



**ÇUBUK BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT VE PEDOT KAPLI ÇUBUK
BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

İrem Funda DURAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2019

İrem Funda DURAN tarafından hazırlanan “ÇUBUK BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT VE PEDOT KAPLI ÇUBUK BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN GENOTOKSİK ETKİLERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Fatma ÜNAL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan : Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 13/12/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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.

İrem Funda DURAN

13/12/2019

ÇUBUK BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT VE PEDOT KAPLI ÇUBUK BENZERİ TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

İrem Funda DURAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Nanoteknolojide oldukça yaygın olarak kullanılan nanopartiküller (NP'ler), sahip oldukları boyutları (<100 nm) sayesinde termal ve kimyasal dayanıklılık, yüksek gerilim direnci, opaklık ve saydamlık gibi birçok olağandışı özellikler ve işlevsellikler kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda NP'lerin kazandığı bu avantajların canlılar ve ekosistem üzerinde dezavantajlara neden olabileceği belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, nanoteknolojide sıkça kullanılan metal oksitlerden çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülünün (TiO_2 -ÇNP), poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (Pedot-Pd) kaplı çubuk benzeri TiO_2 NP'sinin (Ç/Pd TiO_2 -NP) ve kaplama maddesi olan Pedot polimerinin genotoksik etkilerini araştırmaktır. Bunun için, insan periferik lenfositleri, TiO_2 -ÇNP ve Ç/Pd TiO_2 -NP'sinin 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile, Pd polimerinin ise 5, 10, 25, ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bu partiküllerin etkileri, kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile analiz edilmiştir. Ayrıca bu üç NP'nin mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerindeki etkileri de incelenmiştir. TiO_2 -ÇNP'leri, kromozom anormallikleri açısından en etkili partiküldür (48 saatlik uygulamada tüm dozlar anlamlı). Ç/Pd ve pedot NP'leri benzer ve çok daha düşük etkilidir. KKD frekansı, TiO_2 -ÇNP'lerinin 24 saatlik uygulamasında tüm konsantrasyonlarda artış (100 $\mu\text{g/mL}$ hariç), Ç/Pd TiO_2 -NP'ünde ise azalma göstermiştir. Pd NP'sinin 24 saatlik uygulamasında en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar KKD frekansında artışa neden olmuştur. Mikronükleus testinde, Pd NP'sinin 5 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarında bir artış olduğu, bunlardan sadece 25 $\mu\text{g/mL}$ 'nin anlamlı olduğu belirlenmiştir. TiO_2 -ÇNP ve Ç/Pd TiO_2 NP'leri, Mİ'te tüm konsantrasyonlarda düşüşe sebep olmuştur. Bu düşüşler, her iki NP için de 24 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyonda, 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda (Ç/Pd TiO_2 için 50 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ hariç) anlamlıdır. Pd NP'ü 48 saatlik uygulamada, sadece 25 $\mu\text{g/mL}$ 'de mitotik indekste anlamlı düşüş oluşturmıştır. Bu azalışlar Pd NP'ünde mitotik indekste 48 saatlik uygulamada, sadece 25 $\mu\text{g/mL}$ 'de anlamlı düzeydedir. Replikasyon ve nükleer bölünme indekslerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bütün bu sonuçlar, her üç nanopartikülün zayıf sitotoksik, klastojenik/anöjenik ve mutajenik olduğunu ancak nanopartiküllerin genotoksik etkisi konusunda daha detaylı araştırmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : Nanopartikül, titanyum dioksit, pedot, genotoksisite, kromozomal anormallik testi, mikronükleus testi, kardeş kromatit değişimi testi
Sayfa Adedi : 109
Danışman : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

GENOTOXIC EFFECTS OF ROD LIKE TITANIUM DIOXIDE AND PEDOT COATED ROD LIKE TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

(M. Sc. Thesis)

İrem Funda DURAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

Nanoparticles, which are widely used in nanotechnology, have gained many unusual features and functionalities such as thermal and chemical resistance, high voltage resistance, opacity and transparency due to their size (<100 nm). Despite their advantages, nanoparticles have been determined to cause some disadvantages on living organisms and ecosystems. The aim of this study is to investigate the genotoxic effects of Rod like TiO₂ nanoparticles (TiO₂-ÇNP), one of the most widely used metal oxide NPs, poly (3,4-ethylenedioxythiophene (Pedot) coated Rod TiO₂ NPs (Ç/Pd TiO₂-NP) and coating polimer Pedot. Human lymphocytes were treated with 50, 100, 250 and 500 µg/mL concentrations of TiO₂-ÇNPs and Ç/Pd TiO₂-NPs, and 5, 10, 25, and 50 µg/mL concentrations of pedot polymer for 24 h and 48 h. Effects of all these nanoparticles were investigated using chromosome aberrations (CA), sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) tests. In addition, effects of these nanoparticles on mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index (NBI) were also determined. TiO₂-ÇNPs was the most effective particle in the induction of CAs (significant at all the concentrations at 48 h and, 2 concentrations at 24 h). R/Pd TiO₂-NPs and pedot NPs have similar and very low effect on CAs. TiO₂-ÇNPs increased the number of SCEs (except 100 µg/mL) whereas Ç/Pd TiO₂-NPs decreased the number of SCEs. Pd NPs increased the number of SCEs at the lowest and the highest concentrations. In MN assay, only 5 ve 25 µg/mL concentrations of Pd nanoparticles increased the frequency of MN. Among them, only 25 µg/mL was significant. MI decreased at all the concentrations of TiO₂-ÇNPs and Ç/Pd TiO₂ NPs. However, this decrease was significant at the lowest concentration at 24 h for both NPs, and at all the concentrations (except 50 ve 250 µg/mL for Ç/Pd TiO₂ NP) at 48 h. Pd NPs significantly decreased MI at only 25 µg/ml at 48 h. Replication and nuclear division indexes were affected by neither of these nanoparticles. All these results show that all of the three nanoparticles had low cytotoxic, clastogenic/aneugenic and mutagenic effects therefore some more studies should be carried out on the genotoxic effects of NPs.

Science Code : 20316

Key Words : Nanoparticles, titanium dioxide, pedot, genotoxicity, chromosomal aberration, micronucleus, sister chromatid exchange

Page Number : 109

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her konuda desteğini aldığım, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarım sırasında gerek yardımları gerek dostukları ile her zaman yanımda olan Araş. Gör. Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, Esra ERİKEL'e ve laboratuvarında çalışan tüm lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu süreçte beni her zaman yüreklendiren mesai arkadaşlarıma, eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan babam Etnan DURAN'a, annem Ayla DURAN'a ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nanoteknolojinin Gelişim Aşamaları.....	5
2.2. Nanomateryalların Nanoteknolojideki Kullanım Alanları.....	5
2.3. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	7
2.4. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi ve Toksisitesi	9
2.5. Nanopartiküllerin Genotoksisitesi ve Etkileyici Faktörleri	14
2.6. Nanomateryaller ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	21
2.7. TiO ₂ NP ile yapılan genotoksisite çalışmaları.....	23
2.8. Genetik Toksisite Testleri.....	27
3. MATERYAL METOT.....	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Test materyalleri	31
3.2. Metot	34

Sayfa

3.2.1. Kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testlerinin uygulanması.....	35
3.2.2. Mikronükleus testinin uygulanması.....	37
3.2.3. İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Çubuk Benzeri Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Etkileri	39
4.1.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri	39
4.1.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri	43
4.1.3. Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri.....	45
4.2. Pedot Kaplı Çubuk Benzeri Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Etkileri.....	46
4.2.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri	46
4.2.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri	51
4.2.3. Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri.....	53
4.3. Pedot Nanopartiküllerinin Etkileri	55
4.3.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri	55
4.3.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri	59
4.3.3. Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri.....	62
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	87
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Titanyum dioksit ve Pedot nanopartiküllerinin LD ₅₀ ve LC ₅₀ dozları	35
Çizelge 4.1. Çubuk benzeri TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi	40
Çizelge 4.2. Çubuk benzeri TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi	43
Çizelge 4.3. Çubuk benzeri TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi	45
Çizelge 4.4. Ç/Pd TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi	48
Çizelge 4.5. Ç/Pd TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi	52
Çizelge 4.6. Ç/Pd TiO ₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi	54
Çizelge 4.7. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi	56
Çizelge 4.8. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi	60
Çizelge 4.9. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi	62

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. 2014 yılına ait tüketici ürün envanteri raporunda en sık kullanılan ürünlerin grafiği.....	6
Şekil 2.2. Tüketici ürün envanteri 2014 yılı raporuna göre nanomalzemelerin üretim ve dağılımları	7
Şekil 4.1. TiO ₂ -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etkisi.....	40
Şekil 4.2. TiO ₂ -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi.....	41
Şekil 4.3. TiO ₂ -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.4. TiO ₂ -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.5. TiO ₂ -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.6. Ç/Pd TiO ₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etkisi.	48
Şekil 4.7. Ç/Pd TiO ₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi.....	49
Şekil 4.8. Ç/Pd TiO ₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.9. Ç/Pd TiO ₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.10. Ç/Pd TiO ₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.11. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etkisi	57
Şekil 4.12. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi.....	57
Şekil 4.13. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.14. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi	61
Şekil 4.15. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi.....	63
Şekil 5.1. İnsan periferik kan lenfositlerinde gözlenen etkiler.....	85

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. TiO_2 -ÇNP'lerinin fotoğraf görüntüsü ve kimyasal formülü	32
Resim 3.2. Ç/Pd TiO_2 NP'lerinin fotoğraf görüntüsü ve kimyasal formülü	33
Resim 3.3. Pedot NP'lerinin fotoğraf görüntüsü ve kimyasal formülü	34
Resim 4.1. TiO_2 -ÇNP'lerinin insan lenfositlerindeki kromozomal anormallikleri	42
Resim 4.2. TiO_2 -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi	45
Resim 4.3 TiO_2 -ÇNP'lerinin insan lenfositlerindeki bir mikronükleuslu binükleat hücre	46
Resim 4.4. Ç/Pd TiO_2 NP'lerinin insan lenfositlerinde görülen kromozom anormallikleri	50
Resim 4.5. Ç/Pd TiO_2 NP'lerinin insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişiklikleri	53
Resim 4.6. Ç/Pd TiO_2 NP'lerinin insan lenfositlerindeki binükleat hücreler	55
Resim 4.7. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde görülen kromozom anormallikleri ..	58
Resim 4.8. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişiklikleri.....	61
Resim 4.9. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerindeki binükleat hücreler	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
°C	Santigrat derece
mL	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı
mA	Miliamper

Kısaltmalar

Açıklamalar

Ag NP	Gümüş Nanopartikülleri
Au NP	Altın Nanopartikülleri
BEAS-2B	Bronşo epitelyal hücreleri
BrdU	Bromodeoksiüridin
CHO	Çin hamsteri ovaryum hücreleri
CNT	Karbon Nanotüpleri
Cyt-B	Sitokalsin-B
C20	Fullerenler
C60	Fullerenler
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit
FeNP	Demir nanopartikülleri
FPG	Formamidopirimidin glikozilaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KA	Kromozoomal anormallik

Kısaltmalar**Açıklama**

KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatid değişimi
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NM	Nanomateryal
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
Pb	Kurşun
PBS	Fosfat Tamponu
Pd	Pedot
PNP	Polimer Nanopartikülleri
Rİ	Replikasyon indeksi
TiO₂-ÇNP	Çubuk benzeri titanyum dioksit
Ç/Pd TiO₂	Pedot kaplı çubuk benzeri titanyum dioksit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TiO₂ NP	Titanyum dioksit nanopartikülleri
UV	Ultraviyole
ZnO NP	Çinko oksit nanopartikülleri

1. GİRİŞ

Nanoteknolojinin başlangıcı, Amerikalı Fizikçi Richard Feynman'ın 1959'da yapmış olduğu ve atomların ya da moleküllerin çok küçük boyutlara ayrılarak kullanılabileceğini vurguladığı "Aşağıda Daha Çok Yer Var" adlı konuşmasına dayanmaktadır. Bu araştırma alanına nanoteknoloji terimini kazandıran ilk isim ise Japon araştırmacı Norio Taniguchi olmuştur. Devam eden çalışmalar ile 1981'de Gerd Binnig ve Gerhard Rohrer tarafından Taramalı Tünelleme Mikroskobu (Scanning Tunneling Microscopy, STM), 1985'de Robert Curl, Harold Kroto ve Richard Smalley tarafından ise fullerenler bulunmuştur. Karbon nanotüpünün 1991'de keşfini takiben, 2001'den itibaren nanopartiküllerin (NP) askeri alanda kullanımı için araştırmalara başlanmıştır. NP'ler bugün kişisel bakım ve kozmetik, savunma, hastalıkların tanı ve teşhisi, ilaç iletimi ve tıbbi görüntüleme, bilişim ve elektronik, otomotiv, biyoteknoloji, biyomedikal, biyosensörleme, yiyecek ve içecek, tekstil, spor ve aksesuar, optik cihazlar, yenilenebilir enerji ve çevre, makine, inşaat ve su arıtma endüstrileri gibi çok geniş alanlarda kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin temel yapısı olan nanopartiküller, sentezlendikleri ana maddelerden daha küçük boyutlara (<100 nm), daha az kimyasal ağırlığa ve daha geniş yüzey alanına sahiptir. Bu özellikler nanopartiküllere olağandışı özellikler ve işlevsellikler kazandırmakta ve onları daha reaktif hale getirmektedir. Kazanılan reaktif özellikler arasında geniş yüzey alanı, termal ve kimyasal dayanıklılık, ısı ve elektrik yalıtımı, yüksek hidrofobiklik, gerilim direnci, opaklık ve saydamlık gibi daha birçok özellik sayılabilir. NP'ler kazanmış oldukları bu yeni özellikler ile nanoteknolojideki kullanım alanlarını hızla artırmakta ve bu kullanım alanlarının vazgeçilmezi haline gelmektedir.

NP'lerin birçok avantajları nedeniyle bu kadar yaygın kullanılmaya başlanması, bilim insanlarını, bu nanopartiküllerin canlılar ve ekosistem üzerinde bir risk oluşturup oluşturmadığı konusunda araştırmalar yapmaya teşvik etmiştir. Çünkü, nanopartikülleri cazip hale getiren yeni özellikleri, onları aynı zamanda canlılar ve biyolojik moleküller ile daha reaktif şekilde etkileşimine de sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda bazı nanopartiküllerin canlılar ile etkileşimi sonucunda çeşitli hücre tiplerinde, canlı türlerinde ve ekosistemde herhangi bir risk oluşturmadığı ifade edilirken, bazı NP'lerin çeşitli toksik etkileri ve özellikle genotoksik etkileri olabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle son 20 yıldır

nanomateriyallerin (NM) toksik etkileri ve özellikle genotoksik etkileri konusundaki araştırmalar yoğunluk kazanmaya başlamıştır.

En yaygın kullanılan metal oksit NP'lerinden biri olan TiO_2 NP'ü kendi kendini temizleyebilen, antibakteriyel, fotokatalitik ve ultraviyole koruma gibi özel fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir. Bu nedenle TiO_2 NP'leri güneş koruyucu, beyazlatıcı pigment, gıda renklendiricisi ve antibakteriyel olarak, ayrıca kozmetikte şampuan, deodorant, yaşlanma karşıtı ve nemlendirici bakım kremleri, diş macunları, fondoten, pudra ve allık gibi makyaj ürünlerinde geniş kullanım alanlarına sahiptir. Doğal olarak oluşabilen ve üç farklı kristal forma (anataz, rutil ve brookit) sahip olan TiO_2 NP'lerinin son yıllarda bu kadar yaygın şekilde kullanılması, bunların toksik ve özellikle genotoksik etkileri konusunda bazı endişeleri de beraberinde getirmektedir. Yapılan araştırma sonuçlarına göre, TiO_2 NP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olup olmadığı konusunda henüz bir netlik söz konusu değildir. Ancak, International Agency for Research on Cancer (IARC, 2010) raporlarından elde edilen verilere göre, titanyumun ratlarda akciğer kanserine neden olabildiği ve dolayısıyla bu NP'lerin insanlar üzerinde de kanserojenik potansiyeli olduğu belirtilmiştir.

Nanopartiküller tek başına çekirdek, kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilere sahip olarak kullanılabildikleri gibi, metal, metal alaşımı, seramik ve polimerlerle karıştırlarak veya bu maddelerle kaplanmak suretiyle de kullanılabilmektedir. Kaplama maddelerinden olan polimerler vücutta iyi dağılım gösteren, kanser tedavisinde kullanılan, esnek, üretimi kolay, optik ve iyi bir film olması gibi özellikler göstermektedir. Polimerler arasında en çok kullanılan politiyofen polimeri türevlerinden olan poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT), özellikle bataryalarda (karşıt elektrot) güneş enerjisi elde edilen hücrelerin verimini arttırmada, sensörlerde, elektrokimyasal kapasitör ve korozyon engelleyici olarak kullanılmaktadır. NP'lerin etkinliğinin arttırılmasında en başarılı polimer grubundan olan Pedot NP'ünün oldukça geniş kullanım alanına sahip olmasına rağmen, canlılar üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olup olmadığı hakkında herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri, pedot kaplı çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin ve pedot nanopartiküllerinin insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik olup olmadığını belirlemektir. Bu amaca ulaşmak için adı geçen nanopartiküller,

kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknolojinin Gelişim Aşamaları

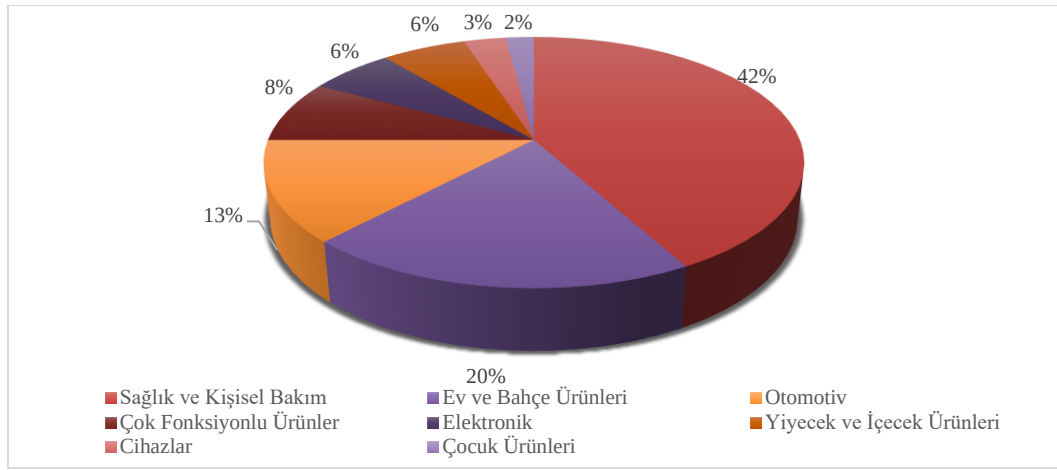
Nanoteknoloji hayatımıza 1959 yılında Richard Feynman'ın "Aşağıda Daha Çok Yer Var" adlı konuşması ile girmiştir. Bu yeni teknolojik gelişmenin günümüze kadar olan aşamaları araştırmacılar tarafından dört farklı döneme ayrılmıştır. Başlangıcından itibaren 2000'li yılların başına kadar olan gelişmelerde pasif nanoyapılar (Nano kaplamalar, nanotüpler, metal, polimer, seramikten yapılmış nano yapılar) üretilmiş ve geliştirilmiştir. Bu süreçte "nanoteknoloji" terimini ilk kez kullanan araştırmacı 1974 yılında Norio Taniguchi olmuştur. 1981 yılında Gerd Binnig ve Gerhard Rohrer taramalı tüneli mikroskopunu (STM) tasarlamışlardır. İlk nanoteknoloji kitabı 1986 yılında Eric Drexler tarafından yazılmış ve ilk nanoteknoloji şirketi 1997 yılında Zynex tarafından kurulmuştur. Süperörgü nanotellerin üretilmesi 2002 yılında gerçekleşmiştir. Nanomekanik sistemler için ilk merkez 2004 yılında kurulmuştur (Beykaya ve Çağlar, 2016; Sayiner ve Çomoğlu, 2016).

Yukarıdaki gelişmelerden sonra ikinci dönemde (~2005-2010) elde edilen yapılar aktif nanoyapılar olarak adlandırılmıştır. Bu dönemde transistörler, hücre içi analizlerde ajan olarak kullanılan biyolojik ve biyolojik olmayan sensörler, hedefe giden ilaç ve çeşitli kimyasallar üretilmiştir. Üçüncü dönemde ise hücre içi manipülasyonlar ve yapay sistemlerin kendi kendini onarabilmesi için nanoaraçlar ve üç boyutlu nanosistemler üretilmiş ve kullanıma geçilmiştir. Son dönem olarak değerlendirilen süreçte üç boyutlu nanosistemler üzerinde her molekülün özel yapıda ve farklı özelliklerde olduğu heterojen nanosistemler üzerine çalışmalar yapılmakta ve süreç hala devam etmektedir (İlyasoğlu ve El, 2010).

2.2. Nanomateriyallerin Nanoteknolojideki Kullanım Alanları

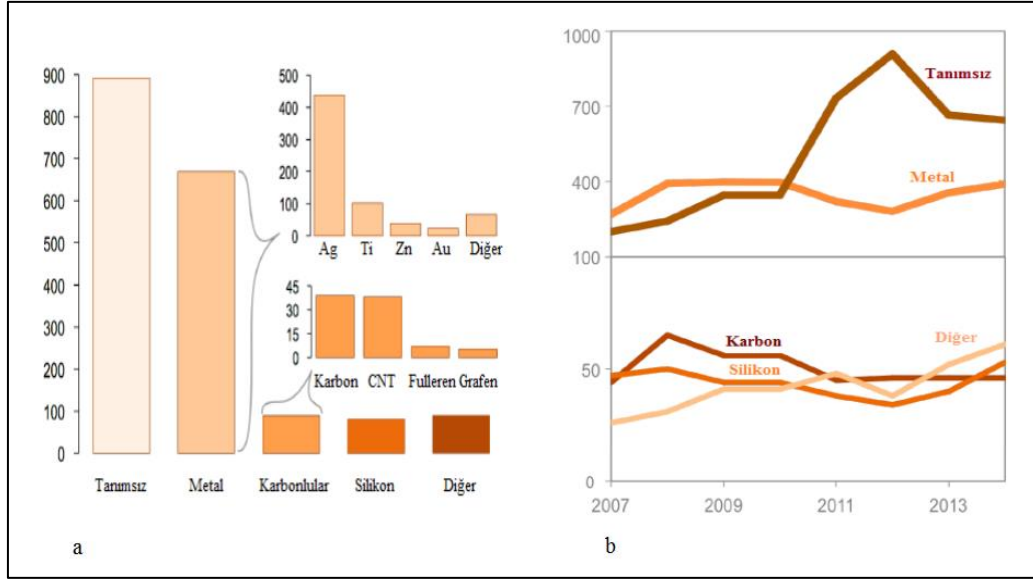
Nanobilim ve nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, birçok tüketici ürününün laboratuvar ortamından mağaza raflarına ve e-ticaret web sitelerinde tüketicilerin kullanımına hazır hale gelebilmesinde büyük imkanlar sağlamıştır. Nanoteknolojinin tüketici pazarındaki etkisini belgelemek için, Woodrow Wilson Uluslararası Bilim Adamları Merkezi ve Yeni Gelişen Nanoteknoloji Projesi, Nanoteknoloji Tüketici Ürün Envanteri'ni (TÜFE) oluşturarak 2005

yılında 54 ürünü, 2014 yılında ise 1.814 ürünü listelemiştir. TÜFE oluşturulmasından bu yana, dünya genelinde nanoteknolojiyle ilgili daha başka envanterler de geliştirilmiştir. Bunlardan bir Alman şirketi 2006 yılında 586 nanoteknolojik ürünü, Japonya'nın Ulusal İleri Endüstriyel Bilim ve Teknoloji Enstitüsü ise 2007 yılında 1.241 ürünü listelemiştir. TÜFE'ye göre 2014 yılında nanomateryallerin kullanım alanları incelendiğinde ilk sırada %42'lik alanla (505 ürün) sağlık ve kişisel bakım ürünleri yer almaktadır. Bunun dışında sırasıyla ev ve bahçe ürünleri (246 ürün), otomotiv (152 ürün), çok fonksiyonlu ürünler (95 ürün), yiyecek ve içecek ürünleri (72 ürün), elektronik (70 ürün), cihazlar (39 ürün) ve çocuk ürünleri (23 ürün) şeklinde sıralanmıştır (Şekil 2.1) (Vance ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.1. 2014 yılına ait tüketici ürün envanteri raporunda en sık kullanılan ürünlerin grafiği (Woodrow Wilson veritabanı, 2014).

TÜFE'de yer alan ürünler içeriği hala bilinmeyen (tanımsız) ve içeriği bilinen, metaller (metal ve metal oksitler), karbonlu nanomalzemeler (karbon siyahı, karbon nanotüpleri, fullerenler, grafen), silikon bazlı nanomalzemeler (silikon ve silika) ve diğer (organikler, polimerler, seramikler, vb.) olarak 5 ana katagoride listelenmiştir. Bu verilere göre dünya çapında en çok üretilen nanopartiküller içeriği bilinmeyen (tanımsız) nanopartiküllerdir. İkinci sırayı ise metal nanopartiküllerden titanyum dioksit, silikon dioksit ve çinko oksit nanomalzemeleri oluşturmaktadır. Gümüş NP'lerinin küresel yıllık üretimi, TiO_2 'nin sadece %2'sini temsil etmektedir. Gümüş nanoparçacıkları daha az üretilmesine rağmen, antimikrobiyal özelliği nedeniyle TiO_2 NP'lerinden daha fazla kullanım alanı bularak TÜFE'de 438 ürün ile (%24) en fazla kullanılan nanomalzeme haline gelmiştir. Karbonlu nanomalzemelerin (89 ürün) çoğu karbon nanoparçacıklı ürünlerden (karbon karası olarak tanımlanan 39 ürün) tek başına veya çok katmanlı karbon nanotüplerini (CNT, 38 ürün) içermektedir (Şekil 2.2) (Vance ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.2. Tüketici ürün envanteri 2014 yılı raporuna göre, a. ürünlerde kullanılan nanomalzemeler ve miktarları, b. ürünlerde kullanılan nanomalzemelerin yıllara göre 2007-2014 yılları arasındaki dağılımları (Vance ve diğerleri, 2015).

2.3. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller, morfolojileri, ebatları ve kimyasal özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada nanopartiküller

- ✓ Karbon bazlı nanopartiküller,
- ✓ Metal bazlı nanopartiküller,
- ✓ Seramik esaslı nanopartiküller,
- ✓ Yarı iletken nanopartiküller,
- ✓ Polimerik nanopartiküller olmak üzere beş gruba ayrılabilir.

Karbon bazlı nanopartiküller, karbon nanotüpler (CNT) ve fullerenler olarak sınıflandırılabilir. Karbon nanotüpler, tek veya çok katlı olabilen ve biyo dirençli olarak hareket etme potansiyeline sahip, uzun karbon tüpleridir. Genel olarak nanotüplerin boyutları 3 μm 'den ince ve 10-20 μm 'den uzundur (<http://www.hse.gov.uk>). Bu nanotüpler çapları 0,8-2 nm arasında değişen tek katlı karbon nanotüpleri (SWCNT) ve çapları 5-20 nm arasında değişen çok katlı karbon nanotüpleri (MWCNT) şeklinde ayrılmaktadır. Karbon nanotüpler çözünme ya da kırılma göstermedikleri için dayanıklıdır, daha kısa liflere dönüşmezler. Dış yüzeylerinin şekillenebilmesi ve hücrelere kolay salınmaları nedeniyle proteinlere

tutunarak hedefli ilaç yüklemelerinde ve fibroblastlarda adezyon oluşturarak apatit kristal formasyon ve osteoblast oluşumu sağlayarak çene cerrahisinde kullanılırlar (Göktepe, 2015; Oyar, 2014; Sayiner ve Çomoğlu, 2016). Fullerenler, farklı sayılarda karbonlardan meydana gelmektedir. En küçük yapısı C₂₀, en büyük yapısı C₅₄₀, en sık üretilenleri ise C₆₀ ya da C₇₀ moleküllerinden oluşmaktadır. Bulundukları ortamın elektriksel ve optiksel yapısında değişime neden olurlar. Diğer yandan, fullerenlerin etkili bir şekilde çevreye salınımının mikrobiyal gruplar üzerinde ciddi etki göstereceği düşünülmektedir (Yamakoshi ve diğerleri, 2003).

Metal bazlı nanopartiküller, tüketim ürünleri içerisinde en çok kullanılan nanopartiküllerdir. Geniş yüzey ve hacim alanı, kolay sentezlenebilme, işlevsel yüzey kimyası ve optik ve antibakteriyel gibi sıradışı özelliklere sahip olan metal oksit NP'leri, başta terapötik kanser tedavisi, ortodonti ve diş uygulamaları, askeri ve endüstriyel alanlar olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Güçlü metal bağlara sahip kristal yapıları nedeniyle bu NP'ler iskelet ve kas sistemine uyumluluğu en yüksek materyal olarak kullanılmaktadır (Atlı-Şekeroğlu, 2013; Xie, Mason ve Wise, 2011).

Seramik esaslı nanopartiküller, inorganik metalik olmayan cisimlerdir. Sıcaklık veya ardışık soğutma yöntemiyle sentezlenirler. Amorf, polikristalin, yoğun, porlu ve hallow (oyuklu) formunda olabilirler (Sigmund ve diğerleri, 2006). Bu NP'ler katalist, fotokatalist, boyalarda fotodegradasyon olarak ve görüntüleme teknolojilerindeki kullanımları nedeniyle büyük ilgi çeken bir gruptur (Thomas ve diğerleri, 2015).

Yarı iletken nanopartiküller, metal ve metal olmayan özellikteki partikülleri kapsadığı için, çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Ali ve diğerleri, 2017). Bu partiküller geniş band aralıklarına sahiptir. Bu özellik NP'lere fotokataliz, fotooptik ve elektronik alanlarda kullanılan cihazların yapımında önemli avantajlar sağlamaktadır (Hisatomi, Kubota ve Domen, 2014). Bu partiküller oldukça küçük boyutlara sahip heterojen bir nanoparçacık yapısındadır (Hardman, 2006). Yarı iletken NP'ler diğer atomların davranışlarını kolaylıkla taklit edebilmekte ve yeni manyetik özellikler kazanabilmektedir. Ayrıca sahip oldukları optik ve elektronik özellikleri, taşıdıkları yük sayısını modifiye edebilmekte ve daha büyük boyutlar elde edilebilmektedir. Bu yeni boyut ile hedef hücrenin yüzeyindeki antikora bağlanarak hücresel yıkımda rol oynarlar (Kouwenhoven, Austing ve Tarucha, 2001; Yılmaz, Yakar, Çakır ve Özmen, 2017).

Polimerik nanopartiküller, normalde organik esaslı partiküller olup, özel bir terim olan polimer nanopartiküller (PNP) şeklinde adlandırılmaktadır. Genellikle nanosfer ve nanokapsül şeklindedir (Mansha, Khan, Ullah ve Qurashi 2017). Nanosfer formu matris partikülleri olup bütün kütlesi genellikle tek bir parça halindedir ve diğer moleküller sferik yüzeyin üzerine adsorbe edilmektedir. Nanokapsül formunda, katı kütle, bir partikül içine hapsedilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011). Bu NP'ler kolayca fonksiyonelize edilmekte ve bu nedenle çok farklı alanlarda kullanılabilmektedir (Abd Ellah ve Abouelmagd, 2016; Abouelmagd, Meng, Kim, Hyun ve Yeo, 2016).

2.4. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi ve Toksisitesi

Nanopartiküller ticari olarak üretilip kullanılabildikleri gibi, aslında doğal olarak oluşan NP'ler insanlığın var oluşundan beri yaşamımızda yer almaktadır. Doğal NP'ler volkanik patlamalar, okyanuslardan yükselen buharlaşmalar, orman yangınları ve toz fırtınaları gibi değişik kaynaklardan oluşmaktadır (Buzea, Blandino ve Robbie, 2007; Turkez, 2011; Zorlu, 2016). NP'ler ayrıca insan kaynaklı olarak, egzoz gazları, sigara dumanı, evsel hava kirliliği, bina yıkıntıları vb. kaynaklardan da oluşabilmektedir. Volkanik patlamalar sonucunda açığa çıkan NP'lerin kısa vadedeki toksik etkileri göz, deri ve solunum üzerinde görülürken, uzun vadede ise lenf sistemi üzerinde hasarlar oluşturarak fil ayağı sendromu, kaposi sarkomu ve daha başka hastalıkların oluşmasını tetiklemektedir (Blundell, Henderson ve Price, 1989; Corachan, 1988; Tüylek, 2018). Orman yangınlarından oluşan NP'lerin canlılar üzerinde solunum yoluyla toksik etki göstererek akciğer hasarlarına yol açtıkları belirlenmiştir (Taylor, 2002). Kirlenen hava, içinde bulundurduğu kurşun ve civa gibi ağır metaller sonucunda birçok insanda özellikle de çocuklarda depresyon, uyku bozukluğu, sinir sisteminde zayıflık gibi nörotoksik etkiler oluşturmaktadır. Sigara dumanı ve bina yıkıntıları sonucunda maruz kaldığımız nanopartiküller ise başta alt solunum yolu hastalığı ve öksürük prevalansı gibi akciğer hastalıklarına ve onunla bağlantılı kalp ve damar hastalıklarına neden olmaktadır (Husgafvel-Pursiainen, 2004; İnandı, Canciğer Eltaş ve Kerman, 2018; Rushton, 2004).

Sağladığı avantajlar nedeniyle, çeşitli yöntemlerle sentezlenen ve nanoteknoloji alanında çokça kullanılmaya başlanan NP'lere maruziyet de her geçen gün artış göstermektedir (Brar, Verma, Tyagi ve Surampalli, 2010). NP'ler, sahip oldukları küçük boyutları nedeniyle, yüzeylerine daha fazla atom bağlayabilmekte ve sonuçta normal ebatlardaki yapılarında

bulunmayan yeni reaktif özellikler kazanmaktadır (Roduner, 2006). Bunun dışında antibakteriyal, fotokatalitik, manyetik, optik ve iletkenlik gibi yeni işlevsel özellikler de kazanmaktadır (Ersöz ve Altun Çolak, 2018; Vidya, George ve Chitra, 2017).

Demir (Fe), canlılar için en hayati fonksiyonlardan olan hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, oksijen taşınması ve gaz değişimi gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde görevli birçok enzimde yer almaktadır. Bu metalin nanopartikül formu, yüksek biyoyumluluğa sahip olup doku onarımı, ilaç iletimi, manyetik görüntüleme ve gen tedavileri gibi alanlarda kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, Fe'in düşük konsantrasyonları canlı yaşamında gerekli iken, yüksek konsantrasyonlarının, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına kapı araladığı belirlenmiştir (Buzea, Blandino ve Robbie, 2007; Quintana ve diğerleri, 2006). Kurşun (Pb), güneş koruyucuları, fondöten, oje, ruj ve diş beyazlatıcı macunlar gibi çeşitli kozmetik ürünlerinde, pil, metal ve boya sanayisinde yaygın kullanılan bir metaldir. Ancak kurşun, vücutta kan dolaşımına katılarak kemiklerde ve diğer dokularda birikme eğilimi gösterebilmektedir. Nörotoksik etkilerinden dolayı, konuşma ve öğrenme güçlüğü ve davranışsal problemler gibi çeşitli mental fonksiyonlarda bozulmaların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Ayrıca görme fonksiyonlarında azalmaya, hafıza kayıplarına, hamilelerde düşüklere ve genç kızlarda adet başlangıçlarında gecikmelere (puberte) de yol açabilmektedir (Zorlu, 2016).

Kadmiyum (Cd), kozmetik alanında sabunlarda, saç kremleri ve medikal/medikal dışı kremlerde ve makyaj ürünlerinde; sanayi alanında pillerde, boyalarda, plastiklerde ve kaplama maddesi olarak yaygın şekilde kullanılan bir nanopartiküldür. Yapılan araştırmalara göre, Cd NP'ü, DNA tamir mekanizmasına zarar vermekte, DNA yanlış eşleşmelerinin düzeltilmesini engellemekte ve hasarlı hücrelerin çoğalmasına neden olmaktadır. Ayrıca kalsiyum metabolizmasının doğru çalışmasını inhibe ederek kemiklerde ve böbreklerde hasarlara neden olarak toksik etkiler göstermektedir. Cd NP'üne uzun süreli maruziyetin, diare ve kusma gibi gastrointestinal bozukluklara, depresyon, pnömoni, ataksi, ağız içi iltihaplanmaları (stomatit), pralizi gibi immün ve merkezi sinir sistemi bozukluklarına ayrıca mide, karaciğer ve pankreas gibi birçok kanser türüne neden olduğu belirlenmiştir (Fu, Xia, Hwang, Ray ve Yu, 2014; Zorlu, 2016). Gıda koruyucularında, deodorantlarda ve paketlemelerde sıklıkla kullanılan alüminyum nanopartikülünün (Al NP), erken yaşta gelişen meme kanseri ile ilişkili olduğu, ayrıca anemi, kemik hastalıkları ve bunamayı da tetiklediği belirlenmiştir. Al NP'ü, sıçan, hamster ve insan beyinde önemli olan

dihidropteridin redüktaz (DHPR) enzimini inhibe ederek, enzim aktivitesinde %40 azalmaya neden olmuştur. Bu azalma NP'ün kan beyin bariyerini geçmesi sonucunda oluşmuştur. Ayrıca, yapılan nörotoksik çalışmalarda, Al NP'lerinin yüksek konsantrasyonlarının konuşma bozukluğu, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif rahatsızlıklara sebep olabileceği görülmüştür (McGrath, 2003; Sipahi, Palabıyık, Balcı ve Şahin, 2014; Zorlu, 2016).

Gümüş nanopartikülleri (Ag NP), antibakteriyal ve antifungal özellikleri ile sağlık, tekstil, gıda ve elektronik gibi birçok alanlarda yaygın kullanıma sahiptir. Ag NP'lerin canlılar üzerinde sergilemiş oldukları primer ve sekonder toksik etkiler, bağışıklık sisteminde immünotoksisiteye, kardiyovasküler ve merkezi sinir sisteminde ise nörotoksisiteye neden olmaktadır. A549 akciğer hücreleri %39 ve %69'luk Ag iyonu içeren solüsyonlara maruz bırakıldığında, hücre canlılıklarının düşük iyon içeren solüsyonda %92, yüksek iyon içeren solüsyonda ise %54 olduğu, kısaca doz artışının sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Beer ve diğerleri, 2012).

