



**DEMİR OKSİT (Fe₂O₃) NANOPARTİKÜLLERİNİN *ALLIUM CEPA*'DAKİ
GENOTOKSİK ETKİSİ**

Derya KIZILKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2021

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.

Derya KIZILKAYA

14/07/2021

DEMİR OKSİT (Fe₂O₃) NANOPARTİKÜLLERİNİN *ALLIUM CEPA*'DAKİ
GENOTOKSİK ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Derya KIZILKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2021

ÖZET

Demir oksit (Fe₂O₃) nanopartikülleri (NP) fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı oldukları ve çevresel olarak güvenilir kabul edildikleri için özellikle klinik uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sahip oldukları özellikler nedeniyle manyetik rezonans görüntülemeye (MRG) kontrast ajan olarak, hücre ayrıştırılmasında ve algılanmasında, hipertermi tedavisinde ve ilaç taşınmasında yaygın kullanım alanı bulmaya başlayan önemli partiküllerdir. Ayrıca güneş koruyucularında, kozmetik, elektrikli ev aletlerinde, gıda ürünlerinde, savunma ve tarımda da kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda yapılan bazı araştırmalar Fe₂O₃ NP'lerinin toksik ve özellikle genotoksik olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, indikatör bir organizma olan *Allium cepa* L. kullanılarak Fe₂O₃ nanopartiküllerinin (NP) ve mikropartiküllerinin (MP) genotoksik etkilerini *Allium* ve komet testi ile incelemektir. Bu amaçla, *Allium cepa* L. kök uçları, Fe₂O₃ NP ve MP'lerin 125, 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiştir. Fe₂O₃'in hem nanopartikül ve hem de mikropartiküllerinin bütün konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada, negatif kontrole kıyasla mitotik indekste anlamlı düşüşlere sebep olmuştur. Buna göre, Fe₂O₃'in NP ve MP formu benzer sitotoksik etkiler göstermiştir. Fe₂O₃ NP'leri, *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik anormalliklerin frekansını tüm uygulama sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. Fe₂O₃ NP'leri ve MP'leri, yapısı bozulmuş profaz, C-metafaz, yapışıklık, kromozom köprüsü ve yıldız anafaz gibi çeşitli mitotik anormallikler oluşturmuştur. Bu sonuçlar, Fe₂O₃'in NP'lerinin MP'lere kıyasla daha genotoksik ve klastojenik olduğunu göstermektedir. Comet testinde, Fe₂O₃'in NP ve MP formu, bazı uygulamalarda DNA hasarını artırmıştır. Burada, MP'ler NP'lere kıyasla daha toksik etki göstermiştir. Bütün bu sonuçlar, her iki partikülün sitotoksik, genotoksik ve klastojenik olduğunu ve ayrıca DNA'da hasarlara sebep olabileceğini göstermektedir. Kısaca bu veriler, bu partiküllerden daha fazla yararlanabilmemiz için, Fe₂O₃'in özellikle NP formunun farklı organizmalar ve test sistemleri kullanılarak daha detaylı şekilde incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : Fe₂O₃ nanopartikül, Fe₂O₃ mikropartikül, *allium* testi, *Allium cepa* L., genotoksisite
Sayfa Adedi : 96
Danışman : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

GENOTOXIC EFFECT OF IRON OXIDE (Fe₂O₃) NANOPARTICLES ON *ALLIUM*

CEPA

(M. Sc. Thesis)

Derya KIZILKAYA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2021

ABSTRACT

Iron oxide (Fe₂O₃) nanoparticles (NP) are widely used, especially in clinical applications, as they are physically and chemically stable and considered environmentally safe. Due to their properties, they are important particles that have begun to find widespread use as a contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI), in cell differentiation and detection, in the treatment of hyperthermia and in drug delivery. They are also used in sunscreens, cosmetics, electrical appliances, food products, defense and agriculture. Recent studies show that Fe₂O₃ NPs can be toxic and especially genotoxic in some species and test systems. Therefore, the aim of this study was to examine the genotoxic effects of Fe₂O₃ nanoparticles and microparticles (MP) using *Allium cepa* L. root tip cells, an indicator organism, by Allium and comet tests. Allium test was applied by treating *Allium cepa* L. root tips with 125, 250, 500 and 750 µg/mL concentrations of Fe₂O₃ NPs and MPs for 24, 48, and 72 hours. All the concentrations of both the nanoparticles and microparticles of Fe₂O₃ caused a decrease in the mitotic index compared to the negative control at 24, 48, and 72 h. These results reveal that both the NPs and MPs of Fe₂O₃ have nearly similar cytotoxic effects. Both the nanoparticles and microparticles of Fe₂O₃ increased the frequency of mitotic aberrations in *Allium cepa* L. root tip cells compared to their respective negative controls at all the treatment periods and concentrations. Fe₂O₃ NPs and MPs induced the formation of irregular prophase, C-metaphase, stickiness, bridge and star anaphase. In the comet assay, increased DNA damage was determined in some treatments of the both NPs and MPs of Fe₂O₃ in *A. cepa* L. root tip cells. On the other hand, genotoxic and clastogenic effects of Fe₂O₃ NPs were much higher than those of the Fe₂O₃ MPs. On the other hand, in the comet assay, MPs were more toxic than NPs. Taken together, this research revealed the cytotoxic, genotoxic and DNA damaging effect of both of the particles. All these results show that genotoxic potential of especially Fe₂O₃ NPs need to be further investigated by using different organisms and test systems for the safe usage of these particles.

Science Code : 20316

Key Words : Fe₂O₃ nanoparticles, Fe₂O₃ microparticles, allium test, *Allium cepa* L., genotoxicity

Page Number : 96

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel tecrübe ve bilgisi ile beni yönlendiren, desteğini hiçbir konuda esirgemeyen, bu süreçteki her aşamada bana hoşgörü ile yaklaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımda bilgi ve görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bu çalışmada kullandığım nanopartiküllerin karakterizasyon işlemlerindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL'a ve Arş. Gör. Gökçe ÇALIŞ İSMETOĞLU'na, Elektron mikroskobu çalışmalarında katkı sağlayan Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye çok teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda emeği olan ve bana bu süreçte her daim yol arkadaşlığı yapan Busenaz TUNCAY'a ayrıca teşekkür ederim. Varlıkları ile yanımda olduklarını hissettiğim, hedeflerime ve hayallerime her zaman saygı duyup beni destekleyen değerli annem Zekiye KIZILKAYA'ya, babam Oktay KIZILKAYA'ya, ablam Duygu KIZILKAYA'ya ve kardeşim Doğukan KIZILKAYA'ya teşekkür ederim. Güzel enerjileri ile hep yanımda olan yakın arkadaşlarım Havva DEMİR'e, Esra SARI'ya, Sümeyye NUR ALTINAY'a ve Reyhan GÜNCAN'a teşekkür ederim.

Bu tez 05/2019-27 nolu BAP projesi ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine teşekkür ederim.

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.....	3
2. 1. Nanopartiküller ve Nanoteknoloji.....	3
2.2. Nanopartiküllerin Biyosfer ile Etkileşimi	6
2.3. Nanopartiküllerin Bitkiler ile Etkileşimi	8
2.3.1. Nanopartiküllerin bitki sistemlerine alımı, translokasyonu ve birikimi ..	8
2.4. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri	11
2.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri	13
2.6. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	16
2.6.1. Metal oksit nanopartikülleri.....	16
2.7. Genetik Toksisite Testleri	19
2.7.1. Bakterilerde geri mutasyon (Ames) testi	20
2.7.2. Kromozomal anormallik testi	21
2.7.3. Mikronükleus testi	22
2.7.4. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi.....	23

	Sayfa
2.7.5. Comet (tek hücreli jel elektroforez) testi	23
2.7.6. <i>Allium</i> testi	24
3. MATERİYAL VE METOT.....	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Bitki materyali	27
3.1.2. Kullanılan test materyalleri ve diğer kimyasallar	27
3.2. Metot	28
3.2.1. Test materyallerinin karakterizasyonu.....	28
3.2.2. Test materyallerin hazırlanması.....	29
3.2.3. Test materyallerinin <i>Allium cepa</i> L.'ya uygulanması.....	30
3.3. Preparatların hazırlanması.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	35
4.1.2. Geçirimli elektron mikroskobu analizleri	35
4.1.3. Dinamik ışık saçılımı analizi	36
4.2. Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da Mitotik İndeks Üzerine Etkileri	38
4.3. Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da Mitotik Anormallikler Üzerine Etkileri	43
4.4. Demir Oksit (Fe ₂ O ₃) Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin DNA Hasarına Etkisi-Comet Testi Sonuçları	50
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	95

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Test materyallerinin TEM karakterizasyonu	36
Çizelge 4.2. Fe ₂ O ₃ nanopartikül ve mikropartiküllerinin yoğunlukları, hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri	38
Çizelge 4.3. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L. da mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks üzerine etkisi	40
Çizelge 4.4. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L. da mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks üzerine etkisi	41
Çizelge 4.5. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L. da farklı fazlardaki mitotik anormallikler ve frekansları üzerine etkisi	45
Çizelge 4.6. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L. da farklı fazlardaki mitotik anormallikler ve frekansları üzerine etkisi	45
Çizelge 4.7. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da oluşturduğu DNA hasarı- Comet testi sonuçları	52
Çizelge 4.8. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da oluşturduğu DNA hasarı- Comet testi sonuçları.....	52
Çizelge 6.1. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> kök hücrelerindeki genotoksik etkileri.....	76
Çizelge 6.2. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> kök hücrelerindeki genotoksik etkileri.....	77

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kategorilerine göre nanoteknolojik tüketici ürünleri ve oranları	4
Şekil 2.2. Nanoteknoloji alanında en yaygın kullanılan nanopartiküller	5
Şekil 2.3. Nanopartiküllerin bitki sistemlerine olası giriş noktalarının şematik gösterimi.	10
Şekil 4.1. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin hidrodinamik çapının frekans eğrisi.....	37
Şekil 4.2. Fe ₂ O ₃ NP'lerinin hidrodinamik çapının bar grafiği	37
Şekil 4.3. Fe ₂ O ₃ MP'lerinin hidrodinamik çapının frekans eğrisi.....	37
Şekil 4.4. Fe ₂ O ₃ MP'lerinin hidrodinamik çapının bar grafiği.....	38
Şekil 4.5. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 24 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L.'da mitotik indeks üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 48 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L.'da mitotik indeks üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.7. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 72 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L.'da mitotik indeks üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.8. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 24 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L. 'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi	46
Şekil 4.9. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 48 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L.'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi	46
Şekil 4.10. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 72 saatlik uygulamalarının <i>Allium cepa</i> L.'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi.....	47

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'ya uygulamasından örnekler.....	30
Resim 3.2. <i>Allium cepa</i> L. kök uçlarından preparatların hazırlanması.....	32
Resim 3.3. Comet testinin aşamaları.....	34
Resim 4.1 Fe ₂ O ₃ NP'lerinin TEM görüntüsü.....	35
Resim 4.2. Fe ₂ O ₃ MP'lerinin TEM görüntüsü.....	36
Resim 4.3. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da profazda meydana getirdiği anormallikler.	47
Resim 4.4. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da metafazda meydana getirdiği anormallikler.	48
Resim 4.5. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da anafaz-telofazda meydana getirdiği anormallikler.....	48
Resim 4.6. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da profazda meydana getirdiği anormallikler.	49
Resim 4.7. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da metafazda meydana getirdiği anormallikler.	49
Resim 4.8. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da anafaz-telofazda meydana getirdiği anormallikler.....	50
Resim 4.9. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da oluşturduğu DNA hasarının comet testi ile görünümü.....	53
Resim 4.10. Fe ₂ O ₃ mikropartiküllerinin <i>Allium cepa</i> L.'da oluşturduğu DNA hasarının comet testi ile görünümü.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mA	Miliamper
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
nm	Nanometre
V	Volt

Kısaltmalar

Açıklamalar

Ag	Gümüş
Au	Altın
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
A549	Akciğer kanser hücre hattı
CNT	Karbon Nanotüpleri
CuO	Bakır oksit
Fe ₂ O ₃	Demir oksit
Fe ₂ O ₄	Manyetit
DNA	Deoksiribonükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KA	Kromozomal anormallik
MDA	Malondialdehit
MgO	Magnezyum oksit
Mİ	Mitotik indeks
Kısaltmalar	Açıklamalar

MN	Mikroçekirdek
MWCNT	Çok katmanlı karbon nanotüpleri
OH	Hidroksil
ROT	Reaktif oksijen türleri
SiO₂	Silikon dioksit
SOD	Süperoksit dismutaz
SWCNT	Tek katmanlı karbon nanotüpleri
TEM	Taramalı elektron mikroskobu
TiO₂	Titanyum dioksit
Zn	Çinko
ZnO	Çinko oksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, materyalleri nanometre düzeyinde sentezleyen, dizayn eden ve bunların uygulamasını kapsayan, tıp, biyoloji, fizik, kimya ve mühendislik gibi birçok konuyu içine alan, interdisipliner ve multidisipliner bir bilim alanıdır. Bu alana ilgi her geçen gün artış göstermektedir. Çünkü hayatımızın her alanında yer bulmaya başlayan bu teknoloji, 21. yüzyılın da en önemli rekabet alanlarından birisini oluşturacaktır. Bu nedenle özellikle gelişmiş ülkeler bu alanda büyük yatırımlar yapmaktadır. Nanoteknoloji, başta sağlık ve çevresel uygulamalarda olmak üzere, kişisel bakım ürünleri, endüstri, elektronik, optik, iletişim, enerji, askeri alanlar, tarım ve gıda sektörü gibi daha pek çok alanda kullanılmaktadır (Yang, Wang, Mettenbrink, DeAngelis ve Wilhelm, 2020).

Nanoteknolojide kullanılan ve metrenin milyarda birini ifade eden nanometre boyutlarındaki nanomalzemeler (NM) ve/veya nanopartiküller (NP), çok çok küçük yapıları nedeniyle, mikron ebatlı partiküllere kıyasla çok daha farklı fiziksel, kimyasal, elektrik ve optik özelliklere sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle birçok alanda tercih edilmeye başlanan nanopartiküller, hacimlerine kıyasla çok büyük bir yüzey alanına, yüksek hücresel penetrasyon yeteneğine ve önemli katalitik aktivitelere sahip olduklarından, mikron ebatlı partiküllere kıyasla çok daha toksik etkiler gösterebilmektedir (Kargozar ve Mozafari, 2018).

Metal oksit grubundan biri olan demir oksit (Fe_2O_3) nanopartikülleri, fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı oldukları ve çevresel açıdan güvenilir kabul edildikleri için başta sağlık alanında hipertermi tedavisinde, magnetik rezonans görüntülemeye, ilaç ve gen taşınmasında, hücre ayrıştırılması ve algılanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik ve gıda ürünlerinde, güneş koruyucularında, doku tamirinde, immünoassay çalışmalarında, elektrikli ev aletleri, savunma sanayi ve tarımda da kullanım alanları mevcuttur. Bu nanopartiküller yarı iletken veya termoelektrik malzeme olarak ve çevre dekontaminasyon uygulamalarında da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, son yıllarda yapılan bazı genetik araştırmalarda, Fe_2O_3 NP'lerinin toksik ve özellikle genotoksik olabileceğine yönelik sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Her geçen gün nanopartiküllere maruziyetin arttığı, diğer yandan da bu maruziyetin genotoksik riskler taşıyabileceğine yönelik verilerin elde edilmeye başlanması, bilim insanlarını, bu partiküllerin genotoksik etkilerinin incelenmesine yönlendirmektedir. Bu nedenle son yıllarda çeşitli

nanopartiküllerin ve özellikle metal oksit nanopartiküllerinin genotoksik etkileri konusunda detaylı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (Seabra ve Duran, 2015).

Ekzojen maddelerin genotoksik riskleri çeşitli prokaryotlarda, bitki ve hayvan türlerinde, çeşitli primer hücreler veya hücre hatları ve farklı genetik toksisite testleri kullanılarak incelenmektedir. Allium testi, hızlı, kolay, ucuz, hassas ve güvenilir olması, az sayıda ve büyük kromozomlara sahip olması, diğer ökaryotik sistemlerdekine benzer sonuçlar göstermesi, deneylerde hayvan kullanımını azaltması ve etik izinlere ihtiyaç göstermemesi gibi avantajları nedeniyle tercih edilen bir *in vivo* test yöntemidir (Banti ve diğerleri, 2019). Comet testi de yine hızlı, ucuz ve hassas bir test olması ve genetik hasarları DNA düzeyinde gösteriyor olması nedeniyle son yıllarda çokça tercih edilen bir test yöntemidir (Mamur , Ünal, Yılmaz, Erikel ve Yüzbaşıoğlu, 2020).

Bir yandan her geçen gün nanopartiküllerin kullanım düzeyindeki artışlar, diğer yandan bu partiküllere maruziyetin giderek artış göstermesi, ayrıca bu maruziyetin genotoksik riskler oluşturduğunun belirlenmeye başlanması gibi nedenler dikkate alınarak, bu tez çalışması, çok geniş alanlarda kullanılmaya başlanan Fe₂O₃ nanopartiküllerinin genotoksik etkilerinin *Allium cepa* L'da mitotoik indeks ve mitotik anormallik testi ve ayrıca comet testi kullanılarak incelenmesi amacıyla planlanmıştır. Nanopartikül formu ile karşılaştırabilmek için Fe₂O₃'in mikropartikül formu da kullanılmıştır. Bu çalışma, Fe₂O₃'in bu ebattaki nano ve mikropartiküllerinin, aynı konsantrasyonlarının, aynı uygulama sürelerindeki etkisinin karşılaştırmalı olarak Allium testi ve comet testi ile inceleneceği ilk araştırma niteliğindedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler, bir yandan Fe₂O₃'in nano ve mikropartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkisi konusunda yeni veriler sağlarken, diğer yandan bu partiküllerden en az zararla yararlanmamız için neler yapılabileceği konusunda gerekli kurum ve kuruluşlara da yeni veriler sağlayacaktır. Böylece, nanoteknolojide çokça kullanılan bu partiküllerden en az zararla daha fazla yararlanma imkanı sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Nanopartiküller ve Nanoteknoloji

Nanopartiküller, şekil, boyut ve kimyasal özelliklerine göre farklı gruplandırılabilen, en az bir boyutu 100 nanometre (nm)'nin altında olan malzemelerdir (Khan, Saeed ve Khan, 2019). Nanometre terimi metrenin milyarda biri olarak ifade edilmektedir (Sahoo, Parveen ve Panda, 2007).

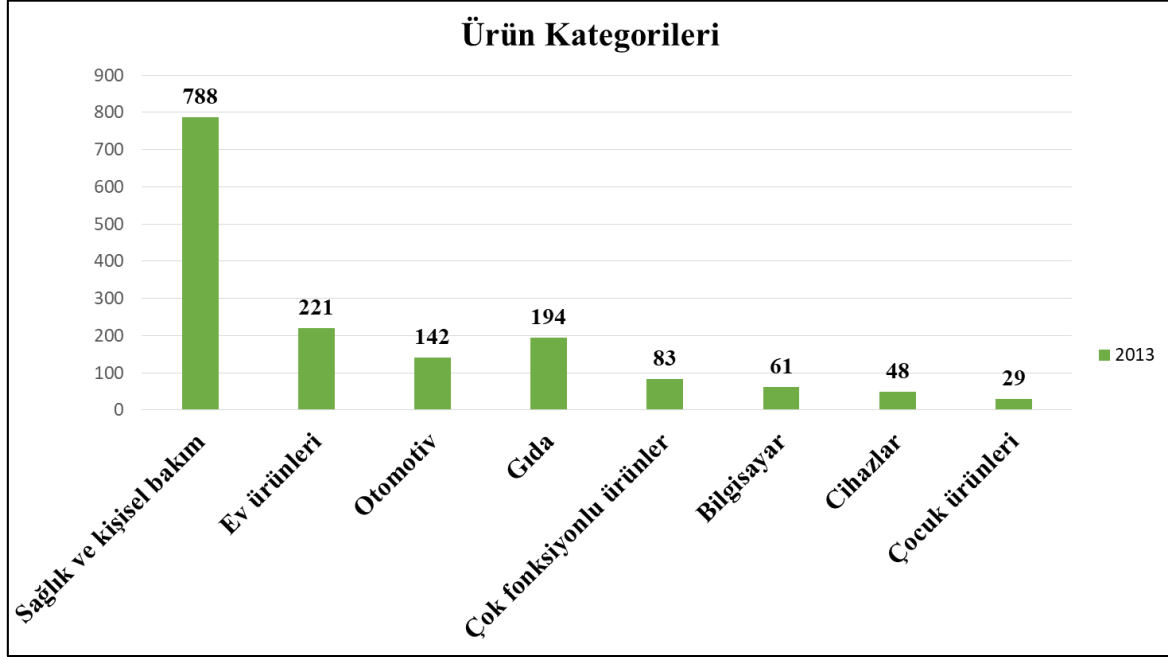
Nanoteknoloji, en az bir boyutu yaklaşık 1-100 nm olan malzemeler kullanarak atomik, moleküler veya makromoleküler düzeylerde araştırma ve teknoloji geliştirme olarak tanımlanır. Nanoteknoloji alanında kullanılan nanomalzemeler (NM)/nanopartiküller (NP) üç farklı şekilde oluşabilir. Bunlardan birincisi virüsler veya volkanik patlamalar gibi doğal süreçlerle oluşan nanopartiküller, ikincisi egzoz gazları vb. ürünlerin havaya salınması sonucunda tesadüfen oluşan nanopartiküller, üçüncüsü ise "özel olarak üretilmiş nanopartiküller" ya da kısaca endüstriyel nanopartiküllerdir (Tarafdar, Sharma ve Raliya, 2013).

Nanopartiküller, mikron ebatlı partiküllerine kıyasla çok spesifik fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler göstermektedir. Bu durum, nanopartiküllerin hacimlerine oranla çok yüksek yüzey alanlarına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu da nanopartiküllerin kimyasal olaylardaki reaktivitesini, stabilitesini, mekanik gücünü, optik vb. daha pek çok özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle nanopartiküller çok farklı alanlarda kullanılmaktadır (Khan ve diğerleri, 2019).

Nanoteknolojideki gelişmeler ve ayrıca çok farklı tipte nanopartiküllerin üretililebiliyor olması nedeni ile son yıllarda başta sağlık alanında olmak üzere, ilaç, gıda, kozmetik, teknoloji, elektronik, tekstil, enerji sektörü, tarım, askeri alanlar ve endüstriyel uygulama alanları gibi çok çeşitli alanlarda geniş ve dikkate değer uygulamalar gerçekleştirilmiş olup, bu üstün teknoloji ve partiküller, insan yaşamı üzerinde derin etkisi olan heyecan verici yeni bir alan oluşturmuştur (Mishra, Keswani, Abhilash, Fraceto ve Singh, 2017).

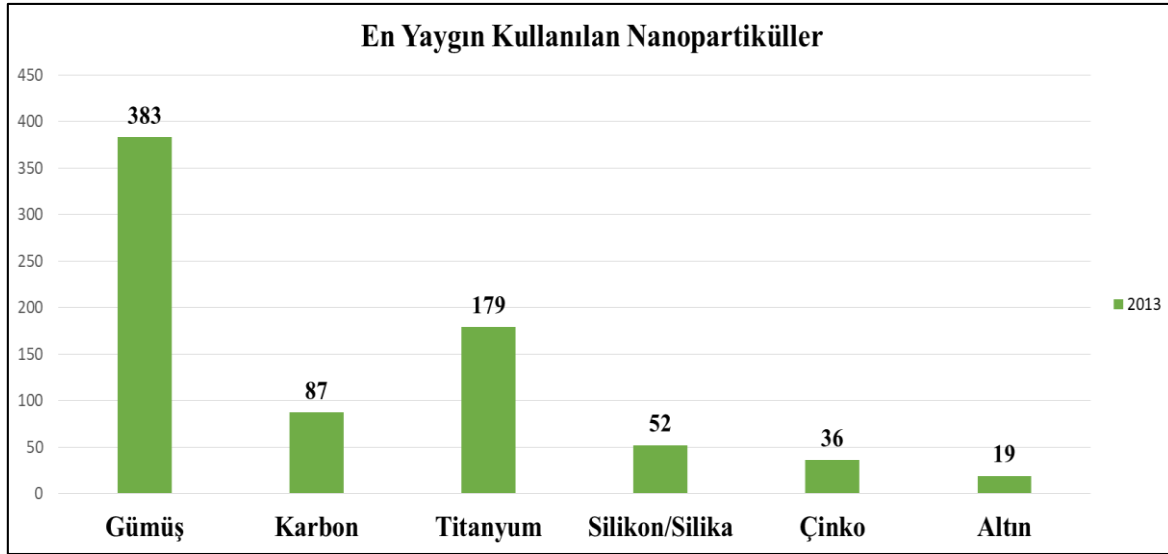
Nanoteknoloji bazlı ürünler en fazla Amerika Birleşik Devletleri tarafından üretilmekte olup, ardından sırası ile Güney Kore, Almanya, Japonya, Fransa ve Rusya federasyonu gelmektedir (Çalıpınar ve Ulaş, 2019).

Ekim 2013 itibariyle, nanoteknoloji tüketici ürünleri envanteri 1.628 ürün veya ürün grubunu içermektedir. En büyük ana kategori, toplam 788 ürünle sağlık ve kişisel bakım ürünleri oluşturmaktadır. Güneş kremleri, kozmetik ve spor malzemeleri de bu kategoriye dahildir (Şekil 2.1).



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

En yaygın kullanılan nanomalzemelerin sırasıyla gümüş (383 ürün), titanyum dioksit içeren titanyum (179 ürün) ve fullerenleri içeren karbon (87 ürün) olduğu, ardından silika (52 ürün), çinko (çinko oksit dahil) (36 ürün) ve altın (19 ürün) türevi materyallerin geldiği belirtilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Nanoteknoloji alanında en yaygın kullanılan nanopartiküller (<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>)

Nanoteknoloji ile birlikte, günlük hayatımızda, çok farklı alanlarda, oldukça çeşitli nanopartiküller kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, titanyum dioksit ve çinko oksit gibi nanopartiküller kozmetik, güneş kremi, diş macunu, yüzey kaplama ve gıda katkı maddelerinde kullanılırken, gümüş nanopartikülleri gıda ambalajlarında, giysilerde, dezenfektanlarda, ev aletlerinde ve su arıtma sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Karbon nanotüpler ise güneş panellerinde kullanım alanı bulan malzemelerdir (Patil ve diğerleri, 2016).

Nanopartiküller farklı şekillerde, büyüklüklerde ve yapılarda kolayca üretilabilmektedir. Küresel, kübik, silindirik, spiral, düz, çubuk benzeri veya şekilsiz üretilabildikleri gibi, çok yüzlü, boşluklu, çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç gibi farklı morfolojik özelliklere sahip, kristal veya amorf yapıda, metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bu maddelerin karışımından istenilen özelliklere sahip olacak şekilde oldukça geniş bir aralıkta üretilabilmektedirler (Gürmen ve Ebin, 2008; Ealia, ve Saravanakumar, 2017; Kinnear ve diğerleri, 2017). Nanopartiküller çeşitli maddeler ile kaplanarak da üretilabilmekte ve kullanılmaktadır. Yüzey kaplama türleri, NP'lerin özellikle biyoyumumluluklarını ve aglomerasyona karşı kararlılıklarını olumlu yönde etkilemektedir. Proteinler veya biyolojik olarak uyumlu yüzey aktif maddeler, biyomedikal uygulamalarda nanopartiküllerin topaklaşmasını önleyebilen, arzu edilen bir bariyer görevi görürler (Jurasin ve diğerleri, 2016).

Nano yapıdaki malzemeler çevresel sorunların ortadan kaldırılması ve çevresel kirleticilerin etkisinin azaltılmasında da kullanılmaktadır. Civa, kurşun, kadmiyum ve arsenik gibi ağır metallerin doğal sulardan uzaklaştırılması, çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Özellikle süperparamanyetik demir oksit NP'leri, emici özellikte olduklarından dolayı bu toksik metalleri sulardan uzaklaştırabilmektedir (Khan ve diğerleri, 2017).

Fosil yakıtların yenilenemez doğası nedeniyle, bilim insanları, kolayca bulunabilen kaynaklardan, ucuz maliyetle, yenilenebilir enerjiler üretmek için araştırma stratejilerini değiştirmektedir. Yapılan araştırmalarda, nanopartiküllerin geniş yüzey alanları, optik davranışları ve katalitik yapıları nedeniyle bu amaç için en iyi aday oldukları belirlenmiştir. Özellikle fotokatalitik uygulamalarda, nanopartiküller, fotoelektrokimyasal ve elektrokimyasal olarak suyu ayrıştırmak suretiyle enerji üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller ayrıca enerjiyi nano ölçekte farklı formlara ayırmak için enerji depolama uygulamalarında da kullanılır. Son yıllarda, enerji üretmek için alışılmadık bir yaklaşım olan piezoelektrik kullanarak mekanik enerjiyi elektriğe dönüştürebilen nanogeneratörler üretilmiştir (Khan ve diğerleri, 2017). Bütün bunlar, nanopartiküllerin ne kadar farklı alanlarda, ne kadar çok amaç için kullanıldığını gösteren sadece birkaç örnektir.

2.2. Nanopartiküllerin Biyosfer ile Etkileşimi

Nanopartiküller eşsiz elektronik, optik, termal ve fotoaktif özelliklere sahip oldukları için çok farklı alanlardaki uygulamalarda çok sayıda ürün için ideal adaylardır. Nanoteknolojideki gelişmelere paralel olarak ve ayrıca bu tür malzemelere olan talebin artması ile birlikte market raflarına ve evlerimize kadar ulaşan nanopartiküller, başta insanlar olmak üzere, diğer canlılara ve biyosferin her alanına ulaşabilmektedir. Bir yandan nanopartiküllerin üretimi artarken, diğer yandan bunların çevreye salınımı da artış göstermektedir. Bu partiküller biyosfere ulaştıktan sonra, öngörülemez bir şekilde insanlarla ve diğer organizmalarla etkileşime girebilir. Nanopartiküller çevreye ya doğrudan (örneğin, kasıtsız salınım nedeniyle ya da iyileştirme amacıyla) ya da dolaylı olarak atık yakma tesisleri, kanalizasyon arıtma tesisleri ve çöplükler yoluyla girebilmektedir (Petosa ve diğerleri, 2010).

Nanopartiküller, toprağı kirlenme, yüzey ve yeraltı sularına ulaşma ve biyota ile etkileşime girebilme potansiyeline sahiptir. Katı atıklarda, atık su verimlerinde veya doğrudan

deşarjlarda bulunan bu partiküller, rüzgar veya yağmur suyu akışıyla birlikte sulu sistemlere taşınabilir. Çevresel salınım için en büyük riskler, üretilen NP'lerin üretim tesislerinden diğer üretim alanlarına taşınması sırasında meydana gelen dökülmelerden, çevresel uygulamalar için bilerek salınımlardan ve genel kullanımdan dolayı aşınma ve erozyonla bağlantılı difüzör salımlarından kaynaklanmaktadır. Karbon nanotüpler ve metal oksitler en fazla üretilen nanomalzemeler olduğu için, bu malzemelerin çevreye salınımı ile ilgili çok fazla araştırma yapılmaktadır (Klaine ve diğerleri, 2008).

Nanopartiküller atmosferde bulunan başka partiküllere kolaylıkla bağlanarak, boyutlarını artırır ve özelliklerini değiştirir. Bunun sonucunda atmosferde aşırı bir yoğunluk göstererek ısınma ve soğutma etkileriyle küresel iklim değişikliğini ciddi şekilde etkilerler (Buseck ve Adachi 2008).

Su sistemlerine karışan nanopartiküller su içerisindeki kolloidlerle birleşirler. Kolloidler genellikle 1 nm ile 1 µm arasında olabilen, hümik asitler (HA), protein ve polisakkarit eksüdalı gibi organik ve demir, alüminyum ve silikon oksit gibi inorganik maddeleri içeren bir makromoleküldür. Su sistemlerine giren nanopartiküller, bu kolloidlerin bileşenleri haline gelir ve sonuçta davranışları ve taşınmaları hem sulu ortamın fizikokimyasal özelliklerine hem de diğer koloidal bileşenlerle etkileşimine bağlı olarak gerçekleşir (Scown ve diğerleri, 2010).

Tarımsal uygulamalar (gübre ve pestisit şeklinde) sonucunda, hava, su, kanalizasyon ve çamur yoluyla toprağa karışabilen NP'ler bazı mikrobiyal topluluklar için tehdit oluşturabilmektedir. Endüstriyel nanopartiküllerin özellikle metal içerikli nanopartiküllerin toprak mikrobiyal aktivitesi üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada demir (II, III) oksit nanopartikül konsantrasyonunun topraktaki bakteri içeriğini önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşılrken (Rajput ve diğerleri, 2017), bir başka araştırmada Çinko oksit ve CeO₂ nanopartiküllerinin toprakta yaşayan azot bakterilerinin enzimatik aktivitelerini engellediği tespit edilmiştir (Rajput ve diğerleri, 2017). TiO₂ NP'lerinin, fonksiyonel toprak bakterilerinin sayısını ve bunların enzimatik aktivitesini azalttığı ve sonuçta mikrobiyal bolluk, aktivite ve çeşitlilik üzerinde zararlı etkiler oluşturabileceği rapor edilmiştir (Buzea ve diğerleri, 2007). Diğer yandan altın (Au) NP'lerinin 33 mg/kg⁻¹ konsantrasyonuna kadar toprak süreçlerini etkilemediği ve dolayısıyla “zararlı değil” şeklinde sınıflandırılabilceği belirtilmiştir (Maliszewska, 2016).

