok az miktarda NP'lere rastlanmıştır (Hashimoto ve Imazato, 2015). NP'lerin nükleusta da gözlenmiş olması, genotoksik etkinin oluşumu açısından oldukça önemlidir.

Nanopartiküllerin solunum yolu ile organizma içine girme potansiyelleri, büyük boyutta olan maddelere kıyasla daha yüksek ve daha toksiktir. Yapılan çalışmalar NP'lerin astım, bronşit ya da diğer solunum yolu enfeksiyonlarının oluşumunu etkilediği yönündedir (Soto ve diğerleri, 2007). İnsan solunum sisteminde bir NP'ün yarılanma ömrü ortalama 700 gündür. Bir NP solunduktan sonra akciğerin farklı bölgelerinde depolanır. Bu maddelerin transferi ve dağılımı, solunum sisteminin anatomisi, hava akışı modeli ve partikülün karakteri olmak üzere üç faktöre bağlıdır. Genellikle büyük partiküller (5-30 µm) nazofarinksal bölgede çökerken, küçük olan NP'ler alveollere geçmektedir (Rahi ve diğerleri, 2014). NP'ler insan vücudu için yabancı bir materyaldir ve bu nedenle NP'ler insan vücudunda akciğer hasarı, oksidatif stres, inflamasyon, fibrosis ve genotoksisite gibi hasarlar oluşturabilirler. Bu hasarlar, solunum hastalıklarını artırmakta ve hatta diğer dokuları da yaralamaktadır (Lu, Zhu, Chen ve Liu, 2014). NP'lerin solunum sisteminde oldukça uzun süre kalması da göz önünde bulundurulduğunda, tehlikenin boyutu daha net ortaya çıkmaktadır.

Gümüş (15 nm), molibden (30 nm) ve alüminyum (30 nm) nanopartikülleri kullanılarak üreme hücrelerinde toksisitenin araştırıldığı bir çalışmada, NP'lerin sitotoksik etki oluşturdıkları ve gametogenezi etkiledikleri belirlenmiştir (Braydich-Stolle ve diğerleri, 2005). Kompleks bir süreç olması ve canlılığın sağlıklı bir şekilde devamının sağlanması bakımından gametogenez sırasında hücre sağlığının korunması büyük önem taşımaktadır. NP'lerin ve özellikle gümüş nanopartiküllerinin gametogenezi olumsuz yönde etkiliyor olması oldukça dikkat çekicidir. Çünkü gümüş nanopartikülleri, antimikrobiyal etkisinden dolayı medikal alanda, ev aletlerinde ve bebek kıyafeti ve oyuncaklarında çokça kullanılmaktadır.

Kobalt kromiyum nanopartiküllerinin (29,5±6,3 nm) insan fibroblast hücrelerinde, zardaki sinyal geçiş proteinlerini kullanarak, zarda bir zarar oluşturmadan DNA hasarına sebep

olduğu belirlenmiştir (Bhabra ve diğerleri, 2009). Nanopartiküllerin, vücudun savunma sistemini devre dışı bırakarak DNA hasarı oluşturabilmesi, insan ve tüm canlıların sağlığı açısından oldukça ürkütücü bir durumdur. Metal oksitler çözünemedikleri için aglomera olmakta ve hücre içinde birikerek toksik etki oluşturabilmektedir (Bhabra ve diğerleri, 2009; Singh ve diğerleri, 2009).

Bu tez çalışmasında kullanılan ve ticari olarak temin edilen CuO ve SiO<sub>2</sub> NP'lerinin aynı konsantrasyonları kullanılarak Çalbay (Çalbay, 2014) tarafından soğan kök uçlarında *Allium cepa* testi uygulanmıştır. Bu test, mitotik indeksteki değişikliklerle birlikte, mitoz bölünmede oluşan anormalliklerin tespitine imkan sağlamakta ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı Genetik Toksikoloji programı (US-EPA-Gene-Tox) tarafından çevresel risklerin değerlendirilmesinde güvenilir bir test olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışma sonucunda, her iki nanopartikülün genel olarak mitotik indekste düşüşe neden olduğu belirlenmiş, tüm uygulama sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallik frekansında artış olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, NP'lerin bitkilerde de toksik etkiler oluşturduğunu ve hem CuO ve hem de SiO<sub>2</sub> NP'lerinin *Allium cepa* da sitotoksik ve genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, Çalbay (2014) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile genel anlamda uygunluk göstermektedir.

Alüminyum ve seryum oksit ile yapılan çalışmalarda da nanopartiküllerin bitkilerde genetik hasarlar oluşturduğu bildirilmiştir. Alüminyum NP'leri ile 5 farklı bitki türünde (lahana, salatalık, mısır, soya fasulyesi ve havuç) yapılan çalışmada, fenantren ile kaplı olan ve kaplı olmayan nanopartiküllerin bitkilerde toksik etkili olduğu ve bu etkinin yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, fenantren ile kaplılık derecesi arttıkça (10,0%, 100,0% ve 432,4%) kök uçlarındaki uzamanın baskılandığı belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2005). 7 nm'lik CeO<sub>2</sub> ve 8 nm'lik ZnO kullanılarak soya fasulyesinde yapılan farklı bir çalışma da NP'lerin bitkinin gelişimini etkilemeden, DNA hasarı ve mutasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Lopez Moreno ve diğerleri, 2010).

Nanopartiküllerin oldukça toksik olduğunu belirten çalışmaların yanında, toksik etkilerinin bulunmadığı ve hatta bir antioksidan gibi davrandığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur. Silika NP'leri ile A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, bu nanopartiküllerin genotoksik

bir etkisinin olmadığı ve biyomedikal alanda belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Jin ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde  $\text{CeO}_2$  nanopartiküllerinin de katarakt tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Piercione ve diğerleri, 2010).

Nanopartiküller beyin kanseri gibi bazı rahatsızlıkların tedavisinde ve hedef dokuya ilaç salınımında çokça kullanılmaktadır. Böylece kemoterapi ve radyoterapiden farklı olarak sadece ilgili dokuya kontrollü olarak ilaç salınımı hedeflenmektedir. Nanopartiküller, beyin kan bariyerinden geçebilecek kadar küçük olduklarından hedef dokuya ulaşmaları kolaydır (Shilo ve diğerleri, 2015). Bu nedenle, beyin kanseri tedavisinde  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'leri sıklıkla kullanılmaktadır (Koo ve diğerleri, 2006; Türk-Şengel, Haşçıçek ve Gönül, 2007; Kocaefe, 2007). Fakat bu tür tedaviler uygulanırken NP'lerin genotoksitesisi dikkate alınmamaktadır. Bu nedenle hedef dokuya yönelik ve özellikle beyine yönelik tedavilerde NP'lerden yararlanırken kar-zarar ilişkisinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. ROT üretimi, demir oksit nanopartiküllerinin toksisitesinin bir mekanizmasıdır. Beyin, oksitlenebilir doymamış yağ asidi içerdiğinden ve antioksidan enzim yetersizliğinden dolayı, diğer organlara göre, ROT hasarına karşı daha savunmasızdır. Ayrıca oksidatif stres Parkinson, Alzheimer ve Huntingon gibi nörodejenaratif hastalıkların da sebebidir (Valdiglesias ve diğerleri, 2015). Bu nedenle oldukça savunmasız olmasına rağmen, beyin kanseri tedavisinde NP'lerin kullanılıyor olması oldukça çelişkili bir durum oluşturmaktadır.