Biyouyumluluğu ve non-toksik özellikler sergilemelerinden dolayı, özellikle biyogörüntüleme, hastalıkların tanı ve teşhisi gibi sağlık alanında yaygın kullanılan altın nanopartikülleri (AuNP), biyolojik moleküllerle olan benzerliği ve hücresel bariyerlerde "kamuflej" sağlayabilmesi nedeniyle, istenmeyen hücresel girişlere sebep olmakta ve sonuçta normal hücresel fonksiyonlara zarar verebilmektedir (Conde, Doria ve Baptista, 2012; Connor, Mwamuka, Gole, Murphy ve Wyatt, 2005; El-Sayed, Huang ve El-Sayed, 2005). Sun ve arkadaşları, fareler üzerinde çubuk şekilli AuNP'lerin en fazla toksik özellik sergilediğini ve bunu küp şekilli olan NP'lerin izlediğini belirlemiştir. Küre şekilli AuNP'lerinin ise, canlı organizmada en iyi biyouyumluluğa sahip olan ve non-toksik özellik sergileyen partiküller olduğu görülmüştür. Ayrıca uygulanan tüm AuNP'lerinin ya karaciğer ya da dalakta biriktiği tespit edilmiştir (Sun, Wang, Zhang, Ren ve Tian, 2011).

Şampuan, deodorant, güneş koruyucusu, diş macunu, boya ve daha birçok üründe yaygın kullanıma sahip TiO₂ NP'leri, az çözünebilen bir yapıda olup, düşük toksik özelliklere sahiptir. Yapılan birçok çalışmada, titanyum NP'lerinin karaciğer, akciğer, bağırsak ve hatta merkezi sinir sisteminde de toksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. (Grassian, O'Shaughnessy, Adamcakova-Dodd, Pettibone ve Thorne, 2007; Jin, Zhu, Wang ve Lu, 2008; Karlsson, Cronholm, Gustafsson ve Möller, 2008; Ray, Yu ve Fu, 2009). Anataz TiO₂

NP'lerinin intragastrik, intravenöz ve intraperitoneal enjeksiyon yoluyla muamelesini takiben Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile yapılan incelemeler sonucunda, NP'lerin fare testislerine ulaşabildiği ve Leydig hücrelerine giriş yaptığı belirlenmiştir (Smith ve diğerleri, 2015). Benzer şekilde, anataz TiO_2 NP'lerinin oral yolla 3 ay boyunca erkek Wistar sıçanlarına uygulanması sonucunda, partiküllerin testislerde doza ve zamana bağlı şekilde biriktiği belirlenmiştir. Ayrıca testis ağırlığında, sperm canlılığında, hareketliliğinde, sayısında ve semen kalitesinde azalmalar ve sperm membran bütünlüğünde bozulmalar görülmüştür. NP'ler, sperm hücrelerinde antioksidanların (SOD, CAT, GPx ve GSH) düzeyinde azalmalara, reaktif oksijen türleri (ROT) ve lipid peroksidasyon düzeyinde artışlara sebep olmuştur. (El-Missiry ve diğerleri, 2017).

Nanoteknoloji ile üretilen ürünlerin temelinde daha işlevsel, daha kullanışlı, daha kaliteli ve daha uygun maliyetli olmaları yer almaktadır. Bu spesifik özellikler nanoteknolojinin hammaddesi olan NP'lerin fiziko-kimyasal özelliklerinin farklılaşmasıyla ortaya çıkmaktadır. NP'lerin çok sayıda üretilmeleri, daha az toksik özellik kazanmaları, fiziksel ve kimyasal yapılarının değişmesi, bu partiküllerin kaplı olup olmamasına ve hatta kaplama maddesine göre de değişiklik göstermektedir. Nanopartiküllerin kaplanmasında kullanılan maddelerden biri de polimerlerdir. Polimerik yapılar partiküllerle daha az etkileşime girdikleri için daha az çözünme göstermekte ve daha az toksik özellik sergilemektedir (Tüylek, 2018). Polimerler arasında yer alan ve toksik özellik göstermediği ifade edilen pedot nanopartikülü (Pd NP), güneş enerjisi panellerinde, sensörlerde, şarj edilebilen pillerde ve iletken lif üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 20 ve 110 nm boyutlarda polivinilpirolidon (PVP) ve sitrat kaplı Ag NP'lerinin akciğerlerdeki toksik etkisi Brown-Norway (BN) ve Sprague-Dawley (SD) ratları üzerinde incelenmiştir. Uygulamanın ilk gününde, BN ratlarında hem nötrofillerde ve hem de eozinofillerde artış gözlenirken, SD ratlarında, 20 nm sitratla kaplanmış AgNP'lerinde sadece nötrofillerde yüksek miktarda artış gözlenmiştir. Ayrıca, hem BN ve hem de SD ratlarında, bronkoalveolar lavajda (BAL) eozinofilik katyonik protein düzeyinde artış belirlenmiştir. BN ratlarında 1. günden 7. güne kadar pulmoner direncin arttığı ve akciğer uyumunun azaldığı görülmüştür. İlk günde, 110 nm'lik AgNP'leri bir değişiklik oluşturmazken, 20 nm'lik AgNP'leri bronşlarda aşırı duyarlılık oluşturmıştır. Aynı durum sitratla kaplı AgNP'lerinde 7. güne kadar devam etmiştir. 110 nm'ye kıyasla, 20 nm'lik partiküller daha fazla inflamatuvarıdır. Ag NP'leri, bronşlarda aşırı duyarlılık ile birlikte

akciğerlerde eosinofilik ve nötrofilik inflamasyon oluşturmuştur ki bunların hepsi astımın karakteristik özellikleridir (Seiffert ve diğerleri, 2015).

Platin esaslı terapötik ajanlar da son yıllarda tıpta yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle platin nanopartiküllerinin (Pt-NP) insan hücreleri üzerindeki etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu konudaki bir araştırmada, ~5-8 nm ebatlarında sentezlenen ve polivinil alkolle (PVA) kaplanan Pt-NP'lerinin hücelere difüzyon yoluyla girdiği ve sitoplazmada lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu partiküllerin DNA hasarında artışa, hücrelerin S-fazında toplanmasına ve apoptoza sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca p53 düzeyinde artış, p21 ve p53 fosforilasyonunda artış ve proliferasyon olan hücrelerde çekirdek antijenlerinde düşüş tespit edilmiştir. Kısaca, Pt-NP ile muamele edilen hücrelerde p53 aktivasyonunun ve sonrasındaki p21 aktivasyonunun genotoksik stres nedeniyle ortaya çıktığı ve çekirdek antijenleri aracılığıyla büyümede gecikmeye ve apoptoza sebep olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmaya dayanarak, uygun yüzey modifikasyonları ile Pt-NP-esaslı antikanser ajanların geliştirilebileceği belirtilmiştir (Asharani, Xinyi, Hande ve Valiyaveetil, 2010). Aynı araştırmacıların yaptıkları bir başka çalışmada, zebra balığı embriyolarının gelişmesi sırasında uygulanan ve sentezi durdurucu ajan olarak PVA'ın kullanıldığı 15-35 nm Au-NP'leri, 5-35 nm Ag-NP'leri ve 3-10 nm Pt-NP'lerinin 10, 25, 50, 75, ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarının toksik etkileri karşılaştırılmıştır. Ag-NP'leri mortalitede konsantrasyona bağlı artış oluşturmuştur. En fazla toksik özellik Ag-NP'lerinde ikinci sırada ise Pt NP'lerinde gözlenmiştir. Au-NP'lerinin ise herhangi bir toksik etki göstermediği belirlenmiştir (Asharani, Lianwu, Gong ve Valiyaveetil, 2011).

Son yıllarda, yaygın kullanıma sahip olan NP'lerin toksik ve özellikle genotoksik etkili olabileceği yönünde endişeler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu nedenle bir çok bilim insanı NP'lerin farklı hücre tipleri, farklı canlı türleri ve ekolojik sistem üzerinde ne tür etkiler oluşturabileceği konusunda araştırmalar yürütmektedir. Nanopartiküllerin toksik etkileri primer hücrelerde, çeşitli insan ve hayvan hücre hatlarında, bakterilerde, bitkilerde, aquatik türlerde (zebra balığı, yayın balığı, yosun) ve çeşitli kemirgenlerde incelenmektedir. Bazı araştırmalardan elde edilen bulgulara, NP'lerin toksik olmadığı görülürken bir çok araştırmada ise NP'lerin toksik olduğu tespit edilmiştir (Collins, Yamani ve Dusinska, 2017; Doğaroğlu ve Köleli, 2014; Fu ve diğerleri, 2014; Schulz ve diğerleri, 2012; Xu ve diğerleri, 2013). Yapılan araştırmalara göre, her bir NP'ün toksik etkisi bir diğerinden farklılıklar göstermektedir. Elde edilen bulgular, NP'lerin toksik etkisinin o partikülün şekline, partikül

boyutuna, yüzey yapısına, partikülün elektriksel yüküne, agregasyon düzeyine ve yüzeyine kaplanan diğer maddelerin özellikleri vb. gibi çeşitli karakteristiklerine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. NP'lerin sahip oldukları tüm bu özellikler, bir yandan hücre ve canlı sistemlere girişinde, diğer yandan bu sistemlerdeki etkilerinde farklılıklar oluşturmaktadır (Catalan ve diğerleri, 2015; Bucchianico ve diğerleri, 2017; Dağlıoğlu ve Özkan 2018; Moleer ve diğerleri, 2015; Seiffert ve diğerleri, 2015).

Nanopartiküllerin toksisitesini etkileyen diğer bir faktör de NP'lere maruz kalma yollarıdır. NP'ler canlıların vücuduna solunum, sindirim ve deri yoluyla alınmakta ve kolaylıkla kana karışabilmektedir (Atlı-Şekeroğlu, 2013; Medina, Santos-Martinez, Radomski, Corrigan ve Radomski, 2007; G. Oberdörster, E. Oberdörster ve J. Oberdörster, 2005). Vücuda alınan NP'lerin birçok organ ve dokuyu etkileyerek çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu belirlenmiştir (Peter, Bruske-Hohlfeld ve Salata, 2004; Sipahi, Palabıyık, Balcı ve Şahin, 2014; Zorlu, 2016). NP'lerin solunum yoluyla vücuda alınması özellikle akciğer rahatsızlıklarını tetiklemektedir. Akciğerlere ulaşan NP'lerin, pulmoner inflamasyona, membran geçirgenliğinde değişikliklere ve sonuçta partiküllerin akciğer dışına dağılmasına neden olmaktadır. Örneğin, hava kirliliğine sebep olan partiküler maddelere (PM) uzun süreli maruziyet, kardiyovasküler hastalıklara ve sinir sistemi bozukluklarına neden olmaktadır (BeruBe, Balharry, Sexton, Koshy ve Jones, 2007; Chau, Yen ve Wu, 2007; Chen ve Yen, 2014; Seiffert ve diğerleri, 2015). Deri yoluyla maruz kalınan NP'lerin vücuda ya emilimle ya da açık yara, egzama ve yanık gibi alanlardan alınabildiği düşünülmektedir. Deri, güneş koruyucuları, losyonlar, kremler, leke tutmaz lifli tekstil malzemeleri ve aksesuarlar nedeniyle sürekli olarak çeşitli partiküllere maruz kalmaktadır. Son yıllarda güneş koruyucularında kullanılan çinko NP'lerinin toksik etki gösterdiği belirlenmiş ve Avrupa Komisyonunca kozmetik ürünlerdeki kullanımı yasaklanmıştır (Chau, Yen ve Wu, 2007; Vance ve diğerleri, 2015).

2.5. Nanopartiküllerin Genotoksitesisi ve Etkileyici Faktörler

Genetik toksisite, kromozom düzeyindeki sayısal ve yapısal anormallikler ile DNA düzeyindeki DNA zincir kırıkları, DNA eklentileri, gen mutasyonları ve DNA onarım mekanizmalarındaki hasarları ve bu hasarlara neden olan ajanların etki mekanizmalarını inceleyen bir araştırma alanıdır. Bu tür hasarları incelemek amacıyla çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu testler ile bir çok gıda katkı maddesinin, ilaç etken maddesinin,

pestisitlerin, sigaranın, UV gibi fiziksel etkenlerin ve NP'lerin genotoksik etkileri araştırılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu Yılmaz ve Unal, 2016; Yüzbaşıoğlu, Zengin ve Unal, 2014; Pfeiffer, Goedecke ve Obe, 2000; Şekeroğlu, 2013; Zirak, Lotfi ve Moghadam, 2016; X. Wang ve diğerleri, 2019). Yaşamın vazgeçilmezi haline gelen nanoteknolojinin yapıtaşı olan NP'lerin üretimlerinin hızla artması, canlılar ve ekosistem üzerinde dezavantajlarının da olabileceği şüphelerini akıllara getirmiş ve bu nedenle son yıllarda bu partiküllerin sitotoksik, genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin test edildiği birçok araştırma yapılmıştır. Nano ölçekteki materyaller şekil, boyut, agregasyon durumu, yüzey alanı, yüzey yükü ve yüzey kaplaması gibi birçok özellikler açısından birbirinden farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir. Bu özelliklerin, NP'lerin toksik ve genotoksik etkilerinde de önemli rol oynadığı belirlenmiştir (S.D Bucchianico ve diğerleri, 2018; Demir, Burgucu, Turna, Aksakal ve Kaya, 2013; Genç ve diğerleri, 2018; Lykaki ve diğerleri, 2018; G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, 2005; Seiffert ve diğerleri, 2015; Tüylek, 2018).

Şekil

Nanopartiküller çok farklı şekillerde olabilen partiküllerdir. Nanotüp, nanotel ve nanoçubuk gibi yapılar yüksek en-boy oranına sahipken, nanoküp, nanoküre ve nanopiramit gibi yapılar daha düşük en-boy oranına sahiptir (Zorlu, 2016). Yapılan araştırmalar, farklı şekillerdeki partiküllerin hücre alım düzeylerinin sırasıyla tüp/tel/çubuk>küre>silindir>küp şeklinde olduğunu göstermektedir. Kısa boyutlu ya da sarmal şekilli olan NP'ler, ilk etapta makrofajlar tarafından farkedilerek etkisiz hale getirilirler. Daha lifsi görünüme sahip uzun boyutlu nanotüpler, fagositoz ya da pinositoz yapacak olan hücrelerin etrafını çevreler ve nanotüplerin fagosite edilmelerini engeller. Endositoz yoluyla yok edilemeyen NP'ler hücrelerde proinflamatuvar, mitojenik ve genotoksik maddelerin salınmasına neden olurlar. Sonuçta primer ve sekonder genotoksik etkilere neden olurlar (Chithrani, Ghazani ve Chan, 2006; Donaldson, Murphy, Duffin ve Poland, 2010; Qiu ve diğerleri, 2010; Uboldi ve diğerleri, 2016; Miura, Ohtani, Hasegawa, Yoshioka ve Hwang, 2017). NP'lerin hücre içine alım hızlarının ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin, bunların şekilleriyle bağlantılı olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada, insan servikal karsinoma epitel hücreleri (HeLa), 2, 3 ve 5 µm boyutundaki kübik NP'lere ve 0,5 µm çap-200 nm boyunda ve 1 µm çap-100 nm boyunda iki farklı silindirik NP'lere maruz bırakılmıştır. TEM analizleri, her iki şekildeki NP'lerin de hücrelere alındığını göstermiştir. Kübik NP'lerin

silindirik olanlara kıyasla hücrelere daha hızlı girdikleri, ayrıca hücre içine alınan NP'lerin hücre canlılığını etkilemediği bildirilmiştir (Gratton ve diğerleri, 2008). Bir başka araştırmada, α -Fe₂O₃ NP'lerinin sitotoksik (hücre canlılığı ve TEM analizleri) ve genotoksik (Flow sitometrisi) etkileri Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücre hattında incelenmiştir. Çalışmada, sentezlenmiş çubuk benzeri (S250 ve S500) ve küresel (P400 ve P500) NP'ler, normal fibroblast ve tümör hücrelerine 25, 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çubuk benzeri hematit NP'lerin küresel olanlara kıyasla hücre içine daha fazla alındığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar hematit nanomalzemelerin üretim yönteminin, malzeme özelliklerinin ve yüzey özelliklerinin toksik etkileri üzerinde farklılıklar oluşturduğunu bildirmişlerdir (Cardillo ve diğerleri, 2016). Warheit ve diğerlerinin (2006) yaptığı çalışmada, mikro TiO₂ (rutil), nano TiO₂ (anataz, çubuk), TiO₂ dotları (anataz, küre) ve kristal silika NP'leri ratlara intratrakeal insilasyon yoluyla uygulanmış ve muameleden 24 saat, 1 hafta, 1 ve 3 ay sonra akut akciğer toksisitesi incelenmiştir. Nano TiO₂ (çubuk ve küre) ve mikro TiO₂, ratlar üzerinde benzer pulmoner etki göstermiştir. Kristal silika partiküllerine maruz kalan ratlarda, doza bağlı akciğer inflamasyonu ve akciğer dokusunda kalınlaşma tespit edilmiştir. Araştırmacılar aynı partikülün farklı şekildeki (çubuk, küre) ve farklı boyuttaki (nano, mikro) benzer konsantrasyonlarının karşılaştırılmasında benzer sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir (Warheit, Webb, Sayes, Colvin ve Reed, 2006). Farklı şekildeki CuO nanopartiküllerinin fare RAW 264.7 makrofaj ve insan periferik hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri (0.1-100 µg/mL), MTT, mikronukleus sitom testi ve komet testi ile incelendiğinde, her iki hücre tipinde de, MTT testi ile hücre canlılığında azalma olduğu ve farklı şekildeki nanopartiküllerin doz artışına paralel şekilde anlamlı toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, primer DNA hasarında, oksidatif DNA hasarında ve mikronukleus frekansında da doza bağlı artış olduğu gözlenmiştir. Prolifreatif aktivite, sitotoksisite ve apoptotik markırlarda anlamlı artışlar belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada, şekil ve büyüklükten bağımsız olarak, kullanılan bütün CuO nanopartiküllerinin kesin sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu ve hatta bu nedenle CuO NP'lerinin pozitif olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Di Bucchianico ve diğerleri, 2013).

Boyut ve yüzey alanı

Nanopartiküller sahip oldukları küçük boyutları sayesinde hücreye kolayca girerek sonuçta sitoplazmada birikme eğilimi göstermektedir. Biriken NP'ler sitoplazmadaki çeşitli protein

ve enzim gibi birçok biyolojik moleküllerle ya da çeşitli organellerle etkileşime girebileceği gibi, bölünme sırasında çekirdek zarının kaybolmasından sonra kromozom ve DNA ile de etkileşime girebilmektedir. Ayrıca oldukça küçük boyutlardaki NP'ler porlardan çekirdek içine girebilmekte, doğrudan DNA ile etkileşime geçebilmektedir (Boyoglu ve diğerleri, 2013; Gonzalez, Lison ve Kirsch-Volders, 2008; He, Hu, Yin, Tang ve Yin, 2010; Nel, Xia, Madler ve Li, 2006; Sakai, Matsui, Nakayama, Tsuda ve Yoneda, 2011; Syed ve diğerleri, 2013; Xia ve diğerleri, 2008). Bununla birlikte nanoboyutlarda üretilen partiküller daha geniş yüzey alanları nedeniyle, mikropartiküllerden daha fazla atom sayısına sahiptir. Yüzeylerine bağlanan atom sayılarının artması ile NP'ler daha yüksek aktiviteye kavuşmakta ve atom başına düşen enerji seviyesinde azalmalar olmaktadır. Örneğin Au NP'lerinin kaynama noktası, daha büyük boyutlardaki Au partiküllerinin kaynama noktasına (300°C) göre daha düşüktür (Roduner, 2006). Gümüş nanopartikülleri, enerji seviyelerindeki azalma nedeniyle, bağlı oldukları atomlardan daha kolay çözünmekte ve ortama salınan gümüş iyonlarının sayısında artış görülmektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Sprague-Dawley farelerinde, TiO₂'in 5, 21 ve 50 nm ebatındaki NP'lerinin 0.5, 5, ve 50 mg/kg'lık dozlarının genotoksik etkileri incelendiğinde, 5 nm'lik TiO₂ NP'lerinin >5 mg/kg dozlarda, pulmoner dokularda LDH ve ALP düzeylerinde artışa neden olduğu, 0.5 ve 5 mg/kg'lık dozlardaki LDH ve ALT düzeyinin, 50 mg/kg'lık dozdan yüksek olduğu tespit edilmiştir. 21 nm'lik partiküller, 5 ve 50 mg/kg'lık dozlarda ALP aktivitesini artırmıştır. LDH ve ALP düzeyinde, 50 nm TiO₂ grubu ile kontrol arasında bir farklılık oluşmamıştır. İnflamatuvar lezyonlarda doza bağlı bir artış gözlenmiştir. 5 nm'lik partiküllerin oluşturduğu pulmoner toksisitenin, 21 nm ve 50 nm'lik gruba nazaran daha ciddi düzeylerde olduğu belirtilmiştir (Liu ve diğerleri, 2009). Benzer şekilde, 344 erkek Fischer ratlarda, 20 ve 250 nm boyutlarındaki TiO₂ NP'leri ile yapılan bir incelemede, ince partiküllere kıyasla ultra ince NP'lerin akciğerlerde daha fazla birikme eğilimi gösterdiği, daha yüksek seviyelerde pulmoner toksik etki oluşturdukları ve bu birikim ve inflamasyonun NP'lerin küçük boyut, geniş yüzey alanı, yüksek ara geçiş ve gelişmiş dağılım özelliklerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (G. Oberdorster, Ferin ve Lehnert, 1994). Silika-titanyum içi boş parçacıklarının 25, 50, 75, 100 ve 125 nm boyutlardaki partikülleri ile insan meme kanser hücreleri (SK-BR-3) ve fare alveoler makrofaj hücrelerinde (J774A.1) yapılan bir araştırmada, en yüksek etkinin 50 nm'lik silika-titanyum parçacıkları tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir (Oh ve diğerleri, 2010). Ag NP'lerinin (20 ve 200 nm) 0.1, 1, 10, 100 ve 1.000 mg/L'lik konsantrasyonları *Daphnia magna* ya uygulandığında, küçük

partiküllerin daha fazla baz oksidasyonu oluşturduğu belirlenmiştir (Georgantzopoulou ve diğerleri, 2012). Farelere gavaj yoluyla 2 hafta boyunca verilen 25, 80 ve 155 nm'lik TiO_2 NP'leri, ALT/AST ve LDH seviyelerinde artışa neden olmuş, farelerin karaciğer ve böbreklerinde çeşitli patolojik hasarlar oluşturmuş ve bu etkilerin sadece 25 ve 80 nm'lik TiO_2 partiküllerde görüldüğü belirlenmiştir (J. Wang ve diğerleri, 2007). TiO_2 NP'lerinin aksine, 20, 40 ve 200 nm'deki Au NP'leri intratrakeal instilasyon yoluyla erkek Wistar ratlarına uygulandığında, komet testinde her hangi bir DNA hasarı oluşmadığı, alveolar sıvıdaki patolojik parametrelerde ve kandaki mikronukleuslu poikromatik eritrositlerde her hangi bir artış olmadığı, kısaca bu deneyde, Au NP'lerinin farklı boyutlarının herhangi bir genotoksik, sistemik ve yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Schulz ve diğerleri, 2012).

Yüzey yükü ve kimyası

Nanopartiküller immün yanıtları uyaramakta ve/veya bastırabilmektedir. Bu özellik, NP'lerin yüzey kimyası ve immün sistemle arasındaki etkileşimi açıkça ortaya koymaktadır. Bu özelliklerinden dolayı NP'ler, hem immün sistemde pasif ve/veya aktif hedeflendirme ile partiküllerin istenilen bölgelere iletilmesinde hem de nanokonjugatlar sayesinde genotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada, TiO_2 ve Fe_2O_3 NP'lerinin, insan akciğer hücreleri (IMR-90) ve insan bronşiyal epitelyal (BEAS-2B) hücrelerindeki etkileri incelendiğinde, TiO_2 NP'lerinin ROT üretimini (herhangi bir fotokatalitik aktivite olmadan) ve DNA eklenti oluşumunu (8-OHdG) tetiklediği ayrıca insan akciğer fibroblastlarının (IMR-90), insan bronşiyal epitelyal hücrelerine (BEAS-2B) kıyasla daha hassas olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, Fe_2O_3 NP'lerinin genotoksik etkiyi uyarmamasının, farklı yüzey yüklerine sahip olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Bhattacharya, Santra, Ghosh ve Karmakar, 2008). İnsan deri melanoma (A375) hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, ZnO NP'lerinin 5, 10 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları 24 saatlik uygulamada, hücre canlılığında sırasıyla %2,4, %16 ve %58,6 ve 48 saatlik uygulamada da %3,2, %38 ve %76,6 azalmaya neden olmuştur. Ayrıca bu azalmanın konsantrasyona ve zamana bağlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan Zn^{+2} 'nin, ZnO NP'lerine kıyasla hücre canlılığını daha az azalttığı için, toksik etkinin nanopartikül den kaynaklanıyor olması nedeniyle, araştırmacılar, tüketici ürünlerinde kullanılan ZnO NP'leriyle ilgili endişe duyduklarını bildirmişlerdir (Alarifi ve diğerleri, 2013). Nano-Cu, nano-CuO, nano-Cu(OH)₂, mikro Cu, mikro CuO ve iyonik Cu^{+2} 'in (CuCl_2 ve CuSO_4) incelenmesiyle, *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Lactobacillus brevis* (ATCC

14869) bakterileri üzerinde en fazla toksik etkiyi nano boyuttakilerin, ikinci sırada iyonik olanların ve son sırada mikroboyuttakilerin gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar nano Cu'nın bakteri içinde tutunduğunu, yüksek miktarda ROT ürettiğini ve benzersiz genotoksik etkiler oluşturduğunu vurgulamışlardır (Kaweeteerawat ve diğerleri, 2015).

Aglomerasyon

Nanopartiküllerin aglomerasyon durumu da, bu partiküllerin hücre tarafından alınmasını etkilemektedir. Nanopartiküller, hem *in vitro* ve hem de *in vivo* koşullarda, hücre içerisinde aglomerasyon-agregasyon-topaklanma eğilimi göstermektedir. Böylece, normalde sahip oldukları boyutlarından daha büyük veya çok daha büyük boyutlara ulaşabilmektedir. Bu durumda NP'ler, sahip oldukları işlevselliklerini kaybetmezler ancak topaklaşma sonucunda boyutlarında meydana gelen artış nedeniyle, hücrelere girişleri zorlaşmakta ve azalmaktadır. Bu da toksik etkilerinde farklılıklara sebep olmaktadır. Bu konuda yapılan bir araştırmada, L929 fibroblasts hücreleri, TiO₂ NP'lerinin tıpta kullanılanlarla bağlantılı konsantrasyonlarla 24 saat muamele edilmiş ve partiküllerin hücreye giriş düzeyleri ultrahigh resolution imaging microscopy (URI), taramalı ve geçirmeli elektron mikroskobu ve inductivity coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS) kullanılarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda, kullanılan tüm NP'lerin (40 nm anataz; 40 nm rutil; 25 nm %84 anataz; 10X40 nm rutil; 5 nm anataz; <100 nm %69 anataz; 10 nm anataz) aglomerat oluşturduğu, bu aglomeratların hücre zarına tutundukları, ayrıca hücre içerisine ve organellere girdiği tespit edilmiştir. Büyük aglomeratların aktin bağımlı yolla, küçük aglomeratların ise aktin-bağımlı olmayan yolla hücre içine alındığı belirlenmiştir. Araştırmacılar hücreye giriş düzeyinin NP büyüklüğüne bağlı ve bu girişin sırasıyla 5>10>40 nm şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (Allouni, Höl, Cauqui, Gjerdet ve Cimpan,2012). Bir başka çalışmada, 10 nm anataz TiO₂ NP'lerinin *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA1537, TA98 ve TA102 suşları üzerindeki etkisi Ames testi kullanılarak incelenmiştir. Suşlar hem metabolik aktivasyon varlığında (S9 mix) ve hem de yokluğunda 20, 100, 500, 1.000, 2.500 ve 5.000 mg/plak konsantrasyonlarda TiO₂ NP'leri ile 48 saat muamele edildiğinde, suşlarda herhangi bir mutajenik etki tespit edilmemiştir. Ayrıca TEM ve enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi ile yapılan analizlerde, TiO₂ partiküllerinin yüksek seviyede aglomeratlar oluşturduğu ve bakteri hücrelerine giremedikleri belirlenmiştir (Landsiedel ve diğerleri, 2010).

Yüzey kaplaması

Nanopartiküller, nanoteknolojik uygulamalarda tek başlarına kullanılabildikleri gibi, daha kullanışlı ve daha etkin hale getirilmeleri için yüzeyleri farklı maddelerle kaplanmak suretiyle de kullanılmaktadır. NP'ler, kaplandıkları maddeye göre (polimer, magnetik yapı vb.) esneklik, dayanıklılık, iletkenlik ve mekanik gibi farklı işlevsellikler kazanmaktadır. Bunların yanında NP'lere uygulanan bu yüzey kaplamaları, NP'lerin davranışlarını ve dolayısıyla genotoksitesini de etkileyebilmektedir (Fu, Xia, Hwang, Ray ve Yu, 2014; Gnach, Lipinski, Bednarkiewicz ve Capobianco, 2015).

Biyomedikal uygulamalar için kullanılan manyetik demir oksit nanopartikülleri (nano- Fe_3O_4), farklı pozitif yüklere sahip poli (etilenimin) (PEI) ve poli etilen glikol (PEG) ile kaplanmış ve bu NP'lerin genotoksik etkisini belirlemek için insan SH-SY5Y, MCF-7 ve U937 hücre hatlarında ROT ve lipid peroksidasyon düzeyleri incelenmiştir. Yüzeyi kaplanmış nanopartiküllerin, kaplanmamış olanlarına kıyasla genotoksik olduğu tespit edilmiştir (Hoskins, Cuschieri ve Wang, 2012). *Allium cepa* köklerinde yapılan bir çalışmada, Ag NP'lerinin üç farklı kaplanmış formu [sitrat, polivinilpirrolidon (PVP) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB)] ve Ag iyonlarının genotoksik etkileri incelenmiştir. Elde edilen verilere göre *Allium cepa* köklerinde tespit edilen toksisite $\text{Ag}^+ > \text{CTAB-Ag} > \text{PVP-Ag} > \text{sitrat-Ag}$ şeklinde sıralanmıştır. Araştırmacılar kaplanmış formlar arasında CTAB-Ag NP'lerinin en yüksek toksik etkiye neden olmasını, daha küçük boyutta olması ve köklere daha fazla alınmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca, AgNP'lerinin toksik etkisinin büyüklük, yüzey yükü ve yüzey kaplaması ile doğrudan ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Cvjetko ve diğerleri, 2017). Diğer yandan, UV filtrelerinin yapımında sıklıkla kullanılan TiO_2 NP'lerinin (21 nm) ve mesoporus silika kaplı (MSN) TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkilerinin insan lenfositleri/monositleri üzerinde incelenmesi sonucunda, sadece TiO_2 NP'lerinin ROT oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Hücrelerde IL-2, IL-17 ve IFN- γ moleküllerinin her iki NP uygulamasında da azaldığı, IL-1 β ve IL-4 salınımının sadece MSN'lerde ve IL-10, TNF- α ve IL-23 salınımının ise sadece TiO_2 NP'lerinde arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar kullanılan NP'lerin proinflamatuvar ve proapoptotik ajanlar olarak görüldüğünü, MSN- TiO_2 NP'lerinin daha büyük genotoksik etkilerin önüne geçtiğini bildirmişlerdir (Petrarca, Clemente, Zaccariello, Sabbioni ve Gioacchino, 2018).

Günlük hayatımızda pek çok alanda yaygın kullanım bulmaya başlayan NP'lerin çok değişik açılardan toksik etkileri olmakla birlikte, bunların özellikle genotoksik risklerinin araştırılması özellikle insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Genetik toksikoloji testleri kullanılmak suretiyle hem NP'lerin genetik materyalde ve kromozomlardaki etkileri hem de başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer bazı hastalıklardaki olası riskleri de belirlenebilmektedir (Seaton ve Donaldson, 2005; Tüylek, 2018; Zorlu, 2016).

2.6. Nanomateriyaller ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Nanopartiküllerin en temel özelliği 100 nm'den küçük boyutlara sahip olmalarıdır. Bu boyutları nedeni ile NP'ler hücre ve çekirdek zarlarından ve diğer biyolojik bariyerlerden kolaylıkla geçebilir, çekirdek içerisindeki DNA ile etkileşime girerek DNA'nın yapısında hasarlara neden olabilir. Ayrıca, diğer hücre organellerine de girebilir veya hücre içi moleküllerle etkileşime geçebilir. Ayrıca, benzersiz geniş yüzey/hacim oranları nedeniyle, nanomalzemeler reaktif veya kataliktir ve bu nedenle potansiyel olarak toksik etki göstermektedir. Bütün bu yapıları nedeniyle NP'ler hücre fonksiyon bozukluklarına, oksidatif hasarlara, genetik hasarlara, çeşitli kronik ve genetik hastalıklara, doğumsal anormalliklere ve kansere neden olabilmektedir (Catalan ve diğerleri, 2015; Daphedar ve Taranath, 2018; Ersöz ve Altun Çolak, 2018; Güneş, Erdal ve Gemi, 2017; Tüylek, 2018; Yen, Hsu ve Tsai, 2009; Yu, Hong ve Zhang, 2016).

Yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan farklı tipteki ve özellikteki bazı nanopartiküllerin genotoksik etkileri çeşitli primer hücrelerde ve hücre hatlarında ve ayrıca *in vivo* koşullarda farklı türlerin hücrelerinde de incelenmektedir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, C57Bl/6 farelerine farenjiyal soluma yöntemiyle uygulanan MWCNT'nin 5, 10, 50, 100 ve 200 µg/fare'lik konsantrasyonlarının olası genotoksik etkileri komet ve mikronükleus testleriyle incelenmiştir. Bu partiküllerin komet testinde, DNA zincir kırıklarında doza bağlı artış oluşturduğu ve farelerin alveolar tip II hücrelerinde mikronükleatları tetiklediği belirlenmiştir (Catalan ve diğerleri, 2015). DNA biosensörü olarak biomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda, gen ve ilaç iletiminde çokça kullanılan partiküllerden biri olan (Jong ve Borm, 2008) SiO₂ NP'lerinin 10, 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süreyle A549 bronş alveolar hücrelerine uygulanmıştır. NP'lerin oksidatif stresi tetikleyerek lipid peroksidasyonunda artışa ve GSH seviyesinde azalmaya neden olduğu

tespit edilmiştir. Oluşan oksidatif stresin topoizomera I ve proteinlerde anormal birikmelere neden olduğu ve sonuçta hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu vurgulanmıştır (Lin, Huang, Zhou ve Ma, 2006). Yapılan bir başka çalışmada, J774 A1 makrofajlarında Au ve Ag NP'lerinin 2-4 nm, 5-7 nm ve 20-40 nm olmak üzere uygulanan üç farklı boyutunun immünolojik etkileri incelenmiştir. Au-NP'leri 1 ppm'lik, Ag-NP'leri 10 ppm'lik konsantrasyonlarda, kısa süreli (3 ve 6 saat) ve uzun süreli (24, 48 ve 72 saat) olarak uygulanmıştır. Her iki NP'ün hücreye giriş yaptığı ancak özellikle küçük ebatlı olanların proinflamatuvar genler olan interlukin-1 (IL-1), interlukin-6 (IL-6) ve tumor necrosis factor (TNF-alfa)'de artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Yen ve diğerleri, 2009).

Nanopartiküller insan hayatında kaplı formlarda da kullanıldıkları için, bu yapıdaki nanopartiküllerin genotoksik etkileri konusunda da araştırmalar yürütülmektedir. Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) NP'lerinin üç farklı yük [nötr (polivinil alkol), pozitif (kitosan) ve negatif (Pluronic F68)] ile kaplanmış formlarının etkileri insan akciğer epitel hücrelerinde (A549) incelenmiştir. NP'ler 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlarda 2, 6, 24 ve 48 saat süreyle hücrelere uygulanmış ve genotoksik etkiler flow sitometre ve LDH salınımı analizlerine göre incelenmiştir. Araştırmacılar kaplanmış olan NP'lerin etkilerini karşılaştırmak için TiO₂ NP'lerinin anataz (küresel, <25 nm) ve rutil (çubuk, 10nmX40 nm) formlarının genotoksik etkilerini de incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, PLGA NP'lerinin TiO₂ NP'lerine benzer genotoksik etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca F68 NP'lerinin diğer kaplanmış yüklerden daha fazla genotoksik olmasını da hücrelere daha yüksek düzeyde alınması nedeniyle yüksek inflamatuvar yanıt oluşturmamasından kaynaklandığı vurgulanmıştır (Grabowski ve diğerleri, 2013). PLGA NP'lerinin üç farklı kaplanmış formunun 0,01, 0,1, 1 ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonları insan benzeri THP-1 makrofajlarında incelendiğinde, uygulanan en yüksek konsantrasyonun, kaplama maddesi dikkate alınmaksızın, ROT üretimi ve proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına bağlı olarak nekrozu tetiklediği belirlenmiştir. Tüm kaplama maddelerinin, tek başına kullanılan PLGA NP'lerine kıyasla, genotoksik olduğu ifade edilmiştir (Grabowski ve diğerleri, 2015).

İnsan bronş alveolar hücrelerinin, negatif [merkaptopropiyonik asit (MPA)] ve pozitif [ysteamin (CYST)] yük ile yüklenmiş kuantum dotların 0,5, 5, 20, 80 ve 160 µg/mL'lik konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edildiği bir araştırmada, CYST-QD'lerin DNA sarmalında kırılmalara neden olduğu, MPA-QD'lerin ROT oluşumunu tetiklemediği fakat yine de çok az düzeyde DNA zincir kırıkları oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca, PCR analizi

ile p53 düzeyinde belirlenen azalma ve p53 bağlayıcı protein 1 (53BP1)'in hücre çekirdeğindeki varlığının DNA hasarlarının göstergesi olduğu ifade edilmiştir (Nagy ve diğerleri, 2013). Diğer bir araştırmada, karboksil (COOH) ve amino polietilenglikol [NH₂(PEG)] ile kaplanmış QD'lerinin J774.A1 hücrelerine 30, 60 ve 120 dakika uygulanmış ve etkileri konfokal mikroskopu ve flow sitometrisi ile analiz edilmiştir. Negatif yüklü kaplanmış NP'lerin hücrelere daha hızlı alındığı, NH₂(PEG) kaplı NP'lerin ise hücrelere daha yavaş alındığı fakat tamamen hücre içine alımlarının engellenemediği belirlenmiştir. Araştırmacılar nanopartiküllerin oluşturduğu toksik etkilerin kaplama maddesine göre farklılık gösterebileceğini bildirmişlerdir (Clift ve diğerleri, 2008). A549 bronş alveolar hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada Ag⁺ iyonlarının ve polivinil pirolidon (PVP) kaplı nano-Ag'nin her ikisinin de hücrelerde ROT oluşumu sonucunda DNA hasarını tetiklediği, bu hasarın erken apoptozis ile güçlü bir korelasyon sergilediği ve doza bağlı genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca N-asetilsistein ile ön muamele sonucunda ROT oluşumu, mitokondriyal hasar veya apoptoz oluşumunda azalma olduğu vurgulanmıştır (Foldbjerg, Dang ve Autrup, 2011).