2.3. Nanopartiküllerin Bitkiler ile Etkileşimi

Bir ekosistemde canlı ve cansız varlıklar bir biriyle sıkı bir etkileşim içindedir. Nanopartiküller gibi inorganik maddelerin doğaya karışması veya salınması sonucunda, özellikle bitkiler ile de büyük bir etkileşime girecekleri tahmin edilebilir. Bu nedenle nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkisinin kapsamlı bir şekilde araştırılması büyük önem taşımaktadır (Singh ve diğerleri, 2017; Rastogi ve diğerleri, 2017; Iqbal ve diğerleri, 2020; Zeb ve diğerleri, 2020; Avellan ve diğerleri, 2021).

2.3.1. Nanopartiküllerin bitki sistemlerine alımı, translokasyonu ve birikimi

Nanopartiküller bitki sistemlerine ya kök dokularından, kök uçları, yaralanma ve yan kök bağlantı noktaları ile ya da toprak üstü organ ve dokulardan (örneğin, kutikula, trikollar, stomalar, stigma ve hidatot) girebilirler. NP'ler hücre duvarından geçerek, endositoz yoluyla hücrelere girebilir ve 3-50 nm çapında olan NP'ler plazmodezmata ile diğer hücrelere taşınabilir (Wang ve diğerleri, 2016).

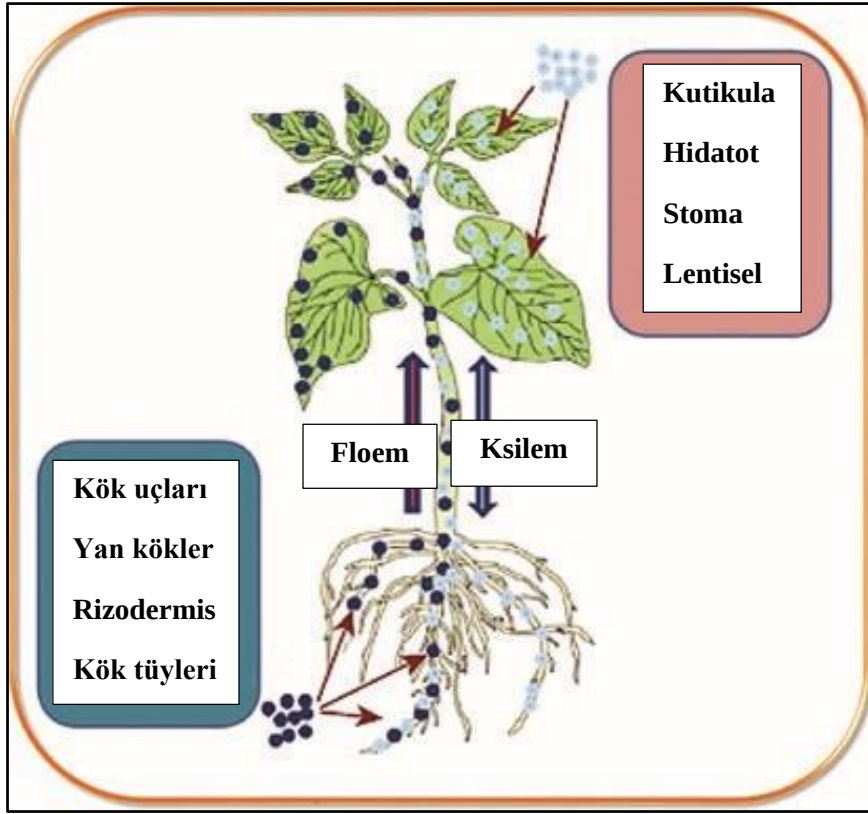
Su moleküllerinin ve diğer çözünebilen maddelerin bitki köklerine girmek için geçmesi gereken hücre duvarları, gözenekli bir polisakkarit yapıları fiber matris ağına sahiptir. Bitki hücre duvarlarının gözenek boyutları tipik olarak 3-8 nm aralığındadır ve bu boyut, test edilen birçok NP'den çok daha küçüktür. Dolayısıyla, oldukça küçük boyuta sahip NP'lerin en büyük gözeneklerden geçerek plazma zarına ulaşması beklenir. Daha büyük ebatlarda olan NP'lerin ise bitki hücrelerine giremediği düşünülebilir. Ancak araştırmacılar, NP'lerin, hücre duvarları boyunca büyük ebatlardaki NP'lerin de geçebilmesine izin veren yeni ve büyük boyutlu gözeneklerin oluşumunu tetikleyebileceğini tespit etmişlerdir (Ma ve diğerleri, 2010).

Yaprağın yüzeyinde bulunan kütikül, nanopartiküllerin substrat dokusuna girmesine karşı ilk doğal engel olarak kabul edilir çünkü bitkilerin yaprakları, su kaybına ve diğer çözünen maddelerin kontrolsüz değişimine karşı bu mumsu yapıda olan kütikül tarafından korunmaktadır. Kütikül (kütiküler yol) boyunca çözünen maddelerin alımı için iki farklı yol vardır; polar olmayan çözünen maddeler (lipofilik yol) ve tahmini boyutu yaklaşık 0,6 ile 4,8 nm arasında değişen polar yapıları çözünen maddeler (hidrofilik yol). Yapılan birçok çalışmada boyut olarak 4,8 nm'nin altındaki NP'lerin doğrudan kütiküler yoldan geçebildiği, 5 nm'den büyük NP'lerin yaprakta birikim gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu

NP'lerin hangi yol ile alındığı hala belirsizdir. Kök yüzey kütikülünün rolü ve bileşimi, yaprak yüzeyi kütikülünükilere benzerdir. Kütikül, kök kıllarının yüzeyinde az gelişmiştir ve ana ve ikincil köklerin kök uçlarını geliştirir, bu nedenle NP'ler bu bölgelerdeki epidermis tabakasına doğrudan temas edebilir. NP'lerin kök kısmından alımı ve translokasyonun meydana gelmesi için, NP'ler toprak yüzeyinden ksilem damarlarına doğru bir dizi fizyolojik kök engelini geçmelidir. NP'ler, kök yüzey kütikülü, epidermis, korteks, endodermis, kaspari şeridi ve son olarak ksilemi geçerek sürgün kısımlarına doğru taşınmaktadır (Lv ve diğerleri, 2018).

NP'lerin kök kısmından alımı, esas olarak aktif yanal kökler ve kök tüyleri yoluyla gerçekleşirken, yaprakta ise büyük ölçüde stoma ve aynı zamanda trikomlar yoluyla olur. Bitkiler ayrıca NP'leri kök yüzeyine bağlayan müsilaj eksüdasyonu yoluyla NP'lerin alımını engelleyebilir. Köklere ve yapraklara girdikten sonra, NP'ler bir hücreden diğerine kolayca yayılır (Khan ve diğerleri, 2019).

Nanopartiküller ksilem veya floem yoluyla kök kısmından yaprağa veya meyveye doğru yer değiştirebilirken, diğer yandan, yapraktan kök kısmına doğru olan yollarda, NP'ler stoma yoluyla geçebilir ya da NP'ler belli yerlere sıkışabilir veya bitki sap kısımlarına yeniden dağılabilir (Cinisli ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.3. Nanopartiküllerin bitki sistemlerine olası giriş noktalarının şematik gösterimi (Rai ve diğerleri, 2018).

NP'lerin fitotoksitesini inceleyen çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bitki sistemlerinden emilimi, taşınması ve birikimi hakkında çok daha az araştırma olduğu görülmektedir. NP'lerin bitki sistemlerine alımı, yer değiştirmesi ve birikmesi, NP'lerin boyutuna, kimyasal konfigürasyonuna, stabilitesine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Ali ve diğerleri, 2021). En büyük gözenekten küçük boyutlara sahip NP'lerin geçerek plazma zarına ulaşması beklenirken, daha büyük parçacıklar aglomerat oluşturacağı için bitki hücrelerine giremeyecektir. ZnO NP'lerin (8 nm) soya fasulyesi bitkisi hücreleri tarafından alımını inceleyen bir çalışmada, Zn alımının, en düşük konsantrasyonda (500 mg/L^{-1}) bitki hücreleri tarafından alındığı fakat en yüksek konsantrasyonlarda ($1.000\text{-}4.000 \text{ mg/L}^{-1}$) toplanma (agregasyon ve aglomerat oluşturma) eğilimi gösterdiği için soya fasulyesi hücreleri tarafından alımının azaldığı bildirilmiştir (Singh ve diğerleri, 2017).

Bitkinin anatomik yapısı gibi özellikleri NP'lerin translokasyonunda çok önemli rol oynamaktadır. Örneğin, altın NP'lerin *Oryza sativa* bitkisinin sürgün kısmında biriktiği fakat *Cucurbita pepo* ve *Raphanus raphanistrum* gibi farklı bitkilerin sürgünlerinde birikmediği tespit edilmiştir. (Zhu ve diğerleri, 2012).

NP'lerin boyutları küçüldükçe hücreye girişi kolaylaşır ve bitkinin farklı hücrelerinde birikimi de artar. *Triticum aestivum* bitkisinde yapılan bir çalışmada, 36 nm boyutundaki TiO₂ nanopartiküllerinin kök parankimasında biriktiği ancak sürgün kısmına ulaşmadığı, diğer yandan 140 nm boyutundaki TiO₂ nanopartiküllerinin kökte birikmediği tespit edilmiştir (Larue ve diğerleri, 2012).

Bitki kökleri tarafından alınan nanopartiküllerin birikim oranı, çevresel koşullardan ve NP'lerin özelliklerinden etkilenebilir. Gümüş sülfür (Ag₂S) NP'lerinin potasyum klorür ve amonyum tiyosülfat ile kombinasyon halinde uygulanmasının, *Lactuca satia* (Marul) bitkisinin sürgün ve köklerindeki Ag NP konsantrasyonunu önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Doolette ve diğerleri, 2015). Bir başka çalışma ise seryum dioksit (CeO₂) NP'lerinin, toprak organik maddesi ile olan kombinasyonunun *Zea mays* (Mısır) bitkisi kökleri tarafından alınmadığını göstermiştir (Zhao ve diğerleri, 2012).

2.4. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri

Endüstriyel nanopartiküllerin (NP) eşsiz fizikokimyasal ve elektriksel özellikleri, onları çeşitli uygulamalarda oldukça cazip hale getirmektedir. Diğer yandan NP'lerin bu yeni özelliklerinin, canlılar, hücreler ve hücre yapılarıyla etkileşiminde ve toksik etkilerinde de önemli rol oynayabileceği endişelerini de beraberinde getirmektedir. Nanopartiküllerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerindeki değişikliklerin, nanopartiküllerle bağlantılı en önemli toksik etkilerden biri olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini de etkilediğini göstermektedir. Endüstriyel NP'lerin partikül boyutu, bileşimi, yüzeyi ve metallerin varlığı gibi faktörler, nanopartiküller tarafından tetiklenen oksidatif stres düzeyini değiştirmektedir. Diğer yandan, mitokondriyal solunum, NP-hücre etkileşimi ve immün hücre aktivasyonu gibi hücresel yanıtlar ROT aracılı hasardan kaynaklanmaktadır. Oksidatif stres NP kaynaklı hasarın önemli bir belirleyicisidir (Manke ve diğerleri, 2013). Reaktif oksijen türlerinin tetiklenmesi sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna ve hatta DNA ve kromozom hasarlarına sebep olmaktadır (De Matteis ve Rinaldi, 2018).

NP'lerin boyutu küçüldükçe, yüzey/hacim oranı katlanarak artmaktadır. Bu özellik de parçacıkları daha reaktif ve daha toksik hale getirmektedir. Ayrıca, NP'lerin boyutları küçüldükçe bitki ve hayvansal dokulara nüfuz etme oranı da artmaktadır. Böylece NP'lerin farklı hücre bariyerlerine nüfuz etmesi, hücrelerde birikerek toksik etki oluşturmaya neden olabilir (Sajid ve diğerleri, 2014). Küçük boyutlu (15 nm) AgNP'lerin, büyük boyutlu (30 ve

55 nm) AgNP'lere kıyasla hücrelerde 10 kat daha fazla ROT üretimine neden olduğu ve toksisiteyi tetiklediği tespit edilmiştir (Carlson ve diğerleri 2008). Nano boyutlu bakır oksit (CuO) partiküllerinin, *Tetrahymena thermophila* türü protozoa hücresinde, bulk CuO'dan 10 ile 20 kat daha fazla toksisite gösterdiği bildirilmiştir (Mortimer ve diğerleri, 2010).

NP'lerin şekil, boyut ve yüzey alanı birlikte değerlendirildiğinde, toksik etkilerinde şekillerinin de oldukça önemli olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, çubuk (rod) şeklindeki ZnO NP'lerinin, insan akciğer epitel hücrelerinde (A549), küresel ZnO NP'lerinden daha fazla toksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Hsiao ve Huang, 2011). Benzer şekilde Au NP'leri ile yapılan bir başka çalışmada, küresel partiküllerin, çubuk tipi partiküllere kıyasla daha fazla toksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Bu etkinin, fonksiyonel moleküllerin küresel yüzeyden daha hızlı salınmasına ve hücreyle etkileşimine bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Tarontola ve diğerleri, 2011).

NP'ler çok çeşitli alanlarda kullanılabilme amacıyla farklı organik yapılarla da işlevselleştirilmektedir. Bu yapılarına göre de toksik etkilerinde farklılıklar olabilmektedir. Örneğin, -COOH ile işlevselleştirilmiş NP'ler pozitif yüklü bir hal alırken, -NH₂ ile işlevselleştirilmiş NP'ler negatif yüklü olmaktadır. Au NP'leri ile yapılan bir çalışmada katyonik zincirler ile işlevselleştirilmiş NP'ler orta derecede toksik bulunurken, anyonik zincirler ile işlevselleştirilmiş olan partiküller ise toksik bulunmamıştır (Goodman ve diğerleri, 2004). Hidrofilik ve hidrofobik tek tabakalarla modifiye edilmiş Au NP'lerinin balık hücrelerine alımları, dağılımları ve toksisiteleri incelendiğinde, balığın bağırsaklarında hidrofilik partiküllerin mevcut olduğu, ancak toksik bir etki oluşturmadığı gözlenirken, hidrofobik partiküllerin 24 saatten kısa sürede balık ölümüne neden olduğu gözlenmiştir (Zhu ve diğerleri, 2010). Tüm bu sonuçlar, nanopartiküllerin toksik etkisinin yüzey yüküne bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

NP'lerin en önemli özelliklerinden biri, kataliz olayı için kullanıldıklarında diğer malzemelere kıyasla son derece yüksek reaktivite göstermeleridir. Reaktif NP'ler, hücreler içerisinde katalitik reaksiyonları başlatarak reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olabilirler. Bu alışılmadık reaktivite NP'leri oldukça toksik hale getirmektedir. NP'lerin sahip olduğu yükler, onları nötr parçacıklara kıyasla hücrelere ve proteinlere karşı daha reaktif hale getirmektedir (Stark 2011). Bu da toksik etkilerinde farklılıklara sebep olmaktadır.

NP'lerin biyolojik sistemler içerisindeki kararlılığı, doğasına, boyutuna ve konsantrasyonuna bağlı olarak da değişmektedir. NP'lerin kararlılığı için ortam pH'ı oldukça önemlidir. Biyolojik sistemlerin pH'ında, organik ve inorganik NP'lerin birçoğu çözünür hale gelir. Metaller ve metal oksit NP'ler ise biyolojik sistemlere girdiğinde, hücreler içinde metal iyonlarının konsantrasyonu artar ve bu da hücrede yüksek strese neden olur. Ağır metal iyonlarının varlığı ROT oluşumunu tetikleyebilir. NP'lerin bir ortamdaki çözünürlüğü, kararlılıkları ve toksisiteleri ile ilgili temel parametrelerden biridir (Roy ve diğerleri, 2003).

Nanopartiküllerin toksisitesini etkileyen faktörlerden bir diğeri agregasyon eğilimleridir. NP'ler, çözelti içerisinde toplanma özelliğine sahiptir. Agregasyon durumu, boyut, şekil, sıcaklık, konsantrasyon, NP'lerin yükü ve türüne bağlı olarak değişmektedir. Agregasyona uğramış NP'ler, ayrı ayrı dağılmış parçacıklardan farklı şekilde davranmaktadır. Dolayısıyla hücrelerle etkileşim yolları, protein adsorpsiyon eğilimleri ve sonuçta toksik etkileri de büyük ölçüde etkilenmektedir. NP'lerdeki kümeleşme hücre alımı etkilediği için toksik etkinin değişmesine de neden olur (Herzog ve diğerleri, 2009).

Hareket kabiliyetlerinin yüksek olması ve küçük bir boyuta sahip olmaları nedeniyle NP'ler bitki ve hayvan hücrelerine çok kolay bir şekilde penetre olabilirler. NP'lerin boyutları küçüldükçe difüzyonları kolaylaşır ve artar. Hücreye kolay bir şekilde penetre olabilen hareketli NP'lerin toksik etkisi de değişebilmektedir (Sajid ve diğerleri, 2014).

2.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

Nanopartiküllerin insan hayatında çok farklı alanlarda yaygın kullanımı nedeniyle, bunların genotoksik etkileri konusunda detaylı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Her ne kadar NP'lerin genotoksik mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamış ise de bu konuda farklı yorumlar mevcut olduğu gibi, DNA üzerinde oluşan etkinin nano-spesifik olup olmadığı da hala net bir şekilde açıklanamamıştır (Magdolenova ve diğerleri, 2013; Tabei ve diğerleri, 2018; Mortezaee ve diğerleri, 2019; Ghosh ve diğerleri, 2019; Kohl ve diğerleri, 2020).

Nanopartiküller ile ilgili araştırmaların çoğu, memeli hücreleri ile bakterilerdeki genotoksik ve mutajenik etkilerine odaklanmıştır. Nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde her ne kadar *in vitro* ve *in vivo* genotoksikite çalışmaları mevcut ise de *in vivo* çalışmaların sayısı nispeten daha azdır (Santonastaso ve diğerleri, 2020; Ling ve diğerleri, 2021). Bu nedenle *in vivo* araştırmalara da ağırlık verilmesi gerektiği

görülmektedir. *In vivo* araştırmalar çeşitli hayvan türleri kullanılarak yapılabildiği gibi, hayvan kullanımını azaltmak amacıyla, ökaryotik organizmalardan olan ve moleküler ve sitogenetik çalışmalarda son yıllarda sıklıkla kullanılan *V. faba* ve *A. cepa* L. gibi bitkilerde de uygulanmaktadır. Bu tür bitkiler, fiziksel ve kimyasal ajanların mutajenik ve klastojenik etkilerini belirlemede mükemmel biyoindikatör organizmalar olarak kabul edildiklerinden genotoksisite çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmeye başlanmıştır (Özkara ve diğerleri, 2014 ; Mehrian ve De Lima, 2016; Ünal ve diğerleri, 2020; Macar, 2021).

Yetişkin erkek farelerde yürütölen bir *in vivo* çalışmada, araştırıcılar 21 nm büyüklüğündeki ve 0, 50,100, 250 ve 500 mg/kg konsantrasyonlarındaki TiO₂ NP'lerin oluşturduğu genotoksik etkiyi incelemişlerdir. Çalışmada sadece 500 mg/kg'lık TiO₂ nanopartiküllerinin periferel kan hücrelerinde mikronökleus oluşumuna ve DNA ipliğinde kırıklara sebep olduğu ve dolayısıyla genotoksik bir etki sergilediği bildirilmiştir (Dobrzynska ve diğerleri, 2014). Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *in vivo* genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Gaharwar ve arkadaşları, Wistar sıçanlarına 28 gün boyunca, haftada bir kez kaudal ven yoluyla uygulamalar yapmışlardır. 7.5, 15 ve 30 mg/kg'lık Fe₂O₃ konsantrasyonların kullanıldığı bu araştırmada, nanopartiküllerin genotoksik etkisi comet testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, Fe₂O₃ nanopartiküllerinin anlamlı bir DNA hasarı oluşturmadığını göstermiştir (Gaharwar ve diğerleri, 2015). İnsan periferel kan lenfosit hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla <50 nm boyutundaki NiO₂ NP'lerinin genotoksik etkisi comet ve mikronökleus tekniği kullanılarak incelenmiştir. 12,5, 25 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonların kullanıldığı çalışmada, DNA hasarı ve MN frekansında, nanopartiküllerin konsantrasyon artışına paralel bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Dumala ve diğerleri, 2019). TiO₂ nanopartikölünün genotoksik etkisi insan periferel lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik testi (KA) ile incelenmiştir. Çalışmada 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda, KA frekansında en fazla artışın en düşük konsantrasyon olan 20 ve 40 µg/mL'lik konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir (Demirtaş Korkmaz, 2012).

Son yıllarda NP'lerin genotoksik etkisi özellikle *Allium* ve komet testi uygulanarak incelenmektedir. Bu testlerde *Allium cepa* L. bitkisi kullanıldığı gibi, *Vicia faba* gibi diğer kolay elde edilebilen bitki türleri de kullanılmaktadır. SiO₂ NP'lerinin *Allium cepa* L. meristem hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi comet testi kullanılarak incelenmiştir. Nanopartiküllerin konsantrasyonu arttıkça, *A. cepa* L. kök uçlarında oluşturdukları DNA

hasarının da arttığı, dolayısıyla SiO₂ NP'lerinin genotoksik etkili olduğu belirtilmiştir (Liman ve diğerleri, 2020). *Vicia faba* bitkisi ile yapılan bir çalışmada ZnO NP'lerinin 0,0, 10, 25, 50 ve 100 mg/L'lik konsantrasyonlarının, genotoksik etkisi 24 saatlik muamele sonucunda incelenmiştir. Araştırmada, ZnO NP'lerinin artan konsantrasyonlarına paralel olarak *Vicia faba* hücrelerinde yapışıklık, köprü ve halka kromozom gibi kromozomal anormalliklerin yanında mikronukleusların da oluştuğu tespit edilmiştir (Youssef ve Elamawi, 2020).

Nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin bulk partiküllerle karşılaştırılması amacıyla da araştırmalar yürütülmektedir. Bu tür incelemelerde genellikle nano ebatlı partiküllerin mikron ebatlı partiküllerden daha genotoksik olduğu belirlenmiştir. Alüminyum oksit nanopartiküllerinin (Al₂O₃) (<50 nm) ve bulk partiküllerin (<5µm) *Allium cepa* L. üzerindeki genotoksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla yürütülen bir çalışmada, her iki partikülün de 1,25 ile 5 µM arasındaki konsantrasyonları kullanılmıştır. Elde edilen veriler kontrol ile karşılaştırıldığında, hem Al₂O₃ nanopartiküllerinin ve hem de bulk partiküllerin konsantrasyonu arttıkça, oluşan kromozom anormallikleri, mikronükleus ve DNA ipliğindeki kırıklarda da bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak, nanopartikül formunun hücrede oluşturduğu genotoksik hasarın bulk formuna kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (De ve diğerleri, 2016).

NP'lerin boyut, yüzey yükü, form, agregasyon gibi özelliklerinin yanında, çeşitli bileşiklerle (polimerler ve amino asit) kaplanma durumları da hem hücresel toksisitelerinde ve hem de genetik toksisitelerinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu kaplamalardan dolayı partikül yüzeyi değiştikçe, partikülün genotoksitesini veya enflamatuar etkilerini de değiştirebileceği tespit edilmiştir. Demir oksit NP'lerinin pozitif yüklü kaplamalarının insan fibroblast hücrelerinde DNA ipliğindeki kırıklarda artışa neden olduğu gözlenirken, negatif yüklü demir oksit NP'leri ile kaplamaların önemli bir genotoksite göstermediği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, sadece pozitif yüklü demir oksit NP'lerinin çekirdeğe ulaşarak, DNA ile etkileşime girdiğini ileri sürmüşlerdir (Klien ve diğerleri, 2012). Farelerde gerçekleştirilen bir *in vivo* çalışmada, polivinilpirolidon (PVP) ve silikon kaplı Ag NP'lerin 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 ve 20,0 mg/kg'lık farklı konsantrasyonları intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulanmış ve genotoksik etkileri comet testi ile değerlendirilmiştir. Araştırmanın sonucunda hem PVP hem de silikon kaplı Ag NP'lerin fare

kemik iliğine ve karaciğere ulaşarak, kemik iliğinde ve karaciğerde oksidatif DNA hasarına sebep olduğu tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2014).

Yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bazı nanopartiküllerin genotoksik olduğunu ve insan sağlığı için özellikle genetik materyal olan DNA'da ve kromozomlarda hasara sebep olabileceğini göstermiştir. NP'lerin üretimi ve kullanımı arttıkça, bu partiküllere isteyerek veya intenmeden maruziyetler sonucunda, üretim sektöründe çalışan kişilerde veya çevreye salınmaları veya bulaşmaları sonucunda hem insanlar ve hem de diğer canlı türlerinin de bu partiküllere maruziyeti giderek artış göstermektedir. Bu nedenle ekosistemde yer alan tüm canlılar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturma potansiyeli artmaktadır (Mu ve diğerleri, 2012; Tortella ve diğerleri, 2020; Martinez ve diğerleri, 2021). Bütün bu sebeplerden dolayı, farklı test sistemleri kullanılarak, farklı tipte nanopartiküllerin farklı konsantrasyonları ve sürelerinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışması da bu gereklilikten dolayı aynı konsantrasyonlardaki Fe₂O₃ nanopartikül ve mikropartiküllerinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerindeki genotoksik etkilerinin *Allium* ve komet testi ile incelenmesi amacıyla tasarlanmış ve yürütülmüştür.

2.6. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller temel olarak dört ana grupta toplanabilir:

- 1) Organik Nanopartiküller
- 2) İnorganik Nanopartiküller
 - Metal Nanopartiküller
 - Metal Oksit Nanopartiküller
- 3) Seramik Nanopartiküller
- 4) Karbon Bazlı Nanopartiküller (Aslani ve diğerleri, 2014; Mohamad ve diğerleri, 2018; Ljaz ve diğerleri, 2020).

2.6.1. Metal oksit nanopartikülleri

Yapısında oksijen atomu bulunduran metal içerikli bileşiklerdir (Fernandez-Garcia ve Rodriguez, 2011; Mallakpour ve Madani, 2015). Metal oksit nanopartikülleri yüzey, optik, termal ve elektriksel gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri bakımından mikron ebatlı (bulk) partiküllerden oldukça farklıdır ve bu nedenle çok farklı özellikler sergilemektedir. Bu özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanılmak üzere yoğun bir ilgi görmektedir. Metal ve

metal oksit nanopartikülleri, indirgeyici veya oksitleyici/çökeltici ajanların eklenmesiyle üretilmektedir (Rastogi ve diğerleri, 2017).

Metal oksit nanopartikülleri arasında en yaygın olarak kullanılan titanyum dioksit (TiO_2), özellikle gıda boyaları, diş macunu ve kozmetik ürünlerde tercih edilmektedir. Seryum oksit (CeO_2), biyosensör ve antikanser ajanı olarak özellikle biomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Silikon dioksit (SiO_2) nanopartikülleri, geniş yüzey alanı, gözenek hacmi, kontrol edilebilir partikül boyutu ve iyi biyouyumluluk gibi eşsiz özellikleri nedeniyle biyosensörlerde ve ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri, diğer metal oksit nanopartikülleri gibi biyomedikal uygulamalarda çokça tercih edilmektedir. Son yıllarda özellikle biyo görüntüleme ve ilaç dağıtım sistemlerinde kullanım alanı bulmaya başlamıştır. Demir oksit (Fe_2O_3) nanopartikülleri manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve hipertermi tedavisinde kullanılmaktadır (McNamara ve diğerleri, 2017). Bakır oksit (CuO) nanopartikülleri ise anti mikrobiyal özelliğe sahip olduğu için mürekkeplere, plastiklere, yağlara ve kozmetik ürünlerine katkı maddesi olarak eklenmektedir (Hanagata ve diğerleri, 2011).

Demir oksit nanopartikülleri

Demir ve oksijen atomu, kimyasal olarak birleşir ve çeşitli demir oksit bileşikleri oluşturur. Günümüze kadar tanımlanmış 16 tane demir oksit bileşiği vardır. Demir (III) oksit (Fe_2O_3), doğada pas formunda bulunmaktadır. Demir oksit bileşiklerinin pek çok biyolojik ve jeolojik süreçte zorunlu bir rol oynamasının yanı sıra, ucuz ve yaygın oldukları için çok fazla tercih edilirler. Manyetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) doğada en yaygın olan formlardır. Ferromanyetik malzemelerden oluşan ve boyutu $<10\text{-}20$ nm olan nanopartiküller, eşsiz bir manyetizma formu, yani süperparamanyetizma gösterirler. Ferromanyetik malzemeler arasında yalnızca NP sistemlerinde bulunan elementel metaller, alaşımlar, oksitler ve harici bir manyetik alan tarafından manyetize edilen diğer kimyasal bileşikler yer almaktadır (Ali ve diğerleri, 2016).

Demir oksit (Fe_2O_3) nanopartikülleri fiziksel ve kimyasal olarak kararlı ve biyouyumlu olduğu için çevresel olarak güvenli kabul edilir. Fe_2O_3 NP'leri manyetik rezonans görüntüleme (MRG), manyetik parçacık görüntüleme (MPG), hipertermi tedavisi, ilaç taşıma sistemleri, gen taşınması, biyo algılama, doku tamiri, biyomoleküllerin ayrılması vb.

pek çok biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Arias ve diğerleri, 2018; Dadfar ve diğerleri, 2019). Bu uygulamaların dışında Fe_2O_3 NP'ler kozmetikte, tekstil endüstrisinde, çevre iyileştirme uygulamalarında, suların arıtılmasında, vb alanlarda kullanılmaktadır (Hernandez ve diğerleri, 2020; Shabani ve diğerleri, 2021).

Fe_2O_3 nanopartiküllerinin birçok alanda bu kadar yaygın kullanılması, hem bunları üreten kişilerde, hem kullananlarda ve hem de atıklarının doğaya ulaşması sonucunda tüm canlılarda bu partiküllerin birikimine sebep olabilmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin bu kadar yaygın kullanımı, hem insanların ve hem de diğer canlı türlerinin yaşamında bir tehdit oluşturmaktadır. Bu düşünceden yola çıkılarak yapılan araştırmalar, genelde çoğu nanopartiküllerin, özelde de demir oksit nanopartiküllerinin toksik potansiyelde olduklarını göstermektedir. Ancak bu konuda yapılan araştırmalar, hem nanoteknolojideki kullanımlarına kıyasla çok daha az sayıdadır ve hem de elde edilen verilerde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Fe_2O_3 NP'leri birçok çalışma sonucunda genel olarak biyoyoumlu kabul edilmiştir fakat yapılan pek çok çalışma bu partiküllerin insan dahil diğer birçok canlı organizma üzerinde toksik etkiler oluşturabileceğini de kanıtlar niteliktedir. Yapılan toksisite çalışmalarının bazılarında Fe_2O_3 NP'lerine maruz bırakılan Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücrelerinde, fare makrofaj J774 hücrelerinde, farklı vasküler endotel hücrelerinde ve insan akciğeri A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinde (ROT) artış gerçekleştiği tespit edilmiştir (Valdiglesias ve diğerleri, 2016). Wistar sıçanları üzerinde yapılan bir genotoksisite çalışmasında, Fe_2O_3 NP'lerinin bağırsak bariyerini kolay bir şekilde geçebilmelerine rağmen karaciğer, dalak, böbrek ve kalpte herhangi bir genotoksositeye sebep olmadığı komet testi ile belirlenmiştir (Valdiglesias ve diğerleri, 2015). Fe_2O_3 nanopartiküllerinin *in vivo* genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Gaharwar ve arkadaşları, Wistar sıçanlarına 28 gün boyunca, haftada bir kez kaudal ven yoluyla uygulamalar yapmışlardır. 7.5, 15 ve 30 mg/kg'lik Fe_2O_3 konsantrasyonların kullanıldığı bu araştırmada, nanopartiküllerin genotoksik etkisi comet testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, Fe_2O_3 nanopartiküllerinin anlamlı bir DNA hasarı oluşturmadığını göstermiştir (Gaharwar ve diğerleri, 2015). 90 nm boyutundaki Fe_2O_3 nanopartikülleri kullanılarak A549 hücre hattı ile fare alveolar makrofajlarında (MH-S) yapılan bir genotoksisite çalışmasında, DNA hasarının belirlenmesi amacıyla comet testi uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda 20 ve 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ konsantrasyonlarındaki Fe_2O_3 nanopartiküllerine 4 saat maruz kalan A549 ve MH-S hücrelerinde DNA hasarı belirtileri gözlenmemiştir. (Freyria ve diğerleri, 2012).