Nanopartiküllerin etki mekanizması konusunda çeşitli görüşler mevcuttur. Bu görüşler birlikte değerlendirildiğinde, nanopartiküllerin meydana getirdiği genetik hasarların, primer (direkt, indirekt) ve sekonder olmak üzere iki esas mekanizma ile oluşturulduğu ifade edilmektedir. Primer etki nanopartiküllerin direkt ya da indirekt olarak DNA ile etkileşime girmesi sonunda meydana gelmektedir. NP'lerin nükleus içerisine yerleşerek DNA molekülüyle etkileşime girip, genetik materyalde hasar oluşturması direkt etki olarak tanımlanmaktadır. NP'ler, interfazda hücre döngüleri boyunca nükleer pordan geçerek ya da mitoz sırasında çekirdek zarının parçalanmasından sonra direkt olarak DNA ile etkileşime geçebilmekte, DNA'ya bağlanmakta, hasar oluşturmakta ve replikasyon ile transkripsiyonu etkileyebilmektedir (Golbamaki ve diğerleri, 2015; Magdolenova ve diğerleri, 2014; Doak ve diğerleri, 2012). NP'lerinin çekirdek zarını geçerek, DNA ile direkt etkileşime girdiği ve irreversible DNA hasarı oluşturduğuna dair çok sayıda çalışma

mevcuttur (Karlsson ve diğerleri, 2008; Ahamed ve diğerleri, 2010; Jose ve diğerleri, 2011; Choi ve diğerleri, 2011; Wang ve diğerleri, 2012; Hashimoto ve Imazato, 2015).

Nanopartiküllerin indirekt etkisi, çoğunlukla, hücre bölünmesinin bileşenleri olan aracı biyomoleküller vasıtasıyla oluşturulur. Kromozomların mekanik ayrılması için gerekli proteinlerde, DNA tamir enzimlerinde, hücre döngüsünde görev alan proteinlerde ya da kromozom replikasyonunda etkili bileşenlerde de hasarlar ortaya çıkabilir. İndirekt etki ayrıca, oksidatif stres oluşumundan da kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, NP'lerin genetik hasar oluşturmadaki temel mekanizmasının oksidatif stresin indüklenmesine bağlı olarak meydana gelen ROT'leri olduğu vurgulanmaktadır (Golbamaki ve diğerleri, 2015; Magdolenova ve diğerleri, 2014; Doak ve diğerleri, 2012). Solunumun normal bir ürünü olan ROT'leri, protein, lipid ve DNA gibi biyomolekülleri kolaylıkla okside etmektedir. Oksidatif hasarı önlemek için hücresel antioksidanlar kullanılarak, ROT'lerinin etkisi yok edilmeye çalışılmaktadır. Fakat, ROT'lerinin oluşumu ve hücredeki antioksidan düzeyi arasında bir dengesizlik olursa, hücrede oksidatif stres düzeyi yükselmekte, buna bağlı olarak da DNA hasarında artış meydana gelmektedir. Benzer şekilde antioksidan sistemin bloke edilmesi, ROT'lerinin oluşumunu arttırarak indirek DNA hasarına neden olmaktadır (Doak ve diğerleri, 2012). Strese cevap olarak hücreler ROT'leri üretmektedir. Örneğin Ag NP'leri mitokondride hasara neden olarak ROT'leri üretimini arttırmakta ve bu da DNA hasarına sebep olmaktadır (Asharani ve diğerleri, 2009). Seryum oksit NP'leri ile insan akciğer kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, NP'lerin oksidatif stres oluşturarak, glutatyon ve  $\alpha$  tokoferol seviyesinde azalmaya, hücre membranına zarar veren malondialdehit ve LDH seviyesinde ise artışa sebep olarak DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Lin ve diğerleri, 2006). Benzer şekilde, CuO NP'lerinin insan larinks epitel hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşturduğu ve bu etkinin yanında antioksidan savunma sistemini de bloke ettiği tespit edilmiştir (Fahmy ve Cormier, 2009).

Genotoksik etkinin sekonder mekanizması genellikle bir maddenin *in vivo* koşullarda kronik inflamatuvar yanıtı indüklemesiyle oluşmaktadır. İnflamasyon sonucu, maruziyet bölgesine gelen nötrofil ve makrofajlar tarafından ROT'leri oluşturularak, sekonder yolla genetik hasarlar meydana gelebilir (Golbamaki ve diğerleri, 2015; Magdolenova ve diğerleri, 2014; Doak ve diğerleri, 2012). Normalde savunma sistemi patojenlere karşı vücudu korumak için nötrofil ve makrofajları hasar bölgesine gönderir, ancak bu mekanizmada meydana gelebilecek hasarlar da kronik inflamasyona ve takiben oksidatif

stres artışına ve buna bağlı olarak hücrelerde hasara neden olmaktadır (Kryston ve diğerleri, 2011). Sekonder genotoksisitede NP'ler *in vitro* test sistemlerinde genotoksik potansiyel göstermeyebilirken, *in vivo* koşullarda kronik bağışıklık yanıtını artırarak genotoksik etki oluşturabilir. Örneğin, silika nanopartikülleri ile yapılan bir çalışmada, *in vitro* koşullarda genotoksik bir etki gözlenmez iken, bu nanopartiküllerin *in vivo* koşullarda inflamatuvar hücre türevli oksidanların salınımı yolu ile sekonder genotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Downs ve diğerleri, 2012).