2.7. TiO₂ Nanopartikülleri ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Kişisel bakım ürünleri, boya ve farmasötik uygulamalarda en çok kullanılan beş nanopartikül arasında yer alan titanyum dioksit nanopartikülleri, pigment üretiminin %70'ini oluşturarak, dünya çapında en çok üretilen Ag NP'lerinden sonra ikinci sıraya yerleşmiştir. Nanoboyuttaki yapıları nedeniyle sahip oldukları ve onları birçok alanda tercih edilir bir duruma getiren spesifik özellikleri, TiO₂ NP'lerinin insan sağlığı ve çevre üzerinde de negatif etkiler oluşturmaya sebep olmaktadır. TiO₂ NP'lerinin inflamasyona, akciğerlerde hasarlara, fibrosise ve tümöre sebep olabileceği ve hatta insanlar için büyük olasılıkla kanserojen olabileceği ifade edilmektedir. Kanserin, mutasyonlardan kaynaklanan bir hastalık olması nedeniyle, TiO₂ NP'lerinin genotoksik etkisi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında TiO₂ NP'lerinin ciddi genotoksik riskler oluşturduğu, bazılarında orta derecede genotoksik olduğu ifade edilirken, diğer bir kısmında herhangi bir genotoksik risk oluşturmadığı vurgulanmaktadır (Chen, Yan ve Li, 2014; Z. Chen ve diğerleri, 2014; Di Virgilio, Reigosa, Arnal ve Fernández Lorenzo de Mele, 2010; Miura, Ohtani, Hasegawa, Yoshioka ve Hwang, 2017; Uboldi ve diğerleri, 2016; Vance ve diğerleri, 2015).

Nanopartiküllerinin hem üretim ve kullanımları ve hem de çevreye salınımlarının her geçen gün artması sebebiyle, sıkça kullanılan TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla primer insan hücrelerinde ve hücre hatlarında ve bakterilerde *in vitro* araştırmalar yapıldığı gibi, bazı canlı türlerinde *in vivo* araştırmalar da yapılmaktadır. İki farklı metal oksit olan SiO_2 ve TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla, bu partiküllerin 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının insan lenfositlerine uygulandığı bir araştırmada, her iki nanopartikülün, hem mikronükleus ve diğer nükleer anormallikleri tetiklediği hem de yüksek konsantrasyonların proliferasyon indeksinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Vidya ve diğerleri, 2017). NM100 (anataz, 50-150 nm), NM101 (anataz, 5-8 nm) ve NM103 (rutil, 20-80 nm) olmak üzere farklı form ve boyuttaki TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, kültüre edilmiş BEAS-2B hücreleri, 1, 5, 15 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlara 3, 24 ve 48 saat maruz bırakılmıştır. mini jel-komet testi uygulanan araştırmada, hücrelerde NM100'ün daha etkili olduğunu fakat her üç nanopartikülün de oksitlenmiş bazlarda artışa sebep olduğu belirtilmiştir (Bucchianico ve diğerleri, 2017).

Botelho ve diğerleri (2014), 21 nm boyuttaki TiO_2 NP'nün genotoksik etkisini belirlemek amacıyla, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 150 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarını, insan gastrik epitel hücrelerine 3, 6 ve 24 saat uygulamışlardır. Komet testine göre, 150 $\mu\text{g/mL}$ 'lik TiO_2 NP'ünün kuyruk yoğunluğunu kontrole kıyasla 1,88 kat artırdığı ve dolayısıyla DNA hasarına ve genotoksik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen DNA hasarlarının kanserle ilişkili olduğu ve bu nedenle NP'lerin kanser gelişiminde etkili olabileceği vurgulanmıştır (Botelho ve diğerleri, 2014). 2,3 nm'deki TiO_2 NP'lerinin (1, 10 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) insan periferik lenfositleri ve insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) üzerindeki etkilerinin komet testiyle incelendiği bir araştırmada, Fpg ve Endo III enzimlerinin bulunup bulunmamasına bağlı olmaksızın, her iki hücre hattında da 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki TiO_2 NP'lerinin DNA hasarını anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Demir ve diğerleri, 2013). İnsan SH-SY5Y nöral hücrelerinin 25 nm'lik %100 anataz ve %80 anataz-%20 rutil TiO_2 NP'lerinin 80, 120 ve 150 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına maruziyeti sonucunda, her iki formdaki TiO_2 NP'lerinin hücrelerde apoptozda artışa neden olduğu, ayrıca MN testinde 3 saatte hasar oluşmazken, 6 saatlik uygulamada genotoksik hasarların oluştuğu tespit edilmiştir (Valdiglesias ve diğerleri, 2013).

Literatürde, nanopartiküllerin çeşitli materyaller ile kaplanmış formlarına yönelik araştırmalar da bulunmaktadır. Kaplanmamış formdaki anataz TiO_2 (A8), ticari olmayan sol-

jel anataz (A72), rutil (R) ve Aeroxide P25 pirojenik anataz/rutil TiO_2 (AR, %80 anataz-%20 rutil) nanopartiküllerinin ve anataz Max Light F-TS20 (A-S), rutil Eusolex TAVO (R-S), rutil UV-Titan M262 (R-Alu-D), AR-PW Covasil S1 (AR-SL1), AR-Tego Sun T805 (AR-SL2) ve AR-Tego Sun TS Plus (AR-SL2-S) gibi kaplanmış partiküllerin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla dorsal kök ganglion (DGR) hücreleri üzerinde bir araştırma yürütülmüştür. Kullanılan A-S ve R-S NP'leri SiO_2 ile kaplanmış ve AR-SL1, AR-SL2 ve AR-SL-S nanopartikülleri ise trimethoxycaprylylsilane (TMCS) ile kaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda, tüm NP'lerin (kaplanmamış rutil hariç) kontrole kıyasla apoptozu tetiklediği, ayrıca inorganik/organik yüzey kaplamalarının hücrelerde apoptoz oluşumuna karşı herhangi bir avantaj sağlamadığı belirlenmiştir. Diğer yandan, toz halindeki NP'lerin hidrofilik yapısının hem kristal faza (anataz > rutil) hem de yüzey bileşimine (kaplanmamış inorganik kaplı > organik kaplanmış) bağlı olduğu fakat boyutuna bağlı olmadığı belirlenmiştir. Araştırmacılar TiO_2 NP'lerinin biyolojik aktivitesinden sorumlu yüzey alanları ve yüzey kaplamalarının fotokatalitik aktiviteden sorumlu olan özelliklerle yakından ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir (Bolis ve diğerleri, 2012).

Nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla *in vivo* araştırmalar da yapılmaktadır. İri burun yunus lökositlerinde 25 nm'den küçük anataz ve rutil TiO_2 NP'lerinin (20, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) genotoksik etkisinin komet testiyle incelenmesi sonucunda, tek ve çift zincir kırıkları ile alkali-işaretleli bölgelerin sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayarak, TiO_2 partiküllerinin dişli deniz hayvanları için “gelişen” bir kirletici olabileceği vurgulanmıştır (Bernardeschi, Guidi, Scarcelli, Frenzilli ve Nigro, 2010). 33 nm boyuttaki TiO_2 NP'lerinin olası genotoksik etkilerini incelemek için, CBAB6F1 farelerine, vücut ağırlıklarına göre 40 mg/kg, 200 mg/kg ve 1.000 mg/kg'lık konsantrasyonlar, 7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verilmiştir. Komet testinin uygulandığı bu çalışmada, farelerin karaciğer ve kemik iliğinde DNA hasarlarının arttığı fakat beyinde herhangi bir hasar oluşmadığı belirlenmiştir (Sycheva ve diğerleri, 2011). Farelerde yapılan bir çalışmada, vinkristin sülfat (VCR) tarafından oluşturulan kromozomal hasarlara karşı nano rutil TiO_2 'in etkileri mikronukleus testi ile incelenmiştir. VCR, mikrotübülerin fonksiyonlarını bozarak hücre bölünmesini metafazda durduran, hücreleri apoptozu yönlendiren bir anti-tümör ajandır. Çalışmada önce, vincristin (VCR, 3, 5 ve 7 mg/Kg) ve nano rutil TiO_2 'in (0,1, 1 ve 3 mg/Kg) farklı konsantrasyonları farelere intraperitoneal olarak enjekte edilerek, 24 saat sonra, mikronukleuslu polikromatik eritrositler (MNPCE) incelenmiş ve etkili dozlar tespit edilmiştir. Daha sonra VCR (5 mg/kg) ve nano

TiO₂ (1 g/Kg) hem tek başlarına ve hem de birlikte farelere uygulanmış ve 24, 48, 72 ve 96 saat sonra MNPCE'ler incelenmiştir. Etkili dozlarda, nano-TiO₂ ve VCR NP'lerinin tek başına, kontrole kıyasla en fazla 24 saatte MN frekansında artışa neden olduğu, her ikisinin birlikte uygulamasında, MN frekansında en fazla artışın 48 ve 72 saatlik uygulamalarda gerçekleştiği tespit edilmiştir. 96 saatlik uygulama ise ölüme sebep olmuştur. Bu sonuçlar, nano rutil TiO₂'in VCR'in etkileri üzerine sinerjistik etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Araştırmacılar VCR'ye bağlanan nano TiO₂'in çekirdek içine girebildiğini ve bunlardan kaynaklanan mitotik işlev bozukluğunun kromozomal anormalliklerini daha da artırdığını ifade etmişlerdir (Lotfi, Zirak, Moghadam ve Pazooki, 2016).

Yapılan bazı araştırmalarda, TiO₂ NP'lerinin genotoksik risk oluşturmadığına dair sonuçlar da mevcuttur. 6-7 haftalık erkek B6C3F1 farelerine TiO₂ NP'lerinin 0,5, 5,0 ve 50 mg/kg'lık konsantrasyonlarının intravenöz uygulaması sonucundaki etkileri mikronukleus testi, Pig-a (phosphatidylinositol glycan, class A gen) mutasyonu testi ve mikronukleuslu retikülosit frekansı (%MN-RET) ile değerlendirilmiştir. Hayvanlara intravenöz olarak 50 mg/kg TiO₂-NP'ü verilerek 4, 24 ve 48 saat sonra yapılan ölçümlerde, nanopartiküllerin 4 saat sonra kemik iliğinde en yüksek düzeye ulaştığı ve bu düzeyin birkaç gün korunduğu tespit edilmiştir. Retikülosit yüzdesinde oluşturduğu düşüklük nedeniyle, partiküllerin kemik iliğinde sitotoksik olduğu fakat Pig-a mutant frekansında ve %MN-RET frekansında artış oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TiO₂-NP'lerinin kemik iliğine ulaştığını ve sitotoksik olduğunu fakat genotoksik ve mutajenik etki oluşturmadığını göstermektedir (Sadiq ve diğerleri, 2012). Farelere TiO₂ NP'lerinin 140, 300, 645 ve 1.387 mg/kg'lık konsantrasyonlarının intravenöz tek doz uygulamasından 14 gün sonra, hayvanlarda ölüm, kan biyokimyası, hematolojik, genotoksik ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. En yüksek dozda, farelerde 2 gün sonra ölümler ve 7 gün sonra, fiziksel aktivitede ve yiyecek ve su alımında azalma tespit edilmiştir. Biyokimyasal parametreler ve histolojik kesitler, nanopartiküllerin beyin, akciğer, dalak, karaciğer ve böbrekte akut toksisiteye sebep olduğunu fakat hematolojik ve genotoksik etkiye sebep olmadığını göstermiştir (Xu ve diğerleri, 2013). Fare epitel hücreleri (CCL-149) üzerinde yapılan bir genotoksisite çalışmasında, nano-CuO, nano-CdO ve nano-TiO₂'inin genotoksisiteleri karşılaştırılmış ve sonuçta DNA zincir kırıkları ve 8-OHdG oluşumu açısından NP'lerin toksik etkisinin sırasıyla nano-CuO>nano-CdO>nano-TiO₂ olduğu tespit edilmiştir. TiO₂ partiküllerinin çok limitli sitotoksisite oluşturduğu fakat genotoksik etkili olmadığı vurgulanmıştır (Zhu, Hondroulis, Liu ve Li, 2013).

Üç farklı formdaki TiO_2 NP'lerinin (P25: 25 nm, %80 anataz, %20 rutil; NA: 5-30 nm, anataz; TLB: 5-10 nm, rutil) genotoksik etkisinin, OECD tarafından önerilen Ames testi ile incelendiği bir araştırmada, *S. typhimurium*'un TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarına, partiküllerin 0,875, 8,75 ve 87,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları uygulanmıştır. Ancak Ames testinde, herhangi bir mutajenik etki tespit edilmemiştir. Araştırmacılar, Ames testindeki negatif sonuçların, kullanılan kültür ortamının, bakterilerle nanopartiküller arasındaki elektrostatik etkileşimi engellemesinden ve nanopartiküllerde aglomerasyon oluşturmamasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir (Jomini, Labille, Bauda ve Pagnout, 2012).

Yukarıdaki paragraflarda da görüldüğü gibi, tıpta, elektronikte, farmasötik ve kozmetik alanında yaygın olarak kullanılan TiO_2 NP'lerinin sahip oldukları spesifik özellikleri nedeniyle insan sağlığı ve çevre üzerinde negatif etkileri olabileceğinden hareketle bu güne kadar bir çok araştırmalar yapılmış ve bu konuda bir çok derlemeler de yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda, nanopartiküllerin çeşitli canlılarda inflamasyona, pulmoner toksisiteye, fibroze ve akciğer tümörlerine sebep olduğu ve bu nedenle insanlarda da kanserojen olabileceği belirtilmektedir. Kanser de mutasyonlardan kaynaklanan bir hastalıklar grubu olması nedeniyle, günümüzde, nanopartiküllerin ve özellikle TiO_2 nanopartiküllerinin genotoksik etkileri konusunda araştırmalar hala devam etmektedir. Genotoksisite araştırmalarında, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan testler, Ames testi, komet testi, mikronukleus testi, kardeş kromatid değişimi testi, memeli hücresi hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz gen testi, kanat somatik mutasyon ve genetik rekombinasyon testi ve fare fosfatidilinositol glikan ve A sınıfı gen testi gibi testlerdir. Yapılan testlerde hem negatif ve hem de pozitif sonuçların elde edilmesi ve bu sonuçların bir birine zıt olmasından, ayrıca, nanopartikül üretimi, kullanımı ve atıklarının insan ve diğer canlı türlerinde ve doğada birikiminin her geçen gün artış göstermesinden dolayı, bu tez çalışmasında TiO_2 nanopartiküllerinin genotoksik etkilerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus testleri ile incelenmesi planlanmıştır.

2.8. Genetik Toksisite Testleri

Yaşadığımız çevrede maruz kaldığımız fiziksel ve kimyasal ajanların DNA ve/veya kromozomlarda oluşturduğu hasarlar (DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, gen

mutasyonları, yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri) çeşitli genotoksisite testleri ile incelenmektedir (Atlı-Şekeroğlu, 2013; Mamur, 2018a; 2018b; Şen, Beceren ve Aksoy, 2018; Yüzbaşıoğlu, 2006, 2008, 2014, 2016). Genetik toksikoloji testleri, gelişmiş ülkelerde düzenleyici kuruluşlar tarafından istenen ve yeni geliştirilen ilaç ve gıda katkı maddelerine ve diğer bazı kimyasallara uygulanması gereken testlerdir. Günümüzde, farmasötiklerin, metabolitlerin, tıbbi ilaçların, tarım ilaçlarının, endüstriyel kimyasalların, evlerde kullanılan kimyasalların, gıda katkı maddelerinin, dolaylı gıda katkı maddelerinin ve çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerini belirlemede kullanılan özel yönergeler mevcuttur. Bilim insanları, bu testleri veya bunların modifiye formlarını kullanarak, ticari amaçla kullanılan çeşitli kimyasalların genotoksik risklerini belirlemek üzere araştırmalar yapmaktadır. Bu araştırmalarda özellikle *in vitro* testler kullanılmaktadır. Bu testlerin amacı, bir yandan genetik testlerde kullanılacak hayvan sayısını azaltmak diğer yandan da kimyasalların genotoksik risklerini güvenli bir şekilde belirlemektir. Son yıllarda uygulanan genotoksisite testlerinin mümkün olduğunca ekonomik olması, basit ve kolay uygulanabilir olması, oluşan genetik hasarların tespitinin hassas ve güvenilir olması, diğer testlerden elde edilen sonuçlarla korelasyon göstermesi ve az sayıda örnek gerektirmesi gibi bazı özelliklere sahip olması istenmektedir (Ataseven, Yüzbaşıoğlu, Çelebi, Keskin ve Unal, 2016; Hagmar ve diğerleri, 1994; Kontaş, Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Mamur, Yuzbasioglu, Altok, Unal ve Deger, 2019; Özparlak ve Çelik, 2016; Pfeiffer ve diğerleri, 2000; Ünal, Yüzbaşıoğlu, Yılmaz, Akıncı ve Aksoy, 2011, Zengin, Ünal, Yılmaz ve Aksoy, 2011).

Fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik risklerini belirlemek amacı ile en çok uygulanan *in vitro* test sistemleri bakterilerde Ames/geri mutasyon testi (OECD TG 471), memeli kromozom anormallikleri testi (OECD TG 473), memeli hücresi gen mutasyonu testi (OECD TG 476 [Hprt] ve TG 490 [MLA/tk]) ve memeli hücresi mikronükleus testleridir. Günümüzde oldukça yaygın kullanılan *in vivo* testlere memeli eritrosit mikronükleus testi (OECD TG 474), memeli kemik iliği kromozom anormalliği testi (OECD TG 475), transgenik kemirgen somatik ve germ hücre gen mutasyon testi (OECD TG 488) ve memeli alkali komet testini (OECD TG 489) örnek verebiliriz. Tüm OECD Test Yönergeleri, OECD web sitesinde detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. Günümüzde genotoksik tehlikenin insanlar ve diğer canlılar üzerindeki değerlendirilmesinde önce *in vitro* test sistemleri ile başlanmakta olan süreç, bazı durumlarda *in vivo* testlerle desteklenmekte ve takip edilmektedir (Corvi ve Madia, 2017).

Bu tez çalışmasında TiO_2 NP'lerinin genotoksik risklerini belirlemek amacıyla uyguladığımız kromozom anormallikleri (KA) testi, kendiliğinden veya bir mutajenin (kimyasal/radyasyon) etkisi sonucunda kromozomlarda oluşan hasarlardan ve/veya hasar gören kromozomların tamir edilememesinden ya da yanlış tamir edilmesinden kaynaklanan anormallikleri belirleyen bir genotoksisite testidir. Kromozom anormallikleri ya normal kromozom yapısında (yapısal anormallik) ve/veya sayısında (sayısal anormallik) ortaya çıkan ve mikroskopik olarak tespit edilebilen genetik değişikliklerdir. KA testi hem *in vitro* ve hem de *in vivo* koşullarda uygulanabilen, canlıların karşılaşılabileceği genotoksik ajanların oluşturduğu/oluşturabileceği kromozom hasarlarını önceden belirlemede kullanılan hassas ve güvenilir bir biyobelirteçtir. KA testi güvenilir ve hassas olmasına rağmen uygulanması zor, yavaş ilerleyen ve deneyim gerektiren bir testtir (Erikel, Yüzbaşıoğlu ve Unal, 2018; Mamur, 2018a; 2018b; Pfeiffer ve diğerleri, 2000; Üstün Alkan ve Anlaş, 2015, Üstüner, 2011; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2016).

Bu tez çalışması kapsamında NP'lerin genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ile de incelenmiştir. OECD tarafından daha önce yönergeleri yayınlanan Memeli Hücrelerinde *in vitro* KKD Testi (TG 479) 2 Nisan 2014 tarihinde OECD test yönergelerinden çıkarılmıştır. Ancak testin sahip olduğu ve sağladığı bir takım avantajları nedeniyle, genetik toksikoloji çalışmalarında hala kullanılmaya devam edilmektedir. KKD testi, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği hasarların belirlenmesinde kullanılmaktadır. KKD, bir kromozomun iki kardeş kromatidi arasında, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen homolog değişim bölgelerini göstermektedir. Bu bölgeler, DNA'nın replikasyon esnasında kırıldığı ve sonra tekrar birleştiği, yani onarılamamış hatalı DNA birleşmelerinin meydana geldiği noktalarlardır. KKD'nin gözlenebilmesi için, hücrelerin iki replikasyon döngüsü geçirmesi gerekmektedir. Perry ve Wolff tarafından geliştirilen bu testte, DNA replikasyonu esnasında kültür ortamına Timin (T) analogu olan 5'-bromo-deoxyuridine (BrdU) ilave edilmektedir. Replikasyon sürecinde, iki hücre döngüsünü takiben, her kromozomun bir kromatidinin her iki ipliğine BrdU katılması ve hazırlanan metafaz preparatlarının UV ile ışınlaması sonucunda bu kromatidin daha açık boyanması nedeniyle, kardeş kromatid değişimi gerçekleşen bölgeler kolayca tespit edilmektedir. Bu metod, tekrarlanabilen güçlü kantitatif veriler elde edilmesini sağlamaktadır (Aghamohammadi ve Savage, 2016; Avuloğlu, 2017a; 2017b; Chen ve Yen, 2014; Kontaş ve diğerleri, 2011; Salawu ve diğerleri, 2018; Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Gönenç, 2015). KKD sayısındaki artış, mutajenlerin neden olduğu genetik hasarın göstergesi olarak

değerlendirilmektedir. Bunun dışında, DNA onarım mekanizmalarında hasar olan ve neoplazi oluşumuna yatkınlık ile karakterize olan çeşitli kalıtsal hastalıklarda da KKD sayısında artış gözlenmektedir. Bu hastalıklara Bloom sendromu, Fankoni anemisi, Ataksi-telanjiyektazi ve Kseroderma pigmentosumu örnek verebiliriz. Ayrıca, Cockayne sendromu, Werner sendromu, Duchenne ve Becker Musküler Distrofi, Kronik myeloid lösemi ve Down sendromlu hastalarda da KKD sayısında anlamlı düzeyde artış olduğu rapor edilmiştir (Bohr ve Wassermann, 1988; Cheng, Tarone, Andrews, Whang-Peng ve Robbins, 1978; German et al., 1996; Kontaş ve diğerleri, 2011; Latt, Stetten, Juergens, Buchanan ve Gerald, 1975).

Bu tez çalışmasında kullanılan mikronükleus (MN) testi de, çeşitli ajanların oluşturduğu kromozom hasarlarının tespitinde kabul edilen ve sıkça kullanılan mutajenite testleri arasında yer almaktadır. Bu test de kromozomlardaki hasarın göstergesi olarak kullanılan bir biyobelirteçtir. MN, hücre bölünmesi sırasında ana çekirdeğe dahil olmayan kromozom kırıkları (klastojenik etki) ve/veya geri kalmış bütün bir kromozomdan kaynaklanan (anöjenik etki), interfaz hücrelerinde gözlenen ana çekirdekten küçük ekstrasükleer yapılar olarak tanımlanmaktadır (Fenech, 2007; 2010; Çelik, 2007, 2009; Üstüner, 2011; Vidya ve diğerleri, 2017). MN testi, hem klastojenik hem de anöjenik potansiyeli belirleme özelliğinde olduğu için çeşitli ilaç adaylarını, gıda katkı maddelerini ve diğer maddelerin taranıp elemine edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Mamur, 2018b, 2018c). MN frekansındaki artış ile çeşitli kanserlerin oluşumu arasında pozitif bağlantı olduğu belirlenmiştir (Atlı-Şekeroğlu, 2013; Mamur, 2018b, 2018c; Yüzbaşıoğlu, 2008, 2018). Bu nedenle MN testi, farklı kanser çeşitlerinin belirlenmesinde, takip edilmesinde ve ayrıca önlenmesine yönelik çalışmalarda da önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Seaton ve Donaldson, 2005; Syed ve diğerleri, 2013; Yıldırım, Yeşilada ve Yoloğlu, 2006).

Bu tez çalışmasında, çubuk benzeri TiO_2 , pedot kaplı çubuk benzeri TiO_2 ve pedot nanopartiküllerinin genotoksik potansiyelleri kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen bulgulara dayanarak, bu üç nanopartikülün genotoksik düzeyi belirlenmiş ve karşılaştırılması yapılmıştır.

3. MATERİYAL METOT

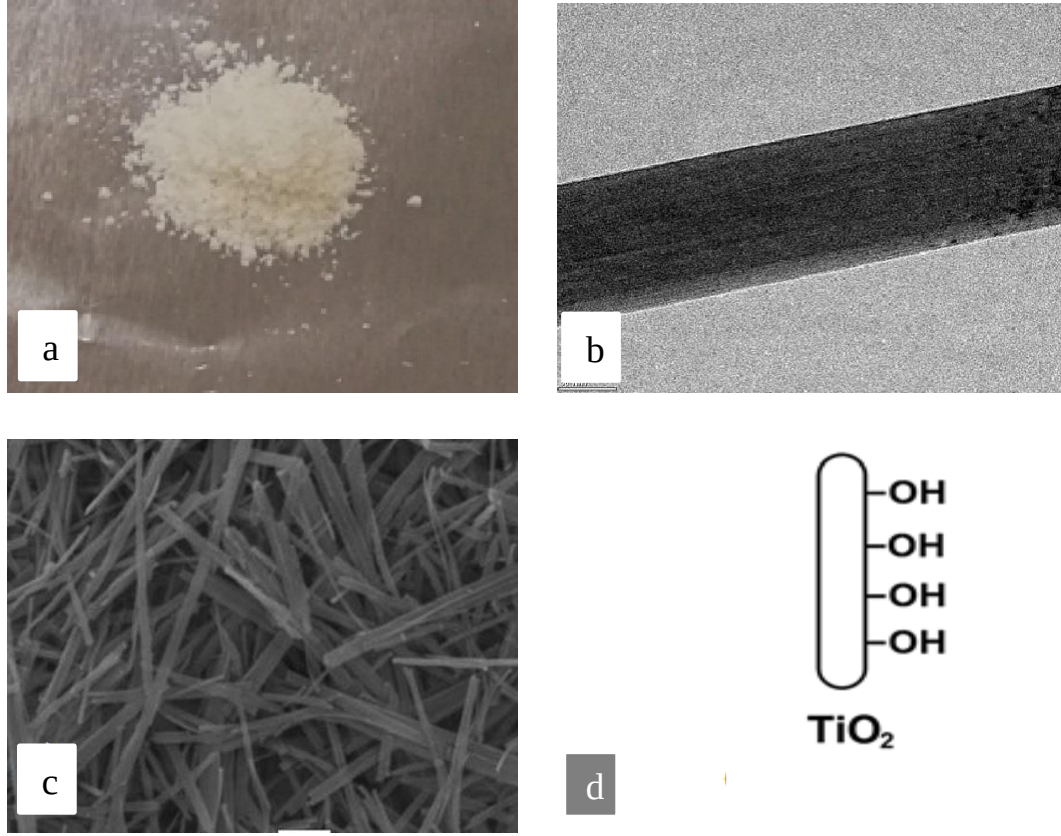
3.1. Materyal

Bu araştırmada çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri (TiO_2 -ÇNP), pedot kaplı çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri (Ç/Pd TiO_2 -NP) ve pedot nanopartiküllerinin (Pd NP) olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla insan periferik lenfositleri kullanılmıştır. Bu araştırmada uygulanan üç farklı genotoksisite testi için kullanılan periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı olmayan ve herhangi bir ilaca veya genotoksik ajana en az 3 aydır maruz kalma öyküsü bulunmayan, 23-27 yaşlarındaki gönüllü bir erkek ve iki bayan donörden temin edilmiştir. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun izni ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 09.10.2017; Karar No: 460; modifiye edilen formatı Tarih: 09.04.2018, Karar No: 304).

3.1.1. Test materyalleri

Çubuk benzeri titanyum dioksit nanopartikülleri

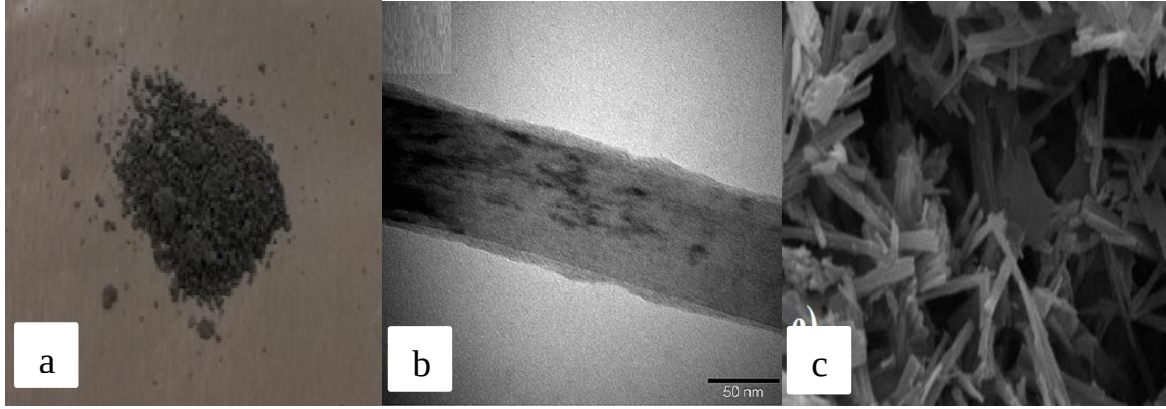
Titanyum dioksit nanopartikülü anataz, rutil, anatas pigmenti ve beyaz pigment olarak da adlandırılır ve E 171 kodu ile bilinir. Bu çalışmada kullanılan çubuk benzeri TiO_2 NP'leri Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Halil İbrahim Ünal'ın laboratuvarında sentezlenmiş ve kendisinden temin edilmiştir. Sentez için öncelikle TiO_2 NP nanopartikülü (%98 anataz, 15 nm) Nanostructured & Amorphous Materials Inc., ABD'den satın alınmıştır. Molekül Ağırlığı; 79,866 g/mol, CAS Numarası; 13463-67-7, yüzey alanı $14 \text{ m}^2/\text{g}$, erime noktası $>350^\circ\text{C}$ (lit.)'dir. Satın alınan TiO_2 nanopartikülünden 0,5 gr kullanılarak, Ünal ve arkadaşları tarafından 30 nm çap ve 100 nm boyunda ve yoğunluğu 3,575 g/mL olan çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri (TiO_2 -ÇNP) sentezlenmiş ve kendilerinden temin edilmiştir (Resim 3.1). Bu partiküllerin sentezi ve karakterizasyonuna ilişkin detaylı çalışmalar, Ünal ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Erol ve Unal, 2015).



Resim.3.1. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartikülünün a. genel görüntüsü b. TEM görüntüsü c. SEM görüntüsü d. kimyasal formülü (Erol ve Unal, 2015).

Pedot kaplı çubuk benzeri titanyum dioksit nanopartikülleri

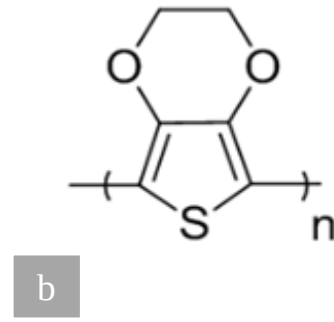
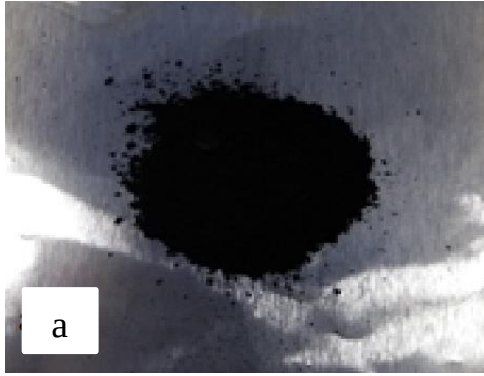
Bu çalışmada kullanılan pedot kaplı çubuk benzeri titanyum dioksit nanopartikülleri (Ç/Pd TiO₂-NP) de Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Halil İbrahim Ünal'ın laboratuvarında sentezlenmiş ve kendisinden temin edilmiştir. Çubuk benzeri titanyum dioksit nanopartikülleri, pedot ile kaplandıktan sonra (Ç/Pd TiO₂-NP) 6-7 nm daha fazla kalınlığa ulaşmıştır. SEM analizlerinde, pedot kaplaması nedeniyle çubuk benzeri TiO₂-NP'lerinin yüzeyinin pürüzlü bir görünüme sahip olduğu ve topaklanma eğiliminin arttığı tespit edilmiştir. Yoğunluğu 2,253 g/mL, iletkenliği 2,69 S/cm, sudaki iletkenliği 7,8x10⁻² S/cm olan bu partiküllerin sentezi ve karakterizasyonuna ilişkin detaylı bilgiler Ünal ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Resim 3.2) (Erol ve Unal, 2015).



Resim 3.2. Pedot kaplı TiO₂ nanopartiküllerinin a. genel görüntüsü b. TEM görüntüsü c. SEM görüntüsü d. kimyasal yapısı (Erol ve Unal, 2015).

Pedot nanopartikülleri

Bu tez çalışmasında kullanılan pedot polimerinin kimyasal adı PEDOT:PSS poli(3,4 etilendioksitiyofen) ve CAS No: 155090-83-8, iletkenliği $3,5 \times 10^2$ S/cm ve sudaki iletkenliği ise 16,4 S/cm olup, yüksek iletkenlik sınıfında yer almaktadır. Yoğunluğu 1,792 g/mL, sudaki konsantrasyonu % 3,0-4,0 olan Pd nanopartikülleri, siyah renkli bir görünüme sahiptir (Resim 3.3). Bu çalışmada kullanılan pedot nanopartikülleri de Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Halil İbrahim Ünal'dan temin edilmiştir. Bu partiküllerin karakterizasyonu ile ilgili detaylı bilgiler, Ünal ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Erol ve Unal, 2015).



Resim 3.3. Pedot nanopartikülünün a. genel görüntüsü b. kimyasal formülü (Erol ve Unal, 2015).

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Bromodeoksiüridin (CAS-No: 59-14-3), Mitomisin-C (CAS-No: 200-008-6), Kolkisin (CAS-No: 64-86-8), Sitokalsin-B (CAS-No: 14930-96-2) ve NaCl (CAS-No: 7647-14-5) Sigma'dan; EDTA (CAS-No: 6381-92-6), NaOH (CAS-No: 1310-73-2) ve KCl (CAS-No: 7447-40-7) Applichem'den ve Kromozom Medium B (Katalog No: F 5023) Biochrom'dan satın alınmıştır.

3.2. Metot

Bu tez çalışmasında incelenmesi planlanan pedot ve pedot kaplı çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerindeki genotoksitesisi üzerine daha önce yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamış, çubuk şekilli TiO_2 nanopartikülleri konusunda ise çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ancak çeşitli TiO_2 nanopartiküllerin, bazı hücre tiplerinde *in vitro* ve bazı canlı türlerde *in vivo* çalışmalarındaki toksisitesi ile ilgili daha fazla çalışma mevcuttur. Bu nedenle, kullanılacak olan konsantrasyonlar, diğer canlılarda tespit edilen LD_{50} değerleri ve daha önce yapılmış olan çalışmalarda konsantrasyonlar göz önüne alınarak (Çizelge 3.1) ve bir ön deneme yapılarak belirlenmiştir. Araştırmamızda her üç nanopartikülün 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile yapılan ön denemede, çubuk benzeri TiO_2 ve pedot kaplı TiO_2 NP'lerinin bu konsantrasyonlarının gerekli testlerin yapılabilmesine imkan sağlayacak düzeyde mitotik hücre bulunmasına imkan sağladığı tespit edilmiştir. Pedot nanopartiküllerinde ise, bu konsantrasyonların söz konusu testlerin uygulanabilmesi için çok yüksek ve toksik olması ve yeterli düzeyde mitotik hücre olmaması nedeniyle, 5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Titanyum dioksit ve Pedot nanopartiküllerinin LD₅₀ ve LC₅₀ dozları (Chesterton Global Solutions, Local Service 2017).

Nanopartikül	Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri	Kaynak
Titanyum dioksit	Sıçan	Oral	> 10.000 mg/kg	2015/830/EU
	Tavşan	Deri	> 10.000 mg/kg	2015/830/EU
	Sıçan	Soluma	> 6,82 mg/L	2015/830/EU
Pedot	Rat	Oral	> 2.000 mg/kg	Chemtec Publishing, 2016, Handbook of Polymers
	Bluegill sunfish	Aquatic toxicity (LC50)	> 10.000 mg/L	Chemtec Publishing, 2016, Handbook of Polymers

Çubuk benzeri TiO₂ ve pedot kaplı çubuk benzeri TiO₂ NP'lerinin uygulama süspansiyonlarının hazırlanması

Bu araştırmada kullanılan TiO₂-ÇNP'leri ve Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin, deiyonize suda 500 µg/mL olacak şekilde hazırlanan stok süspansiyonları, ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v: 50-60 Hz) 30 dakika sonike edilmiştir. Her iki nanopartikülün ana stok süspansiyonlardan 250, 100 ve 50 µg/mL'lik uygulama konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm süspansiyonlar, 10 dakika daha sonike edilmiştir. Süspansiyon halindeki nanopartiküller, kültürdeki hücrelere uygulanmadan hemen önce vortekslenerek homojen hale getirilmiştir.

Pedot NP'lerinin uygulama süspansiyonlarının hazırlanması

Bu çalışmada genotoksik etkisi incelenecek olan Pedot NP'lerinin deiyonize suda 50 µg/mL olacak şekilde hazırlanan stok süspansiyonuna da ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v: 50-60 Hz) 30 dakika sonikasyon uygulanmıştır. Pedot NP'lerinin 25, 10 ve 5 µg/mL'lik diğer uygulama konsantrasyonları, stok süspansiyonun seyreltilmesi ile hazırlanmış ve takiben tüm süspansiyonlar 10 dakika daha sonike edilmiştir. Bu nanopartiküller, kültürdeki insan lenfositlerine uygulanmadan hemen önce vortekslenerek homojen hale getirilmiştir.