Demir oksit nanopartiküllerin bazı bitki türleri üzerindeki genotoksik etkileri konusunda da araştırmalar yapılmıştır. *Raphanus sativus* (turp) bitkisinde Fe_2O_3 NP'lerin genotoksik ve apoptotik potansiyeli incelenmiştir. Fe_2O_3 NP'ler, turpta kök uzunluğunu ve tohum çimlenmesini geciktirmiştir ve düşük konsantrasyonlarda (1.0 mg / mL) hücrede ROT oluşumu meydana gelmiştir. Çalışmada uygulanan comet testi, Fe_2O_3 NP'ler ile muamele edilmiş gruplarda DNA iplik kopmalarında konsantrasyona bağlı bir artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca yüksek Fe_2O_3 konsantrasyonunda (2.0 mg / mL) hücrenin apoptoza uğradığı sonucuna ulaşılmıştır (Saqib ve diğerleri, 2016).

Fe_2O_3 nanopartiküllerinin genotoksik etkisinin *Allium cepa* L. üzerinde incelendiği çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, <50 nm ve <100 nm boyutlarındaki Fe_2O_3 nanopartikülleri ile iyonik Fe_2O_3 formun genotoksik potansiyeli, *Allium* ve comet testleri kullanılarak araştırılmıştır. Fe_2O_3 NP'ler ve iyonik form için dört farklı konsantrasyon (1, 2, 5 ve 10 mM) ve üç farklı uygulama süresi (4, 24 ve 96 saat) kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda <50 nm, <100 nm ve iyonik formdaki Fe_2O_3 'ün *Allium cepa* L. kök hücrelerinde mitotik indekste azalmaya sebep olduğu, comet testi sonucunda da konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada <50 nm boyutundaki Fe_2O_3 'ün, 100 nm ve iyonik forma kıyasla daha toksik bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (Kaygisiz ve Cigerci, 2017).

Fe_2O_3 NP'lerinin genotoksik etkileri konusunda gerek çeşitli hayvan türlerinde ve gerekse çeşitli bitki ve özellikle *Allium cepa* L. da yapılmış araştırma sonuçları, bu partiküllerin hem sitotoksik ve genotoksik olduğunu hem de sitotoksik olmadığını veya genotoksik olmadığını göstermektedir. Bu da, bu partiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri konusunda daha fazla sayıda daha fazla çeşitte testlerin yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

2.7. Genetik Toksisite Testleri

İnsanoğlunun ürettiği ve kendi sağlığı, huzuru ve konforu için kullandığı pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanopartiküller, kozmetik ürünler, ev ve yaşam ürünleri ve daha pek çok endüstriyel maddeler, hem kullanımları ve hem de atılmaları neticesinde başta insanlar olmak üzere tüm canlılarda istenmeyen zararlı etkiler ve özellikle genetik hasarlar oluşturabilmektedir. Bu nedenle, bu tür kimyasal maddelerin insanlarda kullanımından önce olumsuz etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi son derece önem teşkil etmektedir. Ayrıca, insanların kullanımına sunulan bazı kimyasal maddeler de yeterince kontrolden

geçmemektedir. Bu nedenle, bilim insanları her iki durumda da fiziksel ve kimyasal ajanların toksik risklerini belirlemek amacıyla çeşitli kısa süreli mutajenite ve genotoksiste testleri geliştirmiştir. Bu testler, çeşitli maddelerin DNA’da mutasyonlara ve/veya kromozomlarda anormalliklere sebep olup olmadığını ve ayrıca bu maddelerin etki mekanizmalarını anlamak amacıyla kullanılmaktadır (Zakerzadeh ve diğerleri, 2017; Dusinska ve diğerleri, 2017; Du ve diğerleri, 2019; Ueda, 2020).

DNA ve kromozomlarda meydana gelen hasarlar, başta kanser olmak üzere, çeşitli nörodejeneratif ve kalıtsal hastalıklar ile de yakından bağlantılıdır. Çünkü yapılan araştırmalarda, bu tür hastalıklara sahip olan insanlarda çeşitli düzeyde DNA mutasyonlarının ve kromozomal anormalliklerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, fiziksel ve kimyasal maddelerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin önceden belirlenmesi, bunlara maruziyet sonucunda oluşabilecek risklerin önceden tahmin edilmesi kısaca karsinogenik potansiyellerinin tahmin edilmesi ve bu risklerin ortadan kaldırılması veya en azından kabul edilebilir düzeye indirilmesi açısından büyük fayda sağlamaktadır (Doak ve diğerleri, 2017; Salk ve diğerleri, 2020; Choudhuri ve diğerleri, 2021).

Bu testlerin bir kısmı *in vitro* bir kısmı da *in vivo* koşullarda uygulanmaktadır. Her iki test sisteminin de kendine göre avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte, *in vitro* test sistemleri, *in vivo* testlere kıyasla daha kullanışlı, ekonomik ve hızlı birçok testi kapsadığı için ve ayrıca hayvan kullanımını minimize ettiği için tercih edilmektedir. Bu nedenle öncelikle *in vitro* testler uygulanmakta, bunlardan pozitif cevaplar alınması durumunda *in vivo* testlere müracaat edilmektedir. Ancak *in vivo* testler canlı sisteminde yürütüldüğü için *in vitro* ya kıyasla daha fazla avantaj sağlamaktadır (Sandhu ve diğerleri, 1994; Akyıl ve Özkara, 2015; Yüzbaşıoğlu, Ünal ve Zengin, 2014). Kısaca her iki test sistemi de birlikte bir bütünlük oluşturmaktadır.

2.7.1. Bakterilerde geri mutasyon (Ames) testi

İlk kez 1972 yılında Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilen bu test, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla tarama testi olarak uygulanan, basit, kısa sürede sonuç verebilen, güvenilir ve çok yaygın kullanılan bir test sistemidir (Oğuz ve diğerleri, 2013; Zeiger ve diğerleri, 2019; Sun ve diğerleri, 2020; Gruz ve diğerleri, 2020;).

Bu testte belli bir amino asite ihtiyaç gösteren *Salmonella typhimurium* (histidin bağımlı) veya *Escherichia coli* (triptofan bağımlı) suşları kullanılmaktadır. Bu suşların hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için, bu aminoasitlerin üreme ortamlarına dışarıdan ilave edilmesi gerekmektedir. Kısaca bunlar, adı geçen aminoasitleri sentezleme yeteneklerini kaybetmiş mutant suşlardır. Bu suşlarda, mutasyonlar ile bu eksikliği ters yöne çevirecek, yani histidin/triptofan sentezini tekrar yapabilecek şekilde, geri yönde mutasyonlar meydana gelebilir. Böyle bir mutasyon doğal yollarla çok düşük frekansta meydana gelirken, çeşitli kimyasallar bu mutasyonu daha hızlı şekilde oluşturabilmektedir. Bu test, bu mutasyonu belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Mutasyon geçirerek, amino asit sentezleme yeteneğini geri kazanan bakteriler (ters-revers mutasyon geçirenler), atalarının ihtiyacı olan aminoasitlerin ilavesine ihtiyaç göstermeden, kendi sentezledikleri aminoasitleri kullanarak besi ortamında üreyebilirler. Bu test, genetik olarak değiştirilmiş suşlarda, kullanılan kimyasaldan dolayı mevcut mutasyonların eski haline geri dönmesi ve gen fonksiyonunun geri kazanılmasına esasına dayanmaktadır. Bu testte mutasyon geçiren bakterilerin frekansı belirlenerek, incelenen kimyasalın mutajen olup olmadığı değerlendirilir. Bu nedenle bu test, “geri mutasyon testi” veya Ames testi olarak da adlandırılır (Vijay ve diğerleri, 2018; Zeiger, 2019).

2.7.2. Kromozomal anormallik testi

Kromozomal anormallikler (KA), kromozomlarda sayısal veya yapısal düzeyde meydana gelen ve mikroskop altında gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların etkisiyle kromozom yapısında meydana gelen kırıklar DNA’daki onarılmayan çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA’daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından meydana gelmektedir. Bu test ile kromozomların kutuplara hareketi sırasında meydana gelen sayısal anormallikler de tespit edilebilmektedir. Bu hasarlar, mitoz veya mayozda kolayca gözlenebilmektedir. Kromozom anormallikleri testi ile kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, poliploidi ve endoreduplikasyon gibi anormallikler tespit edilebilmektedir (Tripathy ve diğerleri , 2020 ; Afzal ve diğerleri,2020 ; Bakare ve diğerleri, 2021).

Yapılan epidemiyolojik araştırmalar, insan periferik kan lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallik frekansındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif bir

korelasyon olduğunu destekler niteliktedir. Bu nedenle kromozomal anormallik testinin, kanserogenezin erken safhada tespit edilmesinde kullanılan önemli bir test olduğu bildirilmektedir (Bolognesi, 2003; Boffetta ve diğerleri, 2006; Yılmaz ve diğerleri, 2010; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Tripathy ve diğerleri, 2020 ; Afzal ve diğerleri, 2020; Farkas ve diğerleri, 2021;). Bu nedenle kimyasalların genotoksik risklerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Srivastav ve diğerleri, 2017; Honda ve diğerleri, 2018; Toropov ve diğerleri, 2019). Kromozomal anormallikler hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemler ile belirlenebilmektedir. (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Toropov ve diğerleri, 2019; Afzal ve diğerleri, 2020; Aldakheel ve diğerleri, 2021; Farkas ve diğerleri, 2021).

Potansiyel mutajenlere ve kanserojenlere maruz kalan sağlıklı bireylerdeki kromozom anormalliği riskini belirlemek amacıyla genellikle insan periferik lenfositleri kullanılmaktadır (Avuloğlu Yılmaz ve diğerleri, 2016; Mamur ve diğerleri, 2020).

In vivo araştırmalarda genellikle fare ve ratlarda periferik kandaki veya kemik iliğindeki lenfositlerde kromozom anormallikleri değerlendirilmektedir (Yılmaz ve diğerleri 2008; Ünal ve diğerleri 2011).

2.7.3. Mikronükleus testi

Mikronükleuslar, asentrik kromozom fragmentlerinden (klastojenik etki) veya bütün bir kromozomdan (anöjenik etki) köken alan ve hücre bölünmesi esnasında her hangi bir kutba dahil olmayan genetik yapıları ifade etmektedir. Mikronükleus testi de diğer testler gibi, gıda katkı maddeleri, pestisitler, ilaç etken maddeleri, mikotoksinler gibi çeşitli kimyasal maddelerin olası genotoksik risklerini belirleme kullanılan testlerden biridir. Yapılan araştırmalarda, MN frekansındaki artış ile kanser oluşum riski arasında bir korelasyon tespit edilmiş olması nedeniyle, bu test de kimyasalların olası genotoksik ve aynı zamanda kanserojen risklerini tespit etmek amacıyla kullanılan bir testtir (Fenech 2000; Avuloğlu Yılmaz, 2017; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2018; Mamur ve diğerleri, 2020; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2020). MN miktarındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde meydana getirdiği kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2020).

2.7.4. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatit değişimi testi de ekzojen maddelerin mutajenik ve kanserojenik risklerinin belirlenmesinde kullanılan hızlı ve hassas bir test olarak tanımlanmıştır. İlk kez Perry ve Evans tarafından 1975 yılında tanımlanmıştır. Kardeş kromatit değişimleri, bir kromozomun kardeş kromatitleri arasında, homolog bölgelerde meydana gelen DNA kırıklarının karşılıklı yer değiştirmesi sonucunda oluşmaktadır. Değişimin yapıldığı bu bölgeler, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarıldığını göstermektedir. Bu yöntemde özel olarak kullanılan Bromodeoksiüridin (BrdU), DNA replikasyonu esnasında yeni oluşan DNA zincirlerinin yapısına katılarak, takip eden ışınlama ve boyama işlemlerinden sonra, DNA segmentlerinin karşılıklı değişim yaptığı bölgelerin yani kardeş kromatitlerin tespit edilmesine imkan sağlamaktadır. Değerlendirme bu renk değişimlerinin sayısına göre yapılmaktadır. KKD frekansındaki artış, kalıcı DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006;; Latt ve ark., 1980; Perry ve Thompson, 1984; Albertini ve ark., 2000; Wilson III ve Thompson, 2007; Montoro ve diğerleri, 2012; Ataseven ve diğerleri, 2016 ; Mahmoodi ve arkadaşları, 2016; Şen ve diğerleri, 2017; Jain ve ark., 2018; Salawu ve ark., 2018).

2.7.5. Comet (tek hücreli jel elektroforez) testi

DNA düzeyindeki hasarları ve bu hasarların onarımını belirlemek amacıyla son yıllarda çok yaygın şekilde kullanılan bir tekniktir. Çok farklı doku ve hücre tiplerinde uygulanabiliyor olması, az sayıda hücre gerektirmesi ve sonuç alması hızlı olması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu teknikte, elde edilen tek hücre süspansiyonu bir agaroz jel ile karıştırılıp lam üzerine yayılır. Belli bir pH'da DNA sarmalının çözünmesi sağlanır ve sonra hücrelere elektroforez işlemi uygulanır (Singh ve ark., 1988). DNA'nın çözünmesi ve elektroforez işlemleri nötral pH (7-8)'da yapılırsa, çift zincir kırıkları ve çapraz bağlanmalar tespit edilmektedir. pH değeri 12,1-12,4'de uygulanırsa, hem tek ve hem de çift zincir kırıklarına ilaveten, tamamlanmamış kesip çıkarma onarma bölgeleri ve çapraz bağlanmalar tespit edilir. pH değeri 12,6'dan daha yüksek olursa, alkali hassas bölgeler ve diğer tüm DNA hasarları tespit edilir. Daha sonra hücrelere elektroforez ve nötralizasyon uygulanır ve takiben etidyum bromür gibi DNA'ya spesifik floresan boyalarla boyanır. Eğer DNA'da kırıklar mevcutsa, anoda doğru DNA göçü gerçekleşecektir. DNA göçünün düzeyi, hücrelerde ortaya çıkan DNA hasarının düzeyine göre farklılık gösterecektir. Çekirdekten

anoda doğru DNA göçünün oluşturduğu yapı, kuyruklu yıldıza benzediği için “comet” (kuyruklu yıldız) olarak adlandırılmıştır (Tice ve diğerleri, 2000). DNA göçünün miktarı, hücredeki DNA hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Afanasieva ve diğerleri, 2018; Azqueta ve diğerleri, 2020; Moller ve diğerleri, 2020;).

Comet tekniği, öncelikle hayvan ve insan hücrelerinde uygulanmasına rağmen (kan ve sperm hücreleri), son yıllarda bitkiler ve funguslar üzerinde de uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hayvan ve bitki hücrelerinin yapısal olarak farklı oluşu, komet testinin uygulanmasında da bazı farklılıkların oluşmasına sebep olmuştur (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Son on yıldır, tek hücreli jel elektroforezi basit, hassasiyeti yüksek, çok yönlü ve hızlı sayesinde genetik ekotoksikoloji alanında kullanılan en umut verici tekniklerden biri haline gelmiştir. Comet testi, gıda katkı maddeleri, pestisitler ve diğer bazı kimyasalların genotoksik risklerini belirlemede hem *in vivo* ve hem de *in vitro* koşullarda kullanılmaktadır (Yılmaz ve diğerleri, 2019; Mamur ve diğerleri, 2020; Bacanlı ve diğerleri, 2021). Günümüzde sadece insan ve hayvan hücrelerinde değil, *Allium cepa* L., *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* gibi farklı bitkilerde de comet testi ile kimyasal maddelerin genotoksik etkileri *in vivo* koşullarda değerlendirilmektedir (Pourrut ve diğerleri, 2015; Erikel ve diğerleri, 2020; Mamur ve diğerleri, 2020).

2.7.6. *Allium* testi

Allium testi hızlı, kolay, hassas ve güvenilir bir test olması nedeniyle, çeşitli kimyasallar, çevresel kirleticiler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, pestisitler, nanopartiküller vb. maddelerin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan *in vivo* bir testtir. Etik kurul ihtiyacı olmaması ve hayvan kullanımını bertaraf etmesi nedeniyle deneysel çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır. Sahip olduğu aktivasyon enzimleri nedeniyle diğer ökaryotik test sistemleri ile karşılaştırılabilir sonuçlar vermektedir (Fiskesjö, 1988; Firstova ve diğerleri, 2019; Ünal ve diğerleri, 2020).

Allium testinde ekzojen maddelerin hem kök büyümesi üzerindeki engelleyici ve/veya tetikleyici etkileri, hem kromozomlar üzerindeki ve hem de diğer hücre evrelerindeki olumsuz etkileri incelenebilmektedir (Pesnya ve diğerleri, 2017; Özel ve diğerleri, 2018; Banti ve diğerleri, 2019).

Bu testte kullanılan *Allium cepa* L. da kromozomlar büyük ve az sayıdadır. Ayrıca kimyasallar tarafından tetiklenen kromozom sayısı ve yapısı anormallikleri ile diğer anormallikler kolayca tespit edilebilmektedir. Maliyetinin ucuz olması ve kolay yetiştirilebilir olması da *Allium cepa* L.'nın sıklıkla tercih edilmesinin sebepleri arasında yer almaktadır. *Allium* testi kullanılarak, *Allium sativum* L., *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia paludosa* ve *Hordeum vulgare* gibi başka türlerde de genotoksik araştırmalar yürütülmektedir (Fiskesjö, 1988; Leme ve diğerleri, 2008; Firbas ve Amon, 2014; Özkara ve diğerleri, 2014; Özel ve diğerleri, 2018 ; Ünal ve diğerleri, 2020).

Fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla *Allium* testinde kromozomal anormallikler, nükleer anormallikler, diğer mitotik anormallikler ve mikroçekirdek gibi oluşumlar değerlendirilmektedir. Kromozomlarda yapışkanlık, anafaz-telofazda köprü, C- mitoz veya C-metafaz, çok kutuplu metafaz ve anafaz oluşumları en çok gözlenen anormalliklerdir. C-mitoz, mitotik iğlerin inaktivasyonu ve ardından yoğunlaşmış kromozomların rastgele dağılmasından kaynaklanır. Kromozom yapışkanlığı genellikle yüksek derecede toksik ajanlara maruz kaldıktan sonra oluşan, geri dönüşü olmayan ve hücreleri ölüme götüren bir anormalliktir. Kromozomal köprü, aynı mitotik hücrede bir veya daha fazla kromozom arasında, anafaz-telofaz esnasında meydana gelen kromatin köprülerini göstermektedir. Mikronükleuslar ise, ana çekirdeğe dahil olmayan küçük çekirdeklerdir. Bunlar, metafaz sırasında yanlış hizalanmış kromozomlardan ve daha sonraki mitotik aşamalarda kromozomların her hangi bir kutba ulaşamamasından oluşabileceği gibi, sentromeri olmayan (asentrik) kromozom fragmentlerinden de oluşabilmektedir. Mikronükleuslar, bütün bir kromozomdan oluşuyorsa, maruz kalınan kimyasalın anöjenik etkili olduğu, kromozom fragmentlerinden oluşuyorsa, söz konusu kimyasalın klastojenik etkili olduğu ifade edilir. Mikronükleusların sentromer taşıyıp taşımadığı, daha farklı testlerle belirlenmektedir (Rahman ve diğerleri, 2017; Souza ve diğerleri, 2020; Maity ve diğerleri, 2020).

Allium testinde, hücre proliferasyonunu yansıtan mitotik indeks de değerlendirilmektedir. Mitotik indeksteki azalma, kullanılan kimyasalın bitki kök hücrelerinde büyüme ve gelişmeyi engellediğini ve dolayısıyla sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Mitotik indeksteki artış ise, söz konusu ajanın kontrolsüz hücre bölünmelerine sebep olduğunu göstermektedir. Mitotik indekste meydana gelen azalma ve artışların her ikisi de hem biyokimyasal düzeyde, hem DNA düzeyinde ve hem de kromozom düzeyinde hasarların

meydana geldiğine işaret etmektedir (Türkoğlu, 2012 ;Barberio ve diğerleri, 2011; Karaismailoglu, 2015; Özel ve diğerleri, 2018 Banti ve diğerleri, 2019; Souza ve diğerleri, 2020 ; Cherednichenko ve diğerleri, 2020).

Kısaca *Allium* testi ve *Allium cepa* L. bitkisi, hem mitotik indeksin, hem kromozom hasarlarının ve hem de hücre döngüsündeki diğer anormalliklerin kolayca tespit edilmesine imkan sağladığı için, bir çok kimyasal maddenin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da, son yıllarda giderek artan düzeyde üretilmeye ve kullanılmaya başlanan demir oksit nanopartikülleri ve mikropartiküllerinin genotoksik etkileri *Allium* testi ve comet testi kullanılarak incelenmiştir. Bu nanopartiküller ile ilgili bazı araştırmalar mevcut olmakla birlikte, bu ebattaki ve formdaki Fe_2O_3 NP'leri ve MP'lerinin aynı konsantrasyonlarının *Allium cepa* L. kök uçlarında birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer yandan, literatürde bu nanopartiküllerin genotoksik etkileri konusunda halen çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bu tez çalışması, bütün bu sebepler dikkate alınarak planlanmış ve gerçekleştirilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Bu tez çalışmasında canlı materyal olarak *Allium cepa* L. (mutfak soğanı büyük) kullanılmıştır. Kromozomlarının büyük ve sayısının az ($2n=16$) olması nedeniyle (Fiskesjo, 1993), bu türde kromozomlar ve kromozom anormallikleri ışık mikroskopunda kolayca gözlemlenebilmektedir (Bonciu ve diğerleri, 2018). Kolay temin edilmesi, düşük bir maliyete sahip olması, yılın hemen her döneminde çimlenebiliyor olması da *Allium cepa* L. bitkisinin çok çeşitli amaçlar için kullanılmasında büyük avantaj sağlamaktadır. Bütün bu avantajları nedeniyle, *A. cepa* L. , çevresel izlemelerde mükemmel bir biyoindikatör olarak kabul edilir (Singh ve diğerleri, 2017). Bu avantajları dikkate alınarak, bu tez çalışmasında da Fe_2O_3 nano ve mikropartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik risklerinin değerlendirilmesinde *Allium cepa* L. bitkisi tercih edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan test materyalleri ve diğer kimyasallar

Demir Oksit Nanopartikülleri (Fe_2O_3 NP)

Bu araştırmada kullanılan Fe_2O_3 NP'leri (Fe_2O_3 nanopowder) Sigma-Aldrich'den (CAS-No: 1309-37-1) temin edilmiştir. Toz halinde ve kahverengi olan bu partikülün boyutu <50 nm, molekül ağırlığı 159,69 g/mol, yüzey alanı 50-245 m^2/g 'dir.

Demir Oksit Mikropartikülleri (Bulk) (Fe_2O_3 MP)

Bu çalışmada kullanılan Fe_2O_3 bulk formu (Fe_2O_3 powder, <5 μm , ≥ 96 %) Sigma-Aldrich'den (CAS-No: 1309-37-1) temin edilmiştir. Bu partikülün molekül ağırlığı 159,69 g/mol'dür.

Kullanılan Diğer Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan potasyum metabisülfid (CAS-No: 16731-55-8) ve hidrojen peroksit (CAS-No:7722-84-1) Applichem'den, Bazik fuksin (CAS-No: 632-99-5) Carlo

Erba'dan, etanol (asbolu etanol) (CAS-No: 64-17-5) Sigma-Aldrich'ten; hidroklorik asit, glasial (asetik asit) asit, entellan ve charcoal Merck'ten temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Test materyallerinin karakterizasyonu

Ticari olarak temin edilen ve genotoksik etkileri incelenecek olan Fe_2O_3 NP ve Fe_3O_3 MP'lerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu, dinamik ışık saçılımı ve geçirimli elektron mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

Dinamik ışık saçılımı ölçümleri

Çalışmada kullanılan Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartiküllerin hidrodinamik çapları ve zeta (ζ) potansiyelleri dinamik ışık saçılımı kullanılarak belirlenmiştir. DLS ölçümleri Lazer Doppler Elektroforez tekniği ile çalışan Malvern Nano-ZS (zeta-sizer) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesi tüm numuneler (Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartikülleri) çift distile suda (0,5 g/L) hazırlanarak, ultrasonik banyo ile homojenize edilmiştir. Hidrodinamik çap, Malvern yazılımının otokorelasyon fonksiyonundan difüzyon katsayısını ve ardından Stokes Einstein denklemini kullanarak difüzyon katsayısı ile hesaplanmıştır. Sulu ortamdaki zeta potansiyeli, Henry denklemi kullanılarak elektroforetik hareketlilikten hesaplanmıştır. Partikül boyut dağılımını gösteren polidispersite indeksi (PDI) değerleri de Malvern yazılımı ile belirlenmiştir.

Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri

Fe_2O_3 NP ve MP'lerinin deiyonize sudaki fiziksel özellikleri TEM ile incelenmiştir. TEM incelemeleri için hem Fe_2O_3 NP hem de Fe_2O_3 MP'lerinin 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lık süspansiyonları DLS ölçümlerinde belirtildiği gibi hazırlanmış, süspansiyonlardan alınan bir damla örnek karbon kaplı grid üzerine damlatılarak, JEM (1400) ile farklı kV'lerde incelenmiştir.

3.2.2. Test materyallerin hazırlanması

Fe₂O₃ Nanopartiküllerinin hazırlanması

Fe₂O₃ NP'lerinin deiyonize su içerisinde hazırlanan stok süspansiyonu (750 µg/mL) ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v:50-60 Hz) yaklaşık 25-30 dakika kadar sonike edilmiştir. Sonike edilen stok süspansiyon, deiyonize su ile seyreltilerek toplamda dört farklı konsantrasyon (125, 250, 500 ve 750 µg/mL) elde edilmiştir. Her bir uygulama süspansiyonu ultrasonik banyoda 10 dakika sonike edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlar, önceden hazırlığı yapılarak kurulan deney düzeneğindeki tüplere ilave edilmeden hemen önce 5-7 dakika vortekslenmiştir. Bu çalışmada kullanılan konsantrasyonların belirlenmesinde daha önceden yapılan ön deneme sonuçları dikkate alınmıştır. Yapılan ön deneme çalışmasında, Fe₂O₃ NP'nin dört farklı konsantrasyonu (125, 500, 1000 ve 2000 µg/ml) belirlenmiştir ve *Allium cepa* L. kök uçları bu konsantrasyonlar ile muamele edilmiştir. Çalışma sonuçlarında Lc50 (letal konsantrasyon) değeri 500 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yani *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde en fazla genotoksik etkinin 500 µg/ml konsantrasyonunda olduğu, 1000 ve 2000 µg/ml konsantrasyonlarında bu etkinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Ön denemelerdeki Lc50 değeri esas alınarak, asıl deney çalışmasındaki konsantrasyonlar Lc50 değerinin katları olacak şekilde belirlenmiştir. Fakat en yüksek konsantrasyon ön deneme sonuçlarında 1000 µg/ml konsantrasyonunda çok fazla bir genotoksik etki gözlenmemesinden dolayı 750 µg/ml olarak belirlenmiştir.

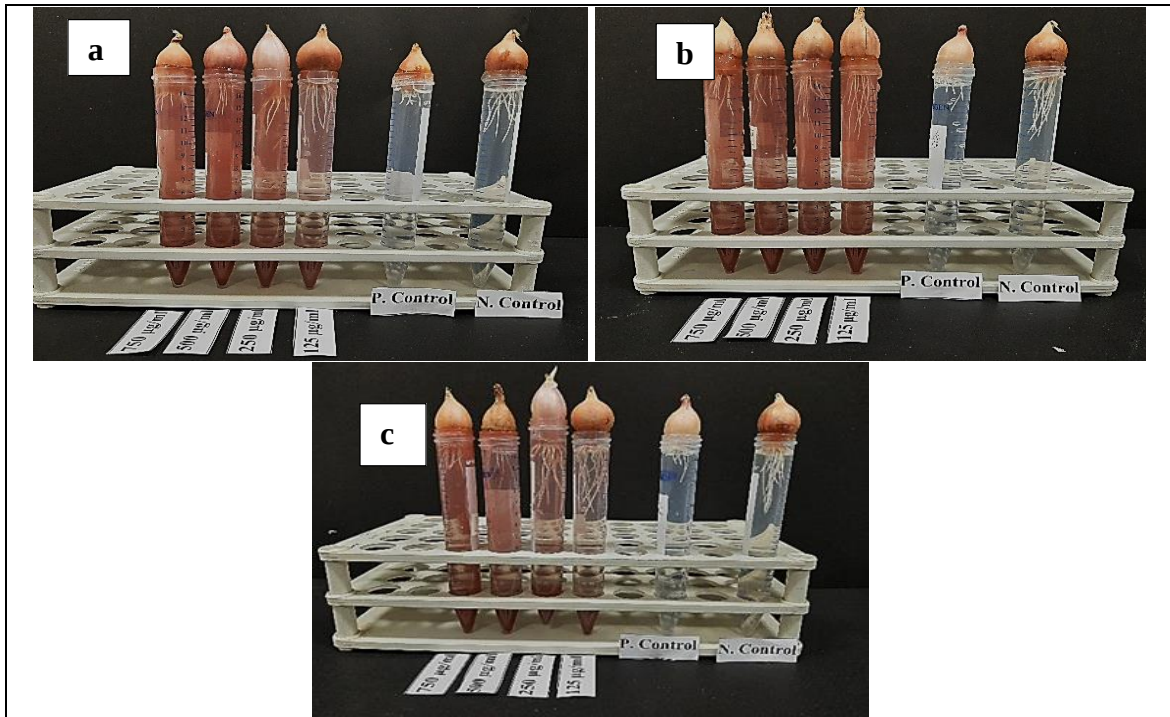
Fe₂O₃ Mikropartiküllerinin hazırlaması

Fe₂O₃ mikropartiküllerinin kullanılacak konsantrasyonları, karşılaştırma yapabilmek amacıyla nanopartiküllerle aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Önce deiyonize su içerisinde stok süspansiyon hazırlanmış (750 µg/mL) ve 25-30 dakika kadar sonike edilmiştir. Stok süspansiyon deiyonize su ile seyreltilerek uygulamada kullanılacak dört farklı konsantrasyon olan 125, 250, 500 ve 750 µg/mL'lik süspansiyonlar elde edilmiştir. Her bir uygulama süspansiyonu, ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v:50-60 Hz) 10 dakika sonike edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlar tüplere ilave edilmeden önce, nanopartikül uygulamasında olduğu gibi, 5-7 dakika vortekslenmiştir. Bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlar nanopartikül uygulamasında olduğu gibi ön deneme sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Her iki partikülün uygulamasında da negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak 0,3 M hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır.

3.2.3. Test materyallerinin *Allium cepa* L.'ya uygulanması

Demir oksit nano- ve mikropartikülleri ile muamele edilecek *A. cepa* L. yumrularının dış kabukları ve eski kökleri temizlenerek distile su içeren tüplere yerleştirilmiş ve kök uzunluğu 1-2 cm'e ulaşana kadar (yaklaşık 2 gün) çimlendirilmiştir. *A. cepa* L. kökleri, demir oksit nano- ve mikropartiküllerinin 125, 250, 500 ve 750 $\mu g/mL$ 'lik konsantrasyonları ile, 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Her iki uygulamada da, negatif ve pozitif kontrol olarak sırasıyla distile su ve 0,3M H_2O_2 kullanılmıştır. Tüplerdeki süspansiyonların buharlaşarak azalması nedeniyle, her gün, sabah ve akşam olmak üzere, tüplere, aynı teknikler ile hazırlanan süspansiyonlar ilave edilmiştir. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için toplam 7 adet *A.cepae* L. yumrusu kullanılmıştır. Bunların en sağlıklı olan 5 tanesinden 24., 48. ve 72. saatlerde kök uçları alınmıştır. Bu yumrular ile hazırlanan deney düzenekleri Resim 3.1' de gösterilmiştir.