Bu tez çalışmasına da konu olan metal oksit nanopartiküllerinin temel toksisite mekanizması oksidatif stres oluşumunu uyarmaları ile gerçekleşmektedir. Oksidatif stres oluşumuna bağlı olarak, ROT üretimi artmakta ve bu durum normal hücresel aktiviteleri etkilemektedir (Wang ve diğerleri, 2012; Könczöl ve diğerleri, 2013; Laha ve diğerleri, 2014; Bulcke ve diğerleri, 2014; Kung ve diğerleri, 2015). Bu çalışmanın sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, kullanılan test materyallerinden en toksik olanının CuO NP'leri olduğu görülmektedir. Nitekim yapılan birçok genotoksisite çalışması da bunu doğrular niteliktedir. Laha ve grubu (2014), insan göğüs kanseri hücrelerinde (MCF7) CuO nanopartiküllerinin hücre büyümesini inhibe ederek, otofajiye sebep olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuca dayanarak, CuO nanopartikülleri ile otofaji inhibitörleri birlikte kombinasyonlar halinde kullanıldığında, göğüs kanseri hücrelerinde apoptosizin artacağı ve böylece kemoterapiye dirençli hücrelerin yok edilmesinde etkili olacağı düşünülmektedir. Fakat bu kombinasyonun canlıdaki diğer sağlıklı hücrelere nasıl etki edeceği bilinmemekte ve akıllarda bir soru işareti oluşturmaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanoteknolojide son 15 yılda yaşanan gelişmeler, nanopartiküllerin yaygın bir şekilde kullanıma sebep olmuştur. Nanopartiküller tıp, biyomühendislik, tekstil, elektronik, savunma sanayi, otomotiv ve diğer birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Bina kaplamaları ve boyaları, kozmetik ürünler, kişisel bakım ürünleri, ilaç ve gen taşıma sistemleri, kalça protezleri, diş implantları, biyosensörler, gıda katkıları, bebek kıyafeti ve oyuncakları bu alanlardan bazılarıdır. Nanopartiküller ayrıca gen transferi, enzim değişimi ya da hedef dokuya kontrollü ilaç salınımında da kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin bu kadar yaygın kullanılması, insanların bu partiküllere hem direkt ve hem de indirekt yollarla maruz kalmasına sebep olmaktadır. Ancak bu maruziyetin, insan sağlığı üzerinde ne tür etkilere neden olacağı konusunda kesin bir bilgi yoktur. Bu nedenle, son yıllarda, nanopartiküllerin toksik etkileri, özellikle genotoksik etkileri konusundaki endişeler arttığından, bu alanda yapılan çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artış göstermektedir. Yapılan genotoksisite çalışmaları, nanopartiküllerin çeşitli toksik etkiler gösterdiği ve insan sağlığı açısından risk taşıyabileceği yönündedir. Ancak, hem kullanılan nanopartiküllerin çeşitliliği ve hem de nanopartiküllerin şekil, büyüklük, yüzey yükü, agregasyon/aglomerasyon durumu gibi bir birinden farklı özellikte olan formlarının üretiliyor ve kullanılıyor olması nedeniyle, yapılan çalışmalar bu gün için çok yetersiz kalmaktadır.

Bu tez çalışmasında, ticari olarak yaygın şekilde kullanılmalarına rağmen, genotoksik etkileri henüz detaylı şekilde incelenmemiş olan bakır oksit, silika oksit ve demir oksit nanopartiküllerinin insan lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik etkileri, kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve comet testleri ile incelenmiştir. Bu testler, yönergeleri OECD tarafından da yayınlanan ve DNA'da ve kromozomlarda meydana gelen genetik değişimleri ortaya çıkaran testlerdir. Genetik materyaldeki hasar, üreme hücrelerinde gerçekleşirse, direkt olarak gelecek nesilleri etkilemektedir. Somatik hücrelerde meydana gelen genetik hasarlar, çeşitli hastalıklar ve özellikle kanser gelişimi ile bağlantılı olduğundan, DNA ve kromozomlarda hasar oluşturan ajanların tespiti, kanser riskinin belirlenmesi açısından da çok önemlidir. Bu çalışmada incelenen kromozom anormallikleri, kanserin erken habercisi olarak değerlendirilmekte ve kanserin biyo-göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kromozomlardaki yapısal anormallikler, kromozom

kırıklarından, DNA'daki onarılmamış tek ve çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomların oluşumu ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Mikronükleuslar, genotoksik ajanların belirlenmesinde kullanılan bir biyomarkır olup, bu test, anöjenik ve klastojenik etkiler nedeniyle kutuplara çekilemeyen, ya tam kromozom ya da kromozom fragmentlerinden oluşan ve ana çekirdeğe katılmayan küçük çekirdeklerin belirlenmesini sağlamaktadır. Kardeş kromatit değişimi testi de, mutajenler ve kanserojenler tarafından oluşturulan DNA hasarını belirlemede kullanılan hassas bir yöntem olup, bir kromozomun iki kromatitinin homolog bölgelerinden kırılarak, kırılan parçaların simetrik olarak yer değiştirmesi ve yeniden birleşmesini göstermektedir. Comet testi, genotoksisitenin göstergesi olup, DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarının, çapraz bağların ve alkali-label bölgelerin belirlenmesi için kullanılan bir testtir. Tek bir hücredeki, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösteriyor olması ve bir gün gibi kısa sürede sonuçlanabilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Tüm bu testlerin, çekirdek ihtiva eden her türlü hücreye uygulanabilmesi gibi önemli avantajları vardır. Bu dört farklı genotoksisite testinin her biri farklı bir mekanizmaya sahip olup, bunlar bir birini tamamlayıcı niteliktedir ve incelenen nanopartiküllerin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması açısından önemlidir. Bu çalışmada, organizmalar için önemli bir savunma mekanizması olması ve oluşan genotoksik hasara diğer dokulardan daha duyarlı olması nedeniyle periferik insan lenfositleri kullanılmıştır. Çeşitli hastalıkların hem teşhisi ve hem de tedavisinde, nanopartiküller vücutta dolaşan kan yoluyla hedef dokulara ulaştırılmaktadır. Bu nedenle, nanopartiküllerin lenfositlerdeki toksik etkilerinin incelenmesi bu açıdan da önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında incelenen metal oksitlerden silika oksit, bakır oksit ve demir oksit nanopartiküllerinin, insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimleri ve mikronükleus oluşumlarına sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, comet testi ile belirlenen primer DNA hasarlarına da neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6.1). SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin tüm konsantrasyonları, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısında artışlara sebep olmuştur. Bu partiküller, kardeş kromatit sayısında da artışlar oluşturmuştur. Bu partiküllerin mikronükleus frekansında ve comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda da (hem 2 ve hem de 3 saatlik uygulamada) artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan, bu partiküller mitotik indekste azalmaya neden olmuştur. Bakır oksit nanopartiküllerinin de tüm konsantrasyonları insan lenfositlerinde, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda, anormal hücre

frekansı, KA/hücre sayısı ve kardeş kromatit değişiminde artışa sebep olmuştur. Bu partiküllerin, 48 saatlik uygulaması mikronükleus frekansında da artış meydana getirmiştir. Comet testinde hem 2 saatlik ve hem de 3 saatlik uygulama, insan lenfositlerinde primer DNA hasarında artış oluşturarak, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda artışa sebep olmuştur. Mitotik indeks, her iki uygulama süresinde ve tüm dozlarda (24 saatlik uygulama, 25 µg/mL hariç) düşüş göstermiştir. Demir oksit nanopartiküllerinin de uygulanan tüm konsantrasyonları, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, anormal hücre frekansı, KA/hücre sayısı ve kardeş kromatit değişiminde artışlara sebep olmuştur. Bu partiküller, 48 saatlik uygulama sonucunda mikronükleus frekansında da artış oluşturmuştur (39,062 µg/mL hariç). Bu partiküllerin, comet testinde, hem 2 ve hem de 3 saatlik muamelede, tüm konsantrasyonlarda primer DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (kuyruk yoğunluğunda, 2 saatlik uygulama 39,062 µg/mL hariç). Diğer yandan demir oksit nanopartiküllerinin tüm uygulama konsantrasyonları ve süreleri, mitotik indekste düşüşe neden olmuştur.

Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, bu partiküllerin hücre içine alımını ve hücresel cevabı (dolayısıyla toksisitesini) etkiliyor olması nedeniyle, bu çalışmada kullanılan test materyallerinin bazı fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu da yapılmıştır (Çizelge 6.2). Bunun için taramalı elektron mikroskobu ve dinamik ışık saçılımı kullanılmıştır. Elektron mikroskobu analizi ile demir oksit nanopartiküllerinin daha ziyade küresel yapıda olduğu, silika ve bakır oksit nanopartiküllerinin, genel olarak küresel ve kübiğimsi yapıda olmaları ile birlikte, şekilsiz yapıların da bulunduğu belirlenmiştir. Elektron mikroskobundaki ortalama partikül boyutuna göre, nanopartiküllerin büyükten küçüğe doğru  $\text{SiO}_2 > \text{CuO} > \text{Fe}_2\text{O}_3$  şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm nanopartiküllerin aglomeratlar oluşturduğu da gözlenmiştir. Partiküllerin hidrodinamik çaplarının da büyükten küçüğe doğru  $\text{SiO}_2 > \text{CuO} > \text{Fe}_2\text{O}_3$  şeklinde sıralandığı belirlenmiştir.  $\text{SiO}_2$  ( $-31 \pm 1$  mV) ve  $\text{CuO}$  ( $-21 \pm 4$  mV) NP'lerinin negatif yüklü olduğu, en büyük zeta potansiyele sahip olan  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP'lerinin ise pozitif yüklü ( $37 \pm 0,2$  mV) olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre, partikül büyüklükleri, hem elektron mikroskobu ölçümleri ve hem de hidrodinamik çapların ölçümünde benzer sıralama göstermiştir.

Çizelge 6.1. SiO<sub>2</sub>, CuO ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin insan lenfositlerindeki genotoksik etkileri

| Silika oksit |               | Anormal Hücre Yüzdesi | KA/ Hücre | KKD | Mİ | MN |              | Kuyruk yoğunluğu | Kuyruk uzunluğu |
|--------------|---------------|-----------------------|-----------|-----|----|----|--------------|------------------|-----------------|
| 24 saat      | 10 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    | Comet 2 saat | ↑                | ↑               |
|              | 50 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 250 µg/mL     | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 1000 µg/mL    | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              |               |                       |           |     |    |    |              |                  |                 |
| 48 saat      | 10 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  | Comet 3 saat | ↑                | ↑               |
|              | 50 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 250 µg/mL     | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 1000 µg/mL    | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
| Bakır oksit  |               |                       |           |     |    |    |              |                  |                 |
| 24 saat      | 25 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↑  |    | Comet 2 saat | ↑                | ↑               |
|              | 50 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 75 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 100 µg/mL     | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              |               |                       |           |     |    |    |              |                  |                 |
| 48 saat      | 25 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  | Comet 3 saat | ↑                | ↑               |
|              | 50 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 75 µg/mL      | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 100 µg/mL     | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
| Demir oksit  |               |                       |           |     |    |    |              |                  |                 |
| 24 saat      | 39,062 µg/mL  | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    | Comet 2 saat | ↓                | ↑               |
|              | 78,125 µg/mL  | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 156,250 µg/mL | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              | 312,500 µg/mL | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  |    |              | ↑                | ↑               |
|              |               |                       |           |     |    |    |              |                  |                 |
| 48 saat      | 39,062 µg/mL  | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | —  | Comet 3 saat | ↑                | ↑               |
|              | 78,125 µg/mL  | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 156,250 µg/mL | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |
|              | 312,500 µg/mL | ↑                     | ↑         | ↑   | ↓  | ↑  |              | ↑                | ↑               |

↑ Kontrolle göre artış  
 ↓ Kontrolle göre azalış  
 — Kontrolle göre aynı

Çizelge 6.2. Test materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

|                       | SiO <sub>2</sub> | CuO     | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |
|-----------------------|------------------|---------|--------------------------------|
| Ortalama boyut (nm)   | 98±5             | 34,0±2  | 21±1                           |
| En küçük boyut        | 11,6             | 9,7     | 4,9                            |
| En büyük boyut        | 208,3            | 87,0    | 55,7                           |
| Konsantrasyon (µg/mL) | 250              | 75      | 156,25                         |
| Hidrodinamik çap (nm) | 709±9            | 612±4   | 202±7                          |
| Zeta potansiyeli (mV) | -31±1,0          | -21±4,0 | 37±0,2                         |

Uygulanan testlerden elde edilen bu veriler, incelenen nanopartiküllerin genotoksik ve sitotoksik etkili olduğunu, CuO nanopartiküllerinin en yüksek genotoksisiteye sahip olduğunu, SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda genetik hasarlar oluşturduğunu göstermiştir. Toksisite sıralaması CuO > SiO<sub>2</sub> > Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> şeklindedir. Kullanılan partiküllerin toksik etkisi ile boyutu arasında tam bir korelasyon belirlenememiştir. Ancak en küçük boyutlu ve zeta potansiyeli en büyük ve artı yüklü olan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin en az toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Zeta potansiyeli en küçük ve negatif yüklü olan CuO nanopartiküllerinin en güçlü genotoksik etkiye, zeta potansiyeli negatif yüklü ve mutlak değeri daha büyük olan SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin ise orta derecede toksisite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu testlere göre, kullanılan nanopartiküller, hem klastojenik (DNA ve kromozomlarda), hem anöjenik (iğ iplikleri üzerinde) ve hem de mutajenik (DNA'nın primer yapısı üzerinde) etkilidir. Ayrıca bu partiküller sitotoksik etki göstermiştir. Burada kullanılan testlerin, nanopartiküllerin genotoksisitesini belirlemede hassas testler olduğu da bir kez daha doğrulanmıştır.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu ve genotoksisitesi arasındaki ilişkiyi belirleyen detaylı çalışmaların sayısının az olması ve fizikokimyasal özellikler ile toksik etkileri arasındaki ilişkinin değişken olması nedeniyle, nanopartiküllerin karakteristik özelliklerine bağlı olarak toksisitesi hakkında genel bir yorum yapmak şu anda oldukça zordur. Ancak, nanopartiküllerin genotoksik etkileri, bunların detaylı karakterizasyonları ile birlikte değerlendirilerek, bunların toksik etkileri konusunda yeni bilgilere ulaşmamızı sağlamıştır. Bu bilgiler de ileride yapılacak karşılaştırma çalışmalarına daha büyük ışık tutabilecek yeni bilgilere ulaşılmasını sağlayacaktır. Bunlar da nanopartiküllerin hücre, doku ve organlarla nasıl etkileştiğinin belirlenmesi ve nanopartiküllerden daha fazla yararlanabilmemiz

açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, çok farklı tipte nanopartiküllerin, çok farklı türlerde, farklı hücrelerde ve hücre hatlarında, hem *in vitro* ve hem de *in vivo* ortamlarda incelenmesi, tüm insanların ve aynı zamanda tüm canlıların geleceği açısından çok önemlidir. Böylece teknolojide ve özellikle sağlık alanında, en az toksisiteye sahip özellikteki partiküllerin kullanılması sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