3.2.1. Kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi testlerinin uygulanması

Çubuk benzeri TiO₂, Pedot ve Pedot kaplı çubuk benzeri TiO₂ NP'lerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kromozomal anormallik testi, Evans ve arkadaşlarının (1984) metodunda yapılan bazı değişikliklerle (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri,

2006; Ünal ve diğerleri, 2011) uygulanmıştır. Kardeş kromatid değişimi testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yönteminde yapılan bazı modifikasyonlarla (Speit ve Haupter, 1985) uygulanmıştır. Bu testler için donörlerden alınan periferik kan, Chromosome Medium B içeren tüplere 0,2 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Aynı tüplere, 10 µg/mL 5-Bromodeoksiüridin (BrdU) ilave edilmiştir. Hazırlanan kültür tüpleri etüvde 37°C'de, 72 saat inkübe edilmiştir. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki TiO₂-ÇNP'leri, Ç/Pd TiO₂-NP'leri ve Pd-NP'leri, kültür süresinin son 24 ve 48 saatinde tüplere ilave edilmiştir. Deneylerde negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak 0,20 µg/mL'lik mitomisin-C (MMC) kullanılmıştır. Kültürün sonlandırılmasından 2 saat önce her tüpe 0,06 µg/mL kolkisin ilave edilmiştir. Kültürün sonlandırılmasıyla tüpler 1.200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Tüplerde kalan süspansiyona 0,075 M KCl ilave edilmiş ve 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Tüplerin santrifüjünden sonra hücreler 3:1 metanol:asetik asitte tespit edilmiştir. Toplam üç fiksasyondan sonra tüpte kalan hücre süspansiyonu lam üzerine yayılmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Preparatların boyanması

Hazırlanan preparatlardan bir kısmı kromozom anormallikleri ve mitotik indeksin belirlenebilmesi için doğrudan %5'lik Giemsa ile (pH 6,8, 15-25 dakika) boyanmıştır. Preparatların diğer kısmı ise kardeş kromatid değişimlerinin gözlenebilmesi ve replikasyon indeksinin belirlenebilmesi amacıyla floresan+giemsa metoduna göre boyanmıştır (Speit ve Haupter, 1985). KKD'lerin belirlenmesi amacıyla preparatlar 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışınlanmıştır (pH 6,8). Yıkanan preparatlar 58°C'de 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-sodyum sitrat) tamponunda 1 saat inkübe edilmiş ve takiben %5'lik Giemsa'da (pH 6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Tekrar yıkanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra entellan ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin belirlenmesi

Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için, her bir donörden, kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz olmak üzere toplam 300 metafaz incelenmiştir. Her bir uygulama için anormal hücrelerin yüzdesi (KA%) ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) sayısı da belirlenmiştir.

Mitotik indeksin (MI) belirlenmesinde, her bir uygulama süresi ve her bir konsantrasyon için, her bir donörden 1.000 hücre olmak üzere toplam 3.000 hücre değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, mitoz bölünme geçiren hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden hesaplanması ile belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksinin belirlenmesi

Kültür ortamına ilave edilen BrdU ve takiben uygulanan ışınlamadan dolayı ortaya çıkan kardeş kromatid değişimlerinin belirlenmesi amacıyla her bir uygulama konsantrasyonu ve uygulama süresi için, preparatlarda ikinci mitozda olan toplam 75 hücre (her bir donör için 25 hücre) değerlendirilmiştir. Replikasyon indeksinin (RI) belirlenmesi için her bir uygulama için toplam 300 hücre (her bir donörden 100 hücre) incelenmiştir. İncelenen hücreler, kromozomların boyanma farkları dikkate alınarak birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz bölünme evresine göre sınıflandırılmıştır. $RI = 1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3) / N$ (N=incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Speit ve Haupter, 1985).

3.2.2. Mikronükleus testinin uygulanması

Araştırmamızda sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi uygulamasında Fenech (2007)'in metodu bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Buna göre her bir donörden alınan heparinize kanlar, içinde kromozom medium B bulunan tüplere 0,2 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan kültür tüpleri 37°C'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürdeki insan periferik lenfositleri, TiO₂-ÇNP'leri ve Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin 50, 100, 250 ve 500 µg/mL'lik ve Pd NP'lerinin ise 5, 10, 25 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiştir. Bu uygulamalarda bir negatif kontrol (distile su) ve bir de pozitif kontrol (0,20 µg/mL MMC) grubu da bulundurulmuştur. Kültürdeki tüplere sitokinezin durdurulması için 44. saatte Sitokalsin-B (7 µl) eklenmiştir. Kültürden alınan tüpler 1.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplerde kalan süspansiyona soğuk 0,075 M KCl eklendikten sonra buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Tekrar santrifüj edilen tüplere, 3:1 metanol:asetik asit ile toplam üç kez tespit işlemi uygulanmıştır. Son fiksatife formaldehit ilave edilmiştir. Yeniden santrifüjü takiben, süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra tüplerde kalan süspansiyon homojen hale getirilerek lam üzerine yayılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Preparatların boyanması

Mikronükleus testi için hazırlanan preparatlar pH 6,8 olan %5'lik Giemsa ile 10-15 dakika boyanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar entellan ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopta incelemeye alınmıştır.

Mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi

MN frekansının belirlenmesinde çekirdek bölünmesi geçirmiş fakat sitoplazma bölünmesi geçirmemiş çift çekirdekli (binükleat) hücreler incelenmiştir. Bu çalışmada incelenen nanopartiküllerin insan lenfositlerinde MN frekansı üzerinde her hangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla üç donörden elde edilen toplam 3.000 binükleat (her bir donörden 1.000 binükleat) hücre incelenmiştir. Bu hücrelerde 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu ve 3 mikronükleuslu hücreler tespit edilmiş ve MN frekansı= $[1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]/N$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Nükleer bölünme indeksinin hesaplanmasında her uygulama için toplam 1.500 hücre (her bir donörden 500 hücre) incelenmiş ve bu hücreler çekirdek sayısına göre sınıflandırılmıştır. Nükleer bölünme indeksi (NBI)=[$1xN1+2xN2+3x(N3+N4)/n$] formülüne göre belirlenmiştir. Formülde geçen N1 bir çekirdekli hücre, N2 iki çekirdekli hücre, N3 üç çekirdekli hücre, N4 dört ve daha fazla çekirdeğe sahip hücrelerin sayısını, n ise incelenen toplam hücre sayısını göstermektedir.

3.2.3. İstatistiksel analizler

Araştırmamızda, nanopartikül uygulaması yapılan ve kontrol grubu olarak kullanılan lenfositlerdeki kromozom anormalliği frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı, mikronukleus frekansı, nükleer bölünme indeksi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks değerleri z testi ile karşılaştırılırken, kardeş kromatid değişimi sonuçları t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında kontrole göre anlamlı değişim belirlenen gruplar için de bu değişimin konsantrasyona bağlı olup olmadığını belirlemek amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çubuk Benzeri Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Etkileri

4.1.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri

Çubuk benzeri TiO_2 NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda kültürdeki insan lenfositlerinde altı farklı yapısal kromozom anormalliği gözlenmiştir. Bunlar sıklıklarına göre sırasıyla kromatid kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom, kromatit değişimi, fragment ve kromozom kırığıdır. Sayısal anormallik olarak sadece poliploidi tespit edilmiştir (Çizelge 4.1., Resim 4.1.).

Yapılan analizlere göre TiO_2 -ÇNP'lerinin kültürdeki insan lenfositlerinde anormal hücre frekansını ve hücre başına düşen kromozom anormalliklerini, 24 saatlik uygulamada negatif kontrole kıyasla artırdığı tespit edilmiştir. Bu artışların iki düşük konsantrasyon olan 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu ancak iki yüksek konsantrasyon olan 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlı olmadığı belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise, TiO_2 -ÇNP'lerinin bütün konsantrasyonları, hem anormal hücre frekansını ve hem de KA/Hücre sayısını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. KA frekansındaki artış, ne 24 saatlik ve ne de 48 saatlik uygulamada konsantrasyon artışına bağlı değildir (Çizelge 4.1., Şekil 4.1., Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi

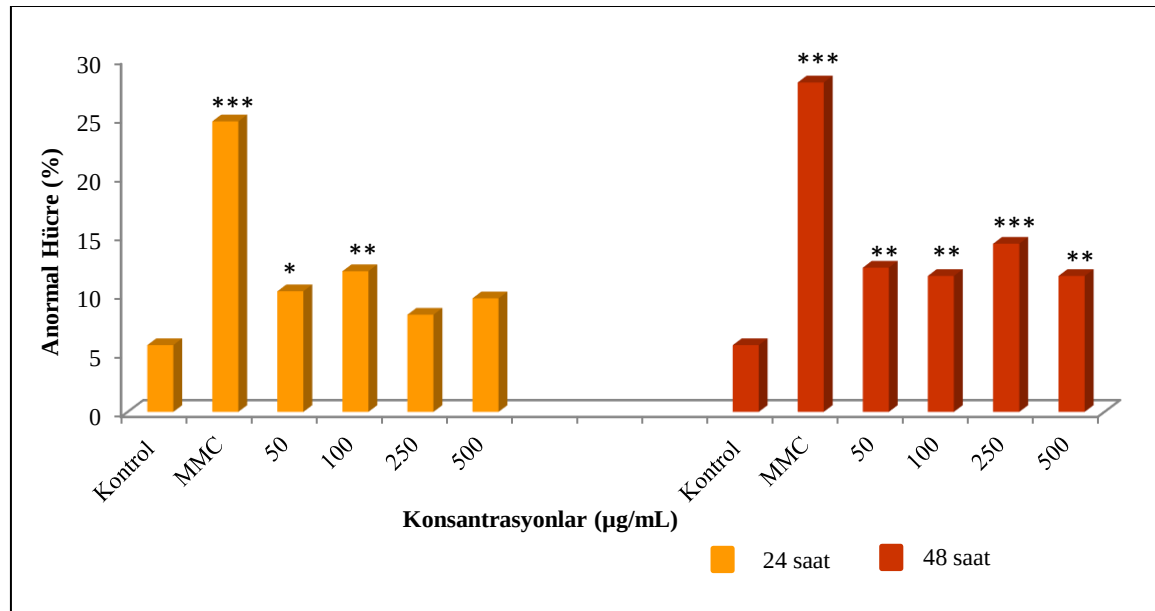
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre	KA/Hücre
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	kkb	ds	ktd	f	p		
										±SH (%)	±SH
N. Kontrol	24	0,00	8	1	7	1	-	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P. K. MMC	24	0,20	35	3	11	16	12	15	-	24,70±2,48***	0,31±0,02***
TiO ₂ -ÇNP	24	50	16	-	9	4	2	2	1	10,30±1,75*	0,11±0,01*
		100	8	3	10	6	2	8	-	12,00±1,87**	0,12±0,018**
		250	11	1	5	4	5	2	-	8,30±1,59	0,09±0,016
		500	17	-	4	5	2	1	-	9,70±1,70	0,10±0,017
N. Kontrol	48	0,00	12	1	1	2	1	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P.K. MMC	48	0,20	43	7	2	5	38	15	-	28,00±2,59***	0,40±0,02***
TiO ₂ -ÇNP	48	50	15	-	12	7	-	1	1	12,30±1,89**	0,12±0,018**
		100	16	5	6	3	2	2	2	11,60±1,84**	0,12±0,019**
		250	15	1	14	11	-	4	1	14,33±2,02***	0,16±0,021***
		500	21	3	9	7	1	5	2	11,60±1,84**	0,16±0,021***

ktk:kromatid kırığı, kzk:kromozom kırığı, kbb:kardeş kromatidlerde birleşme, ds:disentrik kromozom, ktd:kromatid değişimi, f:fragment, p:poliploidi, N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

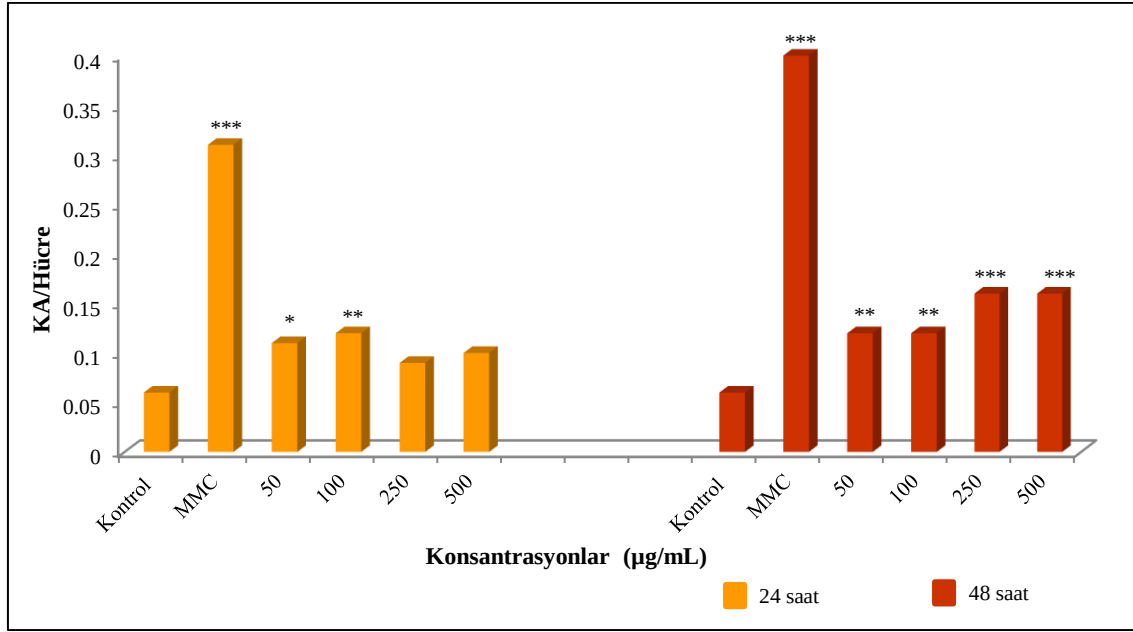


*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

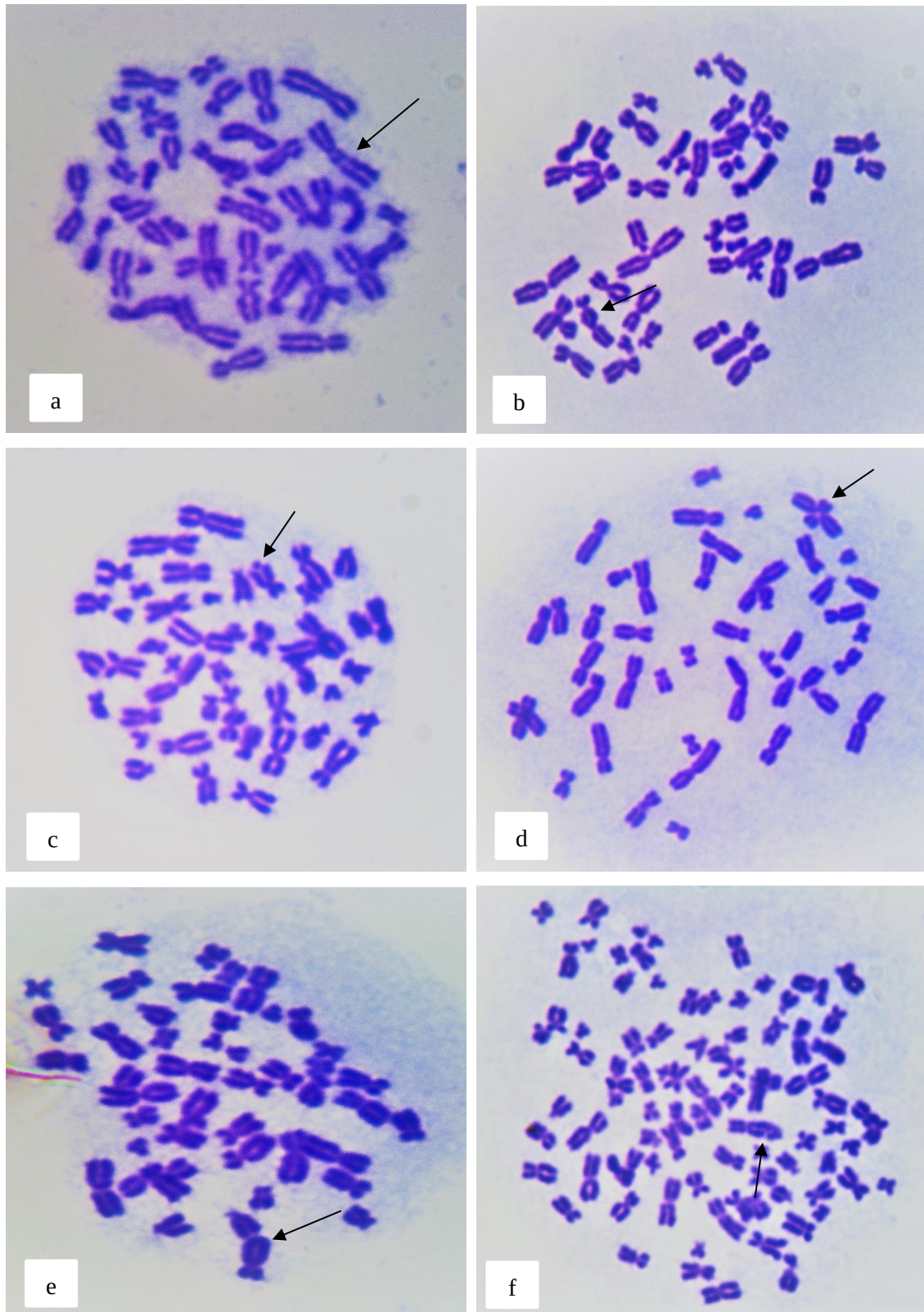
***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.1. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etkisi



*Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
 **Kontrolle göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
 ***Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.2. Çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi



Resim. 4.1. Çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri a.kromozom kırığı b.disentrik koromozom c.fragment d.kromatid değişimi e.kardeş kromatidlerde birleşme f.poliploidi ve kromatid kırığı

4.1.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri

Çubuk benzeri TiO_2 NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) 24 ve 48 saatlik uygulaması sonucunda kültürdeki insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkileri Çizelge 4.2., Şekil 4.3. ve Resim 4.2.'de gösterilmiştir. TiO_2 -ÇNP'leri, lenfositlerde 0-16 arasında KKD oluşturmuştur. TiO_2 -ÇNP'lerinin bazı konsantrasyonları, KKD/Hücre oranını kontrole kıyasla artırmış olmasına rağmen, bu artışın sadece 24 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyonda anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

TiO_2 -ÇNP'lerinin tüm konsantrasyonları, insan lenfositlerinde, mitotik indekste kontrole kıyasla düşüslere sebep olmuştur. Mİ'teki düşüş, 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde gerçekleşirken, 24 saatlik uygulamada sadece 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamada anlamlı düşüş gözlenmiştir. Mİ'teki düşüşlerin konsantrasyon artışına bağlı olmadığı tespit edilmiştir. TiO_2 -ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde, replikasyon indeksi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi

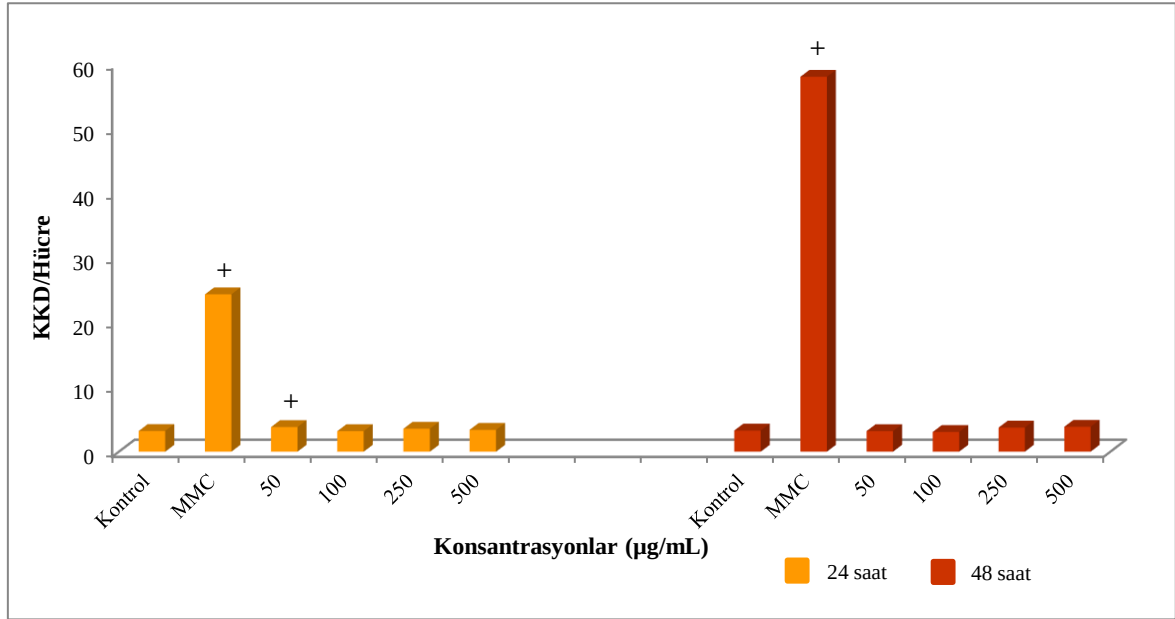
Test maddesi	Uygulama		Min-mak	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)							
N. Kontrol	24	0,00	0-9	3,20 $\pm$ 0,24	109	116	78	1,96 $\pm$ 0,045	8,07 $\pm$ 0,49
P. K. MMC	24	0,20	11-54	24,30 $\pm$ 1,12 +	127	111	64	1,78 $\pm$ 0,044	6,57 $\pm$ 0,45*
TiO_2 -ÇNP	24	50	0-13	3,81 $\pm$ 0,27+	61	116	123	2,20 $\pm$ 0,043	6,60 $\pm$ 0,45*
		100	0-7	3,17 $\pm$ 0,19	86	81	155	2,23 $\pm$ 0,047	7,40 $\pm$ 0,48
		250	0-9	3,54 $\pm$ 0,23	113	80	121	2,01 $\pm$ 0,049	7,30 $\pm$ 0,47
		500	0-11	3,37 $\pm$ 0,27	116	105	96	1,87 $\pm$ 0,046	6,90 $\pm$ 0,46
N. Kontrol	48	0,00	0-9	3,26 $\pm$ 0,19	89	97	114	2,08 $\pm$ 0,047	9,70 $\pm$ 0,54
P.K.MMC	48	0,20	26-104	58,02 $\pm$ 2,19+	161	94	63	1,66 $\pm$ 0,043	6,30 $\pm$ 0,44***
TiO_2 -ÇNP	48	50	0-7	3,17 $\pm$ 0,23	84	96	126	2,12 $\pm$ 0,047	7,80 $\pm$ 0,48*
		100	0-10	3,04 $\pm$ 0,22	105	93	118	2,03 $\pm$ 0,048	7,30 $\pm$ 0,47***
		250	0-16	3,72 $\pm$ 0,37	115	76	149	2,10 $\pm$ 0,049	8,00 $\pm$ 0,49*
		500	0-11	3,84 $\pm$ 0,28	132	84	116	1,89 $\pm$ 0,048	8,00 $\pm$ 0,49*

N. Kontrol: negatif kontrol, P.K.MMC: pozitif kontrol

*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

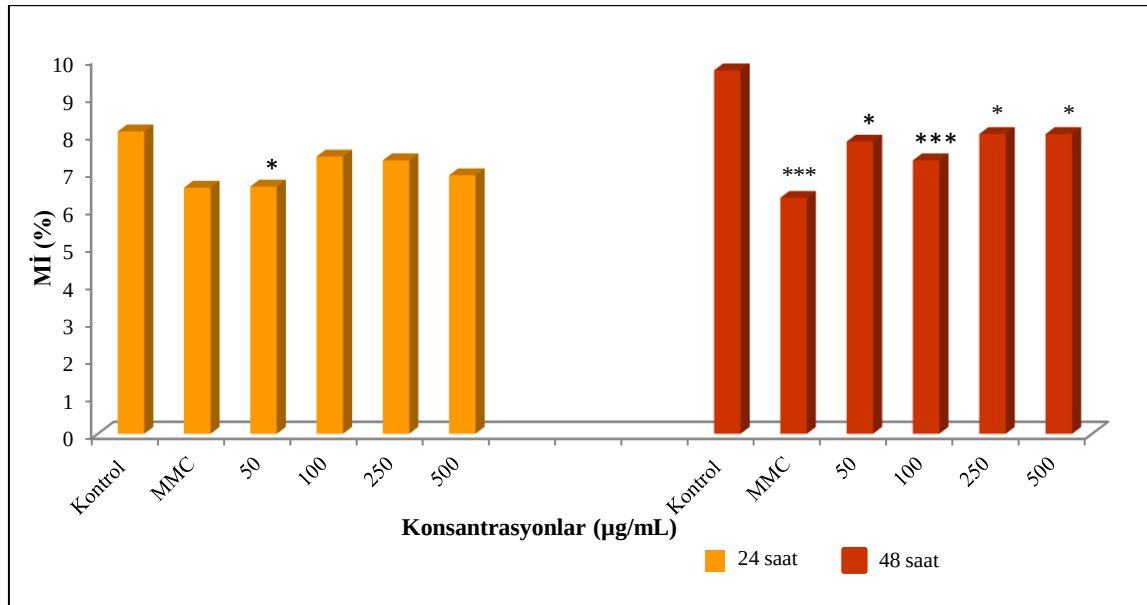
*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



+ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)

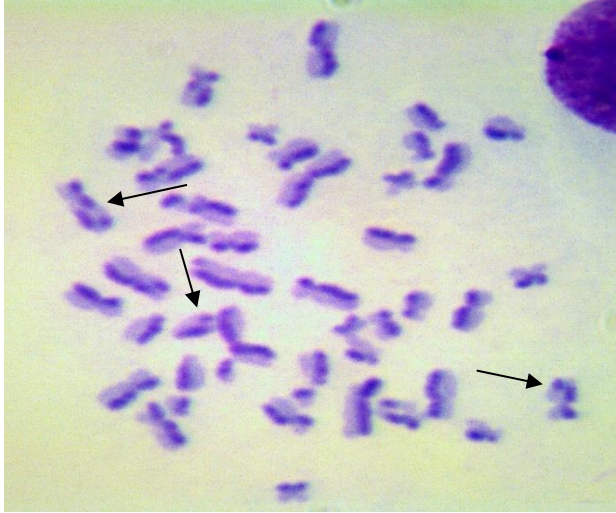
Şekil 4.3. Çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi



*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.4. Çubuk benzeri TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi



Resim 4.2. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu kardeş kromatid değişimleri

4.1.3. Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri

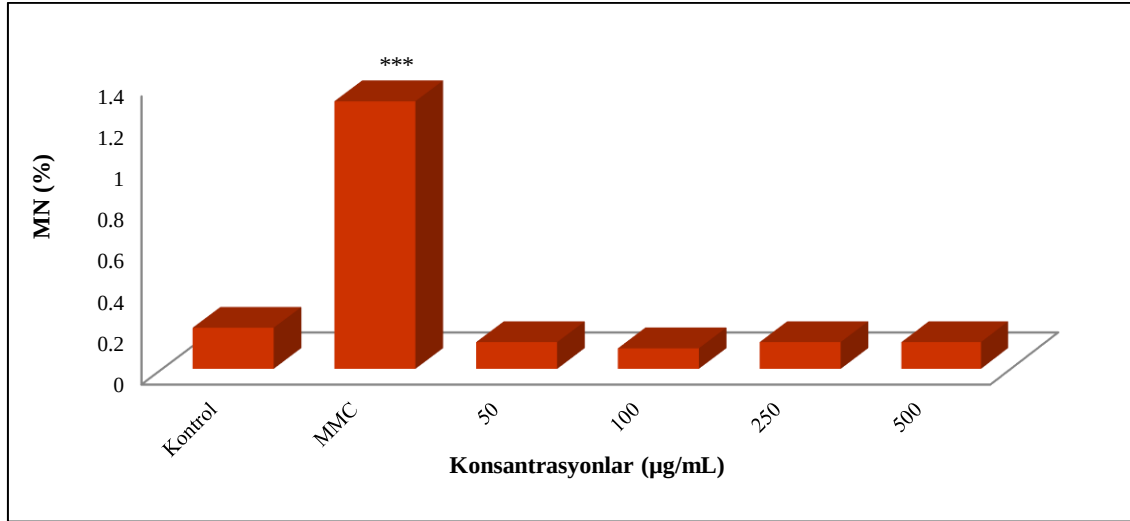
TiO₂-ÇNP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) insan lenfositlerinde 48 saatlik uygulaması sunucunda mikronükleus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Uygulanan hiçbir konsantrasyonda negatif kontrole kıyasla MN frekansında artış gözlenmemiştir. Tam tersine anlamlı olmayan çok küçük bir düşüş belirlenmiştir. İncelenen 3.000 binükleat hücreden çok azında sadece 1 MN bulunduğu gözlenmiştir. TiO₂-ÇNP'lerinin nükleer bölünme indeksi üzerinde kontrole kıyasla küçük fakat anlamlı olmayan bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3., Şekil 4.5., Resim 4.3.).

Çizelge 4.3. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.

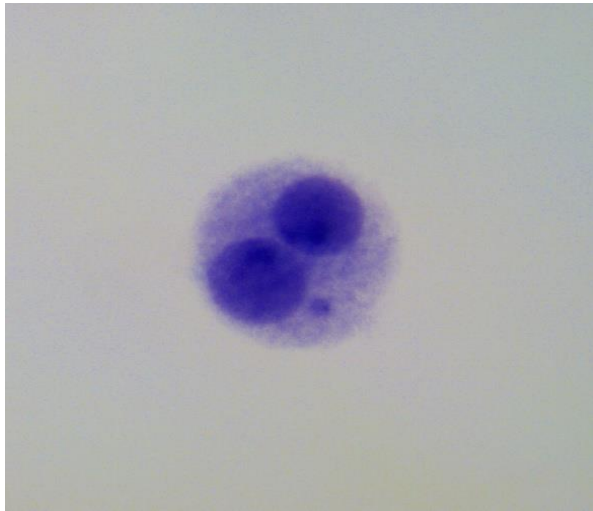
Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat sayısı	BN hücrelerde mikronükleus sayısı	MN±SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ±SH)
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)				
N. Kontrol	48	0,00	3000	7	0,20±0,08	1,49±0,313
P. K. MMC	48	0,20	3000	40	1,30±0,20***	1,37±0,301
TiO ₂ -RNP	48	50	3000	4	0,13±0,66	1,54±0,313
		100	3000	3	0,10±0,057	1,57±0,321
		250	3000	4	0,13±0,66	1,57±0,321
		500	3000	4	0,13±0,66	1,62±0,32

N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol, MMC

***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.5. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi



Resim 4.3. Çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu 1 mikronükleuslu binükleat hücre

4.2. Pedot Kaplı Çubuk Benzeri Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Etkileri

4.2.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri

Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) 24 ve 48 saatlik uygulamasının insan lenfositlerinde oluşturduğu yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir. Bu uygulama sonucunda tespit edilen yapısal anormallikler sıklıklarına göre sırasıyla kromatid kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme,

disentrik kromozom, fragment, kromatid değişimi ve kromozom kırığıdır. Ç/Pd TiO₂ NP'lerinin bazı konsantrasyonları sayısal anormallik olan poliploidi oluşumuna da sebep olmuştur (Resim 4.4.).

Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin 24 saatlik uygulamasında, tüm konsantrasyonlar negatif kontrole kıyasla anormal hücre frekansında, konsantrasyona bağlı olmayan artışlara sebep olmuştur. Anormal hücre frekansındaki artış, sadece 250 µg/mL'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin 48 saatlik uygulamasında da, tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla anormal hücre frekansında artış görölmüştür. Bu artışların konsantrasyon artışıyla paralel olmadığı ve sadece en yüksek konsantrasyonda negatif kontrole kıyasla anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4., şekil 4.6.).

Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin tüm konsantrasyonları, her iki uygulama süresinde de insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısında negatif kontrole kıyasla artışlara sebep olmuştur. Bu artışların, 24 saatlik uygulamada sadece 250 µg/mL'lik konsantrasyonda, 48 saatlik uygulamada ise 50 µg/mL ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4., şekil 4.7.).

Çizelge 4.4. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre	KA/Hücre
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	kkb	ds	ktđ	f	p		
N. Kontrol	24	0,00	8	1	7	1	-	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P.K MMC	24	0,20	35	3	11	16	12	15	-	24,70±2,48***	0,31±0,02***
Ç/Pd TiO ₂ -NP	24	50	7	-	9	2	1	5	-	8,00±1,56	0,08±0,015
		100	12	1	5	6	-	2	5	9,33±1,67	0,10±0,017
		250	15	2	10	4	2	2	1	11,60±1,84**	0,12±0,018**
		500	10	-	8	4	3	2	-	9,33±1,67	0,09±0,016
N. Kontrol	48	0,00	12	1	1	2	1	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P.K MMC	48	0,20	43	7	2	5	38	15	-	28,00±2,59***	0,40±0,02***
Ç/Pd TiO ₂ -NP	48	50	11	-	7	2	3	3	4	9,66±1,70	0,11±0,018*
		100	11	1	5	4	1	1	-	8,00±1,56	0,08±0,015
		250	11	2	3	6	2	3	-	8,60±1,61	0,09±0,015
		500	10	2	12	4	6	1	-	11,30±1,82*	0,12±0,02**

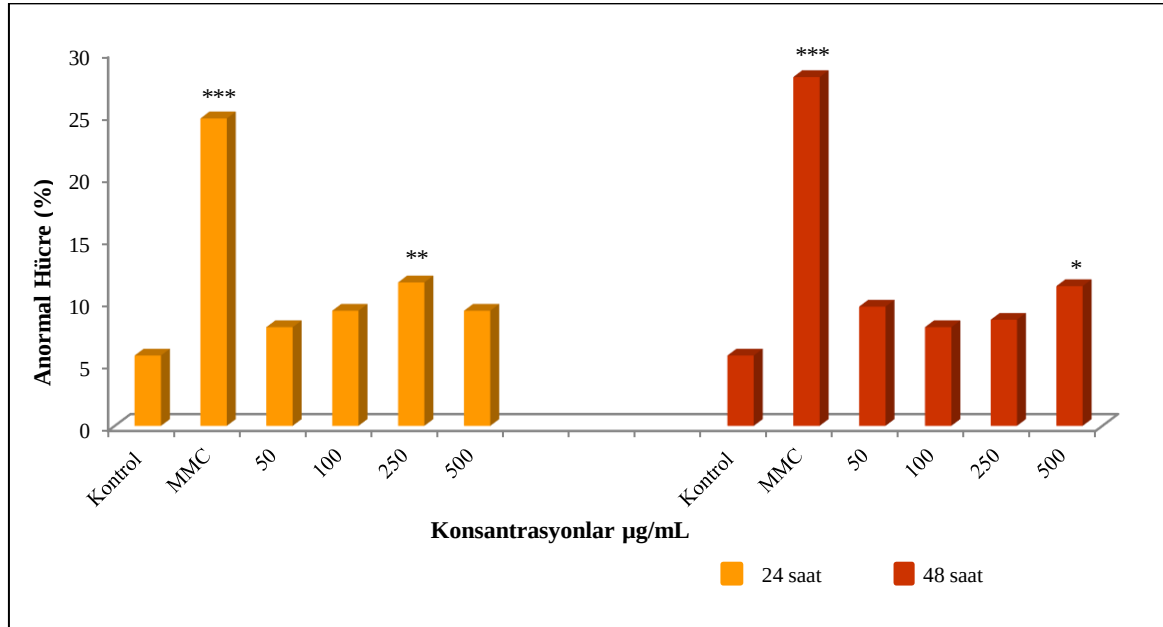
ktk:kromatid kırığı, kzk:kromozom kırığı, kkb:kardeş kromatidlerde birleşme, ds:disentrik kromozom, ktd:kromatid değişimi, f:fragment, p: poliploidi,

N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol,

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

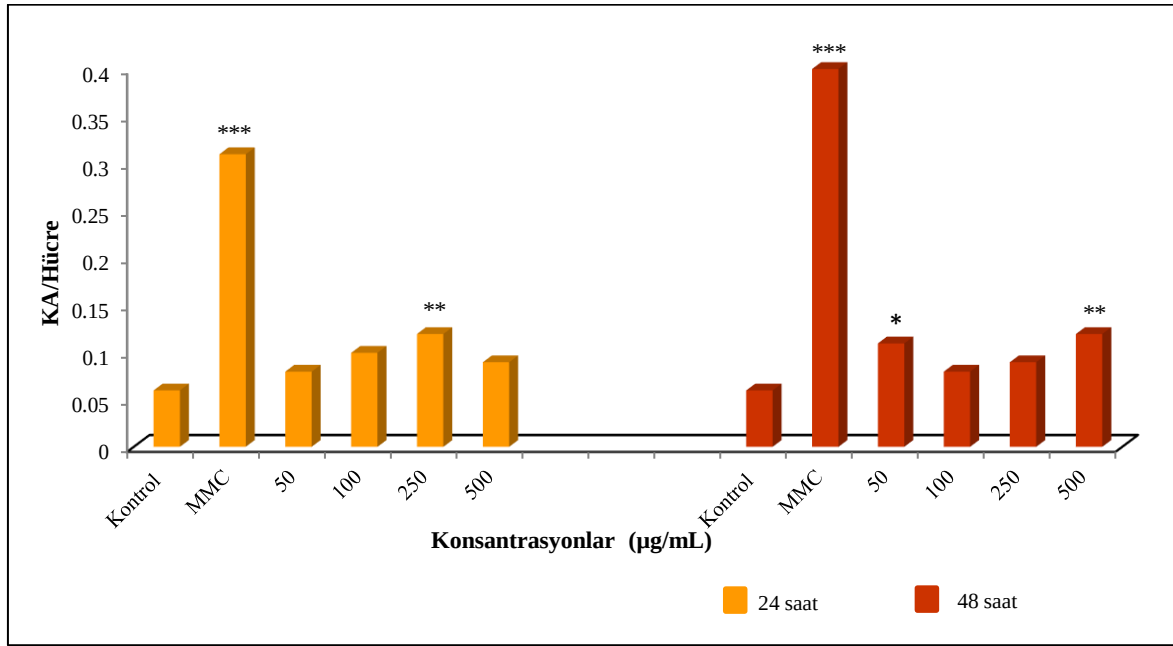


*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

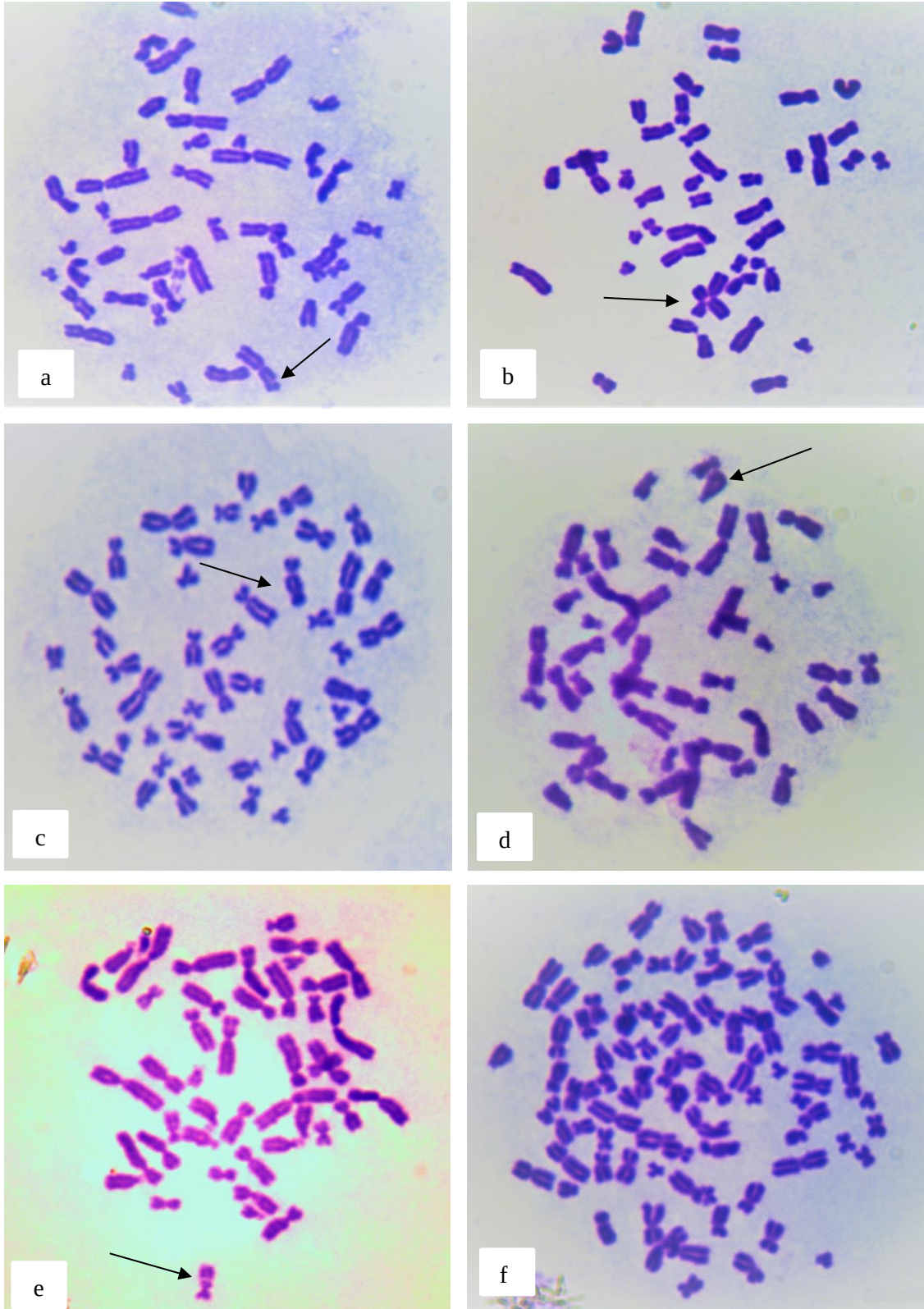
***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.6. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etkisi



*Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 **Kontrolle göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 ***Kontrolle göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.7. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi



Resim 4.4. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri a.kromatid kırığı b.kromatid değişimi c.disentrik kromozom d.kardeş kromatidlerde birleşme e.kromozom kırığı f. poliploidi

4.2.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri

Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir. Bu çizelgede, NP'ün birinci, ikinci ve üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkileri de gösterilmiştir. Ç/Pd TiO₂-NP'leri, lenfositlerde 0-10 arasında KKD oluşturmuştur. 24 saatlik uygulamada, KKD/Hücre sayısı, 250 µg/mL'de negatif kontrole kıyasla küçük bir artış gösterirken, diğer tüm uygulama konsantrasyonlarında düşüş göstermiştir. KKD/Hücre sayısındaki düşüş, sadece 50 µg/mL'de istatistiksel açıdan anlamlı düzeydedir. Ç/Pd TiO₂ NP'lerinin 48 saatlik uygulaması sonucunda da tüm konsantrasyonlarda KKD/Hücre sayısında negatif kontrole kıyasla bir azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın 50 ve 250 µg/mL'lik iki konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.8, Resim 4.5). Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin tüm konsantrasyonları, insan lenfositlerinde, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, mitotik indekste, negatif kontrole kıyasla, konsantrasyona bağlı olmayan düşüşlere sebep olmuştur. Bu düşüşlerin 24 saatlik uygulamada, 50 µg/mL'de, 48 saatlik uygulamada ise 100 ve 500 µg/mL'de anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan Ç/Pd TiO₂-NP'lerinin insan lenfositlerinde replikasyon indeksinde, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada negatif kontrole kıyasla küçük artışlara ve azalışlara sebep olduğu, fakat bu değişimlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5., Şekil 4.9.).