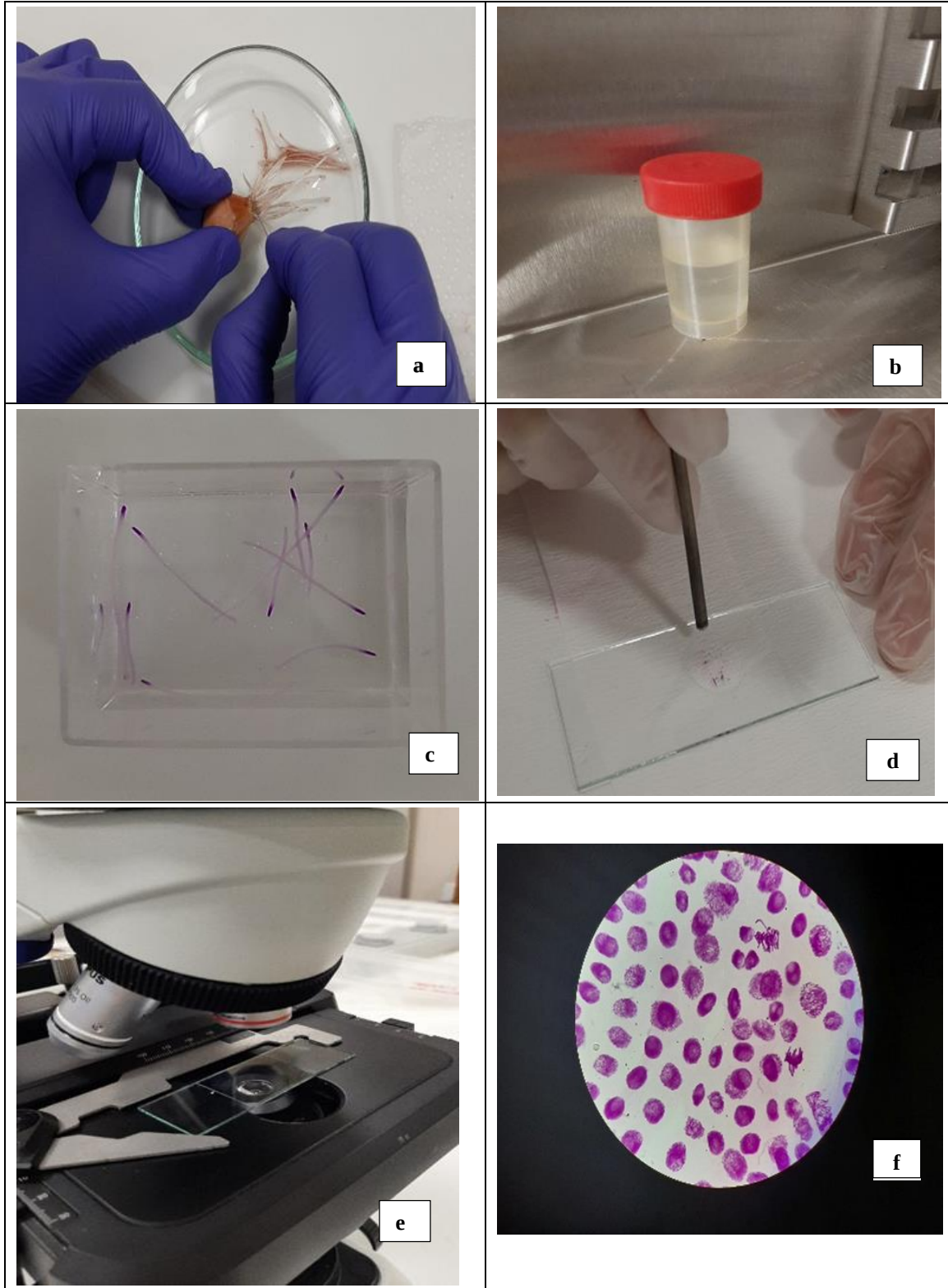
Resim 3.1. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'ya uygulamasından örnekler. a) 24 saat, b) 48 saat, c) 72 saat

Allium testi aşamasında, hem mitotoik indeksin ve hem de mitotik anormalliklerin belirlenmesi amacıyla, her bir konsantrasyon ile 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonunda, her bir soğandan kök uçları alınarak, 3:1 absolu alkol/glasiyal asetik asit karışımı içeren tüplere konularak, buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Tespit edilen kök uçları, daha sonra %70'lik alkol içerisinde depolanmış ve preparat yapımına kadar bu şekilde bekletilmiştir.

3.3. Preparatların hazırlanması

Mitotik indeks (Mİ), mitotik fazların frekansı ve mitotik anormalliklerin türü ve sayısı, *Allium* testi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan dört farklı konsantrasyonun her bir uygulama süresi için, en az 10 farklı kök ucu 60°C'de 12 dakika boyunca 1N HCl içerisinde hidroliz edilmiştir. Daha sonra kök uçları oda sıcaklığında, 1 saat boyunca Feulgende boyanmıştır. Köklerin koyu boyanan uç kısımları lam üzerine alınarak % 45'lik asetik asitte pirinç çubuk kullanılarak ezilmiştir ve lamel ile kapatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar sıvı azot içerisinde hızla dondurularak, lam ve lamel birbirinden ayrılmıştır. Preparatlar bir gece oda sıcaklığında kurutulmuş ve sonra lamların üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatılmıştır. Böylece daimi preparatlar elde edilmiştir (Ünal ve diğerleri, 2003).

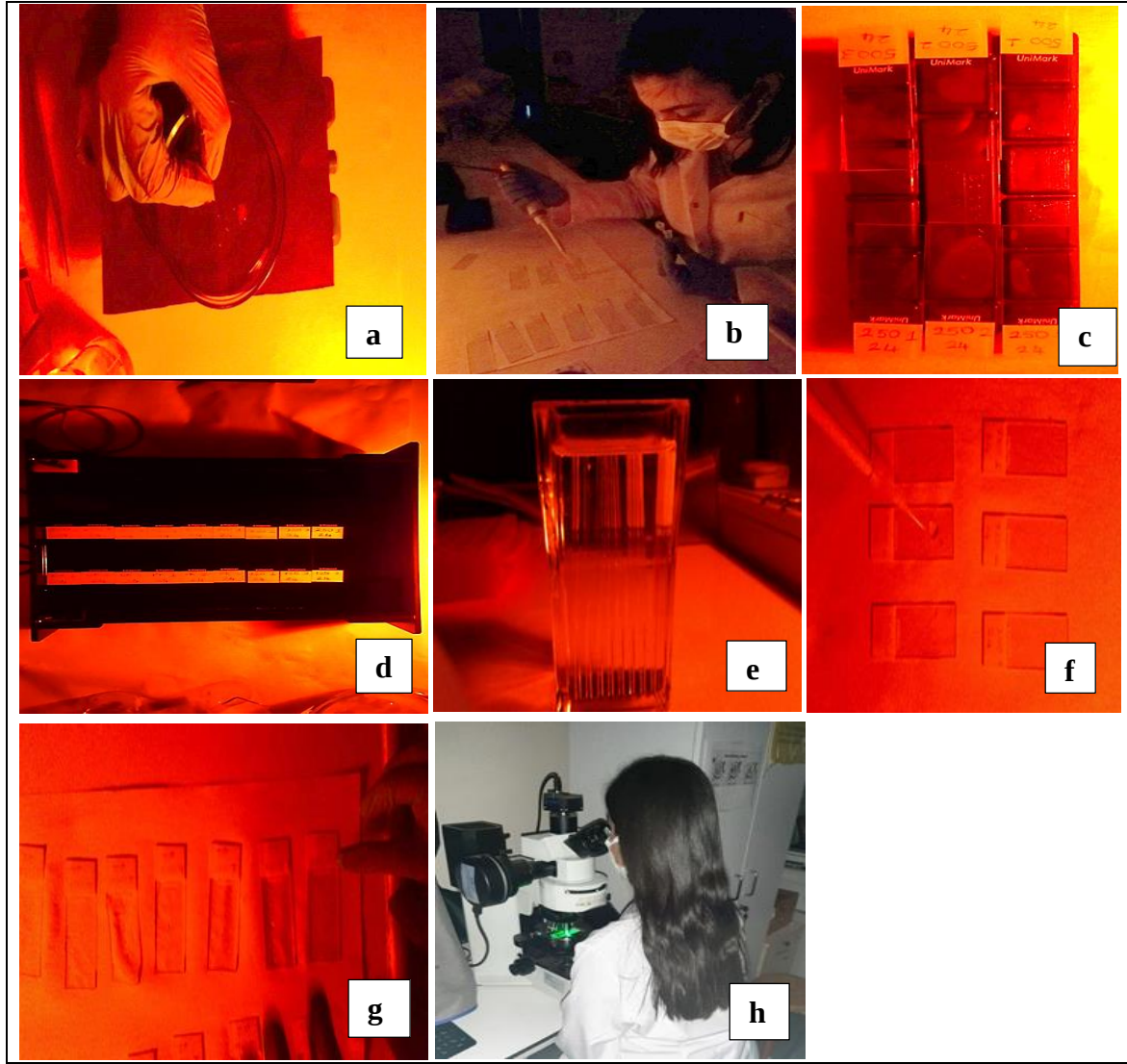
Demir oksitin nanopartikül ve mikropartikül formu ile kontrol gruplarında, her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için hazırlanan her bir preparatta 500 hücre olmak üzere 10 preparatta toplam 5.000 hücre incelenmiştir. Bu hücreler içinde bölünmeyen ve bölünmekte olan hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Bölünen hücrelerin mitoz bölünmedeki fazları ve oluşan anormallikler incelenmiş ve kayıtları tutulmuştur. Mitotik indeks bölünmekte olan hücrelerin, incelenen tüm hücreler içindeki frekansından yararlanarak tespit edilmiştir. Bölünen hücrelerdeki anormallik frekansı ile hücre başına düşen anormallik sayıları da tespit edilmiştir. Uygulama gruplarından elde edilen mitotik indeks değerlerinin kontrollerdeki değerlerden farklı olup olmadığını belirlemek amacıyla z-testi, mitotik anormalliklerin frekanslarının karşılaştırılmasında ise χ^2 - testi kullanılmıştır (Çalbay, 2014). Tüm preparat incelemeleri OLYMPUS CX23 mikroskopta X40 büyütmede yapılmıştır. *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerindeki anormallikler de OLYMPUS CX23 mikroskop ile X40 büyütmede incelenmiştir ve Leica DFC320 kamera ile X100 büyütmede çekilmiştir.



Resim 3.2. *Allium cepa* L. kök uçlarından preparatların hazırlanması. a) Kök uçlarının alınması, b)Hidroliz, c) Feulgen ile boyama, d) Ezme preparatların hazırlanması, e-f) Mikroskopta inceleme.

Comet Testi

Allium testinde olduğu gibi, *Allium cepa* L. yumruları, 2-3 gün boyunca distile su ile oda sıcaklığında çimlendirilmiştir. Kökler 1-2 cm uzunluğuna ulaştığında, demir oksitin nano-ve mikropartiküllerinin 125, 250, 500 ve 750 µg/mL’lik suspnsiyonları ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol olarak sırasıyla distile su ve 0,3 M H₂O₂ kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon ve uygulama süresinden ve kontrollerden taze kesilmiş yaklaşık 10-12 kök ucu, içinde 400 µL soğuk 0,4 M Tris-HCl tamponu bulunan ve buz üzerindeki petri kabı içine alınmıştır. Bu noktadan itibaren bütün uygulamalar kırmızı loş ışıktaki gerçekleştirilmiştir. Bu kök uçları buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra, keskin bir jilet ile çok küçük parçalara ayrılmıştır. Petri kabında izole çekirdekleri ihtiva eden süspansiyon temiz bir ependorfa alınmıştır. Bu stok nükleer süspansiyonun 90 µL’si, % 0,75’lik LMA’nın (Düşük erime noktasına sahip agaroz) (Tris-HCl ile hazırlanmış) 90 µL’si ile temiz bir ependorfta karıştırılmıştır. Bu süspansiyon, daha önce % 1’lik NMA (Normal erime noktasına sahip agaroz) ile iki kat kaplanmış lamaların üzerine yayılmış ve lamel ile kapatılarak 5 dakika boyunca buz üzerinde tutulmuştur. Ardından lamel kaldırılmış ve lam üzerine % 0,75’lik LMA’dan 90 µL yayılmış ve yeniden lamel kapatılarak 5 dakika daha buz üzerinde bekletilmiştir. Preparatlar toplamda dört kat agoroz ile kaplanmıştır. Daha sonra lamel kaldırılmış ve lamalar, içinde elektroforez tamponu bulunan komet tankına dizilmiştir. Lamalar elektroforez tamponunda 20 dakika bekletildikten sonra, elektroforez işlemi 27 V, 280 mA’de 20 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından nötralizasyon tamponunda (0,4 M Tris, pH=7.5) 3 defa yıkanan lamalar, EtBr (Etidyum Bromür) (1:9 EtBr: distile su) ile boyanmıştır. DNA hasarlarının tespit edilmesinde, her bir uygulama konsantrasyonu ve süresinden ve kontrol gruplarından hazırlanan en az 2 preparatta toplam 50 çekirdek/nükleoit değerlendirilmiştir. İncelemeler floresan ataçmanlı (50 W mercury lamp) Olympus BX51 flöresan mikroskopta (excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm), “Comet Assay IV”, Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak, x400 büyütmede incelenmiştir. Çekirdeklerin/nukloitlerin hasar dereceleri, % kuyruk uzunluğu, % kuyruk yoğunluğu ve % kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiştir. Uygulama gruplarından elde edilen komet verilerinin kontrol gruplarından elde edilenlerle karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Comet testinin uygulama aşamaları, Resim 3.3’te gösterilmiştir.



Resim 3.3. Comet testinin aşamaları. a) Kök uçlarının Tris-HCl tamponunda dilimlenmesi, b) Nükleer süspansiyon ve LMA karışımının lamlara yayılması, c) Lamaların lamel ile kapatılarak, 5 dakika buz üzerinde bekletilmesi, d)Elektroforez, e) Nötralizasyon, f) EtBr ile boyama, g) Lamaların üzerine lamel kapatılması, h) Floresan mikroskopta sayım yapılması

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

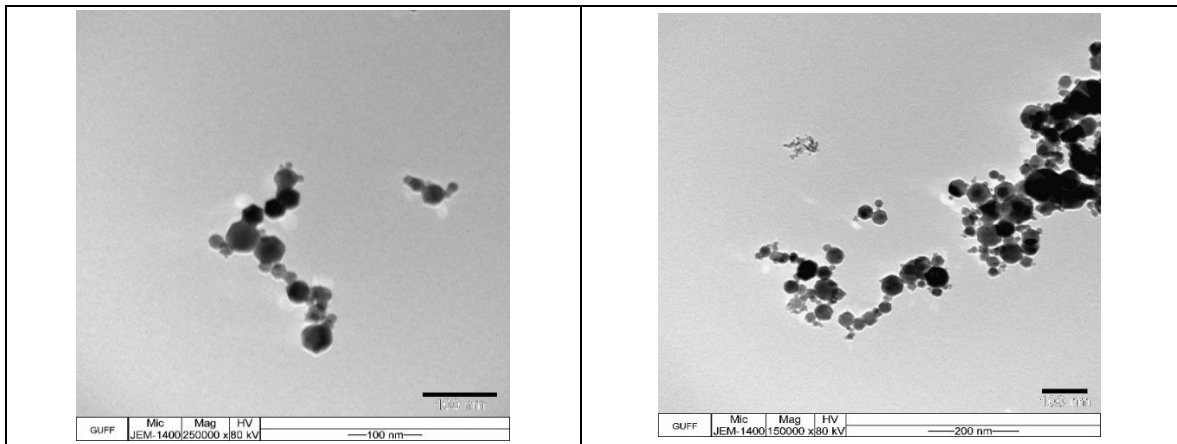
4.1.2. Geçirimli elektron mikroskobu analizleri

Bu çalışmada kullanılan Fe_2O_3 nanopartikülleri ile Fe_2O_3 mikropartiküllerinin geçirimli elektron mikroskobundaki (Transmission Electron Microscopy-TEM) görüntüleri Resim 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir. Fe_2O_3 NP’lerinin genel olarak küresel ve altıgen şeklinde oldukları, Fe_2O_3 MP’lerinin ise genel olarak küresel olmalarına rağmen, şekilsiz yapıların da oldukça yoğun bulunduğu tespit edilmiştir.

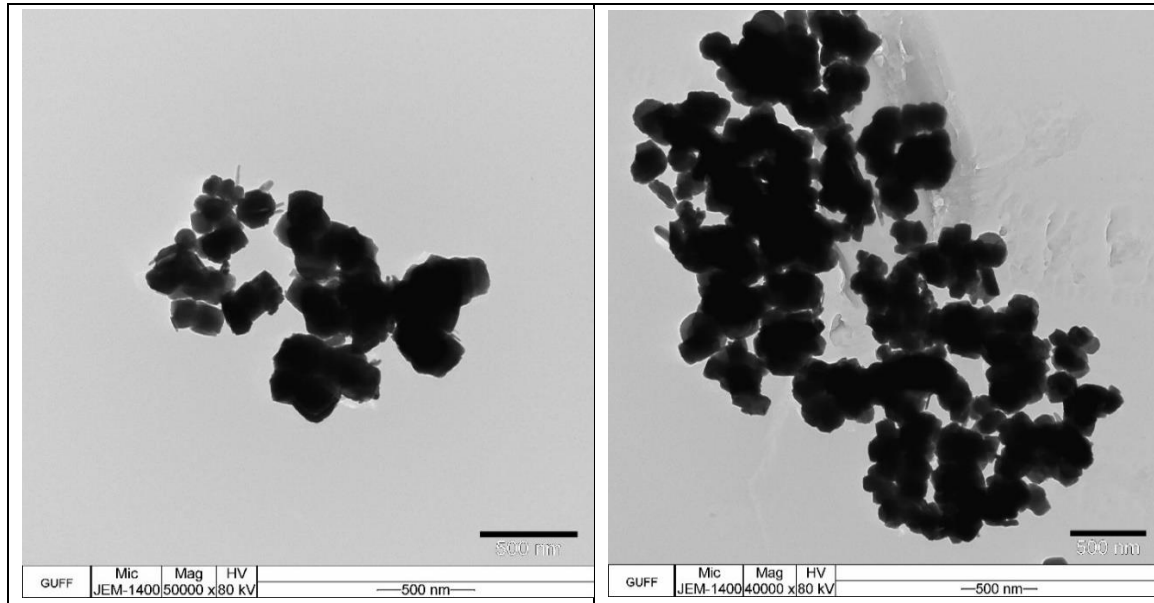
Fe_2O_3 nanopartikülleri ile Fe_2O_3 mikropartiküllerinin ortalama partikül boyutu ile, bu partiküllerin en büyük ve en küçük boyutları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

TEM görüntülemesinde, Fe_2O_3 NP’lerinin genel olarak küresel ve altıgen şeklinde oldukları (Resim 4.1), Fe_2O_3 MP’lerinin ise genel olarak küresel olmalarına rağmen, şekilsiz yapıların da oldukça yoğun bulunduğu tespit edilmiştir (Resim 4.2)

Fe_2O_3 NP’leri, 2,97-135,15 nm arasında dağılım göstermekte olup, ortalama boyutu $44,48 \pm 6,7$ nm’dir. Fe_2O_3 MP’lerinin ortalama boyutu $210,68 \pm 95,8$ nm olup, en küçük ve en büyük partiküllerin boyutunun 71,5-479,67 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Fe_2O_3 NP’lerinin 217,72 nm ebatında, Fe_2O_3 MP’lerinin ise 1294,70 nm büyüklüğünde aglomeratlar oluşturduğu da gözlenmiştir.



Resim 4.1 Fe_2O_3 NP’lerinin TEM görüntüsü



Resim 4.2. Fe₂O₃ MP'lerinin TEM görüntüsü

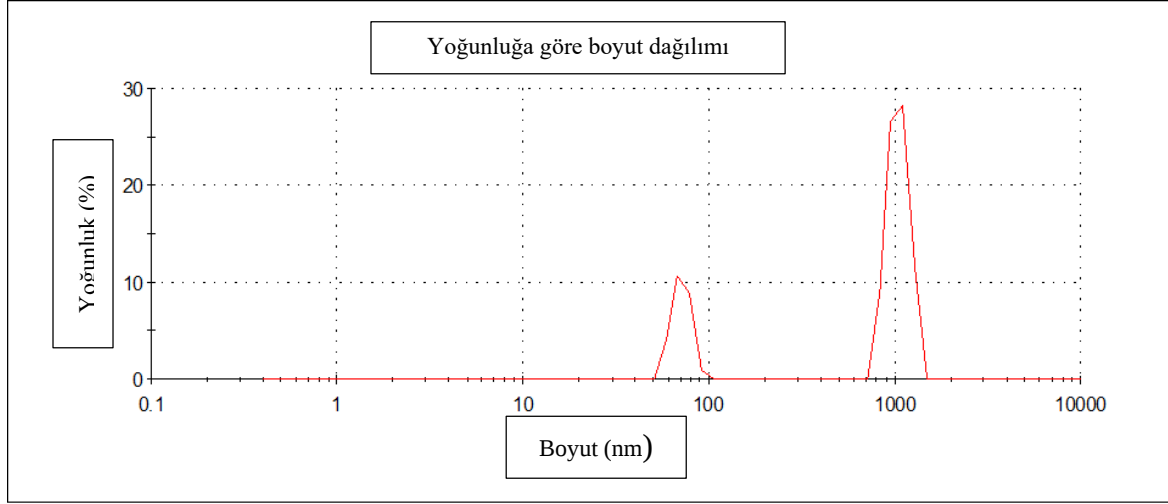
Çizelge 4.1. Test materyallerinin TEM karakterizasyonu

	Ortalama boyut (nm)	En küçük boyut (nm)	En büyük boyut (nm)
Fe ₂ O ₃ NP	44,48 ± 6,7	2,97	135,15
Fe ₂ O ₃ MP	210,68 ± 95,8	71,5	479,67

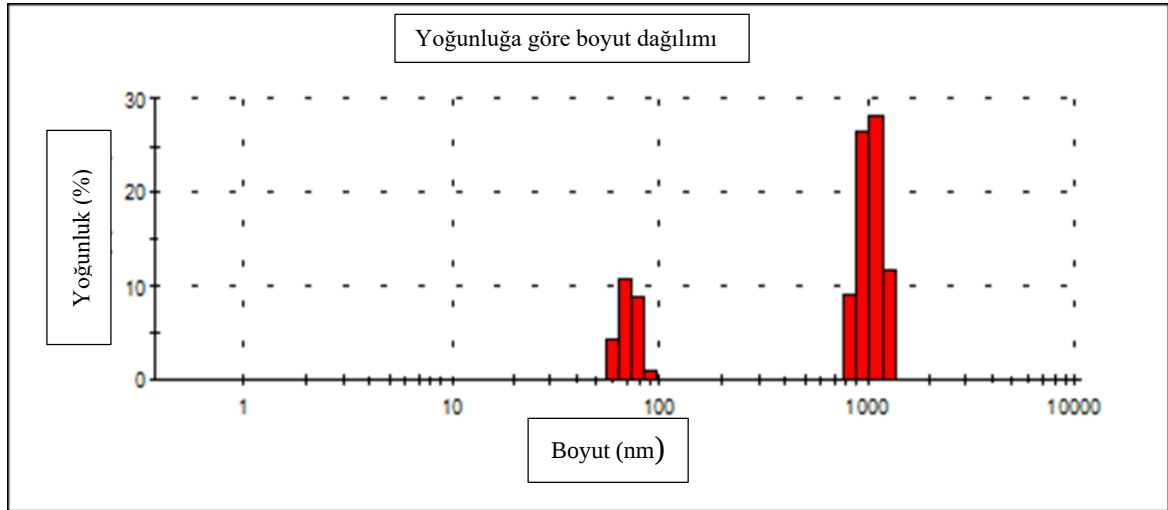
4.1.3. Dinamik ışık saçılımı analizi

Nanopartiküllerin ve mikropartiküllerin deiyonize sudaki hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri Dinamic Light Scattering (DLS) tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Yapılan incelemelerde Fe₂O₃ NP'lerinin hidrodinamik çapının iki farklı dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu dağılımlardan birincisinin ortalaması 1046 ± 137 nm ve ikincisinin ise 71 ± 8 nm olduğu tespit edilmiştir. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin de iki farklı dağılım grubu oluşturduğu gözlenmiştir. Bunlardan birincisinin ortalaması 695 ± 388 nm ve ikincisinin ise 4927 ± 645 nm olduğu belirlenmiştir. Fe₂O₃ NP'lerinin zeta potansiyeli $12,8 \pm 4,2$ mV (pH=5,1), Fe₃O₃ MP'lerinin zeta potansiyeli ise $18,8 \pm 8,4$ mV (pH=5,2) olarak bulunmuştur.

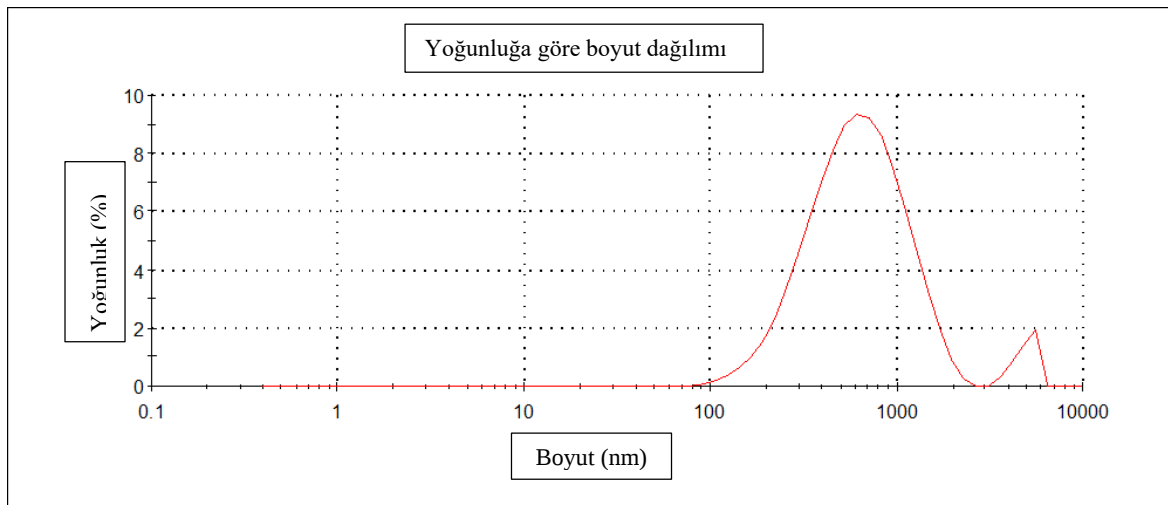
Fe₂O₃ NP'lerinin polidispersite indeksi (polydispersity index) PDI= 1,0 olup, çok geniş partikül dağılımına sahiptir. Fe₃O₃ MP'lerinin PDI= 0,3 olup, geniş partikül dağılımına sahiptir.



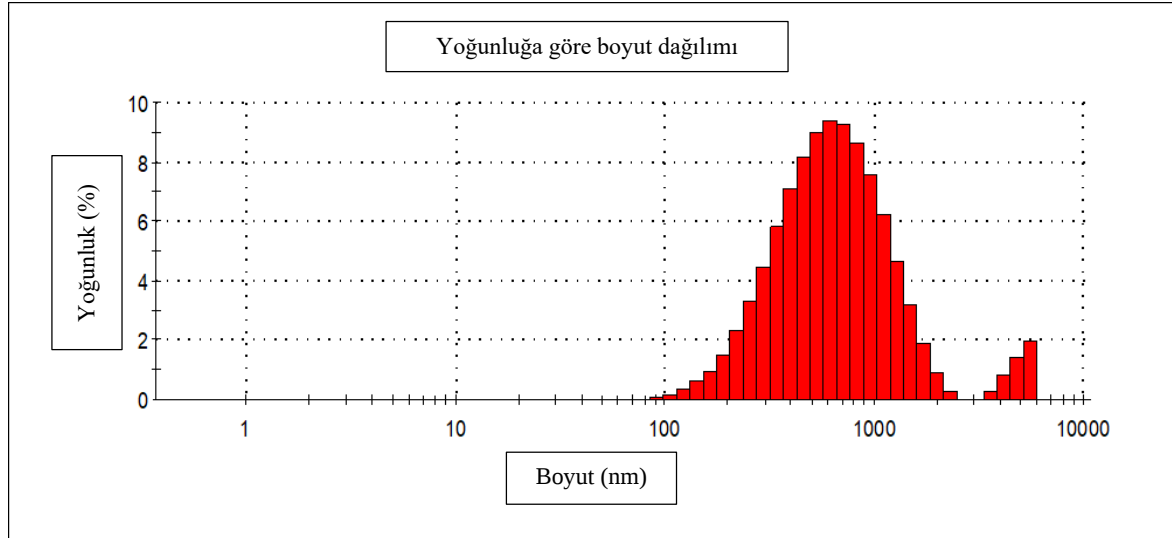
Şekil 4.1. Fe₂O₃ NP'lerinin hidrodinamik çapının frekans eğrisi



Şekil 4.2. Fe₂O₃ NP'lerinin hidrodinamik çapının bar grafiği



Şekil 4.3. Fe₂O₃ MP'lerinin hidrodinamik çapının frekans eğrisi



Şekil 4.4. Fe₂O₃ MP'lerinin hidrodinamik çapının bar grafiği

Çizelge 4.2. Fe₂O₃ nanopartikül ve mikropartiküllerinin yoğunlukları, hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri

	Yoğunluk(%)		Hidrodinamik çap (nm)	Zeta potansiyeli (mV)
Fe ₂ O ₃ NP	Dağılım aralığı 1	75,5	1046 ± 137	12,8 ± 4,2
	Dağılım aralığı 2	24,5	71 ± 8	
Fe ₂ O ₃ MP	Dağılım aralığı 1	95,6	695 ± 388	18,8 ± 8,4
	Dağılım aralığı 2	4,4	4927 ± 645	

4.2. Fe₂O₃ Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da Mitotik İndeks Üzerine Etkileri

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 125, 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarına 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılan *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 24 saatlik uygulamasında, tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla mitotik indekste bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalma, 250 µg/mL dışındaki tüm konsantrasyonlarda anlamlı düzeydedir. 48 ve 72 saatlik uygulamalarda kullanılan tüm konsantrasyonlar da, mitotik indeksi negatif kontrole kıyasla anlamlı şekilde azaltmıştır.

Fe_2O_3 nanopartiküllerinin mitozun farklı evrelerinin (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) frekansı üzerine olan etkileri de incelenmiştir. 24 saatlik uygulamada, profaz frekansında sadece 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlı olmayan azalmalar gözlenmiştir. Metafaz frekansında tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla bir artış gözlenmiştir. Bu artış 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamada anlamlıdır. Anafaz frekansında, 750 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre bir artış gözlenirken, telofaz frekansında 250 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda bir düşüş tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulamada profaz frekansında, 500 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre artış olmuştur. Metafaz frekansında, negatif kontrole kıyasla 125 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda hafif bir düşüş, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda ise küçük bir artış gerçekleşmiştir. Anafaz frekansında, negatif kontrole kıyasla, tüm konsantrasyonlarda düşüş olmuştur. Bu düşüş, 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamada anlamlıdır. Telofaz frekansında negatif kontrole göre bazı konsantrasyonlarda anlamsız artış (125 ve 500 $\mu\text{g/mL}$), bazı konsantrasyonlarda anlamsız azalma (250 ve 750 $\mu\text{g/mL}$) tespit edilmiştir. 72 saatlik uygulamada profaz frekansında, 125 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda negatif kontrole göre bir artış, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda ise bir azalma olduğu gözlenmiştir. 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamadaki düşüş anlamlıdır. Metafaz frekansında ise tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre anlamsız artışlar gözlenmiştir. Anafaz ve telofaz frekansında 125 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulamalarda negatif kontrole göre hafif bir azalma gerçekleşirken, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda küçük bir artış tespit edilmiştir.

Allium cepa kök uçlarının, Fe_2O_3 mikropartiküllerinin 125, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucunda, hücrelerde gözlenen mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Demir Oksit (Fe_2O_3) mikropartiküllerinin kullanılan bütün konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda, negatif kontrole kıyasla mitotik indekste konsantrasyon artışına bağlı anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur (48 saatlik uygulamada, 125 $\mu\text{g/mL}$ hariç) . Fe_2O_3 MP'leri *Allium cepa* L.'da, 24 saatlik uygulamada 125 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla profaz frekansında bir miktar düşüş oluştururken, 250 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar bir miktar artışa sebep olmuştur. Metafaz frekansında, 250 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla küçük bir azalma gözlenmiştir. Anafaz frekansında, negatif kontrole kıyasla 250 ve

750 µg/mL’lik konsantrasyonlarda küçük azalışlar, 125 ve 500 µg/mL’de ise küçük artışlar tespit edilmiştir. Telofaz frekansında ise 750 µg/mL dışındaki tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla artış olduğu gözlenmiştir. Ancak bu artış ve azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı değildir. 48 saatlik uygulamada, tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla profaz frekansında azalma, metafaz frekansında ise artış olduğu tespit edilmiştir. Metafazdaki artış, 750 µg/mL’de anlamlı düzeydedir. Anafazda (125 µg/mL hariç) ve telofazda, tüm konsantrasyonlar, negatif kontrole kıyasla artışlara sebep olmuştur. En uzun muamele süresi olan 72 saatlik uygulamada, Fe₂O₃ MP’leri *Allium cepa* da, tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla, profaz frekansında azalmaya, metafaz ve anafaz frekansında ise artışa sebep olmuştur. Fe₂O₃ MP’leri, telofazda, tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole kıyasla, 125 ve 750 µg/mL’lik konsantrasyonlarda artış oluştururken, 250 ve 750 µg/ml konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmuştur. 72 saatlik uygulamadaki artış ve azalmalar anlamlı değildir.