- Aguilar, F., Charrondiere, U.R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D.M., Grilli, S., Guertler, R., Kass, G.E.N., Koenig, J., Lambré, C., Larsen, J.C., Leblanc, J.C., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I. and Woutersen., R.A. (2009). Copper(II) oxide as a source of copper added for nutritional purposes to food supplements. **The EFSA Journal**, 1089, 1-15.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B. and Alhadlaq, H.A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396(2), 578–583.
- Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Alakhtani, S. and Ali, B.A. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. **International Journal of Toxicology**, 32(4), 296-307.
- AshaRani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P. and Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, 3(2), 279-290.
- Atlı Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011a). Genetik toksisite testleri. **TÜBAV Bilim Dergisi**, 4(3), 221-229.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. and Kolören, Z. (2011b). The *in vitro* alkaline comet assay in genetic toxicology. **Journal of Applied Biological Sciences**, 5(1), 49-54.
- Auffon, M., Rose, J., Orsiere, T., Meo De, M., Thill, A., Zeyons, O., Proux, O., Masion, A., Chaurand, P., Spalla, O., Botta, A., Wiesner, M.R. and Bottero, J.Y. (2009). CeO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblast *in vitro*. **Nanotoxicology**, 3(2), 161-171.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F. and Misra, S. (2009). Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to Aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow. **Mutation Research**, 676, 41-47.
- Barnes, C.A., Elsaesse, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Lesniak, A., Hanrahan, J.P., De Jong, W.H., Dziubaltowska, E., Stepnik, M., Rndzynski, 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.
- Battal, D., Çelik, A., Güler, G., Aktaş, A., Yildirimcan, S. and Ocakoglu, K. (2015). SiO<sub>2</sub> nanoparticule-induced size-dependent genotoxicity an *in vitro* study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay. **Drug and Chemical Toxicology**, 38(2), 196-204.
- Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W.H., Surprenant, A., Castejon, G.L., 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 cellular barrier. **Nature Nanotechnology**, 4, 876-883.

- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R., Hoffmann, E. and Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(17). doi:10.1186/1743-8977-6-17
- Boffetta, P., Hel, O., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Lazutka J., Cebulska-Wasilewska A., Puskailerova D, Znaor A., Kelecsenyi Z., Kurtinaitis J., Rachtan J., Forni A., Vermeulen R. and Bonassi S. (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: Results of a cohort study from central Europe. *American Journal of Epidemiology*, 165(1), 36-43.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E. and Norppa, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60, 1619-1625.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Wasilewska, A.C., Fabianova, E., Fucic, A., L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H. and Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Molecular Cell Biology*, 9, 297-308.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. and Hofmann, M.C. (2005). *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2), 412-419.
- Brender-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S. and Speit, G. (2005). The *in vivo* comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20(4), 245-254.
- Brown C.S., Kamal M., Nasreen N., Baumuratov A., Sharma P., Antony V.B. and Moudgil B.M. (2007). Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. *Advanced Powder Technology*, 18(1), 69-79.
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Sphon, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. and Stark, W.J. (2006). *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility. *Environmental Science Technology*, 40(4), 4374-4381.
- Bulcke, F., Thiel, K. and Dringen, R. (2014). Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes. *Nanotoxicology*, 8(7), 775-785.
- Chang, J.S., Chang, K.L.B., Hwang, D.F. and Kong, Z.L. (2007). *In vitro* cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environmental Science Technology*, 41(6), 2064-2068.

- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B. and Wan, L. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. ***Toxicology Letters***, 163, 109-120.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Yuan, H., Zhao, F., Liu, R., Chang, X., Gao, X., Wang, T., Jia, G., Ye, C., Chai, Z. and Zhao, Y. (2008). Age related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO<sub>2</sub> nanoparticle inhalation: Nanotoxicity has susceptible population. ***Environmental Science Technology***, 42(23), 8985-8992.
- Choi, A.O., Brown, S.E., Szyf, M. and Maysinger, D. (2008). Quantum dot induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. ***Journal of Molecular Medicine***, 86, 291-302.
- Choi, H.S., Kim, Y.J., Song, M., Song, M.K. and Ryu, J.C. (2011). Genotoxicity of nano silica in mammalian cell line. ***Toxicology Environmental Health Science***, 3(1), 7-13.
- Clarke, D.J., Johnson, R.T. and Downes, C.S. (1993). Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. ***Journal of Cell Science***, 105(2), 563-569.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A. Brunborg, G., Gaiva, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. and Sitetina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. ***Mutagenesis***, 23(3), 143-151.
- Colognato, R., Boneli, A., Bonacchi, D., Baldi, G. and Migliore, P.L. (2007). Analysis of cobalt ferrite nanoparticles induced genotoxicity on human peripheral lymphocytes: Comparison of size and organic grafting-dependent effects. ***Nanotoxicology***, 1(4), 301-308.
- Corradi, S., Gonzalez, L., Thomassen, L.C.J, Bilanicova, D., Birkedal, R.K., Pojana, G., Marcomini, A., Jensen, K.A., Leyns L. and Kirsch-Volders, M. (2012) Influence of serum on in situ proliferation and genotoxicity in A549 human lungcells exposed to nanomaterials, ***Mutation Research***, 745, 21- 27.
- Çalbay, Ö. (2014). *Bakır oksit ve silikon oksit nanopartiküllerinin Allium Cepa'daki genotoksik etkileri*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dar, M.A, Naseem, S., Gatoo, M.A., Arfat, M.Y. and Qasim, K. (2014). *In vivo* toxicity of nanoparticles-modalities and treatment. ***European Chemical Bulletin***, 3(10), 992-1000.
- Di Bucchianico, S., Fabbri, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E. Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E. and Migliore, L. (2013). Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced *in vitro* by differently shaped copper oxide nanomaterials. ***Mutagenesis***, 28(3), 287-299.

- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M. and Melea, 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.
- Dinçer Y ve Kankaya S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde comet assay. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*; 30(4), 1365-1373.
- Doak, S.H., Liu, Y. and Chen, C. (2012). Genotoxicity and Cancer. In B., Fadeel, A., Pietroiusti and A. A. Shvedova (Eds.), *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. USA: Academic Press, pp. 243-261.
- Doğan, İ., Yar, A.S., Ergin, V., Menevşe, S., Menevşe, A. ve Ekmekçi A. (2013). L929 fibroblast hücre hattında topoizomeraz inhibisyonunun DNA onarımı ve apoptozis üzerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 38(2), 229-237.
- Downs, T.R., Crosby, M.E., Hu T., Kumar, S., Sullivan, A., Sarlo, K., Reeder, B., Lynch, M., Wagner, M., Mills, T. and Pfuhler, S. (2012). Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. *Mutation Research*, 745(1-2), 38–50.
- Durmaz, A., Dikmen, N. ve Gündüz, C. (2010). DNA hasar analizinde tek hücre jel elektroforezi. *Archives Medical Review Journal*, 19(4), 236-243.
- Durnev, A.D., Solomina, A.S., Shreder, E.D., Nemova, S.E.P., Shreder, O.V., Dauge-Dauge, N.O., Zhanataev, A.K., Veligura, V.A., Osminkina, A.L., Gongalsky, M.B. and Timoshenko V.Y. (2010). *In vivo* study of genotoxicity and teratogenicity of silica nanocrystals. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1), 70-86.
- Eroğlu, Y., Eroğlu, H.E. and İlbas A.I. (2007). Gamma ray reduces mitotik index in embriyonic roots of *Hordeum vulgare* L. *Advances in Biological Research*, 1(1-2), 26-28.
- Evans, H.J., In Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures (2nd)*. Amsterdam: Elsevier Sciences, 405–427.
- Faed, M. (1983). Sister Chromatid Exchange. *Journal of Medical Genetics*, 20, 238.
- Fahmy, B. and Cormier, A.S. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cell. *Toxicology in Vitro*, 23, 1365–1371.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81–95.
- Fenech, M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-416.

- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003). Human micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534(1-2), 65-75.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J. and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.
- Ficai, D., Ficai, A., Alexie, M., Maganu, M., Guran, C. and Andronescu, E. (2011). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/APTMS Nanoparticles with core-shell structure as potential materials for copper removal. *Revista de Chimie*, 62(6), 622-625.
- Fidan, A.F. (2008) DNA hasar tespitiinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Journal of Science*, 8(1), 53-64.
- Figuerola, A., Corato, D.R., Manna, L. and Pellegrino, T. (2010). From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research*, 62, 126-143.
- Freyria, F.S., Barbara, B., Maura, T., Mara, G., Elena, G., Dario, G., Edoardo, G. and Bice, F. (2012). Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), 850-861.
- Golbamaki, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese, R.L., Benfenati, E., Leszczynski, J. and Cronin M. (2015). Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*, 7(6), 2154-2198.
- 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.
- Gonzalez, L., Puzzonia, M.D.S., Ricci, R., Aureli, F., Guarguaglini, G., Cubadda, F., Leyns, L., Cundari, E. and Kirsch-Volders, M. (2015). Amorphous silica nanoparticles alter microtubule dynamics and cell migration. *Nanotoxicology*, 9(6), 729-736.
- Gonzalez, L., Thomassen, L.C.J., Plas, G., Rabolli, V., Napierska, D., Decordier, I., Roelants, M., Hoet, H.P., Kirschhock, C.E.A., Martens, J.A., Lison, D. and Kirsch-Volders, M. (2010). Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range: A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as model. *Nanotoxicology*, 4(4), 382-395.

- Guichard, Y., Scmith, J., Darne, C., Gate, L., Le Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R. and Witschger, O. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Annals of Occupational Hygiene*, 56(5), 631-644.
- Hanagata, N., Zhuang, F., Connolly, S., Li, J., Ogawa, N. and Xu, M. (2011). Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. *ACS Nano*, 5(12), 9326-9338.
- Hashimoto M. and Imazato S. (2015). Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dental Materials*, 31(5), 556-564.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. and Yin C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666.
- Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios*, 57(228), 7-14.
- Hong, C.S., 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.
- Huang, Y.W., Wu, C. and Aronstam, R.S. (2010). Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from *in vitro* studies. *Materials*, 3(10), 4842-4859.
- Ionescu, M.E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A.G., Gologan, S.I., Arbanas, T. and Diculescu, M. (2011). Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *A Journal of Clinical Medicine*, 6(3), 173-178.
- Internet: Annual Report of the EFSA Scientific Network of Risk Assessment of in Food and Feed for 2014, European Food Safety Authority, EFSA supporting publication 2015: EN-762. URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/762e>, Son Erişim Tarihi: 18.09.2015.
- Internet: URL: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Micronucleus+Tests&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Micronucleus+Tests&lang=1), Son Erişim Tarihi: 18.09.2015.
- Internet: Inventory Finds Increase in Consumer Products Containing Nanoscale Materials. URL: <http://www.nanotechproject.org>, Son Erişim Tarihi: 18.09.2015.
- Internet: This is the First Publicly Available On-line Inventory of Nanotechnology-based Consumer Product <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>, Son Erişim Tarihi: 18.09.2015.
- Jin, Y., Kanan, S., Wu, M. and Zhao, J.X. (2007). Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chemical Research In Toxicology*, 20(8), 1126-1133.

- Jose, G.P., Santra, S., Mandal, S.K. and Sengupta, T.K. (2011). Singlet oxygen mediated DNA degradation by copper nanoparticles: Potential towards cytotoxicity effect on cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(9), 1-8.
- Ju Nam, Y. and Lead, J.R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400, 396-414.
- Karlsson, H.L. (2010). The Comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 368, 651-666.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1726-1732.
- 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, 112-118.
- Kayır, Y.Z. ve Baççıl, E.G. (8 Ekim, 2010). *Nanoteknoloji Nedir*, 15. Uluslararası Metalurji ve Malzeme Kongresinde sunuldu, İstanbul.
- Kesteren, P.C., Cubadda, F., Bouwmeester, H., Eijkeren, J.C., Dekkers, S., De Jong, W.H. and Oomen, A.G. (2015). Novel insights into the risk assessment of the nanomaterial synthetic amorphous silica, additive E551, in food. *Nanotoxicology*, 9(4), 442-452.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V. 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.
- Kocaefe, Ç. (2007). Nanotıp: Yaşam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 33-38.
- Kontaş, S., Atlı Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011). Kardeş kromatid değişimi testi ve kullanım alanları. *TÜBAV Bilim Dergisi*. 4(4), 226-234.
- Koo, Y.E.L., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schnedier, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A., Ross, B.D. and Kopelman, R. (2006). Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms. *Advanced Drug Delivery*, 58(14), 1556-1577.
- Könczöl, M., Weiß, A., Gminski, R., Merfort, I. and Mersch-Sundermann, V. (2013). Oxidative stress and inflammatory response to printer toner particles in human epithelial A549 lung cells. *Toxicology Letters*, 216, 171-180.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P. and Georgakilas, A.G (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711, 193-201.