Çizelge 4.5. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)							
N. Kontrol	24	0,00	0-9	3,20±0,24	109	116	78	1,96±0,045	8,07±0,49
P.K. MMC	24	0,20	11-54	24,30±1,12 +	127	111	64	1,78±0,044	6,57±0,45*
R/Pd TiO ₂ -NP	24	50	0-5	2,24±0,17 +	104	83	145	2,16±0,048	6,70±0,46*
		100	0-10	2,68±0,21	73	84	172	2,28±0,046	7,30±0,47
		250	0-8	3,26±0,23	84	87	143	2,17±0,047	7,90±0,49
		500	0-8	2,86±0,21	110	101	111	2,03±0,047	7,00±0,46
N. Kontrol	48	0,00	0-9	3,26±0,19	89	97	114	2,08±0,047	9,70±0,54
P.K. MMC	48	0,20	26-104	58,02±2,19+	161	94	63	1,66±0,043	6,30±0,44***
R/Pd TiO ₂ -NP	48	50	0-8	2,61±0,21 +	114	97	127	2,03±0,047	8,50±0,5
		100	0-8	2,78±0,20	88	110	102	2,04±0,045	7,60±0,48**
		250	0-6	2,56±0,18 +	83	96	127	2,14±0,046	9,20±0,52
		500	0-7	2,82±0,18	96	103	101	2,01±0,043	7,80±0,48**

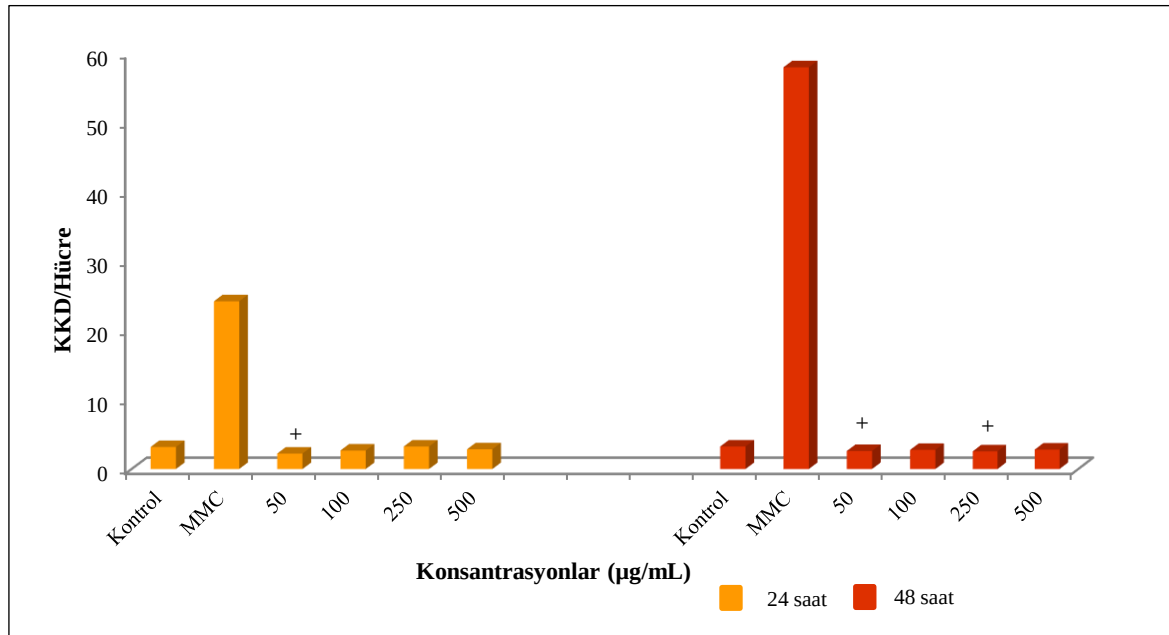
N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol

+Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

*Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

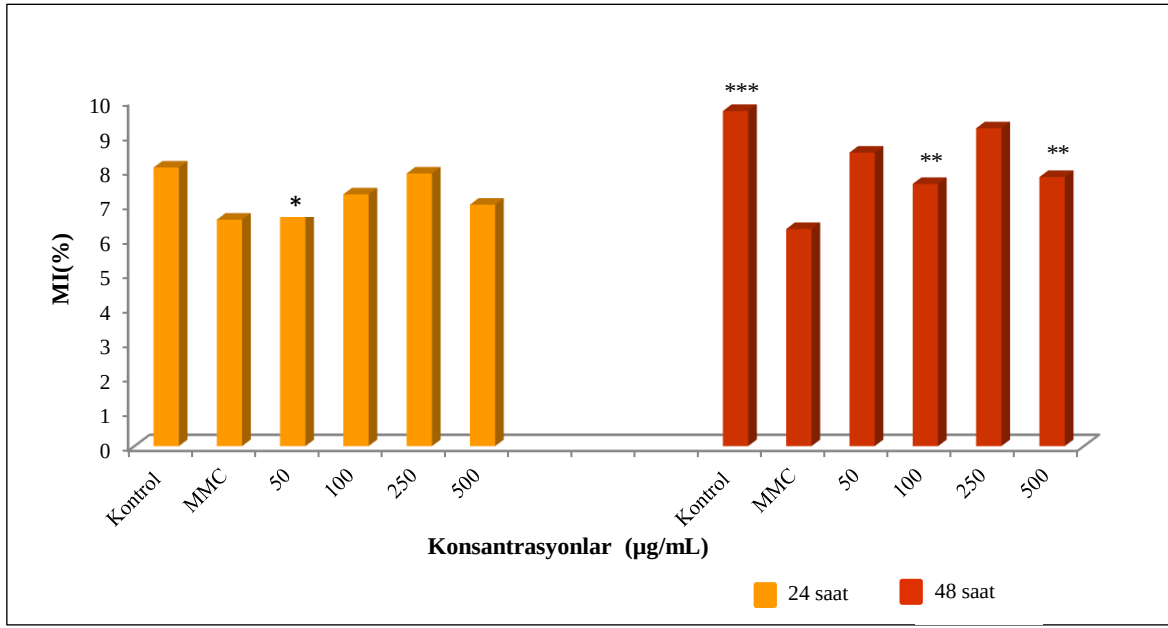
**Kontrolle göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrolle göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



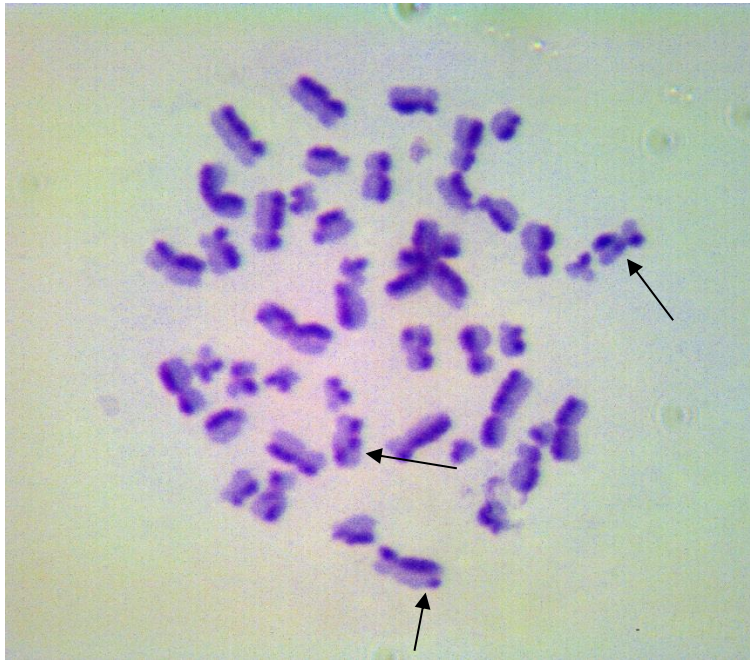
+ Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

Şekil 4.8. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi



*Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
 ***Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.9. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi



Resim 4.5. Ç/Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu kardeş kromatid değişimleri

4.2.3. Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri

Ç/Pd TiO₂ NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) insan lenfositlerine 48 saat uygulanması sonucunda mikronükleus oluşumları üzerindeki etkileri

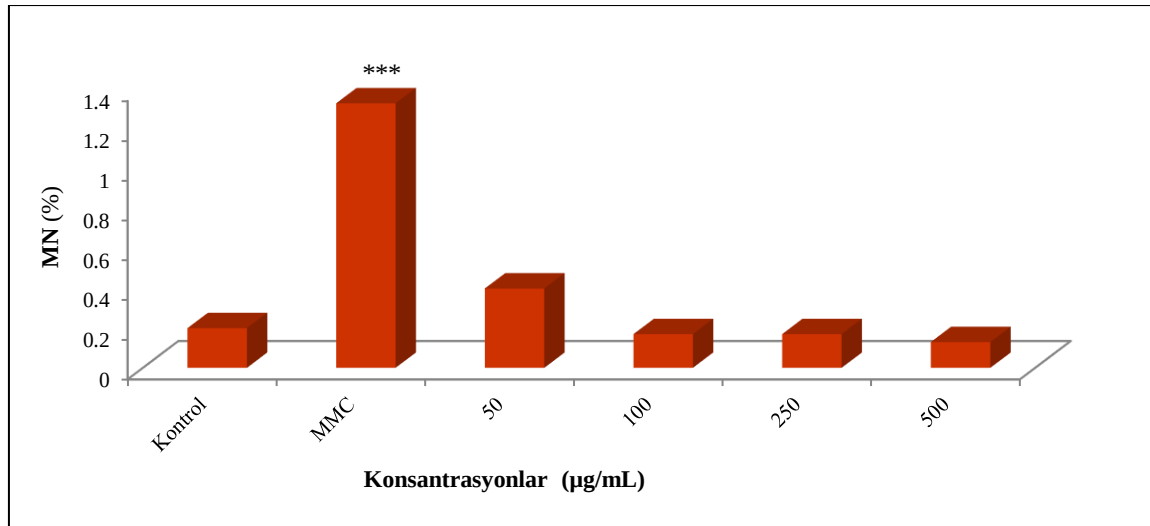
Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. Elde edilen binükleat hücrelerde yapılan incelemede, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon dışında tüm konsantrasyonların binükleatlarda bir mikronükleus oluşturduğu gözlenmiştir. Ç/Pd TiO_2 NP'lerinin oluşturduğu MN frekansı, negatif kontrole kıyasla 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de artış, diğer 3 konsantrasyonda ise azalma göstermekle birlikte, bu değerlerden hiç birisi anlamlı değildir. Benzer şekilde, nükleer bölünme indeksinde meydana gelen küçük değişimler de negatif kontrole kıyasla anlamlı değildir (Çizelge 4.6., Şekil 4.10., Resim 4.6.).

Çizelge 4.6. Ç/Pd TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus sayısı		MN±SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ±SH)
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)		
N. Kontrol	48	0,00	3.000	7	-	0,20±0,08	1,49±0,313
P.K. MMC	48	0,20	3.000	40	-	1,30±0,20***	1,38±0,30
Ç/Pd TiO ₂ -NP	48	50	3.000	10	2	0,40±0,11	1,44±0,30
		100	3.000	5	-	0,17±0,07	1,49±0,31
		250	3.000	5	-	0,17±0,07	1,52±0,32
		500	3.000	4	-	0,13±0,66	1,50±0,32

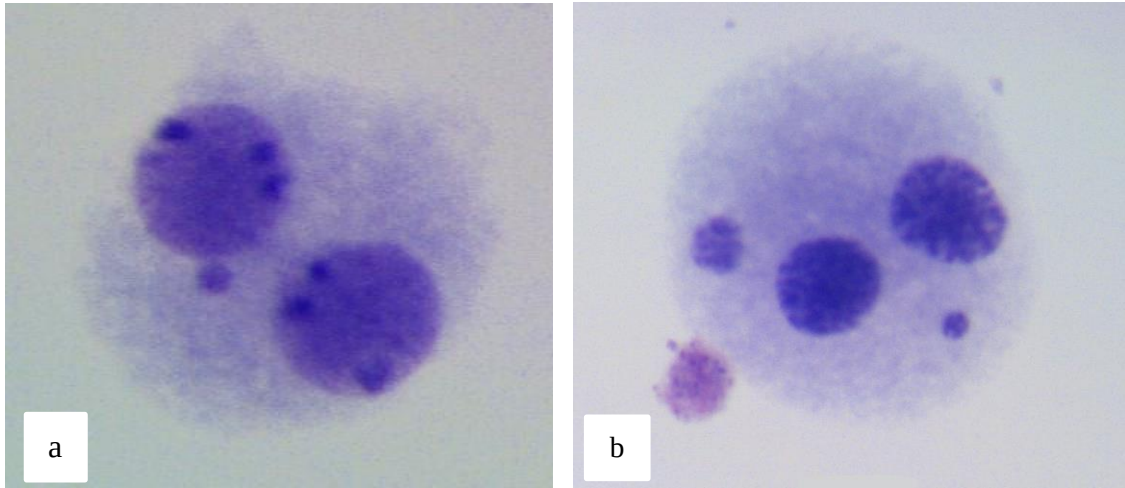
N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol, MMC

***Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



***Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.10. Ç/Pd TiO_2 nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi



Resim 4.6. Ç/Pd TiO₂ nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mükronükleus oluşumuna etkisi a. 1 mikronükleuslu binükelat hücre b. 2 mikronükleuslu binükleat hücre

4.3. Pedot Nanopartiküllerinin Etkileri

4.3.1. Kromozom anormalliği üzerine etkileri

Pedot nanopartiküllerinin dört farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25 ve 50 µg/mL) insan lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda oluşan yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Pd NP'leri, insan lenfositlerinde en çok kromatid kırığına sebep olmuştur. Bunu, sıklıklarına göre sırasıyla kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik ve fragment, kromatid değişimi, kromozom kırığı ve halka kromozom takip etmektedir. Pd NP'leri aynı zamanda sayısal anormallik olarak iki hücrede poliploidiye de sebep olmuştur (Resim 4.7.).

Pedot nanopartiküllerinin 24 saatlik uygulamasında, bütün konsantrasyonlar, negatif kontrole kıyasla anormal hücre frekansını artırmıştır. Bu artış, 10 µg/ml dışındaki tüm konsantrasyonlarda anlamlıdır. Ancak bu artışlar konsantrasyon artışıyla paralellik göstermemiştir. Pd nanopartiküllerinin 48 saatlik uygulamasında da bütün konsantrasyonlarda anormal hücre frekansında, negatif kontrole kıyasla artışlar olmasına rağmen, bu artışların hiç birisi istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.7., Şekil 4.11., Resim 4.7.). Pd NP'leri, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada, bütün konsantrasyonlarda, KA/Hücre sayısında, doz artışıyla paralellik göstermeyen artışlar oluşturmuştur.

Bu artışların, 24 saatlik uygulamada, 25 ve 50 µg/ml’lik konsantrasyonlarda anlamlı olduğu, diğerlerinde ise anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7., Şekil 4.11., Resim 4.7.).

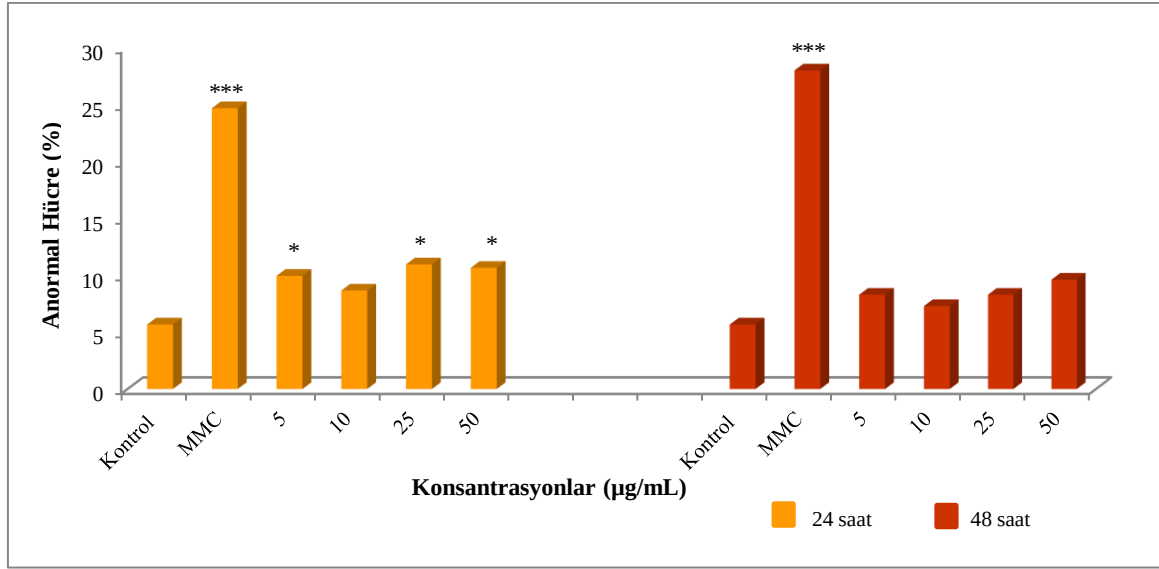
Çizelge 4.7. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre	KA/Hücre
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal				Sayısal					
			ktk	kzk	kkb	ds	ktđ	f	h	p		
N. Kontrol	24	0,00	8	1	7	1	-	-	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P.K. MMC	24	0,20	35	3	11	16	12	15	-	-	24,70±2,48***	0,31±0,02***
Pd NP	24	5	16	1	8	5	-	-	-	-	10,00±1,73*	0,10±0,017
		10	12	-	10	3	-	1	-	-	8,70±1,62	0,09±0,016
		25	10	1	12	4	2	5	-	1	11,00±1,80*	0,12±0,019**
		50	20	1	8	1	-	2	-	-	10,70±1,78*	0,11±0,018*
N. Kontrol	48	0,00	12	1	1	2	1	-	-	-	5,70±1,33	0,06±0,013
P.K. MMC	48	0,20	43	7	2	5	38	15	-	-	28,00±2,59***	0,40±0,02***
Pd NP	48	5	10	-	8	2	1	5	-	-	8,33±1,59	0,09±0,016
		10	10	2	5	-	3	3	-	1	7,33±1,50	0,08±0,015
		25	12	1	6	-	5	2	-	-	8,33±1,59	0,09±0,016
		50	18	-	4	4	1	1	1	-	9,66±1,70	0,10±0,017

ktk:kromatid kırığı, kzk:kromozom kırığı, kkb:kardeş kromatidlerde birleşme, ds:disentrik kromozom, ktd:kromatid değişimi, f:fragment, p:poliploidi, h: halka kromozom, N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

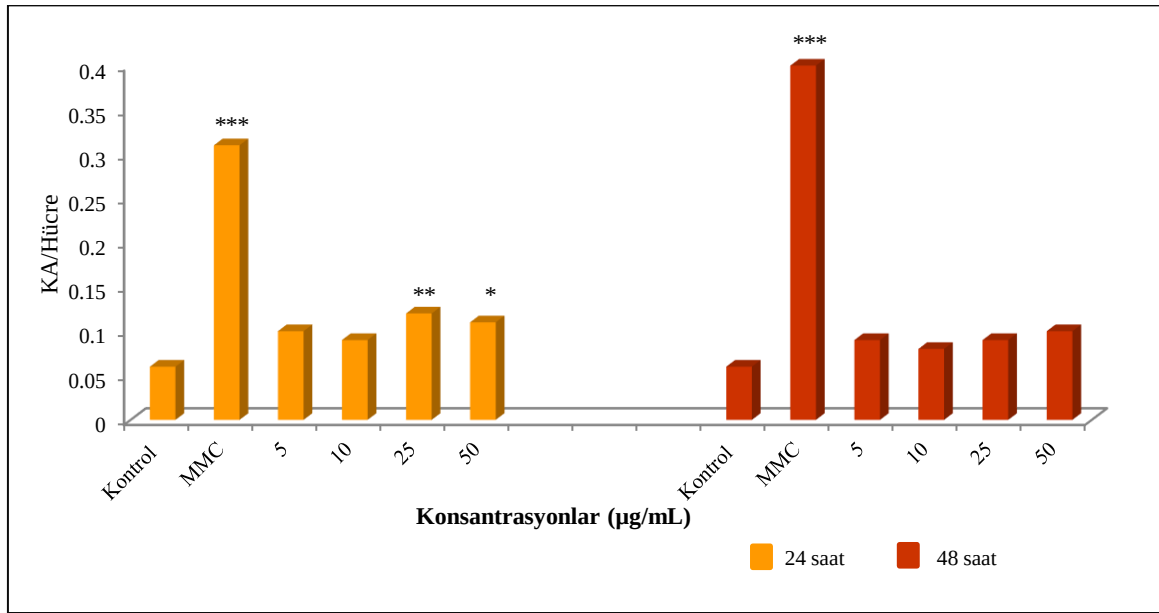
***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.11. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde anormal hücre frekansına etki

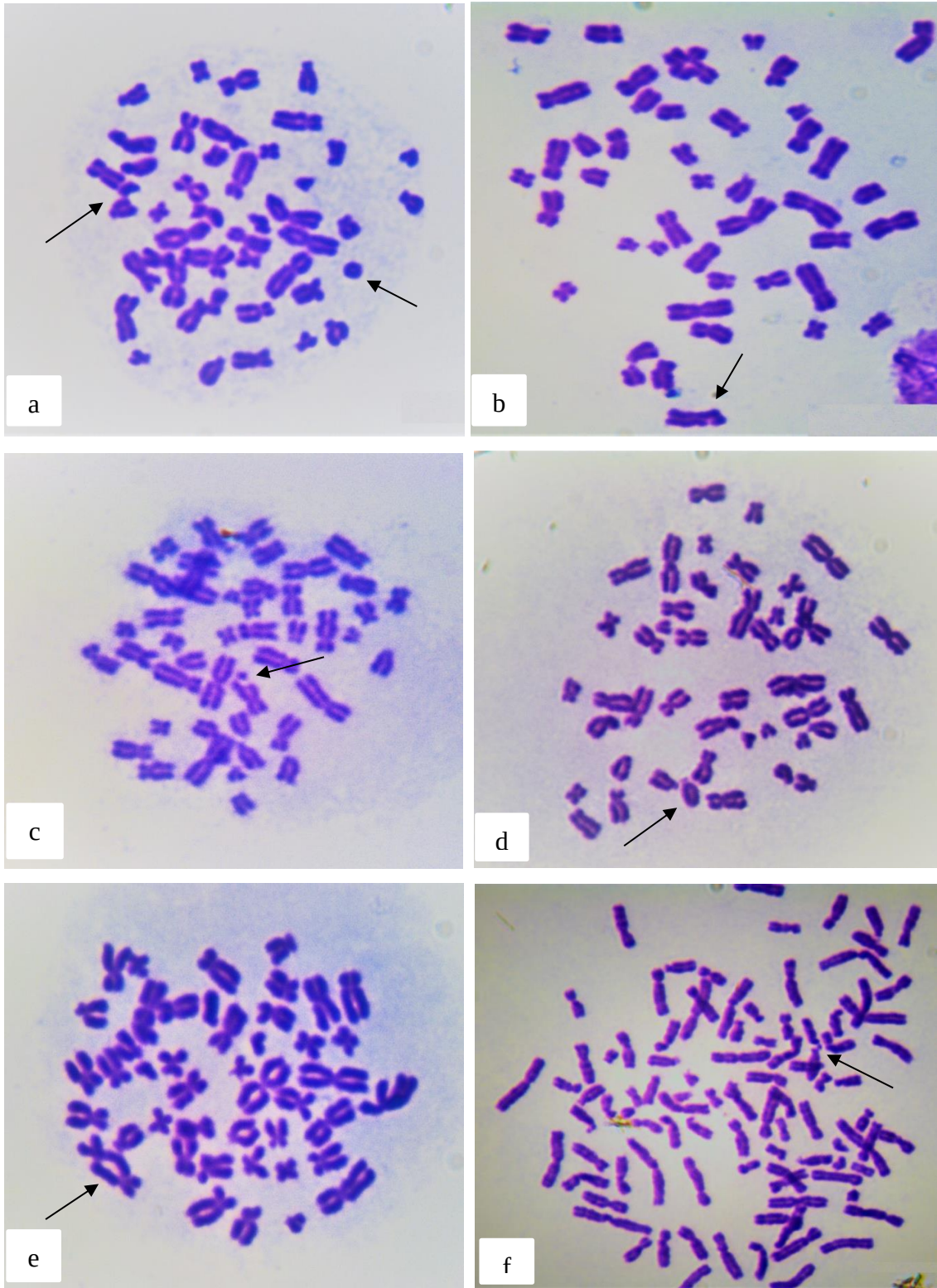


*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.12. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KA/Hücre sayısına etkisi



Resim 4.7. Pedot nanopartikülünün insan lenfositlerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri a.kromozom kırığı ve halka kromozom b.kromatid kırığı c.kromatid kırığı d.kardeş kromatidlerde birleşme e.disentrik kromozom f.polidloidi ve fragment

4.3.2. Kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri

Pedot nanopartiküllerinin dört farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25 ve 50 µg/mL) insan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik uygulamasının kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir. Pd NP'lerinin insan lenfositlerinde 0-14 arasında KKD oluşturduğu tespit edilmiştir. Pedot NP'lerinin 24 ve 48 saatlik uygulamasında KKD/Hücre sayısının bütün konsantrasyonlarda kontrole kıyasla azaldığı ve bu azalışın da hemen hemen bütün konsantrasyonlarda anlamlı olduğu (24 saatte, 50 µg/mL hariç; 48 saatte, 5 µg/mL hariç) tespit edilmiştir (Şekil 4.12., Resim 4.8.). Çizelge 4.8.'de, Pd NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun insan lenfositleri üzerinde mitotik indekse ve replikasyon indeksine etkileri de gösterilmiştir. Pd NP'lerinin 24 saatlik uygulamasında, mitotik indekste, negatif kontrole kıyasla 25 µg/mL'lik konsantrasyonda bir değişim gerçekleşmezken, 10 µg/mL'lik konsantrasyonda azalma, 5 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise artış meydana gelmiştir. Ancak bu artış ve azalışların hiç birisi anlamlı değildir. Diğer yandan Pd NP'lerinin 48 saatlik uygulamasında, tüm konsantrasyonlar, negatif kontrole kıyasla Mİ'te azalmaya sebep olmuştur. Mİ'teki azalma sadece 25 µg/ml'lik konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlıdır. Pedot nanopartiküllerinin, insan lenfositlerinde, replikasyon indeksinde oluşturduğu küçük değişimlerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.8., Şekil 4.13.).

Çizelge 4.8. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ üzerine etkisi

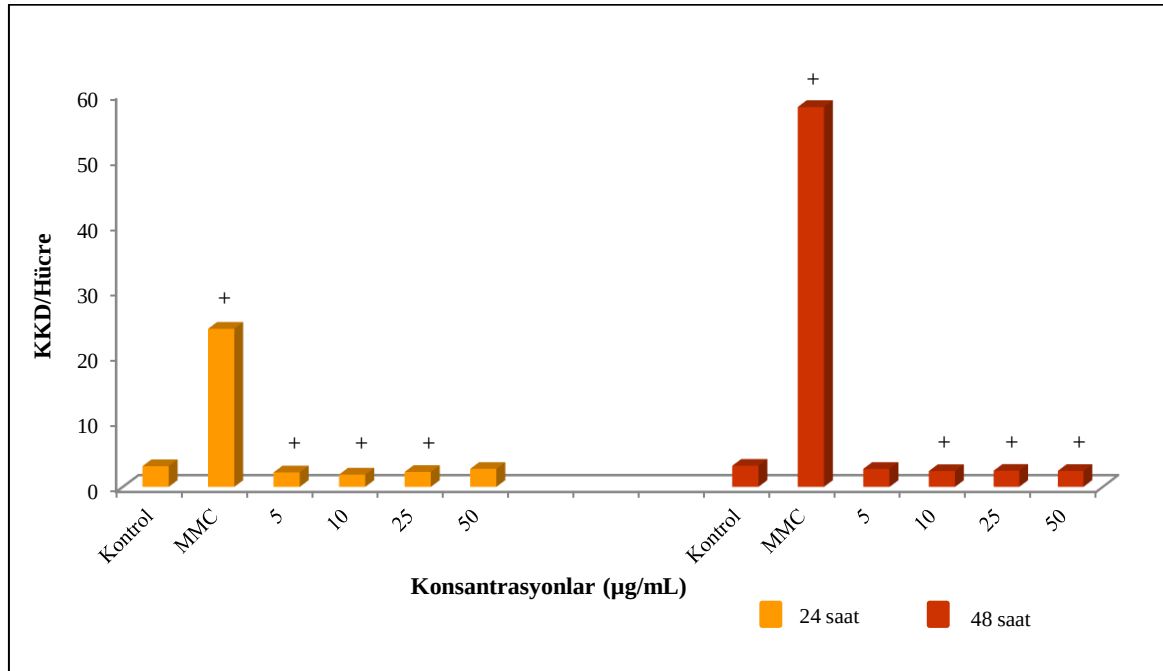
Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)							
N. Kontrol	24	0,00	0-9	3,20 $\pm$ 0,24	109	116	78	1,96 $\pm$ 0,045	8,06 $\pm$ 0,49
P.K.MMC	24	0,20	11-54	24,30 $\pm$ 1,12+	127	111	64	1,78 $\pm$ 0,044	7,53 $\pm$ 0,48*
Pd NP	24	5	0-8	2,23 $\pm$ 0,14 +	87	101	114	2,08 $\pm$ 0,046	8,36 $\pm$ 0,50
		10	0-6	1,90 $\pm$ 0,16 +	86	83	142	2,18 $\pm$ 0,048	7,06 $\pm$ 0,46
		25	0-6	2,30 $\pm$ 0,15 +	77	90	155	2,22 $\pm$ 0,046	8,06 $\pm$ 0,49
		50	0-6	2,78 $\pm$ 0,16	80	97	137	2,13 $\pm$ 0,046	8,83 $\pm$ 0,51
N. Kontrol	48	0,00	0-9	3,26 $\pm$ 0,19	89	97	114	2,08 $\pm$ 0,047	9,70 $\pm$ 0,54
P.K.MMC	48	0,20	26-104	58,02 $\pm$ 2,19+	161	94	63	1,66 $\pm$ 0,043	6,30 $\pm$ 0,44***
Pd NP	48	5	0-8	2,77 $\pm$ 0,21	74	105	119	2,15 $\pm$ 0,045	8,30 $\pm$ 0,50
		10	0-14	2,44 $\pm$ 0,24 +	74	113	113	2,13 $\pm$ 0,045	8,90 $\pm$ 0,52
		25	0-10	2,48 $\pm$ 0,21 +	94	95	117	2,05 $\pm$ 0,047	8,20 $\pm$ 0,50*
		50	0-8	2,45 $\pm$ 0,15 +	107	102	91	1,94 $\pm$ 0,046	8,90 $\pm$ 0,52

N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol

+Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

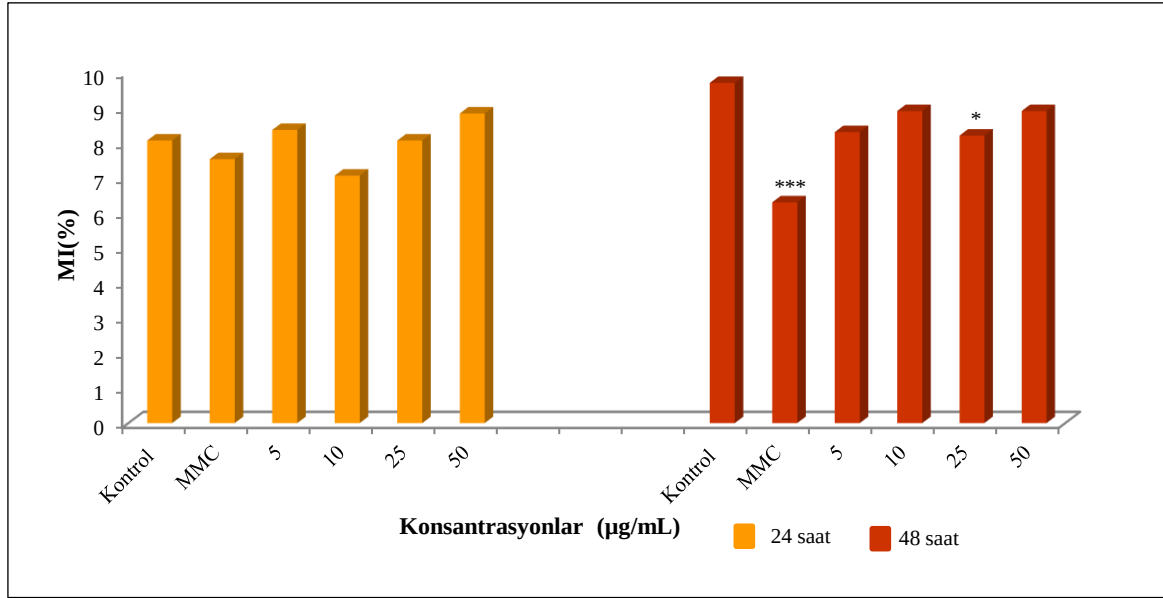
*Kontrolle göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrolle göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