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin karşılaştırmalı olarak 24 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik indeks üzerine etkisi şekil 4.5’de, 48 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik indeks üzerine etkisi şekil 4.6’da ve 72 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik indeks üzerine etkisi şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L. da mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks üzerine etkisi

Konsantrasyon (µg/mL)	İncelenen hücre sayısı	Bölünen hücre sayısı	Profaz (%)	Metafaz (%)	Anafaz (%)	Telofaz (%)	Mİ %±SE
24 saat							
Negatif Kontrol	5000	516	50,80	24,20	9,30	15,70	10,32±0,92
Pozitif Kontrol	5000	485	68,85	20,00	5,80	5,35 ^a	9,7±0,93
125	5000	417	42,92	33,33	14,40	9,35	8,34±0,87***
250	5000	476	41,70	25,45	17,05	15,80	9,5±0,92
500	5000	349	45,00	26,93 ^b	14,62	13,45	6,98±0,80***
750	5000	389	53,50 ^b	27,25	9,25	10,00	7,78±0,84***
48 saat							
Negatif Kontrol	5000	603	46,10	28,35	15,95	9,60	12,06±0,31
Pozitif Kontrol	5000	249	53,80	32,55	8,85	4,80	4,98±0,21***
125	5000	450	55,55	25,55	7,80	11,10	9±0,27***

Çizelge 4.3.(devamı) Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L. da mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks üzerine etkisi

250	5000	303	51,15	35,00	6,25 ^a	7,60	6,06±0,23***
500	5000	400	45,00	30,50	13,25	11,25	8±0,26***
750	5000	403	58,80	17,85	14,40	8,95	8,06±0,26***
72 saat							
Negatif Kontrol	5000	593	56,85	20,05	12,65	10,45	11,86±0,30
Pozitif Kontrol	5000	326	64,40	17,20	11,05	7,35	6,52±0,24***
125	5000	522	58,62	26,63	7,30	7,45	10,44±0,29***
250	5000	513	47,75	27,90	13,85	10,50	10,26±0,29***
500	5000	404	35,60 ^a	34,40	17,32	12,63	8,08±0,26***
750	5000	381	56,95	23,35	10,50	9,20	7,62±0,26***

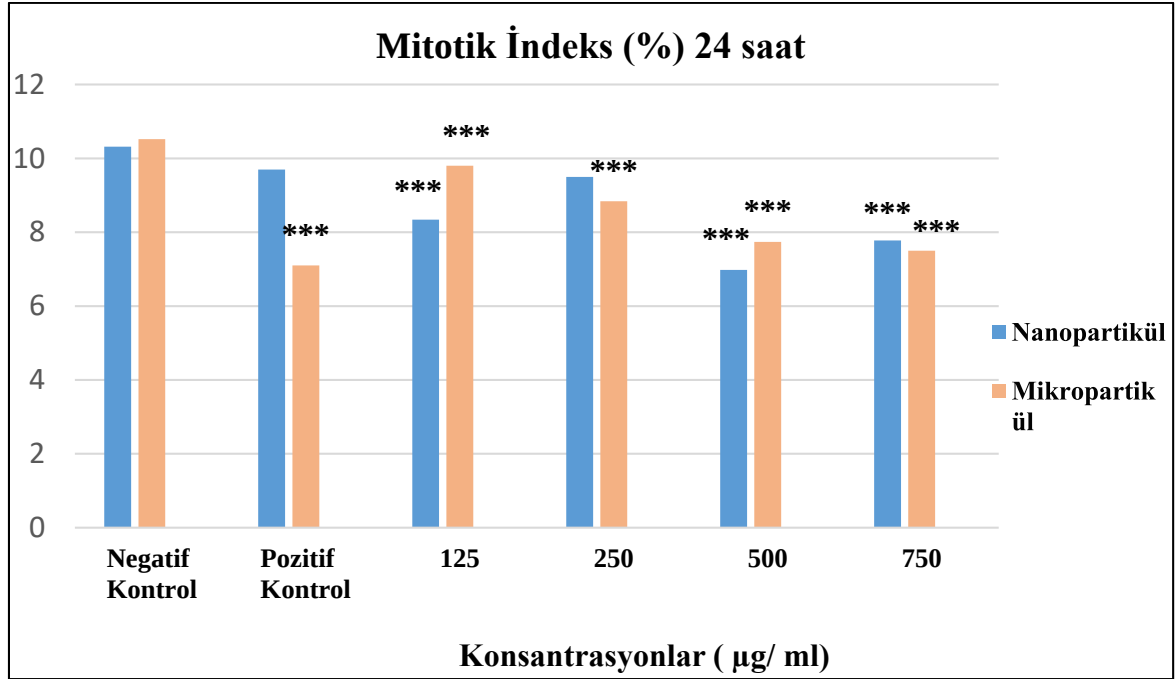
^aNegatif kontrole göre anlamlı, p<0,05 (x² testi) ^bNegatif kontrole göre anlamlı, p<0,001(x²testi)

***p<0,001 (z testi, negatif kontrole göre anlamlı)

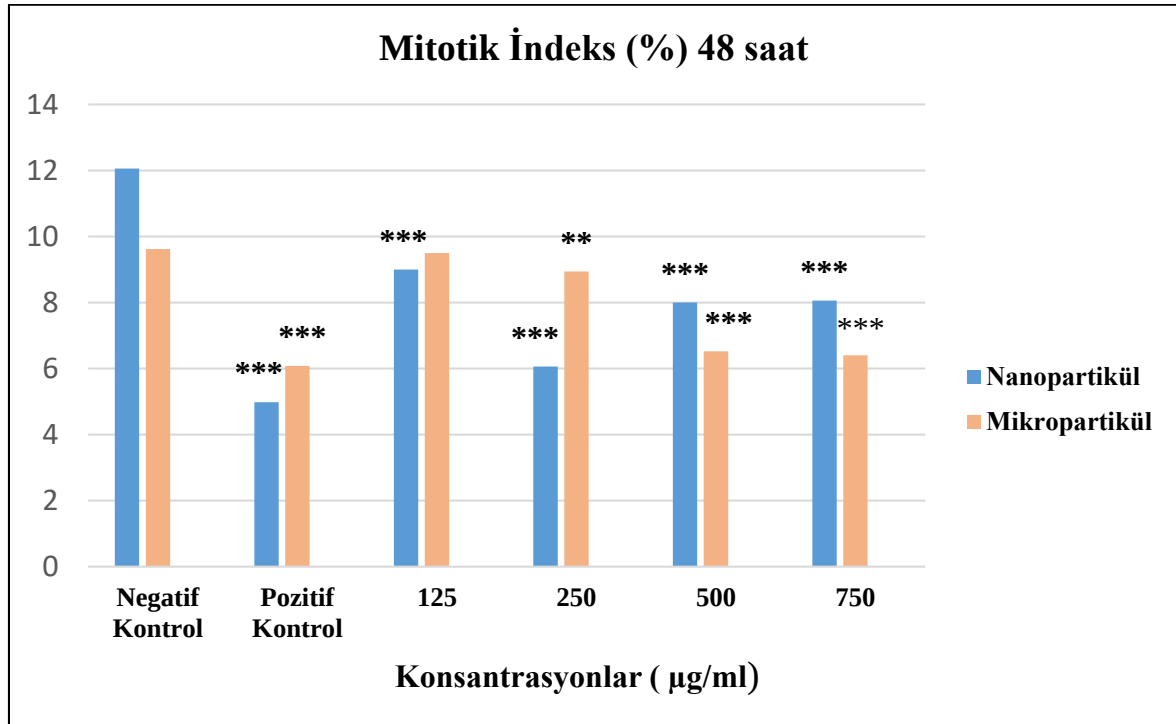
Çizelge 4.4. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L. da mitotik fazların frekansı ve mitotik indeks üzerine etkisi

Konsantrasyon (µg/ml)	İncelenen hücre sayısı	Bölünen hücre sayısı	Profaz (%)	Metafaz (%)	Anafaz (%)	Telofaz (%)	Mİ ±SE
24 saat							
Negatif Kontrol	5000	526	54,75	23,40	11,78	10,07	10,52 ± 0,29
Pozitif Kontrol	5000	355	59,15	25,92	8,73	6,20	7,1 ± 0,25***
125	5000	490	52,45	25,10	11,83	10,62	9,8 ± 0,28***
250	5000	442	55,20	22,62	11,76	10,42	8,84 ± 0,27***
500	5000	387	50,65	26,35	12,15	10,85	7,74 ± 0,26***
750	5000	375	59,73	24,53	10,41	5,33	7,5 ± 0,25***
48 saat							
Negatif Kontrol	5000	481	67,56	14,76	11,85	5,83	9,62±0,20
Pozitif Kontrol	5000	304	50,35	25,65	16,45	7,55	6,08±0,23***
125	5000	475	53,33	26,72	10,95	9,00	9,5±0,28
250	5000	447	59,06	19,92	12,52	8,50	8,94±0,27**
500	5000	326	57,98	22,70	12,57	6,75	6,52±0,24***
750	5000	320	50,00	28,12 ^a	13,13	8,75	6,4±0,24***
72 saat							
Negatif Kontrol	5000	535	75,32	11,02	5,42	8,22	10,7 ± 0,29
Pozitif Kontrol	5000	286	65,38	19,22	9,80 ^b	5,60	5,72 ± 0,23***
125	5000	428	60,28	16,58	11,22	11,92	8,56 ± 0,27***
250	5000	380	62,90	21,05	8,43	7,62	7,6 ± 0,25***
500	5000	339	61,95	19,46	12,68	5,91	6,78 ± 0,24***
750	5000	336	63,70	15,18	11,60	9,52	6,72 ± 0,24***

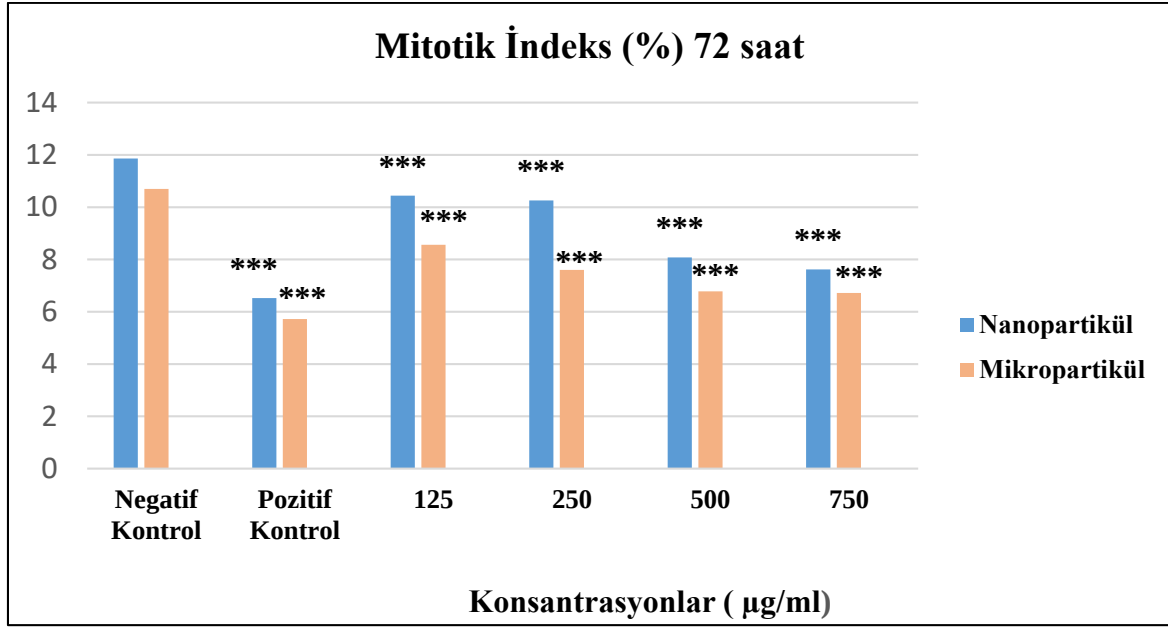
^aNegatif kontrole göre anlamlı, p<0,05 (x² testi),) ^bNegatif kontrole göre anlamlı, p<0,001(x² testi) ** p<0,01 (x² testi, Negatif kontrole göre anlamlı), *** p<0,001 (z testi, Negatif kontrole göre anlamlı)



Şekil 4.5. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 24 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L.'da mitotik indeks üzerine etkisi



Şekil 4.6. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 48 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L.'da mitotik indeks üzerine etkisi



Şekil 4.7. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 72 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L.'da mitotik indeks üzerine etkisi

4.3. Fe₂O₃ Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da Mitotik Anormallikler Üzerine Etkileri

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 125, 250, 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarının *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonucunda mitoz bölünmenin farklı evrelerinde (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) meydana getirdiği anormallikler ve bunların frekansları Çizelge 4.5' de gösterilmiştir. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin bütün konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde mitotik anormalliklerin frekansını negatif kontrole göre anlamlı düzeyde arttırmıştır. 24 saatlik uygulamada, Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 125 µg/mL'lik konsantrasyonda oluşturduğu anormallik frekansları negatif kontrole kıyasla yaklaşık 3 kat kadar artış gösterirken, 250 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyondaki artış 4 kattan daha yüksektir. 750 µg/mL'lik konsantrasyonunda ise bu frekans 5 kattan daha yüksek düzeye ulaşmıştır. 48 saatlik muamelede, Fe₂O₃ nanopartikülleri, mitotik anormalliklerin frekansını, negatif kontrole kıyasla, 125 ve 250 µg/mL'lik uygulamalarda 3 kattan daha fazla, 500 µg/mL'lik konsantrasyonda 6 kattan daha fazla ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonda ise 10 kat kadar arttırmıştır. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L. kök uçlarına 72 saatlik uygulaması sonucunda, 125 µg/mL'lik konsantrasyonun, mitotik anormalliklerin frekansında oluşturduğu artış, negatif kontrole göre anlamlı değilken, 250 µg/mL'lik konsantrasyonda negatif kontrole kıyasla 2

katından daha fazla, 500 µg/mL’lik konsantrasyonda 3 katından daha fazla ve 750 µg/mL’lik konsantrasyonda yaklaşık 3 kat kadar anormallik olduğu gözlenmiştir.

Fe₂O₃ nanopartikülleri mitozun bütün fazlarında çeşitli anormallikler oluşturmuştur. Bu partiküller, profaz safhasında sadece yapısal bozulmalara sebep olmuştur. Metafazda en fazla görülen anormallik kromozomlarda yapışıklıktır. Gözlenen diğer anormallikler c- metafaz ve yapısı bozulmuş metafazdır. Anafaz-telofazda en fazla gözlenen anormallik ileri kromozomlardır. Diğer anormallikler ise frekanslarına göre sırasıyla yıldız anafaz, kromozom köprüsü ve geri kalmış kromozomdur.

Fe₂O₃ mikopartiküllerinin bütün konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde kromozomal anormalliklerin frekansını kontrole göre arttırmıştır. Fe₂O₃ mikopartiküllerinin 24 saatlik muamelesinde, 750 µg/mL’lik konsantrasyonda oluşturduğu anormalliklerin frekansı, negatif kontrole kıyasla 2 katından daha fazla artış göstermiş olup, bu artış anlamlı düzeydedir. Benzer şekilde 48 ve 72 saatlik muamelede de, 750 µg/mL’lik konsantrasyonda ortaya çıkan anormalliklerin frekansı, negatif kontrole göre 2 katından fazla ve anlamlı düzeydedir.

Fe₂O₃ mikropartikülleri, nanopartikül formda olduğu gibi, profazda sadece yapısal bozulmalara sebep olmuştur. Metafazda en fazla görülen anormallik kromozomlarda yapışıklık sonra sırasıyla c- metafaz ve yapısal bozukluktur. Anafaz-telofazda en fazla gözlenen anormallik kromozom köprüsüdür. Diğer anormallikler ise frekanslarına göre sırasıyla ileri gitmiş kromozom, geri kalmış kromozom ve yıldız anafazdır (Çizelge 4.6).

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin karşılaştırmalı olarak 24 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi şekil 4.8’de, 48 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi şekil 4.9’da ve 72 saatlik uygulamasının *Allium cepa* L.’da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi şekil 4.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L. da farklı fazlardaki mitotik anormallikler ve frekansları üzerine etkisi

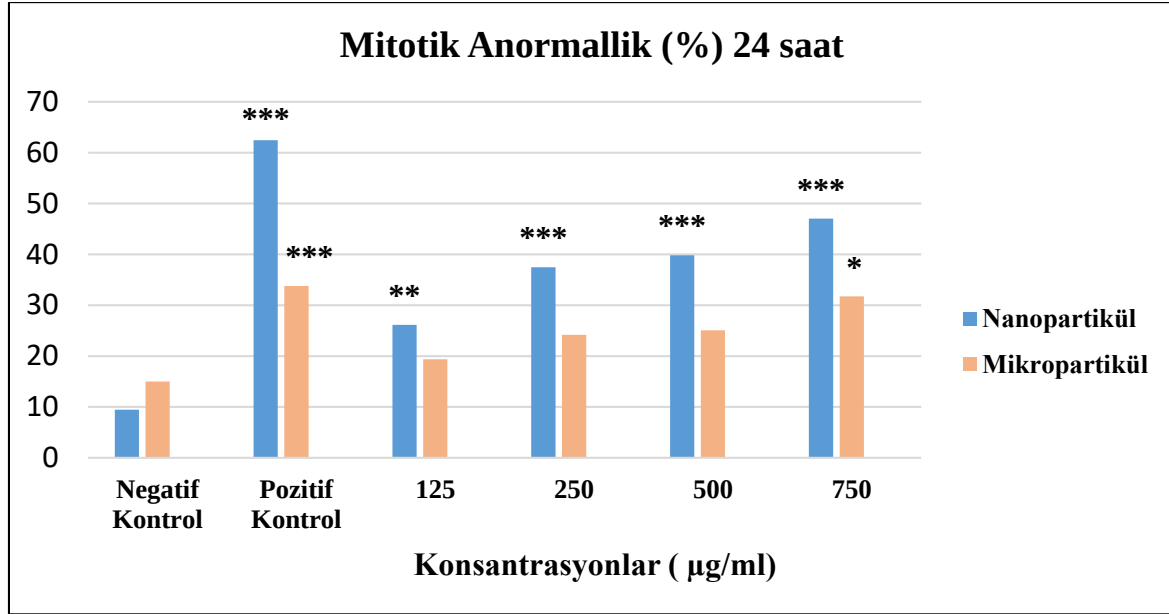
		Profaz				Metafaz				Anafaz-Telofaz				Toplam	
Süre/saat	µg/mL	Yapısı bozulmuş profaz	C-metafaz	Yapışıklık	Yapısı bozulmuş	İleri gitme	Köprü	Geri kalmış kromozom	Yıldız anafaz	Anormallik (%)					
24	Negatif Kontrol	3,46	0,20	0,95	-	3,30	0,96	0,20	0,38	9,45					
	Pozitif Kontrol	37,31	0,20	13,00	2,06	4,13	1,65	2,06	2,06	62,47***					
	125	6,00	2,15	6,00	2,15	2,63	2,63	3,13	1,45	26,14**					
	250	6,30	0,85	9,70	2,95	8,00	4,00	3,15	2,52	37,47***					
	500	6,90	0,85	13,75	0,57	7,75	3,72	2,56	3,72	39,82***					
	750	15,10	1,00	13,05	3,85	7,45	2,50	0,26	3,83	47,04***					
48	Negatif Kontrol	2,15	0,16	1,65	-	0,85	1,16	-	0,16	6,13					
	Pozitif Kontrol	29,73	-	23,70	0,40	9,63	8,83	2,40	17,67	92,36***					
	125	9,11	2,22	4	-	2,90	1,33	1,77	-	21,33***					
	250	8,25	1,65	4,95	-	3,30	1,65	1,32	0,99	22,11***					
	500	15,75	0,75	12,75	-	6,00	2,25	1,75	1,50	40,75***					
	750	21,60	2,50	13,63	-	7,30	7,00	7,00	3,00	62,03***					
72	Negatif Kontrol	1,18	-	2,55	1,01	3,70	2,02	0,33	2,36	13,15					
	Pozitif Kontrol	41,10	1,22	4,90	-	6,13	1,25	0,92	6,13	61,65***					
	125	5,75	1,35	3,83	0,20	3,06	1,35	1,72	2,85	20,11					
	250	16,95	0,40	3,32	0,80	6,62	0,77	1,16	2,72	32,74**					
	500	13,85	0,50	12,37	2,22	10,90	2,72	0,99	5,95	49,50***					
	750	13,38	0,26	8,40	1,05	7,87	0,26	2,63	3,15	37,00***					
Toplam anormallik sıklığı (%)		41,78	2,67	12,96	2,85	16,73	7,58	5,48	9,95						

*** p<0,001 (x² testi, kontrole göre anlamlı) ** p<0,01 (x² testi, kontrole göre anlamlı)

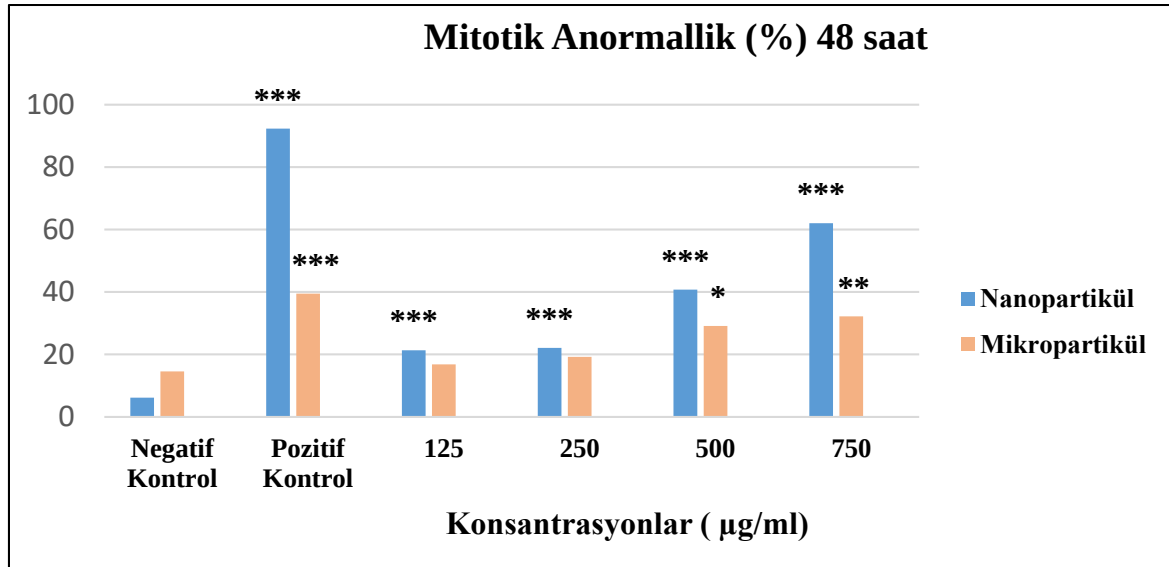
Çizelge 4.6. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L. da farklı fazlardaki mitotik anormallikler ve frekansları üzerine etkisi

		Profaz		Metafaz		Anafaz-Telofaz			Toplam	
Süre	µg/ml	Yapısı bozulmuş profaz	C-metafaz	Yapışıklık	Yapısı bozulmuş	İleri gitme	Köprü	Geri kalmış kromozom	Yıldız anafaz	Anormallik (%)
24	Negatif Kontrol	2,09	1,52	1,52	0,95	0,76	4,56	3,04	0,57	15,01
	Pozitif Kontrol	8,18	1,69	3,38	0,28	2,25	5,07	12,11	0,84	33,80**
	125	2,44	0,6	3,06	1,63	4,17	4,08	2,24	1,16	19,38
	250	4,75	6,68	6,23	1,81	2,26	1,80	0,67	-	24,20
	500	3,65	3,35	4,90	0,77	5,94	4,65	1,03	0,77	25,06
	750	7,75	4,26	5,33	0,8	7,2	3,73	2,13	0,53	31,73*
48	Negatif Kontrol	6,89	1,03	0,41	1,87	0,62	2,07	-	1,66	14,55
	Pozitif Kontrol	14,74	8,22	3,28	0,65	3,94	3,61	2,40	2,63	39,47***
	125	4,42	-	3,1	2,52	2,39	1,89	-	2,52	16,84
	250	2,01	0,22	3,35	1,56	6,51	2,01	3,35	0,22	19,23
	500	8,58	6,44	5,21	-	2,76	3,37	-	2,78	29,14*
	750	11,56	5,31	5,62	0,93	0,93	5	1,58	1,25	32,18**
72	Negatif Kontrol	2,99	6,19	0,56	-	0,93	1,30	0,74	0,37	13,08
	Pozitif Kontrol	20,62	10,13	7,34	1,39	3,49	3,49	2,15	1,04	49,65***
	125	3,50	7,02	7,49	0,93	0,23	1,16	0,23	0,46	21,02
	250	8,15	3,15	8,46	1,31	1,05	0,52	2,36	-	25,00
	500	8,62	5,89	2,35	1,17	2,35	2,06	0,88	1,17	24,49
	750	6,81	3,57	4,16	6,61	2,97	1,78	4,16	1,48	31,54**
Toplam anormallik sıklığı (%)		27,45	16,17	16,27	5,41	10,90	11,24	8,39	4,17	

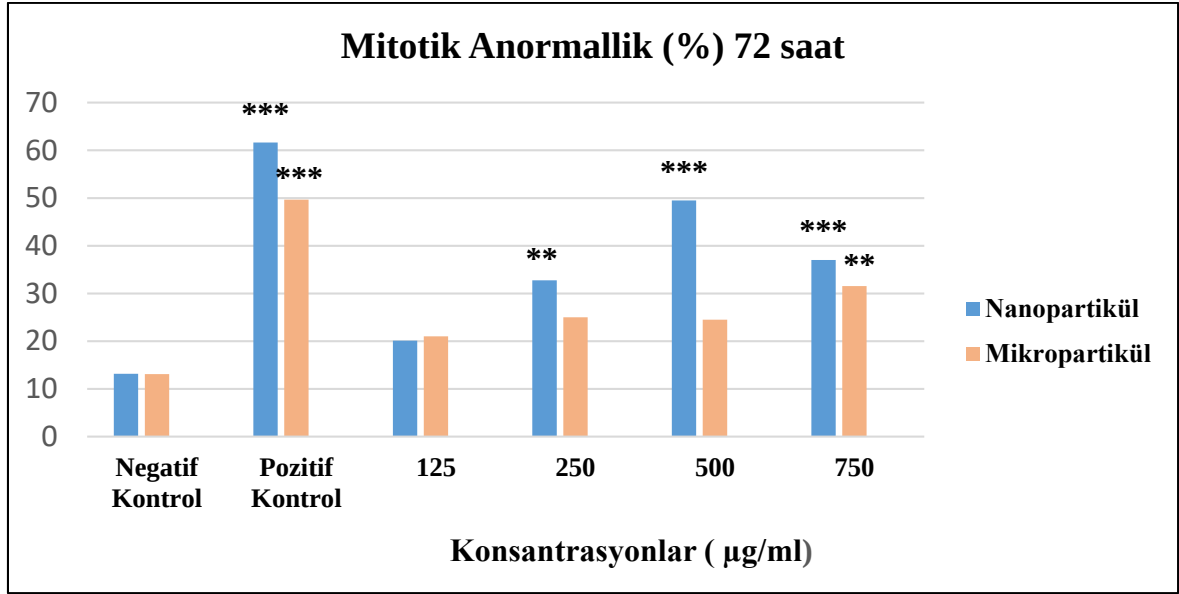
*** $p < 0,001$ (χ^2 testi, kontrole göre anlamlı), ** $p < 0,01$ (χ^2 testi, kontrole göre anlamlı), * $p < 0,05$ (χ^2 testi, kontrole göre anlamlı)



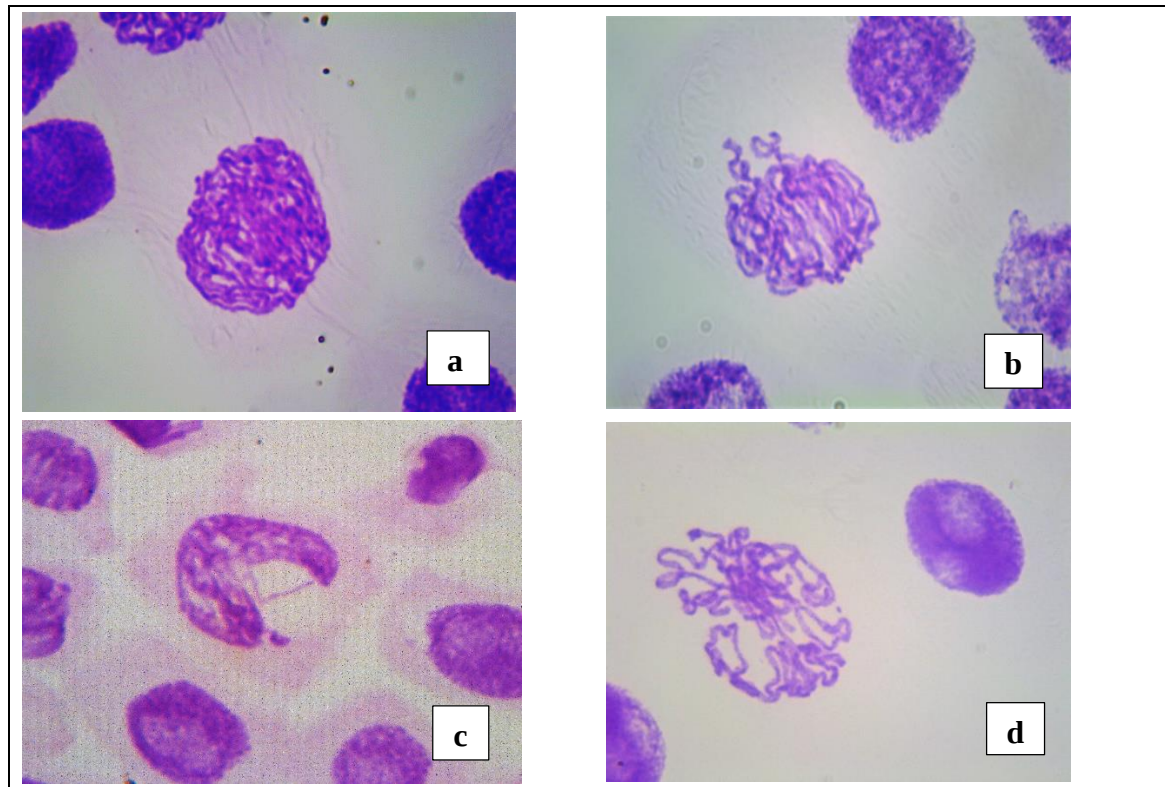
Şekil 4.8. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 24 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L. 'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi



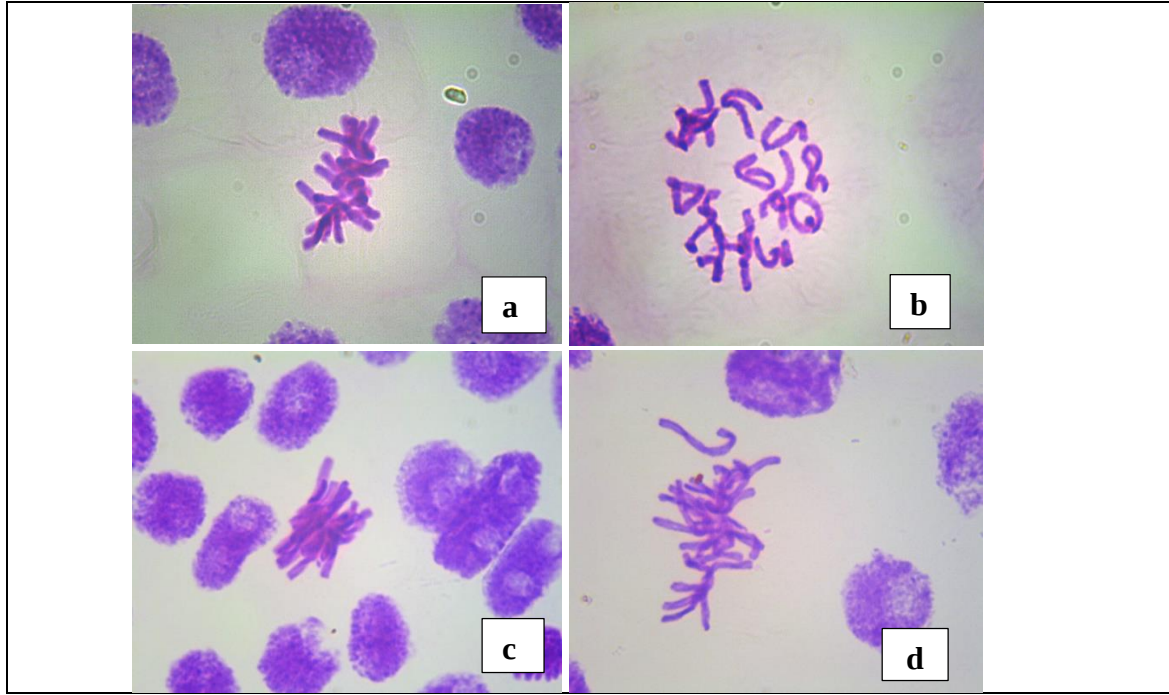
Şekil 4.9. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 48 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L. 'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi



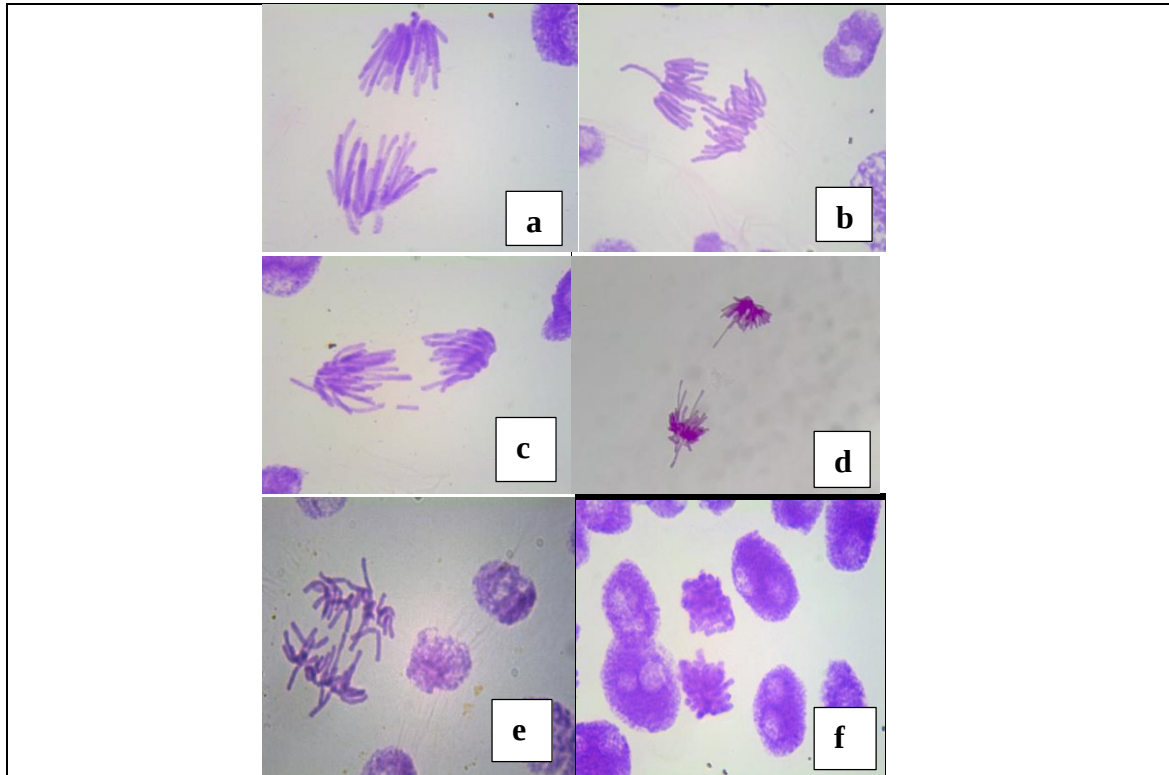
Şekil 4.10. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin 72 saatlik uygulamalarının *Allium cepa* L.'da mitotik anormallik frekansı üzerine etkisi



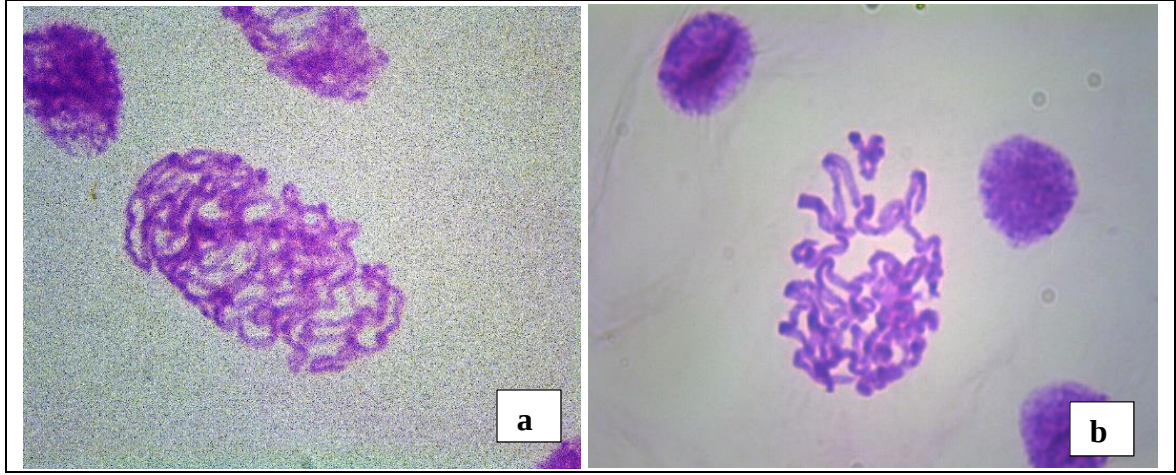
Resim 4.3. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'da profazda meydana getirdiği anormallikler. a) Normal profaz, b-c-d) Yapısı bozulmuş profaz



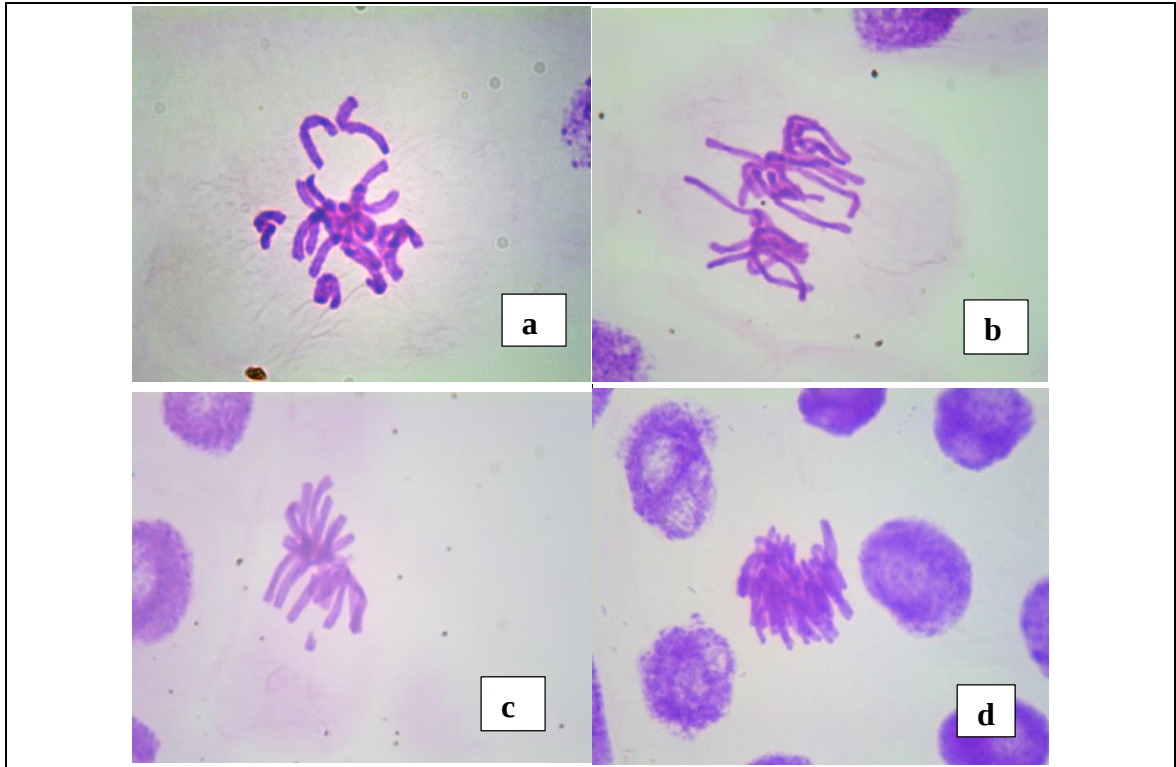
Resim 4.4. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'da metafazda meydana getirdiği anormallikler. a) Normal metafaz, b) C-Metafaz, c) Yapışıklık, d) Yapısı bozulmuş metafaz



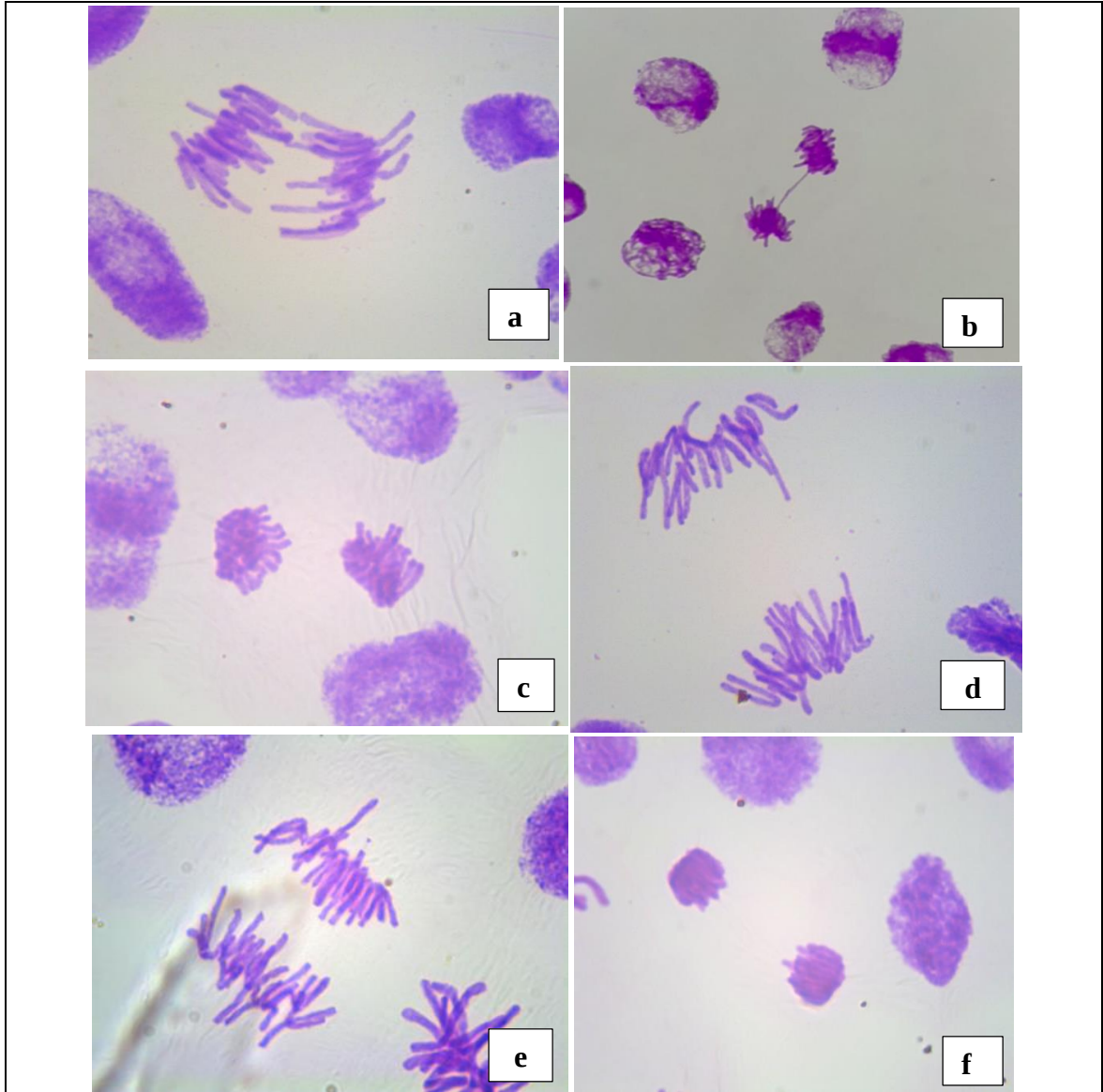
Resim 4.5. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'da anafaz-telofazda meydana getirdiği anormallikler. a) Normal anafaz, b) Köprü ve ileri kromozom, c) Fragment ve ileri kromozom, d) ileri kromozom, e) C-Anafaz, f) Yıldız telofaz



Resim 4.6. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da profazda meydana getirdiği anormallikler. a-b) Yapısı bozulmuş profaz



Resim 4.7. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da metafazda meydana getirdiği anormallikler. a) Yapısı bozulmuş metafaz, b) C-Metafaz, c) Fragment, d) Yapışıklık



Resim 4.8. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da anafaz-telofazda meydana getirdiği anormallikler a) Kromozom köprüsü, ileri kromozom ve yapısı bozulmuş anafaz (kutupsal sapma), b) Telofazda Köprü, c) Yıldız telofaz d) Yapısı bozulmuş telofaz e) Telofazda ileri kromozomlar, f) Telofazda yapışıklık.

4.4. Demir Oksit (Fe₂O₃) Nanopartiküllerinin ve Mikropartiküllerinin DNA Hasarına Etkisi-Comet Testi Sonuçları

Demir Oksit nanopartiküllerinin, 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda *Allium cepa* L. kök uçlarında oluşturduğu DNA hasarı, comet testi kullanılarak üç farklı parametre ile değerlendirilmiştir. Bu parametreler comet kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olup elde edilen veriler Çizelge 4.7' de gösterilmiştir. Comet testinde gözlenen DNA hasarı örnekleri Resim 4.9'da gösterilmiştir.

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 24 saatlik uygulamasında, kullanılan bütün konsantrasyonlar, DNA kuyruk uzunluğunda, negatif kontrole kıyasla artışa sebep olmuştur. Bu artışlar, 125 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı düzeydedir. Diğer yandan, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini, negatif kontrole kıyasla sadece 125 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı bir artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamada, comet kuyruk uzunluğu, 24 saatlik uygulamada olduğu gibi, 125 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir. Comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini ise, negatif kontrole kıyasla sadece en düşük konsantrasyon olan 125 µg/mL'lik konsantrasyonda artış göstermiş olup, bu artış kuyruk momentinde anlamlı düzeye ulaşmıştır.

Demir oksitin mikropartikül formunun 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda *Allium cepa* L. kök uçlarında oluşturduğu DNA hasarının comet testi ile incelenmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini verileri Çizelge 4.8' de gösterilmiştir. Comet testi ile gözlenen DNA hasarı örnekleri ise Resim 4.10'da verilmiştir.

Demir Oksit mikropartiküllerinin 24 saatlik uygulamasında, 125, 250 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlar, *A. cepa* L. kök ucu hücrelerinde, negatif kontrole kıyasla, DNA kuyruk uzunluğunda anlamlı artışlara sebep olmuştur. Kuyruk yoğunluğunda bütün konsantrasyonlarda DNA kuyruk yoğunluğunda artış gerçekleşmiş olup, bunlardan 125, 250 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki artışlar anlamlı düzeydedir. DNA kuyruk momentinde de ilk üç dozadaki artışlar negatif kontrole göre yüksek olup, bunlardan 250 ve 500 µg/mL'deki artışlar anlamlıdır. Mikropartiküllerin 48 saatlik uygulamasında ise, DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinde, en yüksek iki konsantrasyon olan 500 ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki artışların, negatif kontrole kıyasla anlamlı olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). Comet testi sonuçlarına göre nanopartiküllere kıyasla mikropartiküllerin daha genotoksik etkili olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'da oluşturduğu DNA hasarı-Comet testi sonuçları

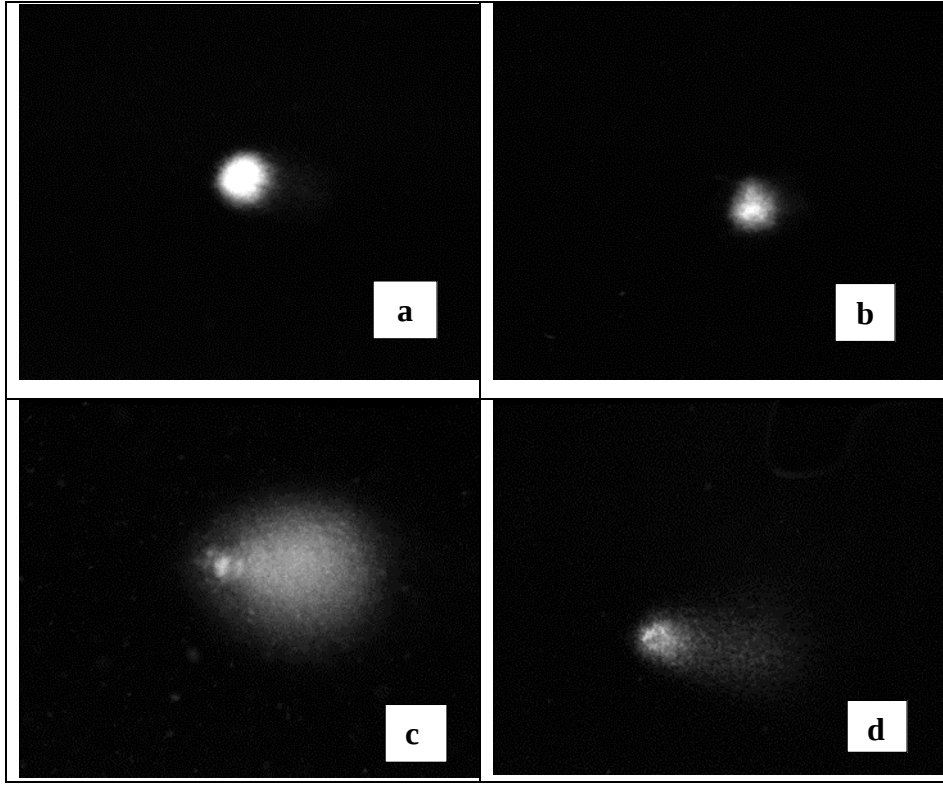
	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk momenti
24 saat			
Negatif Kontrol	50,40 ± 4,67	30,81 ± 4,47	10,89 ± 2,08
Pozitif Kontrol	25,72 ± 2,27*	23,76 ± 4,31	4,53 ± 1,34
125	105,43 ± 8,82*	47,45 ± 4,46*	27,45 ± 3,74*
250	89,16 ± 7,97*	21,39 ± 3,51	9,70 ± 2,82
500	68,36 ± 5,15	19,28 ± 3,45	7,65 ± 2,20
750	59,10 ± 3,94	26,87 ± 3,84	7,98 ± 1,28
48 saat			
Negatif Kontrol	76,38 ± 4,03	45,89 ± 3,95	17,38 ± 1,80
Pozitif Kontrol	153,10 ± 5,95*	76,80 ± 1,84*	50,01 ± 3,12*
125	198,14 ± 9,70*	61,04 ± 3,37	50,80 ± 4,34*
250	127,78 ± 9,86*	34,91 ± 4,40	21,58 ± 4,14
500	70,74 ± 10,48	25,48 ± 4,17*	13,00 ± 3,99
750	64,10 ± 6,23	28,34 ± 4,06	10,13 ± 2,54

*Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

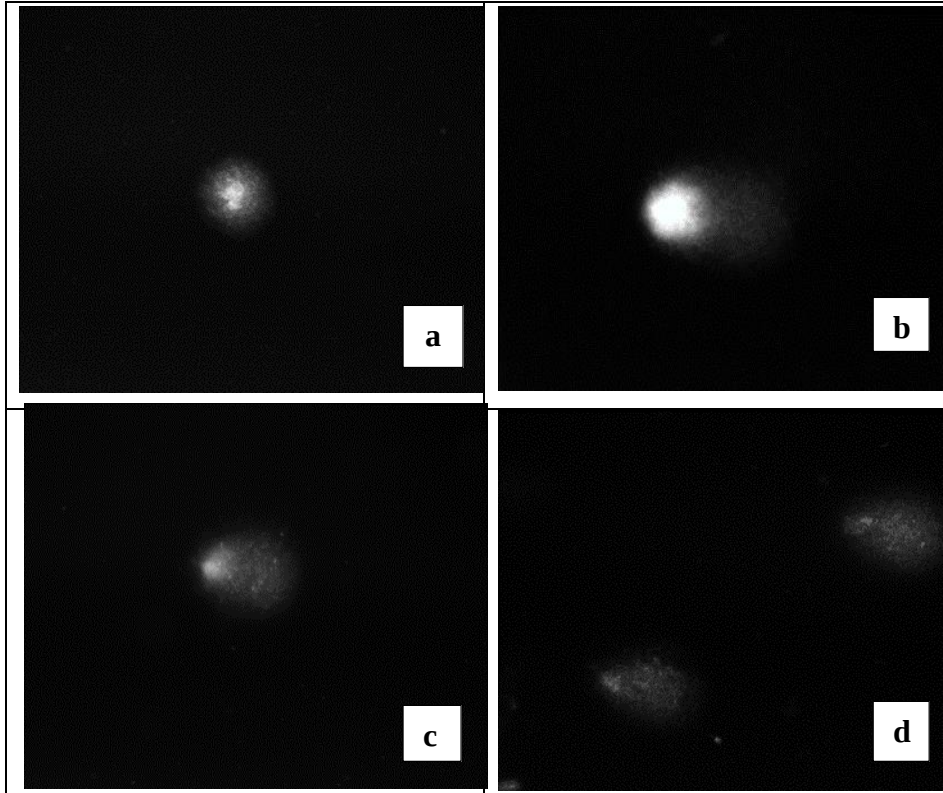
Çizelge 4.8. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da oluşturduğu DNA hasarı-Comet testi sonuçları

	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk momenti
24 saat			
Negatif Kontrol	83,46 ± 7,65	18,06 ± 3,07	83,46 ± 7,65
Pozitif Kontrol	102,50 ± 7,83	20,90 ± 2,93	102,50 ± 7,83
125	119,92 ± 8,70	46,87 ± 4,69 *	119,92 ± 8,70
250	159,52 ± 12,26 *	61,76 ± 4,39 *	159,52 ± 12,26 *
500	212,94 ± 18,28 *	72,86 ± 4,02 *	212,94 ± 18,28 *
750	82,78 ± 6,78	25,07 ± 3,84	82,78 ± 6,78
48 saat			
Negatif Kontrol	139,40 ± 13,74	35,08 ± 4,40	24,56 ± 5,33
Pozitif Kontrol	61,56 ± 4,11 *	17,22 ± 3,78	5,97 ± 1,47 *
125	78,12 ± 5,75 *	21,58 ± 3,90	10,67 ± 2,70
250	59,36 ± 3,99 *	21,68 ± 3,35	7,5 ± 2,17
500	264,80 ± 11,18 *	78,98 ± 3,95 *	96,98 ± 6,93 *
750	220,42 ± 15,16 *	73,56 ± 4,05 *	78,89 ± 7,46 *

* Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)



Resim 4.9. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin *Allium cepa* L.'da oluşturduğu DNA hasarının comet testi ile görünümü a-b) az hasarlı DNA c-d) çok hasarlı DNA.



Resim 4.10. Fe_2O_3 mikropartiküllerinin *Allium cepa* L.'da oluşturduğu DNA hasarının comet testi ile görünümü. a) az hasarlı DNA b-c-d) çok hasarlı DNA

5. TARTIŞMA

Nanoteknoloji, birçok avantajlara sahip olduğu bilinen ve hızla genişleyen multidisipliner bir bilim dalı olsa da, mevcut çalışmalar nanoteknolojide kullanılan nanopartiküllerin toksik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Nanopartiküller ticari kullanım için üretilip piyasaya sürüldükçe, bu partiküllere maruziyetin her geçen gün daha fazla artış göstereceği açıktır. Bu maruziyetle birlikte, nanopartiküllerin insan dahil tüm canlılar üzerinde bazı riskleri olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin toksik özellikle genotoksik etkileri konusunda detaylı araştırmalar yapılmaya başlanmış olmakla beraber, bunlar henüz yeterli düzeyde olmadığından, mevcut araştırmalar da çelişkili olduğundan, daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Bakand, Hayes ve Dechsakulthorn, 2012; Zhang ve diğerleri, 2018). Çünkü genetik materyalde ve/veya kromozomlarda meydana gelen hasarlar, mutasyonların oluşmasına, bozuk proteinlerin üretilmesine, çeşitli biyokimyasal mekanizmaların bozulmasına, başta kanser olmak üzere diğer bazı hastalıkların ortaya çıkmasına ve hatta yeni nesillerde anormalliklere sebep olabilmektedir (Fahmy, Ebrahim ve Gaber, 2020).

Tüketicinin hizmetine sunulan nanoteknoloji ürünlerinin %10'luk kısmını metal oksit türevi ürünler oluşturmaktadır (Mitrano ve ark., 2015). Metal ve metal oksit nanopartikülleri arasında en fazla üretimi yapılan nanopartiküllerin sıralaması $TiO_2 > SiO_2 > Fe > Al_2O_3 > ZnO$ şeklindedir (Keller ve Lazareva, 2014; Nikolova ve diğerleri, 2020; Bai ve diğerleri, 2020; Şengül ve diğerleri, 2020). Metal ve metal oksit nanopartikülleri güneş kremleri, kozmetikler, elektronik cihazlar, cerrahi malzemeler, deterjanlar, otomotiv boyaları, ilaç taşıma sistemleri, gıda katkı maddeleri gibi birçok alanda çok fazla üretilip kullanılmaktadır (Teow ve diğerleri, 2011).

Nanoteknoloji, manyetik rezonans görüntüleme, ultrason, optik görüntüleme ve X-ışını görüntüleme vb. moleküler görüntüleme uygulamalarında belirli nano ajanların uyarlanmasıyla, insan sistemlerini görüntüleme ve hastalığın erken teşhis edilmesinde muazzam bir avantaja sahiptir. Ancak bahsedilen uygulamalarda kullanılan manyetik nanopartiküllerin biyolojik olarak uyumlu olması büyük önem taşımaktadır. Yüksek stabilite, biyoyumluluk ve kullanım kolaylığı gibi belirli özelliklere sahip olması nedeniyle Fe_2O_3 nanopartikülleri biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Fe_2O_3 ve Fe_3O_4 gibi manyetik nanopartiküller ilaç ve gen taşıma sistemlerinde çok fazla

kullanılmaktadır. Biyoteknoloji ve biyomedikal uygulamalarda bu tipteki partiküllerin yüksek düzeyde tercih edilmesinin sebebi, nano ebatlarda olmalarından, manyetik özelliklere sahip olmalarından ve spesifik amaçlar için aktif molekülleri taşıma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. Nanoboyutta olan bu partiküller çok küçük damarlar yoluyla taşınabildikleri ve gerektiğinde hücre membranlarından kolayca geçebildikleri için, insan vücudunda hedeflenen bölgeye kolayca ve doğru şekilde ulaştırılabilmektedir. Böylece gerekli noktada kesin tedavi yapılabilir. Ancak bütün bu uygulamaların, normal hücrelerde ne tür hasarlar oluşturabileceği konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Bu nedenle bu etkilerin de detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir (Tortella ve diğerleri, 2020).

Demir oksit nanopartiküllerin toksik etkileri konusunda yapılan araştırmalar, bunların ticari olarak kullanılması için yapılan araştırmalara kıyasla oldukça az sayıdadır. Ayrıca, mevcut *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların bir kısmı Fe₂O₃ nanopartiküllerinin toksik olmadığını gösterirken, bazı sitotoksik ve genotoksik çalışmalarda bu nanopartiküllerin insan ve diğer canlılarda potansiyel tehlikeler oluşturabileceğini vurgulamaktadır (Teow ve diğerleri, 2011; Pohanka ve diğerleri, 2019; Medici ve diğerleri, 2021; Sani ve diğerleri, 2021). Dolayısıyla sonuçlar bir biriyle çelişir niteliktedir. Özellikle biyotıp alanında sıkça tercih edilen bu nanopartiküllere insanların maruziyetinin her geçen gün artması nedeniyle, bu partiküllerin olası toksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Mitrano ve diğerleri, 2015; Saygılı, 2015). Bütün bu sebeplerden dolayı, demir oksitin nanopartikül ve mikropartikül formlarının toksik ve genotoksik etkilerinin ortaya çıkarılması için, bu partiküllerin farklı konsantrasyonlarının ve farklı uygulama sürelerinin, farklı organizmalar ve farklı test sistemleri ile incelenmesi gerekmektedir (Singh ve diğerleri, 2013).

Bütün bu gereklilikler dikkate alınarak, bu tez çalışmasında demir oksit (Fe₂O₃)'in nanopartikül (<50 nm) ve mikropartiküllerinin (<5µ) *Allium cepa* L.'daki sitotoksik ve genotoksik etkileri, Allium testi ve comet testi kullanılarak incelenmiştir. Allium testinde mitotik indeks, mitotik fazların frekansları, mitoz bölünmede ve kromozomlarda meydana gelen anormallikler tespit edilmiştir. Comet testinde ise, bu partiküllerin *A. cepa* L. kök ucu hücrelerinde DNA üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada hem nano hem de mikro formun dört farklı konsantrasyonu (125, 250, 500 ve 750 µg/mL) *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerine 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toksik ve genotoksik

etkilerinin, bunların fiziko-kimyasal özellikleri ile de bağlantılı olması nedeniyle, partiküllerin karakterizasyonu da geçirmeli elektron mikroskobu, dinamik ışık saçılımı ve zeta sizer kullanılarak tespit edilmiştir.

Her iki partikülün deiyonize sudaki süspansiyonundan elde edilen örnekler incelenmiş ve TEM görüntülemesinde, Fe₂O₃ NP'lerinin genel olarak küresel ve altıgen şeklinde oldukları, Fe₂O₃ MP'lerinin ise genel olarak küresel yapıda fakat şekilsiz yapıların da oldukça fazla sayıda bulunduğu gözlenmiştir. TEM görüntülerinden en az yüz partikülün boyutu tespit edilmiş ve buradan ortalama ve en küçük-en büyük ebatlı partiküllerin ebatları belirlenmiştir. Buna göre, Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ortalama $44,48 \pm 6,7$ nm ebatında olduğu, en küçük ve en büyük partiküllerin ise sırasıyla 2,97 nm ve 135,15 nm olduğu belirlenmiştir. Ticari firma, bu partiküllerin <50 nm olduğunu belirtmesine rağmen, 135 nm'ye kadar olabilen partiküllerin de bulunduğu olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan Fe₂O₃ MP'lerinin ortalama boyutu $210,68 \pm 95,8$ nm olup, en küçük ve en büyük partiküllerin boyutu ise 71,5 nm ile 479,67 nm arasında dağılım göstermektedir. Ticari firma, bu partiküllerin <5 µm olduğunu belirtmiştir. Diğer yandan, Fe₂O₃ NP'lerinin 217,72 nm ebatında, Fe₂O₃ MP'lerinin ise 12.94,70 nm ebatında aglomeratlar oluşturduğu da tespit edilmiştir.

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin deiyonize sudaki hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri de dinamik ışık saçılımı ve zeta sizer kullanılarak tespit edilmiştir. DLS tekniği ile Fe₂O₃ NP'lerinin %75,5'inin hidrodinamik çapının 1.046 ± 137 nm, %24,5'inin ise 71 ± 8 nm olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, Fe₂O₃ MP'lerinin %95,6'sının hidrodinamik çapının 695 ± 388 nm ve geri kalan %4,4'ünün ise 4.927 ± 645 nm olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyellerinin her iki partikül için de pozitif olduğu ve Fe₂O₃ NP'leri için $12,8 \pm 4,2$ mV ve Fe₂O₃ MP'leri için $18,8 \pm 8,4$ mV olduğu belirlenmiştir. Yükü fark etmeksizin, zeta potansiyeli, partiküller arası itme gücünün büyüklüğünü göstermektedir. Zeta potansiyeli $-30 \text{ mV} \leq \zeta \leq +30 \text{ mV}$ arasında olduğunda, nanopartikülün aglomerasyon oluşturma potansiyeli daha yüksektir. Aglomerasyon, hem nanopartiküllerin daha büyük aglomeratlar oluşturmaya ve hem de hücre ile etkileşimlerinin, monodispers partiküllere kıyasla daha farklı etki göstermesine sebep olur (Barnes ve diğerleri, 2008; Sun ve diğerleri, 2014). Van der Waals bağlarının sonucunda oluşan aglomerasyon, yüzey alanını artırmakta ve sonuçta toksisitesinde de değişikliğe sebep olabilmektedir (Kwon, Koedrich ve Seo, 2014).

Nanopartiküllerin sahip olduğu geniş yüzey alanı genellikle yüksek reaktiviteye ve koloidal kararsızlığa neden olur ve sonuçta NP'ler sulu ortamlarda mikropartiküllere kıyasla toplanma eğilimi gösterirler. Nanopartiküller boyut olarak birkaç mikrona kadar kümeler halinde toplanabilir ve bu toplanma eğilimi, NP'lerin hareketliliğini, çevresel etkileşimlerini ve toksisitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Nanopartiküller çözeltinin kimyasına ve partikül özelliklerine bağlı olarak yavaş veya hızlı bir şekilde agregasyona uğrayabilirler (Zhang, 2014). Kısaca, nanopartiküllerin toplanması yani agregasyon oluşturmaları, bunların hücreye girişinde ve hücrel moleküllerle etkileşiminde ve dolayısıyla toksik etkilerinin boyutunda da önemli bir rol oynamaktadır (Sharma, 2009).

Bu tez çalışmasında, Fe_2O_3 'ün nanopartikül ve mikropartikülleri, özellikle sitotoksik ve genotoksik etkileri bakımından da detaylı şekilde incelenmiştir. Fe_2O_3 NP'lerinin 24 saatlik uygulamasında, tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla mitotik indekste azalma olduğu gözlenmiştir. 250 $\mu\text{g/mL}$ dışındaki diğer tüm konsantrasyonlarda bu azalış anlamlı bulunmuştur. 48 ve 72 saatlik uygulamalarda ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre mitotik indekste anlamlı bir azalma görülmüştür. Fe_2O_3 mikropartikül formunun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarında, tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla mitotik indekste konsantrasyon artışına paralel bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalma 48 saatlik uygulamadaki 125 $\mu\text{g/mL}$ hariç diğer tüm konsantrasyonlar için anlamlı olarak bulunmuştur.