- Kumar, C.S.S. and Mohammad, F. (2011). Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 789-808.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P. and Jha A.N. (2009). Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53-64.
- Kung, M.L., Hsieh, S.L., Wu, C.C., Chu, T.H., Lin, Y.C., Yehf, B.W. and Hsieh, S. (2015). Enhanced reactive oxygen species overexpression by CuO nanoparticles in poorly differentiated hepatocellular carcinoma cells. *Nanoscale*, 7, 1820-1829.
- Kwon, J.Y., Koedrich, P. and Seo, Y.R. (2014). Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models *in vitro and in vivo*: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations. *International Journal of Nanomedicine*, 9(2), 271-286.
- Laha, D., Pramanik, A., Maity, J., Mukherjee, A., Pramanik, P., Laskar, A. and Karmakar, P. (2014). Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1-9.
- Lankoff, A., Arabski, M., Wegierek-Ciuk, A., Kruszewski, M., Lisowska, H., Banasik-Nowak, A., Rozga-Wijas, K., Wojewodzka, M. and Slomkowski, S. (2013). Effect of surface modification of silica nanoparticles on toxicity and cellular uptake by human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Nanotoxicology*, 7(3), 235-250.
- Lanone, S. and Baczkowski, J. (2006). Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: Molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 6(6), 651-663.
- Lazutka, J.R. and Margolin, B.H. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: Methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17(3), 188-195.
- Lee, J.H., Ju, J.E., Kim, B., Pak, P.J., Choi, E.K., Lee, H.S. and Chung N. (2014). Rod shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(12), 2759-2766.
- Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D. and Ma, Y. (2006). Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *International Journal of Toxicology*, 25, 451-457.
- Lindberg, H.K., Falck, G.C., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K. and Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Toxicology Letters*, 186(3), 166-173.
- Liu, S., Han, Y., Yin, L., Long, L., and Liu, R. (2008). Toxicology studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticle *in vivo*. *Advanced Materials Research*, 47(50), 1097-1100.

- Liu, Y., Xia, Q., Liu, Y., Zhang, S., Cheng, F., Zhong, Z., Wang, L., Li, H. and Xiao K. (2014). Genotoxicity assessment of magnetic iron oxide nanoparticles with different particle sizes and surface coatings. *Nanotechnology*, 25(42) 425101 doi:10.1088/0957-4484/25/42/425101.
- Lopez Moreno, M.L., Rosa, G., Hernandez-Viezcas, J.A., Michel, H.C., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J.L. (2010). Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soybean plants. *Environmental Science Technology*, 44(19), 7315-7320.
- Lu, X., Zhu, T., Chen, C. and Liu, Y. (2014). Right or left: The role of nanoparticles in pulmonary diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17577-17600.
- M'Bemba-Meka, P., Lemieux, N. and Chakrabarti, K.S. (2007). Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Archives of Toxicology*, 81(2), 89-99.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V. and Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity: A review of *in vitro* and studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233-278.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Aksoy, H. (2012). Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro*. *Cytotechnology*, 64(5), 553-562.
- Marano, F., Hussian, S., Rodrigues, L. F., Baeza-Squiban, A. and Boland, S. (2011). Nanoparticles: Molecular targets and cell signalling. *Archives Toxicology*, 85, 733-741.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: Induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88 (11), 1515-1531.
- McArt, D.G., McKerr, G., Saetzler, K., Howard, C.V., Downes, C.S. and Wasson, G.R. (2010). Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis*, 25(3), 299-303.
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H.L., Elihn, K., Möller, L., Leygraf, C. and Wallinder, I.O. (2009). Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: A cross-disciplinary study. *Small*, 5(3), 389-399.
- Misra, S.K., Nuseibeh, S., Dybowska, A., Berhanu, D., Tetley, T.D. and Valsami-Jones, E. (2014). Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. *Nanotoxicology*, 8(4), 422-432.

- Mitrano, M.D., Motellier, S., Clavaguera, S. and Nowack B. (2015). Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International*, 77, 132-147.
- Music, S., Vincekovic, F.N. and Sekovanić, L. (2011). Precipitation of amorphous SiO<sub>2</sub> particles and their properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 89-94.
- Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Lison, D., Martens, J.A. and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: Another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(39), 1-32.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M., Ahmed, F.J., Maitra, A., Prashant, C. and Dinda, A. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 983-989.
- Natarajan, A.T. (2002). Chromosome aberrations: Past, present and future. *Mutation Research*, 504, 3-16.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, L.I., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Sram, R.J., Kunudsen, L.E., Barale, R. and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, 600, 37-45.
- 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.
- Paget, V., Sergent, J.A. and Chevillard, S. (2011). Nano-silicon dioxide toxicological characterization on two human kidney cell lines. *Journal of Physics: Conference Series*, 304(1), 1-11.
- Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E. and Case, C.P. (2007). The effect of nano and micron sized particles of cobalt chromium alloy on human fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*, 28(19), 2946-2958.
- Park, E.J. and Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Letters*, 184(1), 18-25.
- Perreault, F., Melegari, S.P., Costa, H.C., Rossetto, Oliveria, A.L.F., Popovic, R. and Matias, G.M. (2012). Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. *Science of the Total Environment*, 441, 117-124.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156-158.
- Petushkov, A., Ndiege, N., Salem, A.K. and Larsen, S.C. (2010). Toxicity of silica nanomaterials: zeolites, mesoporous silica and amorphous silica nanoparticles. *Advances in Molecular Toxicology*, 4, 223-266.

- Piercione, B.K., Li, Y., Yassen, A.A., Colhoun, L.M., Schaccar, R.A. and Chen, W. (2010). Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. *Nanotechnology*, 21(3), 035102.
- Rahi, A., Sattarahmady, N. and H. (2014). Toxicity of nanomaterials-physicochemical effects. *Austin Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 2(6), 1737-1754.
- Rajakariar, R., Lawrence, T., Bystrom, J., Hilliard, M., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M. and Gilroy, W.D. (2008). *Blood*, 111(8), 4184-4192.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsenbatt, M.E., Montero, R., Rodríguez, R. and Ostrosky-Wegman P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-cancer Drugs*, 4(6), 637-640.
- Sadiq, R, Khan, Q.M., Mobeen, A. and Hashmat, A.J. (2015). *In vitro* toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(2), 152-161.
- Shilo, M., Sharon, A., Baranes, K., Motiei, M., Lellouche, J.P.M. and Popovtzer, P. (2015). The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: An *in-vitro* endothelial cell model. *Journal of Nanobiotechnology*, 13,(19), DOI 10.1186/s12951-015-0075-7.
- 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.
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Nelson, C.B., Marquis, B.J., Maffei, T.G.G., Brown, A.P., Williams, P.M., Wright, C.J. and Doak S.H. (2012). The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33, 163-170.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffith, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J. and Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891-3914.
- Singh, S.P., Rahman, M.F., Murty, U.S.N., 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, 56-66.
- Song, M.F, Li, Y.S., Kasai, H. and Kawai, K. (2012). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(3), 211-216.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Molecular and Cell Biology*, 19(7), 5166-5169.