+Kontrolle göre P<0.05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

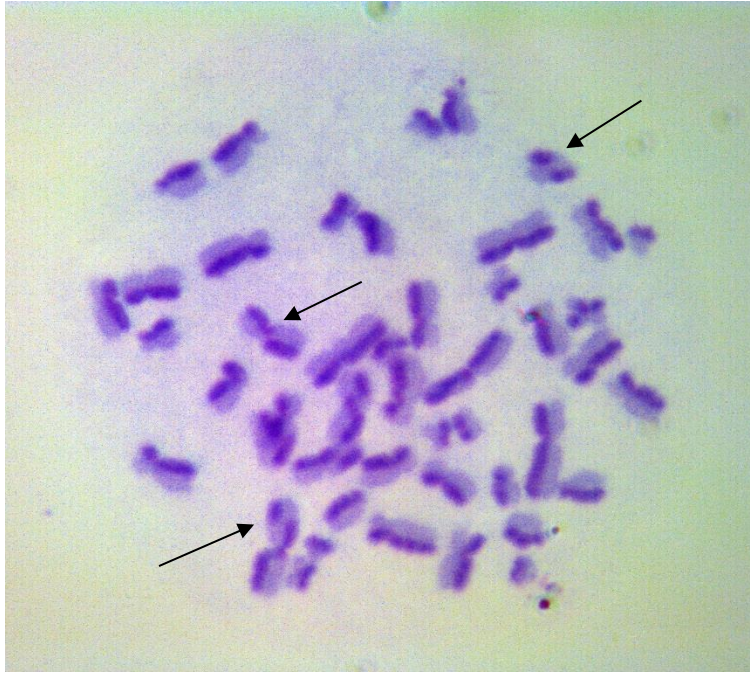
Şekil 4.13. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi



*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.14. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mitotik indeks üzerine etkisi



Resim 4.8. Pedot nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu kardeş kromatid değişimleri

4.3.3 Mikronükleus oluşumu üzerine etkileri

Pedot nanopartiküllerinin dört farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25 ve 50 µg/mL) insan lenfositlerinde 48 saatlik uygulaması sonrasında incelenen binükleat hücrelerdeki mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir. İncelenen binükleatlarda genellikle bir adet MN bulunduğu, sadece 2 hücrede 2 MN bulunduğu tespit edilmiştir (Resim 4.9.). Pd nanopartiküllerinin 5 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarının insan lenfositlerinde MN frekansını kontrole kıyasla artırdığı ve bu artışın da 25 µg/ml'de istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15.). Diğer yandan, Pd NP'lerinin insan lenfositlerinde nükleer bölünme indeksinde anlamlı olmayan küçük bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

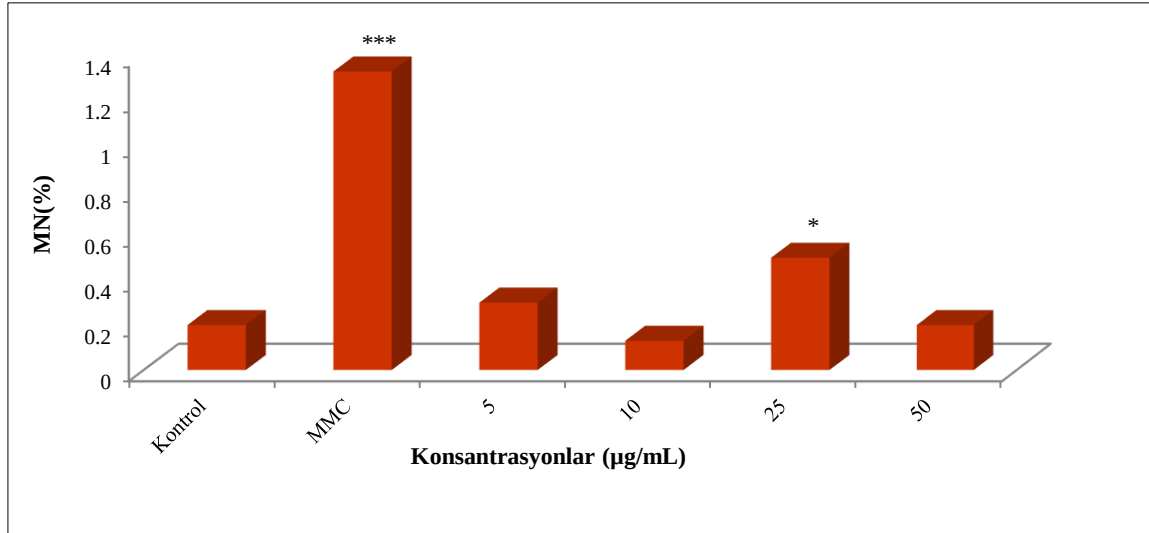
Çizelge 4.9. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		N±SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ±SH)
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)		
N. Kontrol	48	0,00	3.000	7	-	0,20±0,08	1,49±0,313
P.K. MMC	48	0,20	3.000	40	-	1,33±0,20***	1,378±0,30
Pd NP	48	5	3.000	9	-	0,30±0,09	1,57±0,32
		10	3.000	4	-	0,13±0,66	1,55±0,31
		25	3.000	12	2	0,50±0,12*	1,58±0,32
		50	3.000	6	-	0,20±0,08	1,51±0,31

N. Kontrol: negatif kontrol, P.K. MMC: pozitif kontrol

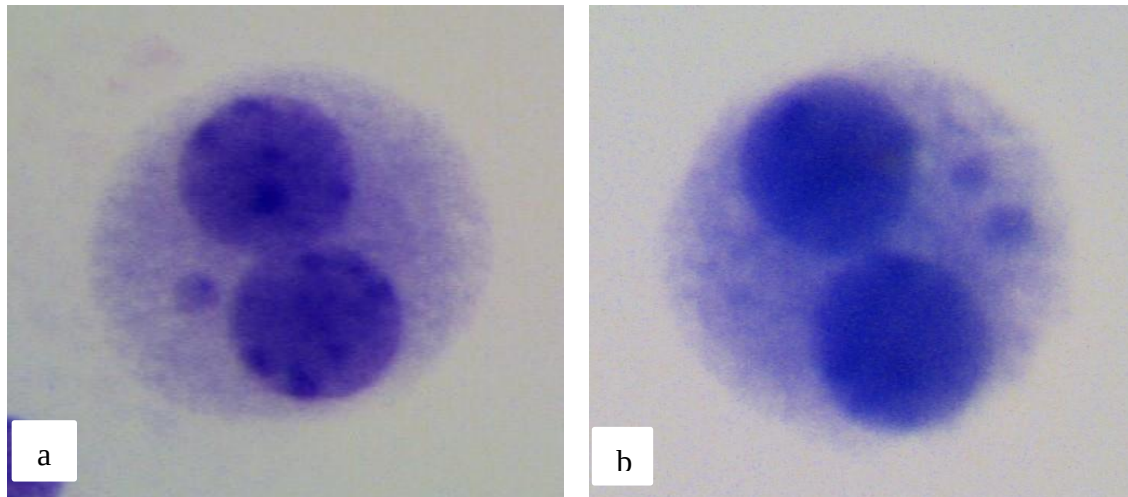
*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.15. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi



Resim 4.9. Pd nanopartiküllerinin insan lenfositlerinde oluşturduğu mikronükleuslar. a. 1 mikronükleuslu binükleat hücre b. 2 mikronükleusu binükleat hücre

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yaygın olarak üretilen ve geliştirilen nano ölçeklerdeki partiküllerin en temel özelliği, <100 nm'den küçük boyutta ve çok geniş yüzey alanına sahip olmalarıdır. NP'ler, ürünlere dayanıklılık, hafiflik, optiklik, iletkenlik ve manyetik gibi birçok yeni ve işlevsel özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle titanyum, alimünyum, gümüş, silika, demir, bakır ve birçok nanopartikül sağlık ve kişisel bakım alanından gıda alanına, sanayi, otomotiv ve elektronik alanlarından askeri alana kadar birçok değişik alanlarda kullanılmaktadır (Bucchianico ve diğerleri, 2018; Lykaki ve diğerleri, 2018; Uboldi ve diğerleri, 2016, Vance ve diğerleri, 2015; Vranic ve diğerleri, 2019).

Nanopartiküller, tek başlarına kullanılabildikleri gibi çeşitli materyallerle kaplanarak da kullanılmaktadır. NP'ler kaplandığı materyale göre daha çok üretim, daha az maliyet, daha az toksik olma, hafiflik, optiklik, iletkenlik ve ısıya dayanıklılık gibi birçok yeni özellikler kazanmakta ve ana partiküle kıyasla daha farklı davranışlar sergileyebilmektedir. Nanoteknolojide kaplama materyali olarak manyetik özellikli materyaller, elektrik yükleri, seramik, silikon ve polimerler kullanılmaktadır. Kaplama materyali olarak sıklıkla tercih edilen polimerik yapılar, NP'ler ile etkileşime girmez, çözünme göstermez, yapılarına zarar vermez ve toksik etki göstermezler. Polimerler ayrıca daha küçük boyutlarda ve daha yüksek miktarlarda nanopartikül üretmek amacıyla da kullanılmaktadır. Kaplamalı NP'ler özellikle ilaç taşınmasında ve gen terapilerinde olmak üzere, tekstilde, boya ve otomotiv sanayisinde, güneş panellerinde ve daha birçok yerde sıkça kullanılmaktadır (Abouelmagd ve diğerleri, 2016; Medina ve diğerleri, 2007; Nagy ve diğerleri, 2013; Pesnya, 2013; Tüylek, 2018).

Son yıllarda insanlar nanoteknolojide kullanılan NP'lere değişik alanlarda, değişik sürelerde ve çeşitli konsantrasyonlarda maruz kalmaya başladıkları ve ayrıca bunların atıklarının doğaya salınması nedeniyle, bu partiküllerin insanda ve diğer canlılarda toksik ve özellikle genotoksik etkileri ve ekosistemdeki etkileri konusunda detaylı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (Fernández-Bertólez ve diğerlerinin, 2019; Kim ve Ryu, 2019; Medina ve diğerleri, 2007; Nymark ve diğerleri, 2013; Pesnya, 2013; X.Wang ve diğerleri, 2019; Tüylek, 2018). Avrupa Komisyonunca Avrupa strateji taslağında, NP'lerin yaygın kullanımının canlılar üzerindeki potansiyel risklerinin ve olası zararlarının araştırılması ve bu konuyla ilgili önlemler alınması gerektiği tartışılmıştır. Bu kapsamda ABD'de, Çevre

Koruma Ajansı verilerine göre belirli hükümler olmadan üretilen nanomalzemeler, Zehirli Maddeler Kontrol yasası (TSCA) ve Federal Böcek İlacı, Mantar ilacı ve Kemirgen İlacı Yasası (FIFRA) kapsamında tehlikeli kimyasal madde ya da böcek ilacı olarak tanımlanmaktadır (Atlı-Şekeroğlu, 2013; European Commission 2015).

Yüksek düzeyde reaktivlik, iletkenlik ve absorpsiyon göstermeleri nedeniyle TiO_2 NP'leri, kozmetikte, kişisel bakım ürünlerinde, filtre yapımında, boya ve gıda renklendiricilerinde, fotokataliz için sensör ve elektronik cihazlar gibi birçok endüstriyel üründe kullanılmaktadır (Gandhi, Jayaseelan, Kamaraj, Rajasree ve Mary, 2018., Jatoi, Kim ve Ni, 2018; Xu ve diğerleri, 2018). TiO_2 NP'lerinin bu kadar yaygın kullanılmasına rağmen, bu partiküllerin gerek kullanımları ve gerekse atıklarının çevresel etkileri konusunda henüz yeterli özen gösterilmemekte ve bu konuda henüz yeterli çalışma bulunmamaktadır. Mevcut araştırmaların da bir biriyle çelişir nitelikte olduğu görülmektedir. Genel olarak, NP'lerin toksik ve özellikle genotoksik etkileri konusundaki çalışmalar, bu partiküllerin sentezi ve kullanımları konusunda yapılan çalışmaların ve gelişmelerin bir hayli gerisinde kalmaktadır. Bu nedenle NP'lerin toksik etkilerinin ve özellikle genotoksik etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesi, hem insan ve diğer canlıların sağlığı ve hem de çevrenin korunması açısından önemli olduğu gibi, bu nanopartiküllerin sağladığı avantajlardan daha sağlıklı bir biçimde yararlanmamız açısından da büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında sağlık, gıda, tekstil, boya ve özellikle kozmetik alanlarında, sensör, batarya ve güneş enerjisi panellerinde sıklıkla kullanılan üç farklı nanopartikülün *in vitro* insan periferik lenfositlerindeki olası genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu partiküller 1) çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri, 2) Pedot ile kaplanmış çubuk benzeri TiO_2 nanopartikülleri 3) Pedot nanopartikülleri. Genotoksik hasarın belirlenmesinde, son yıllarda çokça tercih edilen ve OECD tarafından yönergeleri hazırlanan kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri kullanılmıştır. Lenfositler, çubuk benzeri TiO_2 NP'lerinin ve pedot kaplı TiO_2 NP'lerinin 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik, pedot NP'lerinin ise 5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız TiO_2 -ÇNP, Ç/Pd TiO_2 NP ve pedot NP'lerinin dört farklı konsantrasyonunun 24 ve 48 saatlik uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom, kardeş kromatid

değişimi ve fragment olmak üzere 6 farklı yapısal ve poliploidi olmak üzere bir tip sayısal kromozom anormalliği tespit edilmiştir. Ayrıca, pedot NP'lerinin 48 saatlik uygulamasında, 50 µg/mL'de 1 adet halka kromozom gözlenmiştir. Her üç NP'ün anormal hücre frekansı üzerine olan etkileri karşılaştırıldığında, çubuk benzeri TiO₂ NP'lerinin en toksik düzeyde olduğu görülmüştür. Bu partiküller, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda anormal hücre frekansını negatif kontrole kıyasla artırmış olup, bu artışların 24 saatlik uygulamada 50 ve 100 µg/mL'de, 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Benzer artışların ve anlamlılık düzeylerinin KA/hücre sayısında da geçerli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan pedot kaplı çubuk benzeri TiO₂ NP'lerinin de hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarının, negatif kontrole kıyasla anormal hücre frekansında artışa sebep olduğu, bu artışların sırasıyla 250 ve 500 µg/mL'de anlamlı olduğu belirlenmiştir. KA/Hücre sayısında da bütün uygulamalarda negatif kontrole kıyasla artış meydana geldiği, 24 saatlik uygulamada 250 µg/mL'deki artışın, 48 saatlik uygulamada ise 50 ve 500 µg/mL'deki artışların anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu iki NP'ün kıyaslanması sonucunda çubuk şeklindeki TiO₂ NP'lerinin, pedot kaplı TiO₂ NP'lerinden daha güçlü genotoksik olduğu görülmektedir. Kaplama maddesi olan pedot NP'lerinin, diğer iki nanopartiküle benzer konsantrasyonlarının toksik olması nedeniyle, daha düşük konsantrasyonlar olan 5, 10, 25 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmış olmasına rağmen, bütün konsantrasyonların, negatif kontrole kıyasla hem anormal hücre frekansında ve hem de KA/Hücre sayısında artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Bu artışların, pedot kaplı TiO₂ NP'lerinde olduğu gibi, 5 farklı uygulamada (%KA; 24 saatlik uygulamada 5, 25 ve 50 µg/mL'de; KA/Hücre; 24 saatlik uygulamada 25 ve 50 µg/mL'de) anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Pedot NP'lerinin, Ç/Pd TiO₂-NP'lerinde olduğu gibi beş farklı uygulama noktasında anlamlı etki göstermiş olmasına rağmen, bu etkinin çok daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleşmiş olması nedeniyle, kromozom anormallikleri testine göre bu üç NP'ün genotoksik sıralamasını TiO₂-ÇNP>Pd-NP>Ç/Pd TiO₂-NP şeklinde gösterebiliriz. Ancak genel olarak değerlendirdiğimizde, TiO₂-ÇNP'lerinin insan lenfositlerinde güçlü klastojenik etkili olduğu, Ç/Pd TiO₂ ve pedot NP'lerinin ise klastojenik etkisinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında yapısal anormalliklerden en sık görülen kromatid kırığı, mutajenin S ya da G₂ fazındaki etkisi sonucunda oluşmaktadır. Kromozom kırığı oluşumu ise karşılaşılan mutajenin hücre döngünde G₀ ya da G₁ fazındaki etkisi sonucunda oluşmaktadır. G₁ fazında tek bir kromatidde oluşan kırığın S fazında devam etmesi sonucunda her iki kromatidde kırık oluşumu gerçekleşir ve sonuçta kromozom kırığı ortaya

çıkar. Bu kırıkların tekrar birleşmemesi asentrik fragment oluşumuna neden olur. Bu fragmentler ya takip eden hücre bölünmesi sırasında kaybolur ya da metafaz, anafaz ve/veya telofaz hücresinde ve sonuçta interfazdaki hücrelerde mikronükleus şeklinde görünür (Üstüner, 2011). Disentrik koromozomlar, kromozom kollarında oluşan kırılmaların daha sonra aynı tipteki bir başka kromozom koluyla yanlış eşleşmesi temeline dayanmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009; Satoh, Yamamoto, Miura ve Sofuni, 2004). Kardeş kromatidlerde birleşme ise delesyon sonucunda proksimal uçlarda oluşan kırılmaların karşılıklı birleşmesi sonucunda oluşmaktadır. Bu tip kromozomal anormallikler genellikle mitoz bölünmenin G₂ fazında ortaya çıkmaktadır. Bu hasarların tamir edilememesi ya da yanlış tamir edilmesi sonucunda kromozomal anormalliklerde artış görülmekte ve bu anormallikler kromozom anormallikleri testi ile belirlenebilmektedir (Branzei ve Foiani, 2008, Malumbres ve Barbacid, 2009). Sayısal kromozomal anormalliklerden olan poliploidi, G₁ ve G₂ fazında hücreye giren mutajenlerin iç ipliklerinde bozulmalara neden olması ve mitoz bölünme sırasında kardeş kromatidlerin anafazda kutuplara çekilmesini sağlayan topoizomera II enzimini inhibe ederek hücre bölünmesinin durdurulması sonucunda oluşmaktadır (Clarke, 1993; Tan, 2017, 2018).

Kromozom anormallikleri testine göre elde ettiğimiz ve TiO₂ NP'lerinin güçlü genotoksik, diğer yandan Ç/Pd TiO₂-NP ve Pd-NP'lerinin ise daha düşük düzeyde genotoksik olduğu yönündeki bulgumuz, bu konuda yapılan bazı kaynaklardan elde edilen bulgularla da uygunluk göstermektedir. Örneğin, S.Patel, P.Patel, ve Bakshi (2017), ortalama partikül büyüklüğü 20,25 nm olan TiO₂ NP'lerinin 25, 75 ve 125 µM'lık konsantrasyonlarını 24 saat boyunca insan lenfositlerine uyguladıklarında, hem kromozom anormallikleri frekansında ve hem de kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesinde kontrole kıyasla doza bağlı artış olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, TiO₂ NP'lerinin klastojenik etkili olduğunu ve bu etkinin NP'lerin fosfat grupları ile DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanmasından ve DNA ile direkt etkileşiminden kaynaklandığını vurgulamışlardır (Patel ve diğerleri, 2017). Üç farklı formdaki [anataz (20-60 nm), rutil (30X100 nm) ve anataz/rutil karışımı (45-262 nm)] TiO₂ NP'lerinin, 10, 50, 100 ve 200 µg/mL'lik konsantrasyonları da periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) DNA kırıklarına neden olmuştur. Oluşan bu kırıkların hafif düzeyde fakat anlamlı olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada kullandıkları üç farklı formdaki TiO₂ NP'lerinin pro-oksidanların üretimini tetikleyerek monositlerde az ya da çok genotoksik etkiye neden olduğunu ifade etmişlerdir (Andreoli ve diğerleri, 2018). Bir başka araştırmada, TiO₂ NP'lerinin üç farklı formunun [anataz (21±10 nm), rutil (26±10 nm),

anataz/rutil karışım (21 ± 9 nm)] bronşiyal epitel hücre hattı (16HBE) üzerindeki genotoksik etkileri komet testiyle incelenmiştir. NP'lerin 3,125, 12,5 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının 3 ve 24 saat uygulanmasıyla DNA hasarında zamana ve doza bağlı artış olduğu tespit edilmiştir. 3 saatlik maruziyet sonucunda, anataz TiO_2 NP'lerinin, rutil ve anataz/rutil TiO_2 NP'lerine kıyasla daha fazla genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar nanopartikül toksisitesinin tam olarak belirlenebilmesi için epigenetik çalışmaların da yapılması gerektiğini ifade etmişlerdir (Ghosh ve diğerleri, 2017). Ghosh ve diğerlerinin (2017) kullandıkları nanopartiküller, Andreoli ve diğerlerinin (2018) çalışmalarında kullandıkları nanopartiküller ile aynı kristal formda fakat farklı boyutlarda ve farklı hücreler üzerinde incelenmiştir. Ancak Ghosh ve diğerlerinin (2017) çalışmasında genotoksik olan form "anataz" iken, Andreoli ve diğerlerinin (2018) çalışmasında genotoksik olan form "anataz/rutil"dir. Oluşan bu farklılık, kullanılan NP formlarının, boyutlarının ya da hücre tiplerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan çubuk şeklindeki TiO_2 -NP'leri 30×100 nm ve anataz formda ve insan periferik kan lenfositleri üzerinde anlamlı klastojenik etkiye sahip olup, Ghosh ve diğerlerinin çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Petkovic ve diğerleri, (2010), TiO_2 NP'lerinin (<25 nm anataz ve <100 nm rutil), 1, 10, 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının hepatoma HepG2 hücrelerinde 2, 4 ve 24 saatlik etkilerini komet testi ile incelemişlerdir. Anataz TiO_2 NP'leri, 24 saatlik uygulamada en yüksek konsantrasyonda, rutil TiO_2 NP'leri ise sadece 4 saatlik uygulamada 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda anlamlı genotoksik etki göstermiştir. Buna göre anataz form rutil forma kıyasla daha fazla DNA zincir kırıklarına, Fpg alanlarının oluşumuna ve ayrıca hücre içi reaktif oksijen türünde artışa neden olmuştur (Petkovic ve diğerleri, 2010). TEM analizi ile insan epidermal hücrelerine (A431), 0.008, 0.08, 0.8, 8 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda uygulanan anataz TiO_2 NP'lerinin (50 nm), çoğunlukla sitoplazmada, az miktarda da nükleusta depolandığı görüntülenmiştir. MN frekansında 0.8, 8 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonların hepsi anlamlı artışa sebep olurken, 8 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar, DNA hasarlarında ve lipid peroksidasyonu ile hücre içi ROT miktarında anlamlı artışa, glutatyon seviyesinde ise anlamlı düşüşe sebep olmuştur. Bu çalışmaya göre, anataz TiO_2 NP'leri A431 hücrelerinde hem hücre yapısında bozulmalara neden olarak sitotoksik etki hem de DNA ve kromozom anormalliklerinde hasar oluşturarak genotoksik etki göstermiştir (Shukla ve diğerleri, 2011).

TiO₂ NP'lerinin neden olduğu ROT birikimi, DNA hasarının tamirinde görev yapan nükleotit kesip çıkarma onarımı (NKO) ve baz kesip çıkarma onarımı (BKO) mekanizmasındaki proteinlerde yapısal modifikasyonlar oluşturmaktadır. Böylece hücresel DNA onarımında hem NKO hem de BKO yollarını inaktif hale getirerek, hasar oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. NP'lerin neden olduğu bu protein oksidasyonu/redüksiyonu, onarım yollarının modülasyonu için kritik bir mekanizma olarak görülmektedir. Bu konuda, Jugan ve diğerlerinin (2012) yaptıkları bir çalışmada, küresel ve çubuk şekilli TiO₂ NP'lerinin hem farklı boyut ve formlarının genotoksisitesini ve hem de tamir mekanizmalarına olan etkilerini A549 hücrelerinde incelemişlerdir. Çalışmada TiO₂ NP'lerinin A12 (küresel, 12 nm, %95 anataz), A25 (küresel, 24 nm, %86 anataz), A140 (küresel, 142 nm), R68 (çubuk, 68 nm boy-9 nm çap, %100 rutil) ve R20 (küresel, 21 nm, %90 rutil) formlarının hücreye girip girmedikleri TEM analizi ile, hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile, hücre içindeki genotoksik etkileri GSH ve ROT analizleri ve DNA hasarına etkisi de komet testi ile incelenmiştir. MTT analizinde (25, 50, 75 ve 100 µg/mL) A12, A25 ve R20 NP'lerinin hücre canlılığını kontrole kıyasla %25 düşürdüğü, A140 ve R68 (çubuk) NP'lerinin ise sırasıyla %10 ve %1 düzeyinde düşürdüğü belirlenmiştir. Hücre canlılığı üzerinde en az etkisi olan R68 TiO₂ NP'lerinin çubuk şekilli olması nedeniyle hücrelere daha az girebildiği ve daha az toksik olduğu ifade edilmiştir. Çalışmada, oluşan sitotoksik etkinin NP'lerin farklı kristal faza sahip olmasından değil, farklı partikül çaplarına ve farklı şekillere sahip olmalarından kaynaklandığı, ayrıca çekirdek içine sadece küçük boyuttaki NP'lerin girebildiği ve kristal yapının geçişlerde fark oluşturmadağı belirlenmiştir. Ayrıca, ROT oluşumunun ve 8-okso-dGuo seviyesinin sadece küçük boyuttaki NP'ler tarafından tetiklendiği, uzun şekil (rutil) ve büyük boyuttaki (anataz) partiküllerin kontrole yakın sonuçlar oluşturduğu belirlenmiştir. 24 saatlik uygulamada hücresel kesip çıkarma/tamir mekanizmasındaki NKO ve BKO yollarının etkisiz hale geldiği ve DNA tamir mekanizmasının bozulduğu rapor edilmiştir (Jugan, Barillet ve Simon-Deckers, 2012). Jugan ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçların aksine bu tez çalışmasında kullandığımız çubuk benzeri TiO₂ NP'leri, kromozom anormalliğinde anlamlı artışlara sebep olmuş ve klastojenik bir etki oluşturmuştur. Gözlenen bu farklılıklar, kullanılan hücrelerin (tez çalışmamızda insan periferik kan lenfositleri), nanopartikül konsantrasyonlarının (tez çalışmamızda 50, 100, 250 ve 500 µg/mL) ve formlarının (tez çalışmamızda anataz çubuk) farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar, Gea ve diğerlerinin (2019) anataz çubuk TiO₂ nanopartikülleriyle yapmış oldukları çalışmadan elde ettikleri sonuçlardan da farklılık

göstermektedir. Araştırmacılar, 108 ± 47 nm boyutundaki anataz çubuk TiO_2 NP'lerinin (20, 50, 80, 120 ve 160 $\mu\text{g/mL}$) genotoksik etkilerini insan bronşiyal epitel hücrelerinde (BEAS-2B) formamidopirimidin glikosilaz varlığı (+Fpg) ve yokluğuna (-Fpg) göre komet testi kullanarak incelemişlerdir. Çubuk TiO_2 NP'leri kontrole kıyasla BEAS-2B hücrelerinde herhangi bir genotoksik etki oluşturmamış ve bu etki ortamın farklılığında (aydınlık/karanlık) ya da Fpg varlığı/yokluğunda da değişmemiştir. Araştırmacılar, bu sonucun nanopartiküllerin yüksek aglomerasyonundan kaynaklandığını belirtmişlerdir (Gea ve diğerleri, 2019). Jugan ve arkadaşlarının (2012) çalışmalarına nazaran, Gea ve diğerleri çalışmamızda kullandığımız formda ve şekilde (anataz form ve çubuk şekilli) TiO_2 NP'lerini kullanmış olmasına rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar, bu iki çalışmanın sonuçlarıyla da benzerlik göstermemiştir. Bu farklılıklar, kullanılan hücrelerin ve uygulanan konsantrasyonların farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda anataz forma sahip TiO_2 NP'lerinin daha toksik olduğuna dair bulgular elde edilmiş olsa da rutil formun daha toksik olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, 30,6 nm boyuttaki rutil TiO_2 NP'lerinin 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının insan amniyon epitel hücrelerinde (WISH) 30 dakika muamelesi sonucunda, tüm konsantrasyonların kontrole kıyasla ROT oluşumunu tetiklediği ve ayrıca, 10 $\mu\text{g/mL}$ 'nin katalaz (%46.3) ve glutatyon (%34.6) seviyelerinde azalmaya ve DNA hasarında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Saqib ve diğerleri, 2012).

Araştırmalardan elde edilen verilere göre TiO_2 NP'lerinin anataz formunun genotoksik etkili olduğuna dair daha fazla sonuç bulunmasına rağmen, anataz ve rutil formların genotoksik potansiyelleri hakkında hala detaylı bilgiler olmadığı görülmektedir. Ayrıca TiO_2 NP'lerinin toksik/genotoksik potansiyele sahip olduğuna dair deneysel veriler yayınlanmış olsa da toksisite mekanizmalarında titanyumun kristal formunun ne tür bir role sahip olduğu hala tam olarak belirlenememiştir.

Nanopartiküller birçok alanda ve birçok üründe tek başlarına kullanılabilirler gibi, nanoteknolojinin bize sunduğu uygun maliyet, kullanışlılık, işlevsellik, dayanıklılık, hızlı ve fazla sayıda üretim kapasitesi sağlamaları amacıyla çeşitli özelliklerdeki seramik ve polimer gibi maddeler ile ve elektrik yükleri ile kaplanarak da kullanılabilirler. Kaplanmış NP'lerin sağladıkları avantajların yanında, çevre ve canlılar üzerinde ne tür bir toksik/genotoksik etki oluşturabileceği merak edilmiş ve bu alanda yapılan çalışmalar da hız

kazanmaya başlamıştır. Yapılan kaynak araştırmasında, kaplanmış NP'lerin, kaplanmamış formlarına kıyasla daha az toksik oldukları yönünde bulgular olmasına rağmen, kaplanmış NP'lerin de sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bu tez çalışmasında, çubuk benzeri titanyum dioksik nanopartiküllerinin yanı sıra, pedot ile kaplanmış çubuk benzeri titanyum dioksit nanopartiküllerinin ve kaplama maddesi olan pedot nanopartiküllerinin de genotoksik etkileri incelenmiştir.

Kaplamalı ve kaplamasız NP'lerin genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla, Kermanizadeh ve diğerleri (2012), C3A hücre hattında, NM110 (Zn), NM111 (Triethoxycaprylylsilane kaplı Zn), NM300 (Polyoxylaurat kaplı Ag), NM400 (MWCNT), NM402 (MWCNT), NM101 (anataz TiO₂), NRCWE 001 (rutil TiO₂), NRCWE 002 (rutil TiO₂, pozitif yük kaplı), NRCWE 003 (rutil TiO₂, negatif yük kaplı) ve NRCWE 004 (rutil TiO₂) NP'lerinin 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/cm²'lik konsantrasyonlarının 2, 4 ve 24 saatlik etkilerini incelemişlerdir. Ag, ZnO ve MWCNT NP'leri iyon salınmasını artırarak güçlü bir toksik etkiye neden olmuş ve buna bağlı olarak hücrelerde glutatyon seviyelerini doza bağlı olarak azaltmıştır. En yüksek DNA hasarı, iki tip TiO₂ NP'ünün (7 nm anataz ve 10 nm pozitif yük kaplı) 4 saatlik uygulamasından sonra ortaya çıkmıştır. Polyoxylaurat kaplı Ag nanopartikülleri ve triethoxycaprylylsilane kaplı Zn nanopartikülleri haricindeki diğer tüm NP'lerin C3A hücrelerinde zayıf genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Kermanizadeh, Gaiser, Hutchison ve Stone, 2012). Kaplanmış formlarının daha toksik olduğunun tespit edildiği bu çalışmaya kıyasla, bizim tez çalışmamızda kaplı formun zayıf genotoksik olması, hem kullanılan hücrelerin (insan lenfositleri) ve hem de nanopartikülün kaplama maddesinin (pedot polimeri) ve kaplanmış formun konsantrasyonlarının (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Farklı şekillerde kaplanmış nanopartiküllerin etkisini incelemek amacı ile, nötr yük (Disperbyk, Tween 80®), anyon yük (sitrata, SDS) ve katyon yük (Byk, Chitosan) ile kaplanmış Ag NP'lerinin 0,3, 0,63, 1,25, 2,5 ve 3 µg/cm²'lik dozlarının etkisi TK6 hücrelerinde, Tripan Blue Mavisi (TBE) ve komet testiyle, V79-4 hücrelerindeki etkisi ise HPRT gen mutasyonu testi ile incelenmiştir. Pozitif yükle kaplanmış Ag NP'leri diğer kaplamalara kıyasla hücre içine daha fazla alınmış, mitokondri ve çekirdek içine girebilmiş, membran parçalanmasını, apoptozu ve DNA hasarını tetiklemiş ve hücre proliferasyonunu azaltmıştır. HPRT gen mutasyonu testinde tüm Ag nanopartiküllerin etkili olmasının, yüzey kaplamasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Huk ve diğerleri, 2015).

En yaygın kullanılan nanomalzemelerden biri olan küresel AgNP'lerinin kitosan kaplı formunun (1, 2.5, 5 ve 50 mg/L) genotoksik etkileri *Allium* testi kullanılarak incelenmiş, sonuçta 5 ve 50 mg/L'lik konsantrasyonların kök hücrelerinde çeşitli mitotik anormalliklere, kromozomal köprülere, geri kalmış kromozomlara, poliploid hücrelere ve mikronükleuslarda artışa sebep olduğu ve dolayısıyla hem klastojenik hem de anöjenik aktivite sergilediği bildirilmiştir (Pesnya, 2013). Benzer şekilde Ag NP'lerinin küresel (30-50 nm) ve polyvinyl pyrrolidone (PVP) kaplı formlarının toksik etkileri A549 hücrelerinde MTT ve anneksin V/propidium iyodür analizleri ve Xow sitometrilere ile incelenmiştir. Hücreler 2,5, 5, 10 ve 15 µg/mL'lik (MTT için ayrıca 0,5, 12,5 ve 20 µg/mL) konsantrasyonlara 24 saat maruz bırakılmıştır. Elde edilen verilerde nanopartiküllerin apoptoz, ROT ve mitokondriyal hasar seviyelerinde artışa neden olduğu ayrıca N-asetilsistein ile ön muamele sonrasında hücrelerde hasar seviyelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, PVP kaplamasının, bu nanopartiküllerin hücrelerde oluşturduğu genotoksik hasarı azaltmadığını, Ag NP'lerinin oksidatif strese bağlı sitotoksik ve genotoksik etkiye neden olabileceğini, ancak buradaki mekanizmaların açıklanabilmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (Foldbjerg ve diğerleri, 2011).

Pesnya'nın (2013) ve Foldbjerg ve diğerlerinin (2011) yaptıkları çalışmalarda, küresel Ag NP'lerinin hem tek başına ve hem de kaplı formunun hücrelerde toksik etki gösterdiği ve dolayısıyla uygulanan kaplamanın toksik etkiyi azaltmadığı belirlenmiştir. Toksik etkinin, Ag NP'lerinden salınan iyonlardan kaynaklandığı vurgulanmıştır. Buradaki sonuçların tersine, bizim tez çalışmamızda kullandığımız TiO₂ nanopartikülleri pedot polimeri ile kaplanmış olup, bu kaplama belki de TiO₂ NP'lerinden salınan iyonların düzeyini azaltmış veya engellemiş olabilir. Sonuçta, polimer kaplı TiO₂ NP'leri, bu NP'lerin tek başına uygulanmasından daha az toksik etki göstermiş olabilir.

İlaç iletimi, kanser tanı ve teşhisinde sıklıkla kullanılan QD'lerin N-asetilsistein (NAC-cap) ile kaplanmış ve çekirdeklerine N-asetilsistein yüklenmiş (NAC-conj) formları 5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda 24 saatlik süreyle insan nöroblastomu (SH-SY5Y) hücrelerine uygulanmıştır. Sonuçta, NAC ile modifiye edilmiş QD'lerin hücre içine alımlarının azaldığı ve daha az sitotoksik etkiye neden olduğu, tek başına uygulanan QD'lerin ise membran lipid peroksidasyonunda artışa ve mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir (Choi, Cho ve Desbarats, 2007). Nymark ve diğerleri (2013), 42,5 ± 14,5 nm

boyundaki AgNP'leri ve PVP ile kaplı AgNP'lerinin (1,9, 3,8, 7,6, 15,2, 22,8, 30,4, 45,6, 91,2 ve 182,4 µg/mL) genotoksik etkilerini insan bronş epitel (BEAS 2B) hücreleri üzerinde komet, kromozomal anormallikler ve mikronükleus testleriyle incelemiştir. Elde edilen verilerde mikronükleus oluşumu görülmezken, komet testinde 182,4 µg/mL hariç tüm konsantrasyonlarda doz artışına paralel şekilde artan DNA hasarı görülmüştür. Buna rağmen PVP ile kaplı AgNP'lerinin insan bronş epitel (BEAS 2B) hücreleri üzerinde anlamlı bir genotoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir (Nymark ve diğerleri, 2013).

Bu tez çalışmasında pedot ile kaplanmış nanopartiküllere kıyasla TiO₂-ÇNP'lerinin tek başına kullanılmasının daha anlamlı düzeyde kromozom hasarı oluşturması ve daha fazla genotoksik etki göstermesi ve ayrıca kullanılan NP'ler arasında pedot ile kaplanmış çubuk benzeri TiO₂ NP'lerinin en az düzeyde kromozom hasarı oluşturması, Pesnya'nın (2013) ve Foldbjerg ve diğerlerinin (2011) bulgularından farklılık gösterirken, Choi ve diğerlerinin (2007) ve Nymark ve diğerlerinin (2013) elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

Araştırmamızda kullandığımız kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde yararlanılan hassas bir test olup, bir kromozomun iki kardeş kromatidindeki kırılma ve sonra genetik materyalin karşılıklı olarak değiştirildiği bölgeleri göstermektedir. Kırılan kardeş kromatidlerin yer değiştirmesi, özdeş lokuslar arasında gerçekleştiği için bu test tartışmalı olmakla beraber, genotoksik maddelere maruziyetin ve takiben genetik hasarın belirlenmesinde halen yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. KKD sayısındaki artış, genetik materyaldeki hasarın ve takiben bu hasarın homolog kromozomların rekombinasyonu ile onarıldığının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kısaca KKD sayısındaki anlamlı artış, DNA'daki kalıcı hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. KKD'nin gözlemi mitoz bölünmede, metafaz kromozomlarında gerçekleştirilmektedir. Perry ve Wolff (1974) tarafından geliştirilen ve geçerli bir yöntem olan KKD'nin gözlenebilmesi için, hücrelerin çoğaltıldığı kültür ortamına iki ardışık hücre döngüsü boyunca timidin analogu olan 5'-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) ilave edilir. Kromozomlara uygulanan boyama tekniği sayesinde, genetik materyalin değiştirildiği rekombinasyon bölgeleri açıkça tespit edilebilmektedir (Chen ve Yen, 2014).