Mitototik indekste gözlenen azalmanın Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartikül formlarının *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde toksik etki oluşturmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Toksik olduğu tespit edilen belirli bir kimyasal madde ile muamele sonucunda mitotik indekste gözlemlenen azalma, kimyasal maddenin aktif bir şekilde bölünen hücreleri öldürmesi ve hücre bölünmelerini durdurması ile açıklanabilir. Mitotik indeksdeki azalmanın, hücre döngüsü kontrol noktalarından biri olan S fazında DNA sentezinin inhibisyonu sonucunda olabileceği de bildirilmiştir. Toksik madde, hücre bölünmesi sırasında fizyolojik etkiler ve yapısal değişiklikler dahil olmak üzere nükleik asidin sentezine, durumuna ve yapısına müdahale edebilen metabolik dengesizliklere yol açabilir ve bu da mitotik gecikmeye neden olabilir. Sonuç olarak, mitoz bölünmenin inhibisyonu, DNA sentezinin inhibisyonuna ve uzamış G2 periyoduna bağlı olabilir (Sinha ve Kumar, 2014).

Metallerden ZnO NP'lerinin *A. cepa* nın kök hücreleri üzerindeki sitogenetik etkisinin incelendiği bir araştırmada, NP'lerin artan konsantrasyonlarına (25, 50, 75 ve 100 g ml⁻¹) paralel olarak mitotik indeks frekansının da azaldığı gözlenmiştir. Hücreler içinde ZnO birikiminin reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olduğu, bunun sonucunda da mitotik indeksin azaldığı ve sitotoksik etkinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca mitotik aktivitedeki azalma, NP'lerin mitodepresif etkisini, yani ZnO NP'lerinin mitozun normal gelişimini engelleyerek bir dizi hücrenin profaza girmesini önleyebildiğini göstermektedir. ZnO NP'leri interfaz sırasında mitotik döngüyü bloke edebilir ve DNA/protein sentezini inhibe edebilir (Kumari ve diğerleri, 2011). Altın (Au) NP'lerin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde boyut ve doza bağlı sitogenetik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada 15 (Au15), 30 (Au30) ve 40 (Au40) nm olmak üzere üç farklı boyuttaki sitrat kaplı altın NP'lerin, 0,1, 1 ve 10 µg mL⁻¹ olan üç farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda kök ucu hücrelerinde kontrole kıyasla, mitotik indeks frekansının konsantrasyon artışına bağlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar mitotik indeksteki azalmanın, hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir (Rajeshwari ve diğerleri, 2016).

Nanopartiküller hücredeki konsantrasyon artışına bağlı bir şekilde ROT oluşumunu da arttırabilir ve lipidlerde, yağ asitlerinde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasarlar oluşturarak, hücre zarı işlevlerinin bozulmasına, enzimlerin inaktivasyonuna, hatta hücre ölümüne neden olabilirler. Oksidatif stres, apoptoz ile bağlantılıdır. Apoptoz, çok hücreli organizmalarda iyi bilinen ve gelişim, büyüme regülasyonu ve hastalıkta önemli bir rol oynayan programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Şiddetli oksidatif stres hücre ölümüne neden olabildiği gibi, bazen orta derecede oksidasyon bile apoptozu tetikleyebilir. Çalışmamızda Fe₂O₃ NP'lerinin en yüksek konsantrasyonlarda, hücrede oksidatif stresi arttırarak apoptozu tetiklemiş olabileceği ve bu nedenle mitotik indekste anlamlı düşüşlere sebep olduğu düşünülmektedir (Kong ve diğerleri, 2016).

NP'lerden özellikle metal ve metal oksit NP'lerin fare, çin hamster ovaryumu, insan lenfositleri, akciğer hücre hatları ve bazı mikroorganizmalar üzerinde, oksidatif stresi arttırdığına ve hücre canlılığını azalttığına dair birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcuttur (Chen ve diğerleri, 2008; Yang ve diğerleri, 2008; Ahamed ve diğerleri, 2010; Osman ve diğerleri, 2010; Naqvi ve diğerleri, 2010; Radziun ve diğerleri, 2011; Sun ve diğerleri, 2011;

Ghosh ve diğerleri, 2016; Mahmoud ve diğerleri, 2016; Schneider ve diğerleri, 2017; Ferraro ve diğerleri, 2019; Zivari Fard ve diğerleri, 2020).

Nanopartiküller birçok bakımından normal ebatlı partiküllere kıyasla daha üstün özelliklere sahiptir. Nanoteknolojide tercih edilmelerine sebep olan bu özellikler, canlılar açısından riskler oluşturabilmektedir. Küçük boyut, yüksek yüzey reaktivitesi ve yüzey kimyası gibi özellikler, NP'lerin biyolojik moleküller ile etkileşiminde de farklılıklara sebep olmaktadır. Yapılan toksisite analizleri NP'lerin hem boyutunun hem de yüzey kaplaması gibi özelliklerinin, hücresel tepkinin kritik belirleyicisi olduğunu ve sitotoksik potansiyellerinde önemli faktörler olduğunu göstermiştir. Metalik atomlar ve karmaşık geometriler gibi, NP'lerin gelişmiş reaktivitesi de toksik potansiyellerini artırabilir. Özellikle metal ve metal oksit NP'lerin çok küçük hacimlerine oranla çok yüksek yüzey alanına sahip olması, bulk formlara kıyasla iyonlarının daha fazla çözünmesine ve salınmasına imkan sağlamaktadır. Bu da toksik etkilerinde artışa sebep olmaktadır (Bakand ve Hayes, 2016).

Titanyum dioksit, gümüş, çinko oksit, seryum dioksit, bakır, bakır oksit, alüminyum, nikel ve demir oksit gibi metal ve metal oksit NP'leri endüstride çok fazla kullanıldıkları için ve ayrıca hem çevresel kullanımları ve hem de atıklar yoluyla çevreye salınmaları sonucunda özellikle bitkiler için sitotoksik ve genotoksik riskler taşıyabileceği için, NP'lerin farklı bitkiler üzerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesi, hem bitkilerin sağlığı ve hem de başta insan olmak üzere diğer tüm canlıların sağlığı açısından çok önemlidir. Bu nedenle nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri çeşitli bitki türleri kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmektedir. Bu bitkiler arasında *Allium cepa* L. (soğan), *Allium sativum* L. (sarımsak) ve *Vicia faba* (bakla) başta olmak üzere *Arabidopsis thaliana* (fare kulağı teresi), *Zea mays* (mısır), *Oryza sativa* (pirinç), *Triticum aestivum* (buğday), *Pisum sativum* (bezelye), *Elodea densa* (akvaryum bitkisi), *Raphanus sativus* (turp), *Capsicum annuum* (yıllık biber) ve *Cucurbita pepo* (sakız kabağı) gibi farklı bitkiler üzerinde de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, farklı tipteki metal ve metal oksit NP'lerin farklı bitki türleri üzerindeki etki düzeylerinin değişken olabileceği gibi, bu etkilerin hem olumlu hem de öldürücü etkiye kadar değiştiği de tespit edilmiştir (Rastogi ve diğerleri, 2017).

OECD tarafından yönergeleri yayınlanan ve uluslararası makalelerde de çok fazla kullanılan kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve tek hücre jel elektroforezi-comet testleri en çok bilinen genotoksisite testleridir. *Allium* testi de bu test

sistemleri ile iyi bir korelasyon gösteren, içme sularına ve diğer sulara karışan kirleticilerin canlılarda sebep olabileceği hasarların analiz edilmesinde, çevresel kirleticilerin genotoksik etkisinin taranmasında ve yerinde izlenmesi çalışmalarında kullanılan hassas ve güvenilir bir testtir. Bu nedenle *Allium* testi ile nanopartiküller, pestisitler, azo boyalar, gıda koruyucuları ve hidrokarbonlar gibi birçok tehlikeli kirleticinin genotoksitesini de incelenmektedir. Yapılan çalışmalar ile *A. cepa* L. nın toksisite ve genotoksisiteyi tespit etmede diğer testlere göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Cabuga Jr ve diğerleri, 2017; Ünal ve diğerleri, 2020).

Allium cepa L., ucuz olması, kolay yetiştirilmesi, ökaryotik bir organizma olması gibi avantajlarının yanında, deneylerde hayvan kullanımını azaltması, etik kaygıların ortadan kalkmasını sağlaması ve elde edilen sonuçların hem ökaryotik hücre hatlarındaki sonuçlarla ve hem de hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermesi nedeniyle genetik toksisite çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca kromozomlarının büyük ve az sayıda olması, kirleticilere maruziyet sonucunda kromozomal anormalliklerin ve mikronükleusların tetiklenmesi ve kolay bir şekilde gözlenmesi gibi avantajları nedeniyle genotoksisite çalışmalarında tercih edilen bir bitki türüdür (Radic ve diğerleri, 2010; Özkul ve diğerleri, 2016; Kaygısız ve diğerleri, 2017; Özel ve diğerleri, 2018; Liman ve diğerleri, 2021).

Bu tez çalışmasında incelenen Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartikül formları *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik anormalliklerin frekansını tüm konsantrasyonlarda ve üç farklı uygulama süresinde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde arttırmıştır. Nanopartikül ve mikropartikül formları *Allium cepa* L. hücrelerinde yapısı bozulmuş profaz, C-metafaz, yapışıklık, yapısı bozulmuş metafaz, anafaz-telofaz safhasında ileri gitme, köprü, geri kalmış kromozom ve yıldız anafaz gibi mitotik anormallikler oluşturmuştur. Hem nanopartikül hem de mikropartikül formundaki Fe_2O_3 'in, metafaz safhasında en fazla oluşturduğu anormallik yapışıklıktır. Anafaz safhasında ise her iki partikülün en yüksek oranda meydana getirdiği anormallik kromozomlarda ileri gitmedir.

Kromozomal köprüler, kardeş kromatitler arasındaki veya terminal delesyonlar nedeniyle farklı kromozomlar arasındaki yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Anafaz-telofaz safhasında meydana gelen köprüler, kromatin ayrımı sırasında kromozomal fragmanlardan (kırılmalardan) veya kromozomların metafaz safhasında yapışık olmasından

kaynaklanabilir. Kromozom kırılmalarına, kromatinin dinamiklerini etkileyen dış etkenler de neden olabilir ve onarım sürecine zarar verebilir. Mitotik iğ ipliklerinin bozulması, kromozomal yapışmaya neden olabilir. Yapışkanlık, metafaz safhasında kromatidlerin metafaz düzleminde kümeleşerek, birbirlerinden ayrılmamaları şeklinde tanımlanmaktadır. Kromozomal yapışıklık, DNA'nın kendisinden ziyade proteinli kromatin matrisini içeren geri dönüşü olmayan bir anormalliktir ve genellikle hücre ölümüne yol açmaktadır. Kromozomal kayıplar ve kırıklar, anöjenik veya klastojenik bir etkene bağlı olarak meydana gelen mikronükleuslardan kaynaklanabilir. Nükleer tomurcuklar, kutuplara kromozom göçünü tamamlamadan ve çekirdeklere katılmadan önce nükleer zarf oluşumundan ve ayrıca eliminasyonu teşvik eden hücresel aktivitelerden oluşabilir (Filho ve diğerleri, 2018; Ünal ve diğerleri, 2020; Liman ve diğerleri, 2021).

Bu çalışmada gözlenen C-metafazlar, Fe₂O₃ nanopartikül ve mikropartikül formunun iğ iplikleri üzerindeki etkisi sonucunda oluşmuştur. C-metafaz oluşumuna bağlı olarak poliploidi ve anöploidi gibi sayısal kromozomal anormallikleri de oluşmaktadır. Multipolar anafaz, iğ ipliklerinin tamamen parçalanması ile oluşurken, kalgın kromozomlar iğ ipliği oluşumunun kısmen engellenmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Mikronükleuslar, iğ ipliği fonksiyonunun normal bir şekilde çalışmamasından oluşabileceği gibi, asentrik kromozom fragmentlerinden de kaynaklanıyor olabilir (Soykan ve Koca, 2014). Metal oksit NP'lerinden özellikle TiO₂ (Fadoju ve diğerleri, 2020; Filho ve diğerleri, 2018; Pakrashi ve diğerleri, 2014), CeO₂ (Liman ve diğerleri, 2019), Al₂O₃ (De ve diğerleri, 2016) ve MgO (Mangalampalli ve diğerleri, 2018)'in de *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde kromozomal anormallik ve mikronükleus oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir. Al₂O₃, TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin hücrede reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikleyerek sitotoksik ve genotoksik etkiye sebep oldukları vurgulanmıştır (Pakrashi ve diğerleri, 2014; Rajeshwari ve diğerleri, 2015; Ahmed ve diğerleri, 2017; Sun ve diğerleri, 2019; Debnath ve diğerleri, 2020).

Yapılan birçok *in vitro* çalışmada, NP'lerin nükleer zarı geçerek hücrede ROT oluşumu ile birlikte oksidatif DNA hasarı, gen ekspresyon bozuklukları ve DNA ipliğinde kırıklar gibi çeşitli genotoksik hasarlara sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ROT'un DNA hasarı oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Tek (SWCNT) ve çok katmanlı karbon nanotüpler (MWCNT)'nin toksik etkisi insan deri hücre kültürleri kullanılarak epidermal keratinositler ve fibroblastlar üzerinde incelenmiştir. SWCNT ve MWCNT'nin

sitokin ve lenfokin üretimini aktive ettiği ve hücrel membranı geçerek oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar ile nano ölçekli titanyum ve kuantum noktalarının da hücrede protein ve gen ifadesini değiştirebildiği gösterilmiştir (Zoroddu ve diğerleri, 2014).

NP'lerin kimyasal yapısı, hücrel alım düzeylerinde, oluşturdukları oksidatif stres düzeyinde ve sonuçta sitotoksik etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Nanopartiküllerin kimyasal ve kristal yapısındaki farklılıklar da bunların sitotoksik ve ROT üretiminde farklı etkiler gösterebilir. Örneğin, TiO_2 NP'lerinin rutil ve anataz formu, aynı kimyasal bileşime, ancak farklı kristal yapılara sahip allotroplardır. Anataz NP'ler yumuşak bir yapıda ve sert yapıdaki rutil NP'lere göre daha küçük aglomeratlar oluşturma eğilimindedir. Bu nedenle hücreye alımı rutil forma kıyasla daha yüksektir. Sonuçta, bu özellikler, iki farklı formun hücrede oluşturdukları sitotoksik ve genotoksik etkilerinde de farklılıklara sebep olmaktadır (Osman ve diğerleri, 2019).

Fe_2O_3 nanopartiküllerinin (20 nm) toksik etkisi erkek Wistar ratlarının karaciğer ve akciğer dokuları üzerinde de incelenmiştir. 20 ve 40 mg/kg'lik Fe_2O_3 konsantrasyonları akciğer dokusunda serbest radikallerin oluşumunu önemli ölçüde arttırmış ve karaciğerde yaralanmaya neden olarak toksik bir etki meydana getirmiştir. Dişi Wistar ratların soluma yoluyla Fe_2O_3 NP'lerine (30 nm) maruz bırakıldığı bir araştırmada, demir (Fe) birikiminin, karaciğer ve akciğer dokularında zamana bağlı şekilde önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Fe_2O_3 NP'lerinin karaciğer ve akciğer dokularında bulunan bazı enzimlerin seviyesini azalttığı ve dokularda hasara neden olduğu bildirilmiştir. Akciğerlerde biriken nanopartiküller, akciğer yapısında zararlı ve hatta kötü huylu etkilere yol açarak akciğer iltihabına, fibrozise veya akciğer kanserine neden olabilir (Sadeghi ve diğerleri, 2015).

Literatürdeki bazı çalışmalar, Fe_2O_3 ve diğer bazı nanopartiküllerin alveolar-kılcal bariyerden geçerek ve kan dolaşımına girerek, karaciğer, böbrek, kardiyovasküler sistem ve hatta sinir sistemi dahil olmak üzere akciğer dışı organlarda işlev bozukluklarına yol açabileceğini de göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2010). İnsan kan lenfosit hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada Fe_2O_3 NP'lerinin hücre canlılığını azalttığı, ROT artışına neden olduğu, mitokondriyal ve lizozomal hasar meydana getirerek toksik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Assadian ve diğerleri, 2019).

Fe_2O_3 NP'lerin daha küçük boyutlara ve benzersiz özelliklere sahip olması nedeniyle bulk malzemelere kıyasla daha yüksek toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu konuda, Kumari ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir incelemede, demir oksitin nanopartikül (30 nm) ve mikropartikül (<5 μm) formlarının 500, 1.000 ve 2.000 mg/kg'lık konsantrasyonları kullanılarak, Wistar sıçanları üzerindeki toksik etkileri değerlendirilmiştir. Partiküllerin oral yolla uygulandığı sıçanların serum ve karaciğerinde laktat dehidrojenaz aktivitesinde artış gözlenmiştir. LDH, hücrelerde bulunan ve şekerden enerji elde etmek için kullanılan bir çeşit enzimdir. Hücre, doku veya organlarda toksik bir etki ortaya çıktığında, plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH düzeyinde artış ortaya çıkar. Bu artışın miktarı ölçülmek suretiyle hücre hasarının düzeyi değerlendirilebilmektedir (Kumar ve diğerleri, 2018). Fe_2O_3 nanopartikülü ile muamele edilen sıçanların böbreklerinde enzim seviyelerinde azalma gözlenirken, Fe_2O_3 -mikropartikül formunun biyokimyasal parametrelerde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. Fe_2O_3 nanopartikülleri ile muamele edilen sıçanların beyinlerinde de asetilkolinesterazın önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (Kumari ve diğerleri, 2013).

Fe_2O_3 NP'lerinin farklı organizmalar üzerindeki genotoksitesine yönelik çalışmalar, toksisite çalışmalarında olduğu gibi sınırlı sayıda iken, Fe_2O_3 'in hem nanopartikül hem de mikropartikül formunun birlikte sitotoksitesinin ve genotoksitesinin kıyaslandığı çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Demir oksitin nanopartikül (30 nm) ve mikropartikül (<5 μm) formlarının genotoksik etkisini belirlemek amacıyla dişi Wistar sıçanlarda yapılan bir araştırmada, comet testi, mikronukleus testi ve kromozom anormallikleri (KA) testleri uygulanmıştır. Her iki ebattaki demir oksitin 500, 1.000 ve 2.000 mg/kg'lık konsantrasyonları sıçanlara oral yolla verilmiştir. Comet testi için 6, 24, 48 ve 72 saatlik uygulama, MN testi için 48 ve 72 saatlik uygulama, KA testi için de 18 ve 24 saatlik uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Anormallikler kemik iliği hücrelerinde değerlendirilmiştir. Ayrıca, uygulamalardan 6, 24, 48 ve 72 saat sonra demirin karaciğer, dalak, böbrek, kalp, beyin, kemik iliği, idrar ve dışkıdaki biyolojik dağılımını belirlemek amacıyla, atomik absorpsiyon spektrofotometrisi kullanılmıştır. Nano ve mikro boyuttaki demir oksitin uygulandığı sıçanlarda, kuyruk DNA yüzdesi ile mikronukleusların ve kromozom anormalliklerinin frekanslarındaki artışın kontrole kıyasla anlamsız olduğu ($p > 0,05$) tespit edilmiştir. Buna dayanarak araştırmacılar, Fe_2O_3 nanopartikülü ve mikropartikülünün test edilen dozlarda genotoksik olmadığını ifade etmişlerdir. Diğer yandan Fe_2O_3 'in nanopartikül formunun intestinal bariyeri kolayca aşarak, karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve

kemik iliğinde biriktiği, Fe₂O₃ bulk formunun ise gastrointestinal sistem ile absorbe olduğu ancak organlarda önemli bir birikim olmadan, feçes yolu ile dışarı atıldığı belirtilmiştir (Singh ve diğerleri, 2013). Fe₂O₃ NP'lerinin toksik etkisinin yetişkin erkek Wistar sıçanlarında hücre canlılık testi MTT ile mutajenik etkisi ise Ames testi ile değerlendirildiğinde bir çalışmada da, bu NP'lerin herhangi bir genotoksik etki oluşturmadığı fakat MTT testi sonucunda çok az bir toksik etki oluşturduğu gözlenmiştir (Szalay ve diğerleri, 2011).

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin diğer farklı metal oksit nanopartikülleri ile birlikte sitotoksitesinin ve genotoksitesinin kıyaslandığı çalışmalar da mevcuttur. Karlsson ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada çeşitli metal oksit parçacıklarının (CuO, TiO₂, ZnO, Cu-Zn, Fe₂O₄, Fe₃O₄, Fe₂O₃) ve çok duvarlı karbon nanotüplerinin (MWCNT) insan akciğer epitel hücre hattı (A549) üzerindeki *in vitro* genotoksik etkileri comet testi ile incelenmiştir. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin (29 nm) 2, 40 ve 80 µg/mL'lik konsantrasyonları herhangi bir genotoksik etki oluşturmazken, en fazla DNA hasarının CuO nanopartikülleri tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir (Karlsson ve diğerleri, 2008).

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin farklı bitkiler üzerindeki fizyolojik ve toksikolojik etkileri konusunda da yürütülmüş birçok çalışma mevcuttur. *Citrus maxima* (Çin greyfurdu) türünde Fe₂O₃ nanopartikülünün kök büyümesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada, NP'lerin bitki köklerine girebildiği fakat köklerden sürgünlere geçemediği gözlenmiştir. Nanopartiküllerin, kontrole kıyasla klorofil içeriğini %23,2 ve kök aktivitesini %23,8 oranında ve anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir. Fe₂O₃ NP'leri, sadece en yüksek konsantrasyonda (100 mg/L) MDA oluşumunu önemli ölçüde arttırmış, klorofil içeriği ve kök aktivitesini azaltmıştır. Bu çalışma neticesinde düşük konsantrasyonlardaki Fe₂O₃ NP'lerinin bitki büyümesi için etkili bir demir nano gübre olma potansiyeline sahip olduğu vurgulanmıştır (Hu ve diğerleri, 2017).

Fe₂O₃ nanopartikülleri, tarımda da yenilikçi ve umut verici bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ancak, Fe₂O₃ NP'lerinin olası toksisitesi ve bitki hücresi tarafından alımı ve translokasyonu, büyük ölçekli saha uygulamasından önce daha fazla çalışma gerektirmektedir. Bu gereklilikten yola çıkılarak yürütülen bir araştırmada, Fe₂O₃ NP'lerinin *Zea mays* (mısır) bitkisi kök hücreleri tarafından alımı ve translokasyonu incelenmiştir. Fe₂O₃ NP'lerinin tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri, antioksidan enzim aktivitesi,

malondialdehit (MDA) içeriği ve klorofil içeriği belirlenmiştir. 20 mg/L Fe₂O₃ NP'leri kök uzamasını %11,5 oranında ve önemli düzeyde arttırmıştır. Çimlenme indeksi ile canlılık indeksini sırasıyla %27,2 ve %39,6 oranlarında arttırmıştır. Bununla birlikte, 50 ve 100 mg/L Fe₂O₃ NP'leri kök uzunluğunu sırasıyla %13,5 ve %12,5 oranında ve anlamlı ölçüde azaltmıştır. Fe₂O₃ NP'leri *Zea mays* bitkisinin sadece kök kısmında oksidatif stresi tetiklemiştir (Li ve diğerleri, 2016).

Günümüzde bitki comet testi ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları, nanomateryaller, ağır metaller ve radyasyona maruz kalmış hücrelerdeki genetik hasarları belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Comet testi ayrıca bazı insan ve hayvan hücrelerinde uygulansa da son yıllarda özellikle *Allium cepa* L. (soğan), *Allium sativum* L. (sarımsak), *Nicotiana tabacum* (tütün), *Vicia faba* (bakla) ve *Solanum tuberosum* (patates) gibi bitki türleri üzerinde çokça uygulanmaktadır (akmak, 2017).

Bu alışmada Fe₂O₃ nanopartikül ve mikropartikül formlarının genotoksik etkisi en yaygın kullanılan genotoksisite testlerinden biri olan comet testi ile de incelenmiştir. Hem nano hem de mikro Fe₂O₃ partikülleri, 24 ve 48 saat boyunca *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerine uygulanmıştır. *Allium* testinde kullanılan dört farklı konsantrasyon (125, 250, 500 ve 750 µg/mL) comet testinde de kullanılmıştır. Fe₂O₃ nanopartikülü için, 24 saatlik comet uygulamasında, kuyruk uzunluğu parametresi esas alındığında, kontrole kıyasla DNA hasarı 125 ve 250 µg/mL'de anlamlı bir artış gösterirken, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti sadece 125 µg/mL'de yani en düşük konsantrasyonda anlamlı bir artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise kuyruk uzunluğu, 24 saatlik uygulamada olduğu gibi, 125 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarda DNA hasarı kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti dikkate alındığında ise sadece 125 µg/mL'de DNA hasarının kontrole kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Comet testi sonucuna göre Fe₂O₃ NP'lerinin 24 ve 48 saatlik uygulamaları değerlendirildiğinde, en düşük iki konsantrasyonda (125 ve 250 µg/mL) DNA artışına sebep olduğu, en yüksek iki konsantrasyonda (500 ve 750 µg/mL) ise DNA hasarında artışa sebep olmadığı gözlenmiştir. Bunun nedenlerinden biri konsantrasyon artışıyla birlikte nanopartiküllerin çökelme eğilimi göstererek aglomeratlar oluşturmasından kaynaklanabilir. Konsantrasyon arttıķa agregat oluşturan NP'lerin bitki hücresine penetre olması zorlaşır ve dolayısıyla genotoksik etkileri de yüksek olmaz.

Bu tez çalışması kapsamında Fe_2O_3 mikropartikül formunun *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde 24 saatlik muamelesi sonucunda tüm konsantrasyonlarda DNA hasarı negatif kontrole kıyasla artış göstermiştir. Fakat en yüksek konsantrasyonda DNA hasarı artışı gözlenmemiştir. Fe_2O_3 nanopartikül formunda olduğu gibi mikropartikül formunda da konsantrasyon artışına bağlı olarak kümeleşme eğilimi artarak, bitki hücresine penetre olma yeteneği azalmış olabilir. Dolayısıyla hücre içerisine giremeyen partiküller herhangi bir genotoksik etkiye de neden olmamaktadır. 48 saatlik muamele sonucunda ise en yüksek iki konsantrasyonda (500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$) DNA hasarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Nanopartiküller konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrede oksidatif strese ve serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Nanopartiküller serbest radikalleri yüzeylerinde absorbe etme eğilimi gösterirler. Serbest radikaller hücrede, DNA tek ve çift zincirinde ve proteinlerde oksidasyona, çapraz bağlantılara, deoksiriboz ve fosfat iskeleti arasında hasarlara ve spesifik modifikasyonlara, pürin ve pirimidin bazlarında hasarlara neden olabilirler. Bu oksidasyon ürünleri, onarılabildiği gibi, eğer onarılmazsa, mutasyonlara veya DNA tek veya çift zincirinde kırıklara neden olur. Metal ve metal oksit nanopartiküllerinin genotoksitesi, dolaylı olarak ROT üretiminden kaynaklanmaktadır. Abiyotik stres (ağır metaller dahil) bitki hücrelerinde doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre Fe_2O_3 mikropartikülleri de artan konsantrasyonlarda hücrede ROT üretimini tetikleyerek genotoksik hasara neden olduğu ifade edilebilir. Al_2O_3 nanopartikül (< 50 nm) ve bulk formunun *Allium cepa* L. üzerindeki genotoksik etkisinin comet testi ile incelendiği bir çalışmanın sonucunda hem nano hem de mikro Al_2O_3 'in konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarı oluşumunu da arttırdığı, nanopartikül formun mikropartikül forma göre daha fazla genotoksik etki meydana getirdiği bildirilmiştir (De ve diğerleri, 2016). MgO NP'leri (< 50 nm) ile yapılan bir çalışmada, 12,5, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonların 4 saat boyunca uygulandığı *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde, DNA hasarı comet testi ile incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarının da arttığı tespit edilmiştir (Mangalampalli ve diğerleri, 2018). Bizmut oksit (III) NP'lerinin (90-210 nm) *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde oluşturduğu genotoksik etki de comet testi ile incelenmiş ve konsantrasyon artışına paralel bir şekilde DNA hasarının da arttığı bildirilmiştir (Liman, 2013).

Bu tez çalışmasında olduğu gibi, Kaygisiz ve Cigerci de Fe_2O_3 NP'nin *Allium cepa* L. üzerindeki genotoksik etkisini comet testi kullanarak incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, <50

nm ve <100 nm boyutlarındaki Fe₂O₃ nanopartikülleri ile iyonik Fe₂O₃ formun genotoksik potansiyelini *Allium* ve comet testleri ile araştırmıştır. Fe₂O₃ NP'leri ve iyonik form için dört farklı konsantrasyon (1, 2, 5 ve 10 mM) ve üç farklı uygulama süresi (4, 24 ve 96 saat) kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda <50 nm, <100 nm ve iyonik formdaki Fe₂O₃'ün *Allium cepa* L. kök hücrelerinde mitotik indekste azalmaya sebep olduğu, comet testi sonucunda da konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarında artış oluşturduğu belirtilmiştir. Ayrıca, <50 nm boyutundaki Fe₂O₃'ün, <100 nm ve iyonik forma kıyasla daha toksik bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (Kaygisiz ve Cığerci, 2017). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular Kaygisiz ve Cığerci'nin bulgularına benzerlik göstermekle beraber, bu iki çalışmada incelenen nanopartiküllerin yapısı ve ebatları ile konsantrasyon ve uygulama süreleri de farklılıklar göstermektedir (Kaygisiz ve Cığerci, 2017).

Raphanus sativus (turp) bitkisinde de Fe₂O₃ NP'lerinin genotoksik ve apoptotik potansiyeli incelenmiştir. Fe₂O₃ NP'leri, turpta kök uzunluğunu ve tohum çimlenmesini geciktirmiş ve düşük konsantrasyonlarda (1,0 mg/mL) hücrede ROT oluşumunu tetiklemiştir. Çalışmada uygulanan comet testi, Fe₂O₃ NP'leri ile muamele edilmiş gruplarda DNA iplik kırıklarında konsantrasyona bağlı bir artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca yüksek Fe₂O₃ konsantrasyonunda (2,0 mg/mL) hücrenin apoptoza uğradığı sonucuna ulaşılmıştır (Saqib ve diğerleri, 2016).

Nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin comet testiyle incelendiği birçok araştırma mevcuttur. Bu konuda yapılan bir çalışmada *Allium cepa* L. kök meristem hücrelerinde silikon dioksit (SiO₂)'in mikropartikül (SMP) ve nanopartikül (SNP) (15 nm) formunun 1, 10 ve 100 ppm konsantrasyonları kullanılarak genotoksik etkileri incelenmiştir. Araştırmanın sonuçları dikkate alındığında, 1 ve 10 ppm'de DNA hasarının arttığı, 100 ppm'de azaldığı gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda (100 ppm) SNP'lerin aglomere olduğu ve bu nedenle hücreye girişlerinin azaldığı ve sonuçta DNA hasarındaki etkilerinin de düşük düzeyde kaldığı sonucuna varılmıştır. SMP uygulamasında ise, konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarının da arttığı gözlenmiştir (Kaya ve diğerleri, 2015). *Allium cepa* L. kök hücreleri TiO₂ NP'lerinin 2, 4, 6, 8 ve 10 mM konsantrasyonları ile 3, 6 ve 24 saat boyunca muamele edilmiş ve oluşan hasarlar comet testi ile incelenmiştir. Tüm muameleler birlikte değerlendirildiğinde, DNA hasarında 4 mM konsantrasyona kadar artış olduğu ve ardından en yüksek doza kadar kademeli bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Bu etkinin, 10

mM'da nanopartiküllerin agregat oluşturmamasından kaynaklandığı vurgulanmıştır (Ghosh ve diğerleri, 2010).

Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 0,4, 2 ve 10 µg/kg'lık konsantrasyonlarının farelere intravenöz olarak uygulandığı bir *in vivo* araştırmada, nanopartiküllerin DNA'daki olası etkileri comet testi ile incelenmiştir. Nanopartikül uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla, DNA göçünde ve dolayısıyla DNA hasarında artış olduğu tespit edilmiştir (Nemmar ve diğerleri, 2015). Fe₂O₃ NP'lerinin fare fibroblast kültüründe (L-929), hücre canlılığını ve DNA stabilesini konsantrasyona bağlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında ve DNA stabilitesinde azalma gözlenmiştir (Hong ve diğerleri, 2011).

NP'lerden özellikle metal ve metal oksit NP'lerin, comet testi sonucunda DNA hasarına sebep olduğunu ve genotoksik olduğuna yönelik birçok çalışma daha bulunmaktadır (Balasubramanyam ve diğerleri, 2009; Kim ve diğerleri, 2011; Guan ve diğerleri, 2012; Senapati ve diğerleri, 2015; Zijno ve diğerleri, 2015; Chinde ve Grover, 2017; Siivola ve diğerleri, 2020; Jalili ve diğerleri, 2020; Abudayyak ve diğerleri, 2020; Handral ve diğerleri, 2021).