- Soto, K., Garza, K.M. and Murr L.E. (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*, 3(3), 351-358.
- Soysal, Y., Şahin, F.İ. ve Menevşe, S. (2008). İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve b-karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatit değişimi sıklığı üzerine *in vitro* etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15(3), 23-29.
- Speit, G. and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosome, II. differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Human Genetics*, 70, 126-129.
- Sun, T., Yan, Y., Zhao, Y., Guo, F. and Jiang, C. (2012). Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *Plos*, 7(8), doi:10.1371/ journal.pone, 0043442.
- Sun, T., Zhang, S.Y., Pang, B., Hyun, D.C., Yang, M. and Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(46), 1320-1364.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. and Lenhardt, M. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity, by sum of ranking differences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4879-4885.
- Tarantini, A., Huet, S., Jarry, G., Lancelur, R., Poul, M., Tavares, A., Vital, N., Louro, H., João Silva, M. and Fessard, V. (2015). Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: Oral route. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 218-227.
- Türk-Şengel, C.T., Hasçıçek, C. ve Gönül, N. (2007). Beyne ilaç hedeflenmesinde nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler. *Journal of Neurological Sciences*, 24(3), 12, 254-263.
- Ünal, F., Taner, G., Yüzbaşıoğlu, D. and Yilmaz, S. (2013). Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 65(4), 553-565.
- 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.
- Vodenkova, S., Polivkova, Z., Musak, L., Smerhovsky, Z., Zoubkova, H., Sytarova, S., Kavcova, E., Halasova, E., Vodickova, L., Jiraskova, K., Svoboda, M., Ambrus, M., Hemminki, K. and Vodick, P. (2015). Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis*, 30(4), 557-563.

- 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, 808-815.
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J.C., Qu, P. and Xing, B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export and genotoxicity. ***Chemical Research in Toxicology***, 25(7), 1512-1521.
- Warheit, D.B. (2008). How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization. ***Toxicological Sciences***, 101(2), 183-185.
- Wilson, III D.M. and Thompson, L.H. (2007). Molecular mechanism of sister chromatid exchange. ***Mutation Research***, 616(1-2), 11-23.
- Wu, Y., Tang, W., Wang, P., Liu C., Yuan, Y. and Qian, J. (2015). Cytotoxicity and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles in human cancer cells. ***Particle and Particle Systems Characterization***, 32(7), 779-787.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert B., Shi H., Joanne, I.Y., Jeffrey I. Z. and Andre E.N. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. ***Journal of Biological Chemistry***, 283(43), 28958-28968.
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H. and Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. ***Journal of Applied Toxicology***, 29(1), 69-78.
- Yang, L. and Watts, J.D. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. ***Toxicology Letters***, 158(2), 122-132.
- Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z.P., Xiong, Y., Lai, W., Xu, H. and Wei, H. (2015). Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. ***Nanoscale***, 7, 625-636.
- Ying, E. and Hwang, H.M. (2010). *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. ***Science of the Total Environment***, 408, 4475-4481.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. ***Mutation Research***, 604(1), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. and Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. ***The Journal of Food***, 39(3), 179-186.
- Zeiger, E. (2010). ***Genetic Toxicology Testing***. USA: Chapel Hill, NC, pp. 139-158.

Zucker, R.M., Adams, D.J., Bair, K.W. and Elstein, K. (1991). Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition: A flow cytometric assessment. ***Biochemical Pharmacology***, 42(11), 2199-2208.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SAYGILI, Yasemin  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 12.03.1981, Kırşehir  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : 0 (535) 409 02 43  
 e-mail : Yaseminsaygili@gazi.edu.tr



### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                    | Mezuniyet tarihi |
|---------------|----------------------------------|------------------|
| Yüksek lisans | Kırıkkale Üniversitesi /Biyoloji | 2007             |
| Lisans        | Kırıkkale Üniversitesi /Biyoloji | 2004             |
| Lise          | Mehmet Akif Ersoy Süper Lisesi   | 1999             |

### İş Deneyimi

| Yıl       | Yer                    | Görev                       |
|-----------|------------------------|-----------------------------|
| 2008-2009 | Kırıkkale Üniversitesi | Öğretim Görevlisi (ücretli) |
| 2010-2011 | Gazi Üniversitesi      | Kısmi zamanlı asistan       |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

Saygılı, Y., Ünal, F.,Yüzbaşıoğlu, D. and Demirtaş, F (2012, 26-28 April). *In vitro genotoxic effects of silicon dioxide nanoparticles in human lymphocytes*. Paper presented at the Nanosafety Congress, Antalya, Turkey.

Saygılı, Y., Ünal, F., Demirtaş, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2012, 24-26 Eylül). *Amorf silika nanopartiküllerinin in vitro insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin mikronukleus testi ile belirlenmesi*. Paper presented at the First International Biology Congress, Bishkek, Kyrgyzstan.

- Saygılı, Y., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2013, 24-28 June). *Evaluation of the genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in human lymphocytes by sister chromatid exchanges*. Paper presented at the 9th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Erzurum, Turkey.
- Saygılı, Y., Ünal, F., Erol, O., Suludere, Z. and Yüzbaşıoğlu, D. (2014, 2-6 June) *Genotoxic effect of copper oxide nanoparticles on human lymphocytes by comet assay*. Paper presented at the 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo, Bosnia Herzegovina.
- Saygılı, Y., Ünal, F., Suludere, Z., Erol, O. and Yüzbaşıoğlu, D. (2014, 2-6 June). *Geneotoxicity induced by silica nanoparticles*. Paper presented at the 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo, Bosnia Herzegovina.
- Saygılı, Y., Ünal, F., Suludere, Z., Erol, Ö. and Yüzbaşıoğlu, D. (2015, 22-25 June). *Assessment of iron oxide nanoparticles genotoxicity in human peripheral lymphocytes in vitro*. Paper presented at the 11th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Ankara, Turkey.
- Saygılı, Y., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2012, 15-18 Kasım). *Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human lymphocytes by micronucleus assay*. 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresinde sunuldu, Antalya.
- Saygılı, Y., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2013, 2-4 Ekim). *Gıda katkı maddesi amorf silika nanopartiküllerinin genotoksik etkilerinin in vitro insan lenfositlerinde kardeş kromatit değişimi testi ile belirlenmesi*. İç Anadolu Bölgesi 1. Tarım ve Gıda Kongresinde sunuldu, Niğde.
- Saygılı, Y., Ünal, F., Suludere, Z., Yüzbaşıoğlu, D. ve Erol, Ö. (2014, 23-27 Ekim). *Bakır oksit nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde in vitro genotoksik etkileri*. Uluslararası Katılımlı 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, Eskişehir.

### **Hobiler**

Kitap okuma. zumba, yürüyüş



*GAZİ GELECEKTİR..*