Çalışmamızda TiO₂-ÇNP'leri insan periferik lenfositlerinde, 16 taneye kadar kardeş kromatid değişimi oluşturarak kontrole kıyasla (0-9) KKD/Hücre sayısında en fazla artışa sebep olan partiküldür. Genel olarak değerlendirildiğinde, KKD/Hücre sayısında, kontrole

kıyasla düşüş ve artışlar oluşturmakla beraber, sadece 24 saatlik uygulamada 50 µg/mL’lik konsantrasyondaki artışın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Pedot kaplı çubuk benzeri TiO₂ NP’leri, insan lenfositlerinde 10 taneye kadar KKD oluşturmuştur (kontrolde 0-9 KKD/Hücre). 24 saatlik uygulamada, 250 µg/mL’lik konsantrasyonda KKD/Hücre sayısında kontrole kıyasla anlamsız bir artış oluşmuştur. Diğer bütün uygulama süresi ve konsantrasyonlarında, kontrole kıyasla KKD/Hücre sayısında düşüş tespit edilmiştir. Bu düşüşler, 24 saatlik uygulamada 50 µg/mL’de, 48 saatlik uygulamada ise 50 ve 250 µg/mL’de anlamlı düzeydedir. Pedot nanopartikülleri insan lenfositlerine tek başına uygulandığında, 14 taneye kadar KKD oluşturmuştur (kontrolde 0-9 KKD/Hücre). Pedot nanopartiküllerinin, tüm konsantrasyonlarda KKD/Hücre sayısını kontrole kıyasla anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir (24 saatte 50 µg/mL ve 48 saatte 5 µg/mL hariç). Bu çalışmada, KKD testine göre, çubuk benzeri TiO₂ NP’lerinin insan lenfositlerinde mutajenik olmadığı, ayrıca hem pedot kaplı çubuk benzeri TiO₂ NP’lerinin ve hem de pedot NP’lerinin tek başına uygulamasının, KKD/Hücre sayısında artışa değil, tam tersi azalmalara hatta anlamlı azalmalara sebep olduğu belirlenmiştir. Bu durum hem çubuk şekilli nanopartiküllerin ve kullanılan dozlarının kromozomlarda KKD oluşumuna sebep olan mekanizmaları tetiklemediğini, hem de pedot ve pedot kaplı nanopartiküllerin, fiziko kimyasal özellikleri nedeniyle hücre içine girişlerinde bir azalma olabileceği ve sonuçta toksik etki göstermedikleri şeklinde yorumlanabilir. KKD sayısındaki azalmalar bazen mitotik indekste azalmadan yani sağlıklı hücre sayısındaki azalmadan da kaynaklanabilir. Bu nedenle nanopartiküllerin genotoksik etkisini değerlendirebilmek için, bunların mitotik indekste oluşturduğu değişimlerin de dikkate alınması gerekmektedir. Bu konu biraz daha ilerideki paragraflarda değerlendirilecektir.

Kaynak araştırmalarında, hem TiO₂ nanopartiküllerinin ve hem de diğer bazı nanopartiküllerin KKD frekansında artışa sebep olduğunu gösteren araştırmalar yer aldığı gibi, KKD frekansında bir değişim oluşturmadığını gösteren araştırmalar da mevcuttur. TiO₂ NP’lerinin insan periferik lenfositlerindeki genotoksik etkilerini KKD testiyle değerlendiren Turkez (2011), hem oluşabilecek genetik hasarları ve hem de bu hasarların askorbik asit (AA) ile iyileştirilip iyileştirilemediğini incelemiştir. Araştırmacı, hücrelere, NP’lerin 3, 5 ve 10 µM’luk, AA ise 4,87 ve 9,73 µM’luk konsantrasyonlarını uygulamıştır. TiO₂ NP’lerinin hücrelerde KKD sayısında kontrole kıyasla artışa neden olduğu ve bu artışların en yüksek konsantrasyonda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TiO₂ NP’leri AA ile beraber uygulandığında, KKD sayısında azalma ve proliferasyon indeksinde artma belirlenmiştir.

Sonuçta bu çalışmada, TiO_2 NP'lerinin genotoksik etkiye neden olduğu ayrıca uyarılan hasarların AA varlığında onarıldığı belirtilmiştir (Türkez, 2011). Bir başka çalışmada, insan lenfositlerine TiO_2 NP'lerinin 20, 40, 60, 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Bu partiküller, her iki maruziyet süresinde de uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla KKD sayısını anlamlı düzeyde artırdığında, mutajenik olduğu belirtilmiştir (Demirtaş Korkmaz, 2012). Ayrıca çalışmada değerlendirilen mitotik indekste, 24 saatte kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda azalma görülmüştür (60 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ anlamlı). 48 saatte ise kontrole kıyasla artma ve azalmalar tespit edilmesine rağmen görülen değişiklikler anlamlı değildir. Bizim çalışmamızda mitotik indekste görülen azalmalar, Korkmaz (2012)'ın elde ettiği mitotik azalmalarla benzerlik göstermektedir. Buna rağmen bizim çalışmamızda KKD frekansında gözlenen düşüşler, ne Türkez'in (2011) ne de D. Korkmaz (2012)'ın çalışmalarında KKD sayısında görülen artışlarla uyusmamaktadır.

Çin hamster yumurtalık (CHO-K1) hücreleri üzerinde TiO_2 ve Al_2O_3 NP'lerinin (1, 5, 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$) genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla KKD testinin uygulandığı bir araştırmada, 24 saatlik uygulama sonucunda 1 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlı artışlar gözlenirken, en yüksek iki konsantrasyonda metafaz tespit gözlenememiştir. Araştırmacılar metafaz yokluğunu açık sitotoksik etki olarak bildirmişlerdir. Hücre canlılığı ayrıca MTT ve NR testleriyle de değerlendirilmiş ve kontrole kıyasla anlamlı azalmalar (NR testinde 5 $\mu\text{g/mL}$ hariç) tespit edilmiştir (Di Virgilio ve diğerleri, 2010). Bu tez çalışmasındaki mitotik indeks verileri, yukarıdaki çalışmanın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde çalışmamızda hücrelerde yüksek sayılarda KKD görülmesine rağmen, kontrole kıyasla azalmaların tespit edilmesi, Di Virgilio ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmadaki en yüksek iki konsantrasyonda metafaz görülmemesiyle benzerlik gösteriyor olabilir. Lenfositlerdeki düşük KKD frekansı metafaz hücreleri dikkate alınarak değerlendirildiğinde, aslında DNA kırıklarının olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta hasarlı hücrelerin apoptoz veya nekroz yoluyla yok edildiği böylece metafaz hücrelerinin kontrole kıyasla azaldığı ve kalan hücrelerin daha az hasarlı olması nedeniyle KKD sayısında da aynı şekilde azalma görüldüğü düşünülmektedir.

Mitotik indeks (MI), canlılar için yaşamın gerekliliğinden olan hücresel çoğalmayı ve hücrelerde görülebilecek sitotoksikiteyi ölçmeye imkan tanıyan belirteçlerden birisidir. Mitotik indeksteki değişimlere göre, kullanılan ekzojen ajanın hücrelerde oluşturduğu

sitotoksitenin seviyesi belirlenebilmektedir (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010). Uygulanan nanopartikül/kimyasal, hücresel çoğalma düzeyini %50'nin altına düşürürse, bu ajan canlılar üzerinde öldürücü etkiye sahip olabilmektedir (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010). MI'te belirlenen azalma, hücrelerin S fazında daha yavaş ilerleyerek DNA sentezinin azalması ve hücrelerin bölünme evresi olan mitoz geçişi sağlayan G₂ fazına girişlerin engellenmesi sonucunda oluşmaktadır. MI'teki düşüş, uygulanan maddenin mitoz sırasında mikrotübül oluşumunu engellemesi sonucunda da meydana gelebilir (Daphedar ve Taranath, 2018; Pfeiffer ve diğerleri, 2000). Nano ZnO, nano-TiO₂, nano-Co₃O₄ ve nano-CuO'nun (25, 100 ve 200 mg/L) toksik etkilerini yayın balığı hepatositlerinde ve insan HepG2 hücrelerinde 48 saat uygulaması sonucunda yapılan MTT testinde, sitotoksitenin, TiO₂<Co₃O₄<ZnO<CuO şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, HepG2 hücrelerine kıyasla yayın balığı hepatositlerinin daha fazla toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Y.Wang ve diğerleri, 2011). HepG2 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada TiO₂ NP'leri (1, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL) 6, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. MTT verilerine göre, 24 saat sonunda hücrelerde dehidrogenaz aktivitesinde 40 µg/mL'de %82'ye, 80 µg/mL'de %75'e ve ayrıca 48 saat sonunda 40 µg/mL'de %79'a, 80 µg/mL'de %68'e düştüğü tespit edilmiştir (Shukla ve diğerleri, 2013).

Bu tez çalışmasında, TiO₂-ÇNP'leri, insan periferik kan lenfositlerinde 24 saatlik muamelesinde tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla MI'te düşüşlere sebep olmuştur. MI'te görülen bu azalma sadece en düşük konsantrasyonda (50 µg/mL'de kontrole kıyasla %18,22 düşüş) istatistiksel olarak anlamlıdır. TiO₂-ÇNP'lerinin 48 saatlik uygulamasında, tüm konsantrasyonlar mitotik indeksi kontrole kıyasla anlamlı şekilde düşürmüştür (100 µg/mL'de %24,75 düşüş). Pedot kaplı TiO₂ NP'lerinin 24 saatlik uygulaması tüm konsantrasyonlarda MI'te kontrole kıyasla azalmaya sebep olmuştur, bunlardan sadece 50 µg/mL'lik konsantrasyon (%17 düşüş) anlamlıdır. Bu partiküller 48 saatlik uygulamada da, tüm konsantrasyonlarda MI'te düşüşe sebep olmuştur. Bu düşüşler 100 µg/mL (%21,15 düşüş) ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda anlamlıdır. Pedot NP'lerinin insan lenfositlerinde 24 saatlik uygulamasında sadece 5 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonda kontrole kıyasla anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Buna rağmen 10 µg/mL'lik dozda MI'te anlamlı olmayan %13 düzeyinde bir azalma görülmüştür. Bu NP'lerin 48 saatlik uygulamasında ise, kontrole kıyasla tüm konsantrasyonların MI'te düşüşe sebep olduğu, bu düşüşün 25 µg/mL'lik uygulamada anlamlı ve %15,50'ye düştüğü görülmüştür. Daphedar ve Taranath (2018) *D. polyantha*'nın kök ucu meristematik hücreleri üzerinde Ag NP'lerinin

(küresel, 10-25 nm; 4, 8, 12 ve 16 µg/mL) 6, 12, 18 ve 24 saatlik uygulamalarının, hücrelerde mitotik indekste doza ve zamana bağlı anlamlı azalmalar oluşturduğunu belirlemişlerdir (Daphedar ve Taranath, 2018). Çin hamsteri akciğer fibroblastlarında (V79) 10 ve 100 mg/L'lik konsantrasyonlardaki nano-TiO₂ (anataz), P25 (%83 anataz-%17 rutil), nanofilament (10X40nm, rutil), Hombian bulk (anataz) ve polyakrilat kaplı TiO₂ NP'lerinin etkileri hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiştir. Nano yapıların bulk yapılara kıyasla, hücre canlılığında konsantrasyona bağlı azalmaya neden olduğu, kaplanmış titanyumun ise hücre canlılığında önemli bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Bunun, kaplama nedeniyle, nanopartiküllerin daha fazla dağılmasından aynı zamanda daha fazla aglomere olmalarından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu şekilde kaplı nanopartiküllerin, fizikokimyasal özellikleri nedeniyle (daha büyük partikül oluşturdukları ve negatif yükle yüklendikleri için), hücreye daha az girebilecekleri ve daha az toksik olabilecekleri vurgulanmıştır. TiO₂ partiküllerinin polimer ile kaplanması ve bu nedenle reaktif oksijen türleri oluşumunu azalttıkları için de daha az toksik olabilecekleri ifade edilmektedir (Hamzeh ve Sunahara, 2013). Yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde, bizim çalışmamızda da mitotik indeksten elde edilen verilerde kontrole kıyasla en fazla düşüş çubuk benzeri TiO₂ nanopartiküllerinde gözlenirken, pedotla kaplanmış TiO₂ nanopartiküllerindeki sitotoksik etkinin daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, hem kaplanmış partiküllerin 6-7 nm daha fazla kalınlaşmasından ve yüzeyinin pürüzlü bir görünüme sahip olmasından ayrıca Ünal ve diğerleri (2015) tarafından ifade edildiği gibi topaklanma eğiliminin artmasından kaynaklanabilir. Bu çalışmalardaki sonuçların tam tersine, yüzey kaplamaları alüminyum oksit ve/veya silikon ihtiva eden materyallerle kaplamalarda, TiO₂ nanopartiküllerinin akciğerlerde daha toksik olduğu tespit edilmiştir (Warheit, Brock, Lee, Webb ve Reed, 2005). Benzer toksik etkiler, kaplanmamış TiO₂ (hidrofilik) nanopartiküllerine kıyasla, silan ile kaplanmış (hidrofobik) TiO₂ nanopartiküllerinde de tespit edilmiştir (Oberdörster, 2001).

Mikronükleus testi, hücresel ve nükleer disfonksiyonun çeşitli yönlerinin doğrudan ve/veya dolaylı olarak ölçülmesini sağlayan, DNA hasarı (kromozom kırılması, kromozom kaybı, ayrılmama, kromozomal kararsızlık) veya DNA yanlış tamiri, mitotik anormallikler, nekroz, apoptoz ve sitostaz analizlerinin etkili bir şekilde tanımlandığı geniş kapsamlı ve yaygın olarak kullanılan bir testtir (Seager ve diğerleri, 2014, Unal ve diğerleri, 2018, Demirel ve Zamani, 2002; Yilmaz, 2014a, 2014b). Mikrofilament oluşumunun bir inhibitörü olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile sitokinezi bloke edilen binükleat hücrelerde tespit edilen mikronükleus, kromozomdan kopan asentrik fragmentlerden veya nükleer bölünme

sırasında bir fazda geride kalan bütün kromozomlardan kaynaklanmaktadır. Güvenilirliği ve kolaylıkla tekrarlanabilirliği nedeniyle mikronükleus testi, insan ve memeli hücrelerinde standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir (Seager ve diğerleri, 2014; Şen ve diğerleri, 2018; Unal ve diğerleri, 2018; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2014, Demirel ve Zamani, 2002; Yilmaz ve diğerleri, 2009). Mikronükleus frekansı, DNA'nın hipometilasyonu ve histon modifikasyonları sonucunda da artış gösterebilir, bu nedenle hipometilasyonunun belirleyici markeri olarak da kullanılabilir. Buna, DNA metilasyon inhibitörü olan 5-azasitidin, 1, 9 ve 16. kromozomların heterokromatin bölgelerinde daha az yoğunlaşması ve *in vitro* insan lenfositlerinde spesifik kromozom kayıplarını tetiklemesi sonucunda oluşan mikronükleuslar örnek gösterilebilir. MN oluşumu her ne kadar satellit DNA'nın hipometilasyonunun bir sonucu olarak artmış olsa da, artan genom hasarı nedeniyle DNA onarımı ve hücre döngüsü kontrol noktalarındaki housekeeping genlerinin promoter bölgeleri içindeki veya bitişiğindeki CpG adalarının hipermetilasyonundan da kaynaklanabilir. Örneğin, APC, BUBR1 ve hCDC4 gibi mitotik iğ kontrol noktası genlerinin CpG adası hipermetilasyonu, bu kontrol noktalarının ekspresyonlarını azaltabilir ve bu nedenle MN oluşumuna yol açan kromozomlarda yanlış ayrılmaların olasılığını artırabilir. DNA onarımında yer alan ATM, FANC ve BRCA1 ya da BRCA2 genlerinin susturulması ya da işlev kaybı, insan hücrelerinde daha yüksek MN frekanslarına neden olabilir (Fenech, 2007; Satoh ve diğerleri, 2004; Trenz, Rothfuss, Schutz ve Speit, 2002).

Çalışmamızda TiO₂-ÇNP'lerinin hiçbir konsantrasyonu MN frekansında artışa sebep olmadığı gibi, tam tersi, kontrole kıyasla düşüşler oluşturmuş hatta artan dozlara rağmen hücrelerdeki MN frekansı hemen hemen aynı kalmıştır. Pedot ile kaplanmış çubuk benzeri TiO₂ NP'leri de TiO₂-ÇNP'leri ile benzer sonuçlar göstermiş, kontrole kıyasla anlamsız azalmalara neden olmuştur. Sadece en düşük konsantrasyonda (50 µg/mL) bir miktar artışa sebep olmuştur. Pedot NP'ünün tek başına uygulandığı lenfositlerde, 5 ve 25 µg/mL'lik konsantrasyonlarda MN frekansında artışların olduğu fakat sadece 25 µg/mL'lik dozdaki artışın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre, ne TiO₂-ÇNP'leri ne de Ç/Pd TiO₂ NP'leri MN frekansında etkili olmamıştır. Gözlediğimiz bu sonuçlar, bazı çalışmaların sonuçlarına benzerlik gösterirken, bazı çalışmaların sonuçlarından farklılık göstermektedir. Örneğin, B6C3F1 farelerine 3 gün boyunca intravenöz yolla uygulanan anataz TiO₂ NP'lerinin 0,5, 5 ve 50 mg/kg'lık konsantrasyonlarının genotoksik etkileri incelendiğinde, NP'lerin farelerin kemik iliğine ulaştığı tespit edilmiş olmasına rağmen, MN frekansında doza bağlı herhangi bir artış tespit edilmemiştir (Sadiq ve diğerleri, 2012). C57BL/6J

farelerine 0,8, 7,2 ve 28,5 mg/m³'lük konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'leri (%74 anataz ve %26 brokit) günde 4 saat ve 5 gün boyunca inhalasyon yoluyla uygulandığında, kanda polikromatik eritrositlerde (PCE'ler) MN frekansında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir (Lindberg ve diğerleri, 2012). SHE hücreleri üzerinde her iki formdaki (anataz, rutil) TiO₂ NP ve mikropartiküllerinin 5, 10 ve 50 µg/cm²'lik konsantrasyonlarında MN oluşumu belirlenmemiştir (Guichard ve diğerleri, 2012). Uboldi ve diğerleri (2016), Balb/3T3 fare fibroblastlarında (1, 5 ve 10 µg/mL) rutil TiO₂ NP'lerinin tip III odak oluşumunu indükleyerek az da olsa genotoksik etkiye neden olduğunu, anataz TiO₂ NP'lerinin anlamlı herhangi bir neoplastik veya genotoksik etki oluşturmadığını tespit etmişlerdir (Uboldi ve diğerleri, 2016). Bunun tersine, TiO₂ NP'leri ile yapılan diğer bazı çalışmalarda MN frekansında anlamlı artışlar olduğu görülmektedir. Tavares ve diğerleri, TiO₂ NP'lerinin, %15 rutil-%85 anataz (NM 105)'in 125 µg/mL'lik konsantrasyonu, anataz (NM 102)'in 5 µg/mL'lik konsantrasyonu, hidrofobik rutil (NM 103)'in 45 µg/mL'lik konsantrasyonu ve hidrofilik rutil (NM 104)'in 15 ve 45 µg/mL'lik konsantrasyonlarını insan lenfositlerine uygulayarak MN oluşumlarını incelemişlerdir. Elde edilen bulgular, NM 105'in MN frekansında artış oluşturmadığını fakat diğer tüm NP'lerin kontrole kıyasla MN frekansında anlamlı artış oluşturduğu gözlenmiştir (Tavares ve diğerleri, 2013). Shukla ve diğerlerinin (2013), HepG2 hücreleri ile yaptıkları çalışmada 1, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'lerinin genotoksik etkileri MN testi ile incelendiğinde, 6 saatlik uygulamada, 20 µg/mL'lik konsantrasyonun kontrole kıyasla anlamlı artışa, 40 ve 80 µg/mL'lik konsantrasyonların ise azalışa neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, TiO₂ NP'lerinin preparatlar üzerinde aglomerasyonlara neden olduğunu ve bunun MN gözlemlerini olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir (Shukla ve diğerlerinin, 2013). TiO₂ NP'lerinin insan akciğer bronşial epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki genotoksik etkileri (20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL; 24 saat) MN testi ile değerlendirildiğinde, TiO₂ NP'lerinin en düşük konsantrasyonun en düşük aglomerasyona neden olduğu ve S fazındaki nanopartikül-hücrel etkileşim oranının MN oluşumunu arttırarak genotoksik etkiye neden olduğu belirtilmiştir (Prasad ve diğerlerinin, 2013). İnsan bronşiyal epitel hücrelerinde (BEAS 2B) yapılan bir diğer çalışmada, kaplanmamış iki farklı TiO₂ NP'ünün (anataz, <25nm; rutil, <5µm) ve SiO₂ kaplı rutil TiO₂ NP'lerinin (rutil, 10X40 nm) 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/cm²'lik konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, hiçbir NP'ün (anataz TiO₂, 72 saat hariç) MN oluşumunu tetiklemediği, tersine MN oluşumunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, kaplanmamış nano anataz TiO₂ ve mikro rutil

TiO₂'in oluşturduğu DNA hasarlarının silikon kaplı nano rutil TiO₂'in oluşturduğu hasarlardan çok daha yüksek olduğunu fakat sadece nano anataz TiO₂'in, sadece 10 ve 60 µg/cm²'lik dozda anlamlı düzeyde MN oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Diğer dozlarda MN frekansında bir artış gözlenmemiştir (Falck ve diğerleri, 2009). Zirak ve diğerleri tarafından (2016) yapılan bir araştırmada, anataz TiO₂ NP'lerinin (küresel, 20,17 nm) ve Bleomisin Sülfat (BLM-S) ile kaplı formunun genotoksik etkileri fare kemik iliği hücrelerinde incelenmiştir. Elde edilen veriler, BML-S ile kaplı TiO₂ NP'lerin, MN oluşumunu, kaplanmamış NP'lere kıyasla daha fazla tetiklediği tespit edilmiştir. Bleomisin varlığının, TiO₂ NP'lerinin daha fazla genotoksik etki oluşturmaya neden olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, uygulanan metod, konsantrasyon ve sürenin, genotoksisite düzeyini etkilediğini belirtmişlerdir (Zirak ve diğerleri, 2016). TiO₂ NP'lerinin 0,5, 1, 5 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonları Çin hamster ovaryum hücreleri (CHO-K1) üzerinde MN testiyle incelendiğinde, tüm konsantrasyonların kontrole kıyasla MN oluşumunda artışa neden olduğu (0.5 ve 1 µg/mL anlamlı) tespit edilmiştir (Di Virgilio ve diğerleri, 2010). TiO₂ NP'lerinin (10 ve 50 µg/mL; 24 saat) A549 insan akciğer kanser hücrelerinde MN oluşumunu her iki konsantrasyonda da doza bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, A549 hücrelerinde oksidatif stresin genotoksik etkiye neden olduğunu ve bu etkinin MN oluşumunda güçlü rol oynadığını bildirmişlerdir (Srivastava ve diğerleri, 2011). Benzer şekilde insan SH-SY5Y nöral hücrelerinde TiO₂ NP'lerinin (anataz ve %80 anataz-%20 rutil) 80, 120 ve 150 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 6 saatlik maruziyeti sonucunda her iki formda da doza bağlı artan mikronükleus oluşumu gözlenmiştir (Valdiglesias ve diğerleri, 2013). Rahman ve diğerleri (2002), Suriye Hamster Embriyo (SHE) hücrelerinde TiO₂ NP'lerinin 0,5, 1, 5 ve 10 µg/cm²'lik konsantrasyonlarının (12, 24, 48, 66 ve 72 saat) etkilerini MN testi ile incelemişlerdir. MN artışının tüm uygulama sürelerinde (12 saat hariç) 1 ve 5 µg/cm²'lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar oluşan bu genotoksik hasarların tümörögenesisle doğrudan ilişkili olduğunu ve yapılan bu çalışmanın TiO₂ nanopartiküllerinin apoptozu indüklediğini belirleyen ilk çalışma olduğunu bildirmişlerdir (Rahman ve diğerleri, 2002).

Çalışmamızda TiO₂-ÇNP, Ç/Pd TiO₂ ve Pedot NP'leri, insan periferik kan lenfositleri üzerinde, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda, replikasyon indeksinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Benzer şekilde kullanılan NP'lerin etkisi ile nükleer bölünme indeksinde de önemli bir değişim gözlenmemiştir. Replikasyon indeksi, kültürdeki hücrelerde

sitokinetik indeksin bir başka göstergesi olarak kullanılmaktadır. RI'nin belirlenmesi, uygulanan diğer toksisite testlerinden elde edilen verilere destek sağlamaktadır. DNA sentezinin engellenmesi, RI'te anlamlı düşüşe sebep olmaktadır. Bazı kimyasal maddeler, DNA sentezinin inhibisyonuna ve sonuçta RI'nin düşmesine neden olabilir (Lzutka, 1991). Nükleer bölünme indeksi de genel sitotoksitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Yüksek düzeyde kromozom hasarına sahip olan hücrelerin ya hücre bölünmesinden önce ölmesi ya da bölünme fazına girememesi durumunda NBI düşecektir. Tam tersi, kanserogeneze gibi durumlarda, NBI yükselecektir (Fenech, 2000; Vidya ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında RI ve NBI için elde edilen değerler, Korkmaz (2012), Saygılı (2016) ve Korkmaz (2018) tarafından, çeşitli nanopartiküllerin etkileri sonucunda elde edilen değerlerle benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında incelenen çubuk benzeri TiO_2 -NP'leri, uzun süreli uygulamada (48 saat), bütün konsantrasyonlarda kromozom anormalliklerinde anlamlı artışa sebep olmuştur. Ancak kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus frekansında önemli bir etki göstermemiştir. Pedot kaplı çubuk benzeri TiO_2 -NP'leri, KA ve KKD frekansında, sadece birkaç uygulamada, sırasıyla artış ve düşüşlere sebep olmuştur. Pedot NP'leri de birkaç uygulamada kromozom anormalliklerinde, sadece bir uygulamada MN frekansında artışa sebep olmuştur. Mitotik indekste oluşturdukları etki sırasıyla TiO_2 -ÇNP (48 saatte hepsi anlamlı), Ç/Pd TiO_2 (24 saatte 1, 48 saatte 2 uygulama anlamlı) ve Pedot NP'leri (sadece 48 saatte 1 uygulama) şeklindedir. Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, hem mitotik indekste düşüşler ve hem de KA, KKD ve MN frekansındaki artışlar negatif kontrole kıyasla tüm dozlarda ve anlamlı düzeylerde olmadığı için (Çizelge 5.1.), bu nanopartiküllerin çok zayıf sitotoksik, çok zayıf klastojenik ve çok zayıf mutajenik olduğu ifade edilebilir. Tüm testler birlikte değerlendirildiğinde, bu partiküllerin çok düşük olan sitotoksik ve genotoksik etkisi TiO_2 -ÇNP > Ç/Pd TiO_2 -NP > Pedot NP'ü şeklinde sırlanabilir. Bu bilgiler, nanopartiküllerin toksik olmadığı yönünde genel bir sonuç oluşturuyor ise de, bazı uygulamalarda ortaya çıkan anlamlı düşüş ve artışların, bu nanopartiküllerin hala güvenilir bir şekilde kullanılamayacağını, kullanımında dikkatli olunması gerektiği ve bu konuda hala detaylı araştırmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Nanopartiküllerin canlılar üzerindeki genotoksik etkilerin primer ve sekonder olmak üzere iki ayrı mekanizmayla oluşturulabileceği ifade edilmektedir.

Primer genotoksik mekanizma, nanopartiküllerin inflamasyon yokluğunda oluşturdukları genotoksisite olarak ifade edilir. Bu da direk ve dolaylı genotoksisite olarak iki şekilde gruplandırılmaktadır. Direk primer genotoksisitede, nanopartiküller direk olarak genomik DNA ve onun kararlılığıyla bağlantılı yapılarla etkileşime girer. Bu etkileşim partikülün yüzeyindeki reaktif oksijen türleri gibi oksidatif yollarla yapılır veya partikülün çekirdeğe girmesini takiben DNA ile direk fiziksel etkileşimi yoluyla gerçekleştirilir. Direk genotoksisite, hücre bölünmesi sırasında, partikülün fiziksel veya kimyasal yolla kromozom ayrılmasındaki mekanik işlemler ile etkileşimi yoluyla da ortaya çıkabilmektedir. Dolaylı primer genotoksisite, partiküle maruziyet sonucunda, mitokondri ve hücre zarları gibi yapılardan oluşturulan ROT'lerinden veya antioksidan savunma sisteminin baskılanması sonucunda ortaya çıkar. Serbest radikallerin endojen yollarla artışı veya antioksidan savunma sisteminin bozulması, sırasıyla, oksidatif stresi ve sonuçta oksidatif DNA hasarlarını artırır. İndirekt olarak oluşan DNA hasarının, ROT ve oksidatif stresin oluşumuyla beraber amyotrofik lateral skleroz, artrit, kardiyovasküler hastalık, inflamasyon, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, diyabet ve kanser dahil olmak üzere birçok dejeneratif hastalıkla da ilişkili olduğu bilinmektedir (Donaldson ve diğerleri, 2010).

Sekonder genotoksisite, primer genotoksiteden oldukça farklıdır. Çünkü bu mekanizma, makrofajlar ve polikromatik nötrofilik lökositler gibi inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler, nanopartiküllere karşı oluşturulan inflamatuvar cevap olarak partiküllerin etrafında toplanırlar. Vücudu işgal eden patojenlerden kurtarmak için uğraşan ve kalıtsal olan bu inflamatuvar cevap, normal fonksiyonların yerine konması için gerekli olan bir işlemdir fakat görev yaptıkları hücrelerde oluşturdukları reaktif türleri, DNA hasarlarına sebep olmaktadır. Kronik inflamasyon durumunda, bu durum kalıcı oksidatif strese ve tekrarlayan DNA hasarlarına ve sonuçta hücre yaşamı ve çoğalması için gerekli proliferasyon için sinyal moleküllerinin üretimine sebep olur. Bu da sürekli olarak genetik hasarların birikmesine ve dolayısıyla hücrelerin malin forma (kanser) dönüşümüne sebep olur (Donaldson ve diğerleri, 2010).

Bu tez çalışmasında kullanılan nanopartiküllerin çok düşük de olsa sitotoksik ve genotoksik etkili olması, yukarıda adı geçen mekanizmalardan biri ya da daha fazlası ile bu etkilerini gösterebileceği şeklinde yorumlanabilir. Kaynak araştırmasında da nanopartiküllerin etkileri konusunda yapılan bazı araştırmalar, bu partiküllerin her hangi bir genotoksik risk oluşturmadığını gösteriyor olsa da, birçok araştırmada bu partiküllerin DNA'da gen

mutasyonlarına, DNA tamiri ve hücre döngüsünde bozulmalara ve kromozom yapısı ve sayısında anormalliklere neden olabileceğine yönelik bulgular mevcuttur. Öyle ki bu etkilerin karsinogeneze ve kalıtsal hastalıklara neden olabileceği dahi ifade edilmektedir (Corvi ve Madia, 2017; Fu ve diğerleri, 2014; Zhu ve diğerleri, 2013; Valavanidis, Vlachogianni ve Fiotakis, 2009). Kromozom yapısında meydana gelen anormalliklerin frekansındaki artışlar kanser oluşumu ile de doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan genotoksisite testleri hem kimyasalların genetik risklerinin belirlenmesinde ve hem de kanserin erken zamanda belirlenmesine imkan tanıyan testlerdir (Şen ve diğerleri, 2018; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2014).

TiO ₂ -ÇNP		Anormal Hücre Yüzdesi	KA/Hücre	KKD	MI	MN
24 saat	50 µg/ml	↑	↑	↑	↓	
	100 µg/ml	↑	↑	↓	↓	
	250 µg/ml	↑	↑	↑	↓	
	500 µg/ml	↑	↑	↑	↓	
48 saat	50 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
	100 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
	250 µg/ml	↑	↑	↑	↓	↓
	500 µg/ml	↑	↑	↑	↓	↓
Ç/Pd TiO₂ NP						
24 saat	50 µg/ml	↑	↑	↓	↓	
	100 µg/ml	↑	↑	↓	↓	
	250 µg/ml	↑	↑	↑	↓	
	500 µg/ml	↑	↑	↓	↓	
48 saat	50 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↑
	100 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
	250 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
	500 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
Pedot NP						
24 saat	5 µg/ml	↑	↑	↓	↑	
	10 µg/ml	↑	↑	↓	↓	
	25 µg/ml	↑	↑	↓	—	
	50 µg/ml	↑	↑	↓	↑	
48 saat	5 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↑
	10 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↓
	25 µg/ml	↑	↑	↓	↓	↑
	50 µg/ml	↑	↑	↓	↓	—

↑ Kontrolle göre anlamlı artış

↓ Kontrolle göre anlamlı azalış

— Kontrolle göre aynı

↑ Kontrolle göre anlamsız artış

↓ Kontrolle göre anlamsız azalış

Şekil 5.1. İnsan periferel kan lenfositlerinde gözlenen etkiler

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal yollarla eskiden beri maruz kaldığımız nanopartiküller, son yıllarda nanoteknolojinin sağladığı avantajlar sayesinde yaşamımıza hızla girmiş ve yaşamımızın ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Sağlık, gıda, kozmetik, elektronik, askeri, tekstil, tarım ve sanayi gibi çok değişik alanlardaki ürünlere sağladığı esneklik, sağlamlık, antibakteriyellik, iletkenlik, optiklik, ucuza mal edilebilirlik ve toplu üretim kalitesi gibi birçok avantajına rağmen, nanopartiküllerin canlılar ve ekosistem üzerindeki etkileri hala tam olarak bilinmemektedir.

Son 20 yıldır araştırmacılar hem nanopartiküllerin olası toksik, klastojenik ve mutajenik etkilerini belirlemek hem de mevcut toksik etkilerini azaltmak için araştırmalar yapmaya başlamışlardır. Nanopartiküller farklı şekil, kristal yapı, yük kimyası, boyut ve aglomerasyon durumuna sahiptirler. Nanopartiküllerin sahip oldukları bu farklı özellikler uygulandıkları ortamda da farklı etkiler göstermelerine neden olmaktadır. Nanopartiküller küçük boyutlarından dolayı geniş yüzey alanı oluşturmakta ve yüzeylerinde fazla sayıda atom bulundurmaktadır. Bu nedenle çok reaktiftirler ve hızlı bir şekilde en yakındaki biyolojik moleküllerle etkileşime girerler ve sonuçta toksik etkiler oluşturabilirler. Hem bunu engellemek ve hem de ekstra özellikler daha kazandırmak amacıyla nanopartiküller farklı malzemelerle kaplanmak suretiyle de kullanılmaktadır. Böylece nanopartiküller hem kimyasal özelliklerini koruyabilmekte hem de daha az çözünme ve daha az toksisite gösterebilirler.

Bu çalışmada, TiO_2 -ÇNP'lerinin hem tek başına hem pedot ile kaplanmış formu ve hem de sadece kaplama maddesi olan pedot nanopartiküllerinin insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri, kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus testleri kullanılarak incelenmiştir. İncelenen tüm nanopartiküller, incelenen konsantrasyonlarda, burada uygulanan sürelerde kromozom anormalliklerinde, kardeş kromatid değişimlerinde ve mikronukleus oluşumlarında anlamlı artış oluşturmamıştır. Ancak yine de bazı uygulamalarda pozitif sonuçların gözlenmiş olması, bu partiküllerin dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir. Diğer yandan, bu nanopartiküllerin farklı konsantrasyonları ve uygulama süreleri kullanılarak, farklı primer hücreler veya hücre hatlarında, ayrıca *in vivo* koşullarda da toksik ve genotoksik etkileri hakkında daha detaylı

araştırmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Böylece, nanopartiküllerden daha fazla fakat daha sağlıklı şekilde yararlanma imkanı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abd Ellah, N. H., and Abouelmagd, S. A. (2016). Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1-14.
- Abouelmagd, S. A., Meng, F., Kim, B. K., Hyun, H., and Yeo, Y. (2016). Tannic acid-mediated surface functionalization of polymeric nanoparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2, 2294-2303.
- Aghamohammadi, S. Z., and Savage, J. R. K. (2016). A pulse BrdU method for SCE. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 5, 259-266.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Verma, A., Ahamed, M., Ahmed, M., and Alhadlaq, H. (2013). Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 983-993.
- Ali, S., Khan, I., Khan, S. A., Sohail, M., Ahmed, R., Rehman, A., Ur Ansari, M. S., and Morsy, M. A. (2017). Electrocatalytic performance of Ni@Pt core-shell nanoparticles supported on carbon nanotubes for methanol oxidation reaction, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 795, 17-25.
- Allouni, Z. E., Høi, P. J., Cauqui, M. A., Gjerdet, N. R., and Cimpan, M. R. (2012). Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association With BIBRA*, 26, 469-479.
- Andreoli, C., Leter, G., Berardis, B. D., Degan, P., Angelis, I. D., Pacchierotti, F., Crebelli, R., Barone, F., and Zijno, A. (2018). Critical issues in genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles by human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Applied Toxicology*, 38, 1471-1482.
- Asharani, P. V., Lianwu, Y., Gong, Z., and Valiyaveetil, S. (2011). Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 1, 43-54.
- Asharani, P. V., Xinyi, N., Hande, M. P., and Valiyaveetil S. (2010). DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine*, 1, 51-64.
- Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Çelebi Keskin, A., and Unal, F. (2016). Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 8-18.
- Atlı-Şekeroğlu, Z. (2013). Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70, 33-42.
- Atlı-Şekeroğlu, Z., ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *Tübav Bilim Dergisi*, 4, 221-9.

- Avuloglu Yilmaz E., Unal F., and Yüzbaşıoğlu D. (2017a). Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antidepressant drug-active ingredients, trazodone and milnacipran, *in vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*, 40, 57-66.
- Avuloglu-Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D., Ozcelik, A.B., Ersan, S., and Unal, F. (2017b). Evaluation of genotoxic effects of 3-methyl-5-(4-carboxycyclohexylmethyl)tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazine-2-thione on human peripheral lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 55, 1228-1233.
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D., and Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion?. *Toxicology Letters*, 208, 286-292.
- Bernardeschi, M., Guidi, P., Scarcelli, V., Frenzilli, G., and Nigro, M. (2010). Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 619-23.
- Berube, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L., and Jones, T. (2007). Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34, 1044-1094.
- Beykaya, M., and Çağlar, A. (2016). Bitkisel özütler kullanılarak gümüş-nanopartikül (AgNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 16, 631-641.
- Bhattacharya, D., Santra, C. R., Ghosh, A. N., and Karmakar, P. (2014). Differential Toxicity of rod and spherical zinc oxide nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 707-716.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., 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, 1-11.
- Blundell, G., Henderson, W., and Price, E. (1989). Soil Particles in the Tissues of the Foot in Endemic Elephantiasis of the Lower Legs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83, 381-385.
- Bohr, V. A., and Wassermann, K. (1988). DNA repair at the level of the gene. *Trends in Biochemical Sciences*, 13, 429-433.
- Bolis, V., Busco, C., Ciarletta, M., Erriquez, J., Fenoglio, I., Livraghi, S., and Morel, S. (2012). Hydrophilic/hydrophobic features of TiO₂ nanoparticles as a function of crystal phase, surface area and coating, in relation to their potential toxicity in peripheral nervous system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369, 28-39.
- Botelho, M. C., Costa, C., Silva, S., Costa, S., Dhawan, A., Oliveira, P. A., and Teixeira, J. P., (2014). Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells *in vitro*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68, 59-64.
- Boyoglu, C., He, Q., Willing, G., Boyoglu-Barnum, S., Dennis, V. A., Pillai, S., and Singh, S. R. (2013). Microscopic studies of various sizes of gold nanoparticles and their cellular localizations. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 1-13.

- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 297-308.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y., (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge: evidence and impacts. *Waste Management*, 30, 504-20.
- Bucchianico, S. D., Cappellini, F., Bihanic, F. L., Zhang, Y., Dreij, K., and Karlsson, H. L. (2017). Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 32, 127-137.
- Bucchianico, S. D., Fabbri, M. N., 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, 287-299.
- Bucchianico, S. D., Gliga, A. R., Åkerlund, S. S., Wallinder, I. O., Fadeel, B., and Karlsson, H. L. (2018). Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 15, 1-14.
- Buzea, C., Blandino, I. I. P., and Robbie K. (2007). Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2(4), 17-71.
- Cardillo, D., Tehei, M., Hossain, Md. S., Islam, Md. M., Bogusz, K., Shi, D., Mitchell, D., Lerch, M., Rosenfeld, A., Corde, S., and Konstantinov, K. (2016). Synthesis-Dependent Surface Defects and Morphology of Hematite Nanoparticles and Their Effect on Cytotoxicity *in vitro*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 5867-5876.
- Catalán, J., Siivola, K. M., Nymark, P., Lindberg Suhonen, S., Järventaus, H., Koivisto, A. J., Moreno, C., Vanhala, E., Wolff, H., Kling, K. I., Jensen, K. A., Savolainen, K. M., and Norppa, H. (2015). *In vitro* and *in vivo* genotoxic effects of straight versus tangled multiwalled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 1743-5390.
- Catalána, J., Suhonena, S., Järventaus, H., Birkedal, R., Clausenb, P. A., Jensenb, K. A., Vippolaa, M., Savolainena, K., and Norppaa, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells Penny Nymarka. *Toxicology*, 313, 38-48.
- 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. *Environment Science & Technology*, 41, 2064-2068.
- Chau, C. F., Yen, G. C., and Wu, S. H. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 269-280.
- Chen, S. W., and Yen, Y. W. (2001). Interfacial Reactions in the Sn-Ag/Au Couples. *Journal of Electronics Materials*, 30, 1133-1134.
- Chen, T., Yan, J., and Li, Y. (2014). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 95-104.

- Chen, Z., Wang, Y., Ba, T., Li, Y., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Quian, Q., Yang, J., and Jia, G. (2014). Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Letters*, 226, 314-319.
- Cheng, W. S., Tarone, R. F., Andrews, A. D., Whang-Peng, J. S., and Robbins, J. H. (1978). Ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum and in Cockayne's Syndrome lymphocyte cell. *Lines Cancer Research*, 38, 1601-1609.
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., and Chan, W. C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6, 662-668.
- Cho, S. J., Maysinger, D., Jain, M., Röder, B., Hackbarth, S., and Winnik, F. M. (2007). Long term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairment in living cells. *Langmuir*, 23, 1974-1980.
- Choi, A. O., Cho, S. J., and Desbarats, J. (2007). Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblas-toma cell. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 1-13.
- 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, 563-569.
- Clift, M. J. D., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D.M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., Guy, K., and Stone, V. (2008). The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232, 418-427.
- Collins, A., Yamani, N. E., and Dusinska, M. (2017). Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 69-76.
- Conde, J., Doria, G., and Baptista, P. (2012). NobleMetal Nanoparticles Applications in Cancer. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Drug Delivery*, 2012, 1-12.
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., and Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 3, 325-327.
- Corachan, M. (1988). Endemic Non-Filarial Elephantiasis of Lower Limbs-Podonconiosis. *Medicina Clinica*, 91, 97-100.
- Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced?. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 600-608.
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A. M., Vrčak, I. V., Tolić, S., Štefanić, P. P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., ve Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 18-28.

- Çelik, M., Donbak, L., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., and Yılmaz, S. (2007). Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutation Research*, 627, 158-163.
- Çelik, M., Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., and Dönbak, L. (2009). Evaluation of the genotoxicity of fusarium mycotoxin moniliformin in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 431-434
- Dağlıoğlu, Y., and Özkan Yılmaz, H. (2018). Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksiste deneylerindeki önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 1, 1-17.
- Daphedar, A., and Taranath, T. C. (2018). Characterization and cytotoxic effect of biogenic silver nanoparticles on mitotic chromosomes of *Drimia polyantha* (Blatt.&McCann) Stearn. *Toxicology Reports*, 5, 910-918.
- Demir, E., Burgucu, D., Turna, F., Aksakal, S., and Kaya, B. (2013). Determination of TiO₂, ZrO₂, and Al₂O₃ nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 76, 990-1002.
- Demirel, S., and Zamani, A. G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12, 123-127.
- Demirtaş Korkmaz, F. (2012). *Titanyum dioksit ve Çinko oksit nanopartikülerinin in vitro insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 44-45.
- Derfus, A. M., Chan, W. C. W., and Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4, 11-18.
- 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, 287-299.
- Di Virgilio, A. L., Reigosa, M., Arnal, P. M., and Fernández Lorenzo de Mele, M. (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, 711-8.
- Doğaroğlu, Z. G., ve Köleli, N. (2014). Titanyum Dioksit Nanopartikülünün Buğday Çimlenmesine Etkisi. *Akademik Platform*, 3342, 1283-1288.
- Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R., and Poland, C. A. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 1-17.
- Donaldson, K., Poland, C. A and Schins, R. P. F. (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 4, 414-420.

- Duffin, R., Mills, N. L., and Donaldson, K. (2007). Nanoparticles-a thoracic toxicology perspective. *Yonsei Medical Journal*, 48, 561-633.
- El-Missiry, M., Fayed, H., Othman, A., Gouida, M., Shabana, S., and Khalifa, E. (2017). Titanium Dioxide Nanoparticles Provoke Testicular Injury and Apoptosis in Sperm through Oxidative Stress-Activated Mitochondrial and Death Receptor Pathways. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 3, 517-525.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., and El-Sayed, M. A. (2005). Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Letters*, 5, 829-834.
- Erikel, E., Yuzbasioglu, D., and Unal, F. (2019). *In vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal of Ethnopharmacology*, 237, 171-181.
- Erol, O., and Unal, H. I. (2015). Core/shell-structured, covalently bonded TiO₂/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) dispersions and their electrorheological response: the effect of anisotropy. *Royal Society of Chemistry*, 5, 103159-103171.
- Ersöz, Ç., ve Altun Çolak, D. (2018). Meyve sineği larvalarında SiO₂ nanopartiküllerine bağlı toksisitenin araştırılması. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11, 255-262.
- Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam, Elsevier Sciences, 19, 405-427.
- Falck, G. C., Lindberg, H. K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Human & Experimental Toxicology*, 28, 339-52.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Publishing Group*, 5, 1084-1104.
- Fenech, M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics*, 98, 234-243.
- Fernández-Bertólez, N., Costa, C., Brandão, F., Duarte, J. A., Joao, P. T., Eduardo, P., Vanessa, V., and Blanca, L. (2019). Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity induced by oleic acid-coated iron oxide nanoparticles in human astrocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60, 816-829.
- Fındıklı, Z., ve Türkoğlu, Ş. (2010). Glyphos ve DDVP' nin *Allium cepa* L.'da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 2.
- Foldbjerg R., Dang D. A., and Autrup H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 85, 743-750.

- Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H. M., Ray, P. C., and Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 64-75.
- Gandhi, P. R., Jayaseelan, C., Kamaraj, C., Rajasree, S. R. R., and Mary, R. R. (2018). In vitro antimalarial activity of synthesized TiO₂ nanoparticles using Momordica charantia leaf extract against Plasmodium falciparum. *Journal of Applied Biomedicine*, 16, 378-386.
- Gea, M., Bonetta, S., Iannarelli, L., Giovannozzi, A. M., Maurino, V., Bonetta, S., Hodoroaba, V. D., Armato, C., Rossi, A. M., and Schilirò, T. (2019). Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127, 89-100.
- Genç, H., Barutca, B., Koparal, T., Özöğüt, U., Şahin, Y., and Suvacı, E. (2018). Biocompatibility of designed MicNo-ZnO particles: Cytotoxicity, genotoxicity and phototoxicity in human skin keratinocyte cells. *Toxicology*, 47, 238-248.
- Georgantzopoulou, A., Balachandran, Y. L., Rosenkranz, P., Dusinska, M., Lankoff, A., Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Guignard, C., Audinot, J. N., Girija, S., Hoffmann, L., and Gutleb, A. C. (2012). Ag nanoparticles: size- and surface-dependent effects on model aquatic organisms and uptake evaluation with NanoSIMS. *Journal Nanotoxicology*, 7, 1168-1178.
- German, J., Ellis, N. A., and Proytcheva, M. (1996). Bloom's Syndrome XIX. Cytogenetic and population evidence for genetic heterogeneity. *Clinical Genetics*, 49, 223-231.
- Ghosh, M., Öner, D., Duca, R. C., Cokic, S. M., Seys, S., Kerkhofs, S., Landuyt, K. V., Hoet, P., and Godderis, L. (2017). Cyto-genotoxic and DNA methylation changes induced by different crystal phases of TiO₂-np in bronchial epithelial (16-HBE) cells. *Mutation Research*, 796, 1-12.
- Gnach, A., Lipinski, T., Bednarkiewicz J. R., and Capobianco J. A (2015). Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44, 1561-1584.
- Gonzalez, L., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. *Nanotoxicology*, 2, 252-273.
- Göktepe, F. (2015). Eğrilebilir karbon nanotüpler ve bu özel liflerden üretilen teknik iplikler. *Journal of Textiles and Engineer*, 100, 1-12.
- Grabowski, N., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Santiago, L. A., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Tsapis, N., and Fattal, E. (2013). Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 454, 686-694.
- Grabowski, N., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Tsapis, N., Pallardy, M., Kerdine-Romer, S., and Fattal, E. (2015). Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 482, 75-83.

- Grassian, V. H., O'Shaughnessy, P. T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., and Thorne P. S. (2007). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental Health Perspectives*, 115, 397-402.
- Gratton, S. E., Ropp P.A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., and DeSimone, J. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11613-11618.
- Guichard, Y., Schmit, J., Darne, C., Gaté, L., Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R., Witschger, O., Martin, A., Fierro, V., and Binet, S. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Annals of Occupational Hygiene*, 56, 631-644.
- Güneş, E., Erdal, M. O., and Gemi, L. (2017). The Effect of Nanofiber on the Biological Traits of *Drosophila melanogaster*. *Sakarya University Journal of Science*, 21(6), 1609-1613.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Högstedt, B., and Knudsen, L. (1994). Cancer risk in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Research*, 54, 2919-2922.
- Hamzeh, M., and Sunahara, G. I. (2013). In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide-TiO₂ nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, 27, 864-873.
- Hardman, R. (2006). A toxicological review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, 114, 165-172.
- Harris, G., Palosaari, T., Magdolenova, Z., Mennecozzi, M., Gineste, J. M., Saavedra, L., Milcamps, A., Huk, A., Collins, A. R., Dusinska, M., and Whelan, M. (2015). Iron oxide nanoparticle toxicity testing using high-throughput analysis and high-content imaging. *Nanotoxicology*, 9, 87-94.
- 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 nanoparticle. *Biomaterials*, 31, 3657-3666.
- Hisatomi, T., Kubota, J., and Domen, K. (2014). Recent advances in semiconductors for photocatalytic and photoelectrochemical watersplitting. *Chemical Society Reviews*, 43, 7520-7535.
- Hoskins, C., Cuschieri, A., and Wang, L. (2012). The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 1-11.
- Huang, S., Chueh, P. J., Lin, Y. W., Shih, T. S., and Chuang, S. M. (2009). Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicology Applied Pharmacology*, 241, 182-194.

- Huk, A., Izak-Nau, E., El Yamani, N., Uggerud, H., Vadset, M., Zasonska, B., Duschl, A., and Dusinska, M. (2015). Impact of nanosilver on various DNA lesions and HPRT gene mutations-effects of charge and surface coating. *Part Fibre Toxicology*, 12, 1-20.
- Husgafvel-Pursiainen, K. (2004). Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutation Research*, 567, 427-445.
- İlyasoğlu, H., ve El, S. N. (2010). Nanoemülsiyonlar: oluşumları, yapıları ve kolloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 35, 143-150.
- İnandı, T., Cancığer Eltaş, M., ve Kerman, B. (2018). Türkiye’de Havadaki PM10 ve SO2 Düzeyindeki Değişimler, 2005-2015. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences Journal Identity*, 38, 209-217.
- İnternet: European Commission. Nanomaterials-Chemicals-Enterprise and Industry. URL: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/nanomaterials/index_en.htm, Son Erişim Tarihi: 02 Mart 2015.
- İnternet: Using nanomaterials at work: Including carbon nanotubes (CNTs) and other biopersistent high aspect ratio nanomaterials (HARNs) URL: <http://www.hse.gov.uk/pubns/books/hsg272.pdf>, Health and Safety Executive 4-18, Son Erişim Tarihi: 25 Şubat 2015.
- İnternet: Chesterton Global Solutions, Local Service, Reach (1907/2006EC,2015/830/EU ile değişik) Güvenlik Bilgi Formu. URL: <https://chestertonlubricants.chesterton.com>, Son Erişim Tarihi: 28 Ağustos 2017.
- İnternet: WoodrowWilson. URL: <http://webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nanotechproject.org%2Fcpi%2F8&date=2014-11-05>, Son erişim tarihi: 18.08.2014.
- Jatoi, A.W., Kim, I. S., and Ni, Q. Q., (2018). Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO₂ nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. *ResearchGate*, 18, 1-19.
- Jin, C. Y., Zhu, B. S., Wang, X. F., and Lu, Q. H. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1871-1877.
- Jomini, S., Labille, J., Bauda, P., and Pagnout, C. (2012). Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO₂ nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO₂-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215, 54-61.
- Jong, W. H. D., and Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3, 133-149.
- Jugan, M. L., Barillet S., and Simon-Deckers A. (2012). Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 6, 501-513.

- 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, 1726-1732.
- Kaweeteerawat, C., Chang, C. H., Roy, K. R., Liu, R., Li, R., Toso, D., Fischer, H., Ivask, A., Ji, Z., Zink, J. I., Zhou, Z. H., Chanfreau, G. F., Telesca, D., Cohen, Y., Holden, P. A., Nel, A. E. and Godwin, H. A. (2015). Cu Nanoparticles Have Different Impacts in *Escherichia coli* and *Lactobacillus brevis* than Their Microsized and Ionic Analogues. *ACS Nano*, 7, 7215-7225.
- Kermanizadeh, A., Gaiser, B. K., Hutchison, G. R., and Stone, V. (2012). An in vitro liver model- assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 1-13.
- Kim, S., and Ryu, D. Y. (2013). Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 78-89.
- Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Muñoz Javier, A., Gaub, H. E., Stölzle, S., Fertig, N., Parak, and W. J. (2005). Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*, 5, 331-338.
- Kontaş, S., Atlı-Şekeroğlu, Z., ve Şekeroğlu, V. (2011). Kardeş Kromatid Değişimi Testi ve Kullanım Alanları. *Türk Bilim Araştırma Vakfı*, 4, 226-234.
- Kouwenhoven, L. P., Austing, D. G., and Tarucha, S. (2001). Few-Electron Quantum Dots. *Reports on Progress in Physics*, 64, 701-736.
- Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R., and Hunter, R. L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicology Sciences*, 77, 126-134.
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Schulz, M., Wiench, K., Champ, S., Schulte, S., Wohlleben, W., and Oesch, F. (2010). Genotoxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology*, 4, 364-381.
- Latt, S. A., Stetten, G., Juergens, L. A., Buchanan, G. R., and Gerald, P. S. (1975). Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's Anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 4066-4070.
- Lazutka, J. R. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17, 188-195.
- Lin, W., Huang, Y. W., Zhou, X. D., and Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217, 252-259.

- Lindberg, H. K., Falck, G. C., Catalan, J., Koivisto, A. J., Suhonen, S., Järventaus, H., Rossi, E.M., Nykäsenoja, H., Peltonen, Y., Moreno, C., Alenius, H., Tuomi, T., Savolainen, K.M., and Norppa, H. (2012). Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutation Research*, 745, 58-64.
- Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Xiao, Z., and Ye, B. (2009). Pulmonary Toxicity Induced by Three Forms of Titanium dioxide Nanoparticles via Intra-Tracheal Instillation in Rats. *Progress in Natural Science*, 19, 573-579.
- Lotfi, A., Zirak, R. G., Moghadam, M. S., and Pazooki, N. (2016). Effects of the interaction of Nanorutile TiO₂ with vincristine sulfate on chromosomal abnormalities *in vivo*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 7, 1083-1093.
- Lotfi, A., Zirak, R. G., Moghadam, M. S., and Pazooki, N. (2016). Effects of the interaction of Nanorutile TiO₂ with vincristine sulfate on chromosomal abnormalities *in vivo*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4, 1083-1093.
- Lykaki, M., Pachatouridou, E., Carabineiro, S. A. C., Iliopoulou, E., Andriopoulou, C., Kallithrakas-Kontos, N., Boghosian, S., and Konsolakis, M. (2018). Ceria nanoparticles shape effects on the structural defects and surface chemistry: Implications in CO oxidation by Cu/CeO₂ catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 230, 18-28.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9, 153-166.
- Mamur S., Unal F., Altok K, Değer S. M., and Yuzbasioglu D. (2016). DNA damage in hemodialysis patients with chronic kidney disease; a test of the role of diabetes mellitus; a comet assay investigation. *Mutation Research*, 800, 22-27.
- Mamur, S., Ataseven, N., Unal, F., ve Yüzbaşıoğlu, D. (2018a). Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3, 155-164.
- Mamur, S., Yuzbasioglu, D., Altok, K., Unal, F., and Deger, S. M. (2019). Determination of genotoxic effects in hemodialysis patients with chronic kidney disease and the role of *diabetes mellitus* and other biochemical parameters. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environment*, 844, 46-53.
- Mamur, S., Yuzbasioglu, D., Yılmaz, S., Erikel, E., and Unal, F. (2018c). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and Chemical Toxicology*, 11, 1-9.
- Mamur, S., Yuzbasioglu, D., Yılmaz, S., Erikel, E., and Unal, F. (2018b). Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of enniatin-A *in vitro*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 1633-1644.
- Mansha, M., Khan, I., Ullah, N., and Qurashi, A. (2017). Synthesis, characterization and visible-light-driven photoelectrochemical hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 10952-10961.

- Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., and Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150, 552-560.
- Miura, N., Ohtani K., Hasegawa T., Yoshioka H., and Hwang, G-W. (2017). High sensitivity of testicular function to titanium nanoparticles, *The Journal of Toxicological Sciences*, 42, 359-366.
- Moller P., Hemmingsen, J. G., Jensen, D. M., Danielsen, P. H., Karottki, D. G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Cao, Y., Kermanizadeh, A., Klingberg, H., Christophersen, D.V., Hersoug, L. G., ve Loft, S. (2015). Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure. *Mutagenesis*, 30, 67-83.
- Monteiro-Riviere, N. A., Nemanich, R. J., Inman, A. O., Wang, Y. Y., and Riviere, J. E. (2005). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters*, 155, 377-384.
- Muller, E. G. D., Snyderman B. E., Novik I., Hailey D. W., Gestaut D. R., Niemann C. A., O'Toole, E. T., Giddings, T. H., Sundin, B. A., and Davis, T. N., (2005). The Organization of the Core Proteins of the Yeast Spindle Pole Body. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 3341-3352.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J. F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J. B., and Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 221-231.
- Nagy, A., Hollingsworth, J. A., Hu, B., Steinbrück, A., Stark, P. C., Valdez, C. R., Vuyisich, M., Stewart, M. H., Atha. D. H., Nelson, B. C., and Iyer, R. (2013). Functionalization-Dependent Induction of Cellular Survival Pathways by CdSe Quantum Dots in Primary Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *ACS Nano*, 7, 8397-411.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-627.
- Nymark, P., Catalan, J., Suhonen, S., Jarventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P. A., Jensen, K. A., Vippola, M., Savolainen, K., and Norppa, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313, 38-48.
- Oberdörster, G., (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 74, 1-8.
- Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B. E. (1994). Correlation between Particle Size, *in vivo* Particle Persistence, and Lung Injury. *Environmental Health Perspective*, 102, 173-179.

- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., and Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicology*, 2, 1-8.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-839.
- Oh, W. K., Kim, S., Choi, M., Kim, C., Jeong, Y. S., Cho, B. R., Hahn, J. S., and Jang, J. (2010). Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano*, 4, 5301-5313.
- Oyar, P. (2014). Diş hekimliğinde nanopartiküllerin kullanım alanları. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 8, 49-55.
- Özparlak, H., ve Çelik, B. (2016). Tavuk yumurtası mikronükleus testi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6, 17-28.
- Patel, S., Patel, P., and Bakshi, S. R. (2017). Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. *Cytotechnology*, 69, 245-263.
- Perry, P., and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156-158.
- Pesnya, D. S. (2013). Cytogenetic effects of chitosan-capped silver nanoparticles in the *Allium cepa* test. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 3, 275-281.
- Peter, H., Bruske-Hohlfeld, I., and Salata, O. (2004). Nanoparticles-Known and Unknown Health Risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1-15.
- Petkovic, J., Zegura, B., Stevanovic, M., Drnovsek, N., Uskokovic, D., Novak, S., ve Filipic, M. (2011). DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*, 5, 341-353.
- Petrarca, C., Clemente, E., Zaccariello, G., Sabbioni, E., and Gioacchino, M. D. (2018). TiO₂ and TiO₂-Mesoporous Silica Nanoparticle Toxicity Evaluated On Primary Human Peripheral Blood Mono/Lymphocytes. *Occupational and Environmental Medicine*, 75, 1333.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 4, 289-302.

- Prasad, R. Y., Wallace, K., Daniel, K. M., Tennant, A. H., Zucker, R. M., Strickland, J., Dreher, K., Kligerman, A. D., Blackman, C. F., and DeMarin, D. M. (2013). Effect of Treatment Media on the Agglomeration of Titanium Dioxide Nanoparticles: Impact on Genotoxicity, Cellular Interaction, and Cell Cycle. *ACS Nano*, 3, 1929-1942.
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., and Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31, 7606-7619.
- Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, Y. J., Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., and Patiño, C. (2006). Study of the Localization of Iron, Ferritin, and Hemosiderin in Alzheimer's Disease Hippocampus by Analytical Microscopy at the Subcellular Level. *Journal Structural Biology*, 153, 42-54.
- Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T., and Radomski, M. W. (2005). Nanoparticle- induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British Journal of Pharmacology*, 146, 882-893.
- Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D. G., and Schiffmann, D., (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environment Health Perspect*, 110, 797-800.
- Rao, J. P., and Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.
- Ray, P. C., Yu, H., Fu, and P. P. (2009). Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology*, 27, 1-35.
- Roduner, E. (2006). Size matters: Why nanomaterials are different. *Chemical Society*, 35, 583-592.
- Rushton, L. (2004). Health Impact of environmental tobacco smoke in the home. *Reviews on Environmental Health*, 19, 291-309.
- Sadiq, R., Bhalli, J. A., Yan, J., Woodruff, R. S., Pearce, M. G., Li, Y., Mustafa, T., Watanabe, F., Pack, L. M., Biris, A. S., Khan, Q. M., and Chen, T. (2012). Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutation Research*, 745, 65-72.
- Sakai, N., Matsui, Y., Nakayama, A., Tsuda, A., and Yoneda, M. (2011). Functional dependent and size-dependent uptake of nanoparticles in PC12. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 1-10.
- Salawu, A., Wright, K., Al-Kathiri, A., Wyld, L., Reed, M., and Sisley, K. (2018). Sister Chromatid Exchange and Genomic Instability in Soft Tissue Sarcomas: Potential Implications for Response to DNA-Damaging Treatments. *Hindawi*, 2018, 1-8.

- Saqui, Q., Al-Khedhairi, A. A., Siddiqui, M. A., Abou-Tarboush, F. M., Azam, A., and Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in vitro*, 26, 351-361.
- Satoh, T., Yamamoto, K., Miura, K. F., and Sofuni, T. (2004). Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells. *Cytogenetic and Genome Research*, 104, 289-294.
- Sayed, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J. M., Moore, V. C., Doyle, C. D., West, J. L., Billups, W. E., Ausman, K. D., and Colvin, V. L. (2006). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicology Letters*, 161, 135-42.
- Sayiner, Ö., ve Çomoğlu, T. (2016). Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40, 62-79.
- Schulz, M., Ma-Hock, L., Brill, S., Strauss, V., Treumann, S., Gröters, S., Ravenzwaay, B., ve Landsiedel, R. (2012). Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. *Mutation Research*, 745, 51-57.
- Seager, A. L. Shah, U. K., Brüsehafer, K., Wills, J., Manshian, B., Chapman, K. E., Thomas, A. D., Scott, A. D., Doherty, A. T., Doak, S. H., Johnson, G. E., ve Jenkins, G. J. S. (2013). Recommendations, evaluation and validation of a semi-automated, fluorescent-based scoring protocol for micronucleus testing in human cells. *Mutagenesis*, 29, 155-164.
- Seaton, A., and Donaldson, K. (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think Small. *The Lancet*, 365, 923-927.
- Seiffert, J., Hussain, F., Wiegman, C., Li, F., Bey, L., Baker, W., Porter, A., Ryan, M.P., Chang, Y., Gow, A., Zhang, J., Zhu, J., Tetley, T. D., and Chung, K. F. (2015). Pulmonary Toxicity of Instilled Silver Nanoparticles: Influence of Size, Coating and Rat Strain. *PLOS ONE*, 10, 1-17.
- Shukla, R. K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A. K., Singh, S., and Dhawan, A. (2013). TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*, 7, 48-60.
- Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., and Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology In Vitro*, 25, 231-241.
- Shvedova, A. A., Castranova, V., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Murray, A. R., Gandelsman, V. Z., Maynard, A., and Baron, P. (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology Environmental, Health Part A*, 66, 1909-1926.
- Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., Taylor, J., and Nino J. C. (2006). Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems. *Journal of the American Ceramic Society*, 89, 395-407.

- Sipahi, H., Palabıyık, Ş. S., Balcı, S., ve Şahin, G. (2015). Alüminyum Toksisitesi ve Nörodejeneratif Hastalıklardaki Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology*, 10, 6-14.
- Smith, M. A., Michael, R., Aravindan, R. G., Dash, S., Shah, S. I., Galileo, D. S., and Martin-DeLeon, P. A. (2015). Anatase titanium dioxide nanoparticles in mice: evidence for induced structural and functional sperm defects after short-, but not long-, term exposure. *Asian Journal of Andrology*, 2, 261-268.
- Soto, K. F., Carrasco, A., Powell, T. G., Garza, K. M., and Murr, L. E. (2005). Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 145-169.
- Speit, G., and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70, 126-129.
- Srivastava, R. K., Rahman, Q., Kashyap, M. P., Kashyap, M. P., Lohani, M., and Pant, A. B. (2011). Ameliorative effects of dimethylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. *PLOS ONE*, 6, 1-12.
- Srivastava, R. K., Rahman, Q., Kashyap, M. P., Singh, A. K., Jain, G., Jahan, S., Lohani, M., Lantow, M., and Pant, A. B. (2013). Nanotitanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human and Experimental Toxicology*, 32, 153-166.
- Sun, Y. N., Wang, C. D., Zhang, X. M., Ren, L., and Tian, X. H. (2011). Shape dependence of gold nanoparticles on *in vivo* acute toxicological effects and biodistribution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2, 1210-1216.
- Sycheva, L. P., Zhurkov, V. S., Iurchenko, V. V., Daugel-Dauge, N. O., Kovalenko, M. A., Krivtsova, E. K., and Durnev, A. D., (2011). Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutation Research*, 726, 8-14.
- Syed, S., Zubair, A., and Frieri, M. (2013). Immune response to nanomaterials: implications for medicine and literature review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13, 50-7.
- Şen, S., Beceren, A., ve Aksoy, H. (2018). Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi. *Journal of Human Sciences*, 15, 2458-9489.
- Tan, Z., Chan, Y. J. A., Chua, A. S., Karen, Y. J., Rutledge, S. D., Pavelka, N., Cimini, D., and Rancati G. (2018). Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 42-55.
- Tan, Z., Chu, D. Z. V., Chan, Y. J. A., Lu, Y. E., and Rancati, G. (2017). Mammalian Cells Undergo Endoreduplication in Response to Lactic Acidosis. *Scientific Reports*, 8, 1-10.

- Tavares, A. M., Louro, H., Antunes, S., Quarré, S., Simar, S., De Temmerman, P. J., Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K. A., Norppa, H., Nessler, F., and Silva, M. J. (2013). Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicology In Vitro*, 28, 60-69.
- Taylor, D. A. (2002). Dust in the Wind. *Environmental Health Perspectives*, 110, 80-87.
- Thomas, S., Harshita, B. S. P., Mishra, P., and Talegaonkar, S. (2015). Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 21, 6165-6188.
- Trenz, K., Rothfuss, A., Schutz, P., and Speit, G. (2002). Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutation Research*, 500, 89-96.
- Turkez, H. (2011). The role of ascorbic acid on titanium dioxide induced genetic damage assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 453-457.
- Tüylek, Z. (2018). Nanoteknolojinin çevre ve insan sağlığı üzerindeki riskleri, *Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2, 1-12.
- Uboldi, C., Urbán, P., Gilliland, D., Bajak, E., Valsami-Jones, E., Jessica Ponti, P., and François Rossi, F. (2016). Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 31, 137-145.
- Uchino, T., Ikarashi, Y., and Nishimura, T. (2011). Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. *Journal Toxicology Science*, 36, 95-100.
- Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S., Akıncı N., and Aksoy, H. (2011). Genotoxic effects of chlorophenoxy herbicide diclofop-methyl in mice *in vivo* and in human lymphocytes *in vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*, 34, 390-395.
- Üstün Alkan, F., ve Anlaş, C. (2015). Genotoksisite testleri ve genotoksik zehirler. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji*, 1, 69-74.
- Üstüner, D. (2011). Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. *Türk Bilim Araştırma Dergisi*, 4, 64-69.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27, 120-139.
- Valdiglesias, V., Costa, C., Sharma, V., Kiliç, G., Pásaro, E., Teixeira, J. P., Dhawan, A., and Laffon, B. (2013). Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 352-361.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., and Hull M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal Nanotechnology*, 6, 1769-1780.
- Vidya, P. V., George, A., and Chitra, K. C. (2017). An *in vitro* study on the induction of micronuclei and other nuclear anomalies in peripheral blood lymphocyte culture by metal oxide nanoparticles. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4, 1-8.
- Vranic, S., Shimada, Y., Ichihara, S., Kimata, M., Wu, W., Tanaka, T., Boland, S., Tran, L., and Ichihara, G. (2019). Toxicological Evaluation of SiO₂ Nanoparticles by Zebrafish Embryo Toxicity Test. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1-12.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., and Sun, J. (2007). Acute Toxicity and Biodistribution of Different Sized Titanium dioxide Particles in Mice after Oral Administration. *Toxicology Letters*, 168, 176-185.
- Wang, S. H., Lee, C. W., Chiou, A., and Wei, P. K. (2010). Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 33-45.
- Wang, S., Hunter, L. A., Arslan, Z., Wilkerson, M. G., and Wickliffe, J. K. (2011). Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52, 614-622.
- Wang, X., Li, T., Su, X., Li, J., Li, W., Gan, J., Wu, T., Kong, L., Zhang, T., Tang, M., and Xue, Y. (2019). Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *Applied Toxicology*, 6, 908-918.
- Wang, Y., Aker, W. G., Hwang, H. M., Yedjou, C. G., Yu, H., and Tchounwou, P. B. (2011). A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*, 409, 4753-4762.
- Warheit, D. B., Brock, W. J., Lee, K. P., Webb, T. R., and Reed, K. L. (2005). Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicological Sciences*, 88, 514-524.
- Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. A., and Webb, T. R., (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences*, 77, 117-125.

- Warheit, D. B., Webb, T. R., Sayes, C. M., Colvin, V. L., and Reed, K. L. (2006). Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity Is not Dependent upon Particle Size and Surface Area. *Toxicological Sciences*, 91, 227-236.
- Woodruff, R. S., Li, Y., Yan, J., Yvonne Jones M., Watanabe, F., Biris, A. S., Rice, P., Zhou, T., and Chen, T. (2012). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 934-943.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., ve Nel, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2, 2121-2134.
- Xie, H., Mason, M. M., and Wise Sr, JP. (2011). Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health*, 26, 251-319.
- Xu, J., Futakuchi, M., Iigo, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Shimizu, H., Sakai, Y., Tamano, S., Furukawa, F., Uchino, T., Tokunaga, H., Nishimura, T., Hirose, A., Kanno, J., and Tsuda, H. (2010). Involvement of macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP1alpha) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*, 31, 927-935.
- Xu, J., Shi, H., Ruth, M., Yu, H., Lazar, L., Zou, B., Yang, C., Wu, A., and Zhao, J. (2013). Acute toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in mice. *PLOS ONE*, 8, 1-6.
- Xu, X., Lai, L. Zeng, T., Yu, Y., He, Z., Chen, J., and Song, S. (2018). In Situ Formation of Pyridine-Type Carbonitrides-Modified Disorder-Engineered C-TiO₂ Used for Enhanced Visible-Light-Driven Photocatalytic Hydrogen Evolution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 122, 18870–18879.
- Yamakoshi, Y., Umezawa, N., Ryu, A., Arakane, K., Miyata, N., Goda, Y., Masumizu, T., ve Nagano, T. (2003). Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 12803-12809.
- Yen, H. J., Hsu, S. H., and Tsai, C.L. (2009). Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 13, 1553-1561.
- Yıldırım, I. H., Yesilada, E., and Yologlu, S. (2006). Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Russian Journal of Genetics*, 42, 573-577.
- Yılmaz, S., Unal, F., Yuzbasioglu, D., and Gonenc, I. M. (2015). Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays by clomiphene citrate in human lymphocytes. *Human and Experimental Toxicology*, 34, 284-288.
- Yılmaz, S., Unal, F., Yüzbasioglu D., and Çelik, M. (2014a). DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 30, 926-937.

- Yılmaz, S., Ünal, F., and Yüzbaşıoğlu, D. (2009). The in vitro genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 60, 55-61.
- Yılmaz, S., Ünal, F., Yılmaz, E., Yuzbasioglu, D., and Erkal Ilhan, S. (2014b). Evaluation of the genotoxicity of clomiphene citrate. *Mutation Research*, 759, 21-27.
- Yılmaz, F., Yakar, Y., Çakır, B., and Özmen, A. (2017). Küresel kuantum nokta yapının elektronik yapısı ve bağlanma enerjisi. *Aksaray University Journal of Science and Engineering*, 1, 41-52.
- Yin, J. J., Liu, J., Ehrenshaft, M., Roberts, J. E., Fu, P. P., Mason, R. P., ve Zhao, B. (2012). Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263, 81-88.
- Yu, X., Hong, F., and Zhang, Y. Q. (2016). Bioeffect of Nanoparticles in the Cardiovascular System. *Journal of Biomedical Materials Research*, 104, 2881-2897.
- Yüzbaşıoğlu, D., Avuloğlu Yılmaz, E., ve Unal, F. (2016). Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *Türk Bilim Araştırma Vakfı*, 1, 17-28.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Enguzel-Alperen, C., and Ünal, F. (2018). Investigation of *in vitro* genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 235-241.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., and Çelik, M. (2008). Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research*, 649, 155-160.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., ve Unal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39, 179-186.
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., and Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 763-769.
- Zhu, X., Hondroulis, E., Liu, W., and Li, C. Z. (2013). Biosensing approaches for rapid genotoxicity and cytotoxicity assays upon nanomaterial exposure. *Small*, 9, 1821-1830.
- Zirak, R. G., Lotfi, A., and Moghadam, M. S. (2016). Effects of the interaction of nanoanatase TiO₂ with bleomycin sulfate on chromosomal abnormalities *in vivo*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4, 1094-1108.
- Zorlu, T. (2016). *Farklı dozlardaki Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülünün Galleria Mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) 'nın biyolojisine ve enzim sistemine etkisi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, İstanbul, 1-19.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DURAN, İrem Funda
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 12.04.1988, İzmir
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (553) 411 74 47
 e-mail : iremmfunda@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi	Devam Ediyor
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2009
Lise	İhsaniye Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-halen	Ankara Çalışma ve İş Kurumu	İş ve Meslek Danışmanı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Duran, İ. F., Yüzbaşıoğlu, D. and Ünal, F. (2018, 26-27 April). *Genotoxic Effect of Pedot Coated Rod TiO₂ Nanoparticles by Sister Chromatid Exchange in Human Lymphocytes*. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018) Ankara/Turkey,.
2. Duran, İ. F., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2017, 11-13 October). *In vitro Genotoxic Effect of Rod TiO₂ Nanoparticles by Sister Chromatid Exchange on Human Lymphocytes*. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS), Ankara/Turkey.

Hobiler

Sudoku, seyahat etmek, kitap okumak, fotoğraf çekmek.



GAZİ GELECEKTİR...