Yukarıdakilerin tersine, Fe₂O₃ nanopartiküllerinin comet testinde DNA hasarı oluşturmadığını gösteren sonuçlar da mevcuttur. Örneğin, Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *in vivo* genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Gaharwar ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, Wistar sıçanlarına 28 gün boyunca, haftada bir kez kaudal ven yoluyla uygulamalar yapılmıştır. 7,5, 15 ve 30 mg/kg'lık Fe₂O₃ konsantrasyonlarının kullanıldığı bu araştırmada, nanopartiküllerin genotoksik etkisi comet testi ile değerlendirildiğinde, elde edilen verilere göre, bu nanopartiküllerinin anlamlı bir DNA hasarı oluşturmadığı belirtilmiştir (Gaharwar ve diğerleri, 2015). 90 nm boyutundaki Fe₂O₃ nanopartikülleri kullanılarak A549 hücre hattı ile fare alveolar makrofajlarında (MH-S) yapılan bir araştırmada, DNA hasarının belirlenmesi amacıyla yine comet testi uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda 20 ve 40 µg/cm⁻² konsantrasyonlarındaki Fe₂O₃ nanopartiküllerine 4 saat maruz kalan A549 ve MH-S hücrelerinde DNA hasarı gözlenmediği bildirilmiştir (Freyria ve diğerleri, 2012).

Nanopartiküllerin genotoksik mekanizmaları hâla tam olarak bilinmemektedir. Nanopartiküllerin olası genotoksik mekanizmaları primer ve sekonder mekanizma olmak

üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Primer mekanizma ise kendi içerisinde direkt ve indirek genotoksik mekanizma olarak ikiye ayrılmıştır. Nanopartiküllerin birincil genotoksitesisi, enflamasyon yokluğunda genetik hasarın ortaya çıkması anlamına gelir. Partiküllerin direkt birincil genotoksitesisi, partiküllerin genomik DNA ile veya hücre döngüsündeki olayları düzenleyen bileşenlerle doğrudan etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir. Bu etki, partiküllerin yüzeyindeki ROT'lar gibi oksidanların, oksidatif saldırısı veya partiküllerin çekirdeğe girmesi sonucunda DNA ile doğrudan fiziksel etkileşimi yoluyla gerçekleşebilir. Direkt genotoksiste, hücre bölünmesi sırasında, çekirdek zarından kurtulan kromatin ve kromozomların veya kromozomların kutuplara ayrıştırılmasında görev yapan moleküllerin, nanopartiküllerin fiziksel veya kimyasal müdahalesine maruz kalmasından ortaya çıkabilir. İndirekt birincil genotoksiste, parçacıklarla etkileşimlerine yanıt olarak artan ROT üretiminden veya hücre içindeki glutatyon gibi antioksidanların tükenmesi yoluyla mitokondri ve zara bağlı NADPH oksidazlar dahil hücresel bileşenlerdeki bozulmalardan kaynaklanabilir. Endojen serbest radikallerin oluşumunun artması veya bu türlere karşı bozulmuş antioksidan savunması, oksidatif stresle sonuçlanır ve oksidatif DNA hasarının tetiklenmesine yol açabilir. Sekonder genotoksiste, makrofajlar ve polimorfonükleer nötrofilik lökositler (PMN) gibi enflamatuvar hücreler tarafından oluşturulduğu için birincil genotoksiteden önemli ölçüde farklıdır. Bu hücreler, enflamatuvar bir yanıtın ortaya çıkarılmasıyla partiküllerin birikim bölgesine toplanır. Hücreleri istilacı patojenlerden kurtarmaya yönelik bu normal doğal enflamatuvar yanıt, normal işlevin geri kazanılmasında önemlidir, ancak reaktif türlerin oluşumu, istenmeyen etkilere ve DNA hasarına neden olur.

Bu tez çalışmasında metal oksit nanopartiküllerinden biri olan demir oksitin nanopartikül ve mikropartikül formlarının *Allium cepa* L. bitkisindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi ilk defa detaylı bir şekilde ve karşılaştırmalı olarak *Allium* testi ve comet testi ile incelenmiştir. Böylece bu partiküllerin insan ve diğer canlı türleri üzerinde de herhangi bir risk oluşturup oluşturmayacağına yönelik bilgiler elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, demir oksitin hem nanopartikül hem de mikropartikül formu *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik indekste anlamlı düşüşlere, bazı mitotik fazlarda anlamlı değişimlere ve mitoz bölünmenin farklı safhalarında (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) DNA ve kromozomlarla ve/veya mitotik döngüdeki moleküllerle doğrudan veya dolaylı etkileşim yoluyla yapışıklık, C-metfaz, köprü, ileri gitme, geri kalmış kromozom gibi çeşitli anormalliklerine sebep olmuştur. Demir oksitin nanopartikül formu, mikropartikül forma kıyasla daha fazla mitotik anormallik oluşumuna sebep olmuştur. Nanopartiküllerin boyutları küçüldükçe bitki

hücresine penetre olabilmesi kolaylaşır ve hücrede oluşturabileceği genotoksik etki de mikropartikül forma kıyasla daha fazla olabilir. Bu çalışmada uygulanan bir diğer genotoksisite testi olan comet testi sonucunda demir oksit nanopartikül ve mikropartikül formunun zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değişmekle birlikte, DNA hasarı oluşturdukları da gözlenmiştir. Nanopartiküllerin özellikle somatik hücrelerin genetik materyalinde oluşturabileceği hasarlar, başta kanser olmak üzere birçok hastalıkla bağlantılı olduğu gibi, gametik hücrelerde oluşturabileceği hasarlar ise, gelecek nesilleri doğrudan etkileme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin ve bunların mekanizmasının belirlenmesi ve anlaşılması başta insan sağlığı olmak üzere, doğadaki bütün canlılar için büyük önem taşımaktadır (Azad ve diğerleri, 2008; Donaldson ve diğerleri, 2010; Magdolenova ve diğerleri, 2013).

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile, manyetik rezonans görüntüleme, doku tamiri, ilaç ve gen taşıma sistemleri, biyolojik akışkanların detoksifikasyonu, gen terapisi, hücre ayrımı gibi biyomedikal alanlarda çok fazla tercih edilen Fe_2O_3 nanopartiküllerinin genotoksik etkileri ve potansiyel riskleri hakkında hem üreticiler hem de kullanıcılar bilinçlenecektir. *Allium* testi diğer genotoksisite testleri ile yakınlık gösteren bir test olması nedeniyle, bu çalışmada kullanılan Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartiküllerinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde genotoksik hasarlar meydana getirdiğinin belirlenmiş olması, insanlar ve diğer canlı organizmalar üzerinde de genetik hasarlar oluşturabileceğini göstermektedir.

Nanopartiküllerin etki mekanizmaları konusunda bazı görüşler ileri sürülmekle birlikte, bu mekanizmaların daha net bir şekilde belirlenebilmesi için daha fazla çalışmanın yanında farklı test sistemleri üzerinde farklı birçok nanopartikülün genotoksik etkisinin değerlendirildiği araştırmalara da gereksinim duyulmaktadır. Böylece, hem bu partikülleri üreten ve kullanan kişilerin, hem de bunları kullanan diğer kişilerin, ayrıca bazı devlet kuruluşlarının nanopartiküllerin genotoksik etkileri konusunda bilinçlenmesi, zararlı olan nanopartiküllerle ilgili daha farklı üretim teknikleri kullanılması konusunda farkındalıkların oluşturulması sağlanacaktır. Sonuçta, nanoteknoloji ve nanopartiküllerden daha az zarar ile daha fazla fayda sağlanması konusunda toplumların sağlığına katkı sağlanmış olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanoteknolojinin son yıllardaki gelişimine bağlı olarak nanopartiküllerin üretimi ve kullanımı her geçen gün artış göstermektedir. Nanopartiküller tıp, tekstil, kozmetik, kişisel bakım ürünleri, yüksek teknoloji, savunma sanayi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküller ise, biyolojik varlıkların (hücre, protein, nükleik asitler, enzim, bakteriler ve virüs vb.) tespiti, ilaç ve gen taşıma sistemleri, klinik tanı ve tedaviler (MRG gibi) de dahil olmak üzere, önemli tıbbi ve biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin birçok alanda yaygın kullanım alanı bulmasının sonucu olarak, insan dahil tüm canlılar doğrudan veya dolaylı olarak bu partiküllere maruz kalmaktadırlar.

Nanopartikül kullanımdaki, salınımdaki ve doğaya yayılışındaki artış, bu partiküllerin toksik ve özellikle genotoksik etkileri konusunda bazı endişelerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Yapılan bazı araştırmalarda sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi, bilim insanlarını, bu konuda daha fazla farkındalık oluşturmaya ve daha detaylı araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir. Yapılan bazı çalışmalar nanopartiküllerin canlılarda her hangi bir genotoksik etkisinin olmadığını gösterirken, bazı çalışmalarda genotoksik olduğu yönünde bilgiler mevcuttur. Dolayısıyla bu konudaki çalışmalar yeterli olmadığı gibi, birbiri ile çelişir niteliktedir.

Bu tez çalışmasında biyomedikal alanlarda çok yaygın bir şekilde kullanılmalarına rağmen genotoksik etkilerine yönelik çalışmaların çok yetersiz olması ve birbiri ile çelişkili sonuçlar göstermesi nedeniyle Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartikül formlarının genotoksik etkileri *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde *Allium* testi ve comet testi ile incelenmiştir. Hem nano hem de mikro formun *Allium* testinde çoğu uygulamada sitotoksik ve genotoksik olduğu belirlenmiştir. Comet testinde de her iki partikülün DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6.1 ve 6.2).

Demir oksitin hem nanopartikül hem de mikropartikül formu 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda *Allium cepa* L. hücrelerinde kontrole kıyasla mitotik indekste azalmaya sebep olmuştur. Bu azalma Fe_2O_3 nanopartikülü için, 24 saatlik muamele süresinin 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu ve Fe_2O_3 mikropartikülü için 48 saatlik uygulama süresinin 125 $\mu\text{g/mL}$ hariç diğer tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı düzeydedir. Fe_2O_3 nanopartikül ve mikropartikül formları kromozomal anormallik

frekansında artışa sebep olmuşlardır. Fe_2O_3 nanopartikül formunun 24 ve 48 saatlik uygulamalarında konsantrasyon artışına paralel bir şekilde, kromozom anormallik frekansının da kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Fe_2O_3 mikropartikül formu da 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde konsantrasyon artışına paralel bir şekilde kromozomal anormallik frekansında artışa sebep olmuştur. Fakat bu artışın sadece bazı konsantrasyonlarda anlamlı olduğu belirlenmiştir.

DNA hasarının tespit edildiği comet testi sonucunda nano demir oksitin 24 saatlik uygulamasında comet kuyruk uzunluğu kontrole kıyasla 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir artış gösterirken, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti sadece 125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda anlamlı bir artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise kuyruk uzunluğu 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti dikkate alındığında ise sadece 125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda DNA hasarının kontrole kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Demir oksit mikropartikül formunun 24 saatlik comet uygulamasında kontrole kıyasla DNA hasarı 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlı artış göstermiştir. 48 saatlik comet uygulamasında ise 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla DNA hasarında anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Nanopartiküllerin birtakım özelliklerinin (boyut, şekil, yüzey yükü, agregasyon), bunların toksisitesi üzerinde etkili olabileceği belirlenmiştir. Fakat çalışmaların az sayıda olması ve elde edilen verilerin birbiri ile çelişkili olmasından dolayı nanopartiküllerin toksisitesi hakkında kesin yorumlar yapmak oldukça güçtür. Fakat farklı test sistemleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarda küçük ebatlı nanopartiküllerin büyük ebatlardaki nanopartiküllere kıyasla ve mikron boyuttaki formlara kıyasla daha fazla sitotoksik ve genotoksik olabileceği bildirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada, Allium testinde elde edilen veriler, mevcut literatür çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir ve nano formun mikron forma kıyasla daha fazla toksik olduğunu tespit ederek, nanopartiküllerin boyutlarının Allium testindeki toksisite oluşumunda önemli bir faktör olduğu bilgisini güçlendirmiştir. Comet testinde, Fe_2O_3 'in mikropartikül formunun, nanopartikül formuna kıyasla, DNA hasarında daha fazla uygulamada anlamlı artışlara sebep olduğu tespit edilmiştir. Comet testinde elde edilen bu sonuç, aynı partiküllerin incelenen test sistemine göre toksik etkilerinde de bazı farklılıklar gösterebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca büyük ebatlı partiküllerin hücreye endositoz yolu ile alınmasından dolayı mikropartiküller

nanopartiküllere kıyasla hücre içerisine endositoz ile fazla bir şekilde alınabilir ve daha fazla genotoksik etki oluşturabilir.

Bu tez çalışmasında, uygulanan genotoksisite testleri ile, demir oksit'in hem nanopartikül hem de mikropartikül formu *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde genotoksik etkili olup, hem klastojenik hem de anöjenik etkiler ve hem de DNA'da kırıklar oluşturmuştur. Dolayısıyla bu nanopartiküllerin potansiyel bir risk oluşturabilecek özellikte oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Özellikle biyomedikal alanlarda Fe_2O_3 nanopartiküllerinin kullanılmasına daha fazla dikkat edilmelidir ve Fe_2O_3 nanopartiküllerinin genotoksisitelerine yönelik, farklı test sistemlerinde, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların sayısının artırılması gerekmektedir. Bu tez çalışması ile ayrıca nanopartiküllerin, ekosistemdeki besin zincirinin çok önemli bir parçasını oluşturan bitkiler üzerinde genotoksik bir etki meydana getirdikleri ve bitkileri besin kaynağı olarak kullanan insanlar ve diğer canlılar için de potansiyel bir tehlike oluşturabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle her iki partikülün daha dikkatli kullanılması gerekmektedir. Diğer yandan, bu partiküllerin genotoksik etkileri konusunda daha farklı türlerde, farklı test sistemleri ile daha detaylı araştırmalar yapılması, pratik uygulamalarda bunların avantajlarından en verimli şekilde yararlanmamız ve bunların potansiyel yan etkilerinin azaltılması açısından büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma ile elde edilen verilerin, nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik riskleri konusunda üreticileri ve kullanıcıları bilinçlendirerek, insan sağlığına ve konforlu yaşamına büyük katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Çizelge 6.1. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *Allium cepa* kök hücrelerindeki genotoksik etkileri

Fe ₂ O ₃ Nanopartikül	Mİ	KA	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Momenti
	Allium Testi		Comet Testi		
24 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					
48 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					
72 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					

Kontrole göre anlamlı artış ↑

Kontrole göre anlamlı azalış ↓

Kontrole göre aynı ■

Çizelge 6.2. Fe₂O₃ mikropartiküllerinin *Allium cepa* kök hücrelerindeki genotoksik etkileri

Fe ₂ O ₃ Mikropartikül	Mİ	KA	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Momenti
	Allium Testi		Comet Testi		
24 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					
48 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					
72 saat					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					
750 µg/ml					

Kontrole göre anlamlı artış ↑

Kontrole göre anlamlı azalış ↓

Kontrole göre aynı —

KAYNAKLAR

- Abudayyak, M., Güzel, E. and Özhan, G. (2020). Cytotoxic, Genotoxic, and Apoptotic Effects of Nickel Oxide Nanoparticles in Intestinal Epithelial Cells. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 446.
- Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B. and Alhadlaq, H. A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 578-583.
- Ahmed, B., Dwivedi, S., Abdin, M. Z., Azam, A., Al-Shaeri, M., Khan, M. S. and Musarrat, J. (2017). Mitochondrial and chromosomal damage induced by oxidative stress in Zn²⁺ ions, ZnO-bulk and ZnO-NPs treated Allium cepa roots. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.
- Akyıl, D. ve Özkara, A. Bitkilerde Genotoksisite Çalışmalarında Yaygın Olarak Kullanılan Parametreler ve Uygulanan Test Sistemleri. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2), 223-247.
- Ali, A., Hira Zafar, M. Z., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S. and Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, 49.
- Ali, S., Mehmood, A. and Khan, N. (2021). Uptake, Translocation, and Consequences of Nanomaterials on Plant Growth and Stress Adaptation. *Journal of Nanomaterials*, 2021.
- Arias, L. S., Pessan, J. P., Vieira, A. P. M., Lima, T. M. T. D., Delbem, A. C. B. and Monteiro, D. R. (2018). Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: a perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. *Antibiotics*, 7(2), 46.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd Julkapli, N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S. G. and Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *The Scientific World Journal*.
- Assadian, E., Dezhampanah, H., Seydi, E. and Pourahmad, J. (2019). Toxicity of Fe₂O₃ nanoparticles on human blood lymphocytes. *Journal of Biochemical and Molecular toxicology*, 33(6).
- Avellan, A., Yun, J., Morais, B. P., Clement, E. T., Rodrigues, S. M. and Lowry, G. V. (2021). Critical Review: Role of Inorganic Nanoparticle Properties on Their Foliar Uptake and in Planta Translocation. *Environmental Science & Technology*.
- Azad, N., Rojanasakul, Y. and Vallyathan, V. (2008). Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 11(1), 1-15.
- Bakand, S. and Hayes, A. (2016). Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 929.

- Bakand, S., Hayes, A. and Dechsakulthorn, F. (2012). Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhalation Toxicology*, 24(2), 125-135.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M. F., Hussain, S. M. and Grover, P. (2009). *In vivo* genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, 24(3), 245-251.
- Barberio, A., Voltolini, J. C. and Mello, M. L. S. (2011). Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, 20(4), 927-935.
- Bhatt, I. and Tripathi, B. N. (2011). Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*, 82(3), 308-317.
- Boffetta, P., Van Der Hel, O., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S. and Bonassi, S. (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *American journal of Epidemiology*, 165(1), 36-43.
- Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D. and Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3), 191-209.
- Buseck, P. R. and Adachi, K. (2008). Nanoparticles in the atmosphere. *Elements*, 4(6), 389-394.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Cabuga Jr, C. C. (2017). *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 7(1), 12.,
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L. and Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), 13608-13619.
- Chen, L., Yokel, R. A., Hennig, B. and Toborek, M. (2008). Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 3(4), 286-295.
- Chinde, S. and Grover, P. (2017). Toxicological assessment of nano and micron-sized tungsten oxide after 28 days repeated oral administration to Wistar rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 819, 1-13.
- Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C. and Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 109531.
- Cinisli, K. T., Uçar, S. ve Dikbaş, N. (2019). Nanomateriyallerin Tarımda Kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(4), 817-831.

- Çalipınar, H. and Ulas, D. (2019). Development of Nanotechnology in the World and Nanotechnology Standards in Turkey. *Procedia Computer Science*, 158, 1011-1018.
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knuchel, R., Kiessling, F. and Lammers, T. (2019). Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 302-325.
- De Matteis, V. and Rinaldi, R. (2018). Toxicity assessment in the nanoparticle era. *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, 1-19.
- De, A., Chakrabarti, M., Ghosh, I. and Mukherjee, A. (2016). Evaluation of genotoxicity and oxidative stress of aluminium oxide nanoparticles and its bulk form in *Allium cepa*. *The Nucleus*, 59(3), 219-225.
- Debnath, P., Mondal, A., Sen, K., Mishra, D. and Mondal, N. K. (2020). Genotoxicity study of nano Al₂O₃, TiO₂ and ZnO along with UV-B exposure: An *Allium cepa* root tip assay. *Science of The Total Environment*, 713, 136592.
- Doak, S. H., Liu, Y. and Chen, C. (2017). Genotoxicity and cancer. In Adverse effects of engineered nanomaterials, *Academic Press*, 423-445.
- Dobrzynska, M. M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Lankoff, A., Dusinska, M. and Kruszewski, M. (2014). Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. *Toxicology*, 315, 86-91.
- Donaldson, K., Poland, C. A. and Schins, R. P. (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 4(4), 414-420.
- Doolette, C. L., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K. and Navarro, D. A. (2015). Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (*Lactuca sativa*): Effect of agricultural amendments on plant uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 788-795.
- Du, X., Gao, S., Hong, L., Zheng, X., Zhou, Q. and Wu, J. (2019). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838, 22-27.
- Dumala, N., Mangalampalli, B. and Grover, P. (2019). *In vitro* genotoxicity assessment of nickel (II) oxide nanoparticles on lymphocytes of human peripheral blood. *Journal of Applied Toxicology*, 39(7), 955-965.
- Dusinska, M., Tulinska, J., El Yamani, N., Kuricova, M., Liskova, A., Rollerova, E. and Smolkova, B. (2017). Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: New strategies for toxicity testing?. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 797-811.
- Ealia, S. A. M. and Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 263, No. 3, p. 032019). IOP Publishing.

- Fadoju, O. M., Osinowo, O. A., Ogunsuyi, O. I., Oyeyemi, I. T., Alabi, O. A., Alimba, C. G. and Bakare, A. A. (2020). Interaction of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles induced cytogenotoxicity in *Allium cepa*. *The Nucleus*, 1-8.
- Fahmy, H. M., Ebrahim, N. M. and Gaber, M. H. (2020). In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 60, 126481.
- Fernandez-Garcia, M. and Rodriguez, J. A. (2011). Metal oxide nanoparticles. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1-22.
- Ferraro, S. A., Domingo, M. G., Etcheverrito, A., Olmedo, D. G. and Tasat, D. R. (2020). Neurotoxicity mediated by oxidative stress caused by titanium dioxide nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 57, 126413.
- Firbas, P. and Amon, T. (2014). Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. *Caryologia*, 67(1), 25-35.
- Fiskesjo, G. (1988). The *Allium* test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 197(2), 243-260.
- Freyria, F. S., Bonelli, B., Tomatis, M., Ghiazza, M., Gazzano, E., Ghigo, D. and Fubini, B. (2012). Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), 850-861.
- Gaharwar, U. S. and Paulraj, R. (2015). Iron oxide nanoparticles induced oxidative damage in peripheral blood cells of rat. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 8(04), 274.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10), 1253-1262.
- Ghosh, M., Ghosh, I., Godderis, L., Hoet, P. and Mukherjee, A. (2019). Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 132-145.
- Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Jana, A., Nag, A. and Mukherjee, A. (2016). Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells *in vitro* and Swiss albino male mice *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 286-296.
- Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. and Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(4), 897-900.

- Gruz, P., Shimizu, M., Sugiyama, K. I., Yamada, M. and Honma, M. (2020). Effect of episomally encoded DNA polymerases on chemically induced mutagenesis at the hisG46 target in Ames test. *Genes and Environment*, 42(1), 1-12.
- Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H. and Liu, M. (2012). Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 1-7.
- Gürmen, S. and Ebin, B., İTÜ, M. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metallurji Dergisi*, 150, 31-38.
- Handral, H. K., Ashajyothi, C., Sriram, G., Kelmani, C. R., Dubey, N. and Cao, T. (2021). Cytotoxicity and Genotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Fibroblasts. *Coatings*, 11(1), 107.
- Hernandez-Hernandez, A. A., Aguirre-Alvarez, G., Carino-Cortes, R., Mendoza-Huizar, L. H. and Jimenez-Alvarado, R. (2020). Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer. *Chemical Papers*, 74, 3809-3824.
- Herzog, E., Byrne, H. J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A. and Oostingh, G. J. (2009). Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), 276-281.
- Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J. and Han, D. W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3219.
- Hsiao, I. L. and Huang, Y. J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*, 409(7), 1219-1228.
- Hu, J., Guo, H., Li, J., Gan, Q., Wang, Y. and Xing, B. (2017). Comparative impacts of iron oxide nanoparticles and ferric ions on the growth of Citrus maxima. *Environmental Pollution*, 221, 199-208.
- Hui, Y., Yi, X., Hou, F., Wibowo, D., Zhang, F., Zhao, D. and Zhao, C. X. (2019). Role of nanoparticle mechanical properties in cancer drug delivery. *ACS nano*, 13(7), 7410-7424.
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A. and Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 223-245.
- Iqbal, M. S., Singh, A. K., Singh, S. P. and Ansari, M. I. (2020). Nanoparticles and plant interaction with respect to stress response. *In Nanomaterials and Environmental Biotechnology*, (1-15).

- Jalili, P., Huet, S., Lanceleur, R., Jarry, G., Le Hegarat, L., Nesslany, F. and Fessard, V. (2020). Genotoxicity of aluminum and aluminum oxide nanomaterials in rats following oral exposure. *Nanomaterials*, 10(2), 305.
- Jurasin, D. D., Curlin, M., Capjak, I., Crnkovic, T., Lovric, M., Babic, M. and Gajovic, S. (2016). Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7(1), 246-262.
- Karaismailoglu, M. C. (2015). Investigation of the potential toxic effects of prometryne herbicide on *Allium cepa* root tip cells with mitotic activity, chromosome aberration, micronucleus frequency, nuclear DNA amount and comet assay. *Caryologia*, 68(4), 323-329.
- Kargozar, S., Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today. Proceedings*, 5(7), 15492-15500.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1726-1732.
- Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G. and Sasaki, Y. F. (2010). Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?. *Journal of Nucleic Acids*, 2010.
- Kaya, N., Çakmak, I., Akarsu, E. and Kaya, B. (2015). DNA Damage Induced by Silica Nanoparticle. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(12 A), 4478-4484.
- Kaygisiz, Ş. Y. and Ciğerci, İ. H. (2017). Genotoxic evaluation of different sizes of iron oxide nanoparticles and ionic form by SMART, Allium and comet assay. *Toxicology and Industrial Health*, 33(10), 802-809.
- Keller, A. A. and Lazareva, A. (2014). Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local. *Environmental Science ve Technology Letters*, 1(1), 65-70.
- Khan, I., Saeed, K. and Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khan, M. R., Adam, V., Rizvi, T. F., Zhang, B., Ahamad, F., Josko, I. and Mao, C. (2019). Nanoparticle–Plant Interactions: Two-Way Traffic. *Small*, 15(37), 1901794.
- Kim, H. R., Kim, M. J., Lee, S. Y., Oh, S. M. and Chung, K. H. (2011). Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 129-135.
- Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. and Petri-Fink, A. (2017). Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. *Chemical reviews*, 117(17), 11476-11521.

- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y. and Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1825-1851.
- Klien, K. and Godnic-Cvar, J. (2012). Genotoxicity of metal nanoparticles: Focus on in-vivo studies. *Arhiv za higijenu rada i Toksikologiju*, 63(2), 133-144.
- Kohl, Y., Rundén-Pran, E., Mariussen, E., Hesler, M., El Yamani, N., Longhin, E. M. and Dusinska, M. (2020). Genotoxicity of nanomaterials: Advanced in vitro models and high throughput methods for human hazard assessment . *Nanomaterials*, 10(10), 1911.
- Kong, L., Gao, X., Zhu, J., Cheng, K. and Tang, M. (2016). Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1674-1683.
- Kumar, P., Nagarajan, A. and Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6).
- Kumari, M., Khan, S. S., Pakrashi, S., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2011). Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 613-621.
- Kumari, M., Rajak, S., Singh, S. P., Murty, U. S., Mahboob, M., Grover, P. and Rahman, M. F. (2013). Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 296-305.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M. and Carriere, M. (2012). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*, 431, 197-208.
- Leme, D. M., Marin and Morales, M. A. (2008). Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(1), 80-86.
- Li, J., Hu, J., Ma, C., Wang, Y., Wu, C., Huang, J. and Xing, B. (2016). Uptake, translocation and physiological effects of magnetic iron oxide (γ -Fe₂O₃) nanoparticles in corn (*Zea mays* L.). *Chemosphere*, 159, 326-334.
- Li, Y., Bhalli, J. A., Ding, W., Yan, J., Pearce, M. G., Sadiq, R. and Chen, T. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*, 8(sup1), 36-45.
- Liman, R. (2013). Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. *Chemosphere*, 93(2), 269-273.
- Liman, R., Acikbas, Y., Ciğerci, İ. H., Ali, M. M., Kars, M. D. (2020). Cytotoxic and genotoxic assessment of silicon dioxide nanoparticles by *allium* and comet tests.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 104(2), 215-221.

- Liman, R., Acikbas, Y. and Ciğerci, İ. H. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by Allium and Comet tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 408-414.
- Ling, C., An, H., Li, L., Wang, J., Lu, T., Wang, H. and Liu, S. (2021). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vitro: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Biological Trace Element Research*, 199(5), 2057-2076.
- Liu, G., Gao, J., Ai, H. and Chen, X. (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), 1533-1545.
- Lv, J., Christie, P. and Zhang, S. (2019). Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano*, 6(1), 41-59.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. and Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3053-3061.
- Macar, T. K. (2021). Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in Allium cepa L. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(2), 2391-2399.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V. and Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233-278.
- Mahmoodi, M., Soleyman-Jahi, S., Zendehtdel, K., Mozdarani, H., Azimi, C., Farzanfar, F. and Rezaei, N. (2017). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, and micronuclei in lymphocytes of oncology department personnel handling anti-neoplastic drugs. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2), 235-240.
- Mahmoud, A., Ezgi, Ö., Merve, A. and Özhan, G. (2016). *In vitro* toxicological assessment of magnesium oxide nanoparticle exposure in several mammalian cell types. *International Journal of Toxicology*, 35(4), 429-437.
- Maliszewska, I. (2016). Effects of the biogenic gold nanoparticles on microbial community structure and activities. *Annals of Microbiology*, 66(2), 785-794.
- Mallakpour, S. and Madani, M. (2015). A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, 86, 194-207.
- Mamur, S., Ünal, F., Yılmaz, S., Erikel, E. and Yüzbaşıoğlu, D. (2020). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and chemical toxicology*, 43(2), 149-157.
- Mangalampalli, B., Dumala, N. and Grover, P. (2018). Allium cepa root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 125-137.
- Manke, A., Wang, L. and Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced

oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013.

- Martinez, G., Merinero, M., Perez-Aranda, M., Perez-Soriano, E. M., Ortiz, T., Begines, B. and Alcudia, A. (2021). Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Materials*, 14(1), 166.
- Matsuoka, A., Yamazaki, N., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. (1992). Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 272(3), 223-236.
- McNamara, K., Tofail, S. A. (2017). Nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Physics*, 2(1), 54-88.
- Mehrian, S. K. and De Lima, R. (2016). Nanoparticles cyto and genotoxicity in plants: Mechanisms and abnormalities. *Environmental Nanotechnology, Monitoring ve Management*, 6, 184-193.
- Mishra, S., Keswani, C., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. and Singh, H. B. (2017). Integrated approach of agri-nanotechnology: challenges and future trends. *Frontiers in Plant Science*, 8, 471.
- Mitrano, D. M., Motellier, S., Clavaguera, S. and Nowack, B. (2015). Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International*, 77, 132-147.
- Mohamad, A. T., Kaur, J., Sidik, N. A. C. and Rahman, S. (2018). Nanoparticles: A review on their synthesis, characterization and physicochemical properties for energy technology industry. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 46(1), 1-10.
- Montoro, A., Soriano, J. M., Barquinero, J. F., Almonacid, M., Verdu, G., Sahuquillo, V. and Sebastia, N. (2012). Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 216-221.
- Mortezaee, K., Najafi, M., Samadian, H., Barabadi, H., Azarnezhad, A. and Ahmadi, A. (2019). Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Chemico-biological interactions*, 312, 108814.
- Mortimer, M., Kasemets, K. and Kahru, A. (2010). Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*, 269(2-3), 182-189.
- Mu, Q., Hondow, N. S., Krzeminski, L., Brown, A. P., Jeuken, L. J. and Routledge, M. N. (2012). Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), 1-11.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M. Z., Ahmed, F. J., Maitra, A. N., Prashant, C. K. and Dinda, A. K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 983.
- Nemmar, A., Beegam, S., Yuvaraju, P., Yasin, J., Tariq, S., Attoub, S. and Ali, B. H. (2015). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles acutely promote thrombosis

- and cardiac oxidative stress and DNA damage in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 1-11.
- Osman, I. F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J. N. and Anderson, D. (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine*, 5(8), 1193-1203.
- Osman, N. M., Sexton, D. W. and Saleem, I. Y. (2020). Toxicological assessment of nanoparticle interactions with the pulmonary system. *Nanotoxicology*, 14(1), 21-58.
- Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., Erdoğan, S. F., Konuk, M. and Sağlam, E. (2015). Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of pyracarbolid by *Allium* test and micronucleus assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 337-341.
- Özkul M., Özel Ç.A., Yüzbaşıoğlu D. and Unal F. 2016. Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology* 68(6): 2395-2405.
- Pakrashi, S., Jain, N., Dalai, S., Jayakumar, J., Chandrasekaran, P. T., Raichur, A. M., and Mukherjee, A. (2014). *In vivo* genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. *PloS one*, 9(2), e87789.
- Patil, S. S., Shedbalkar, U. U., Truskewycz, A., Chopade, B. A. and Ball, A. S. (2016). Nanoparticles for environmental clean-up: a review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology ve Innovation*, 5, 10-21.
- Petosa, A. R., Jaisi, D. P., Quevedo, I. R., Elimelech, M. and Tufenkji, N. (2010). Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. *Environmental Science ve Technology*, 44(17), 6532-6549.
- Pourrut, B., Pinelli, E., Celiz Mendiola, V., Silvestre, J. and Douay, F. (2015). Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis*, 30(1), 37-43.
- Radic, S., Stipanicev, D., Vujcic, V., Rajcic, M. M., Sirac, S. and Pevalek-Kozlina, B. (2010). The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 408(5), 1228-1233.
- Radziun, E., Wilczynska, J. D., Ksiazek, I., Nowak, K., Anuszevska, E. L., Kunicki, A. and Zabkowski, T. (2011). Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in vitro*, 25(8), 1694-1700.
- Rai, M., Ingle, A. P., Pandit, R., Paralikar, P., Shende, S., Gupta, I. and da Silva, S. S. (2018). Copper and copper nanoparticles: role in management of insect-pests and pathogenic microbes. *Nanotechnology Reviews*, 7(4), 303-315.
- Rajeshwari, A., Kavitha, S., Alex, S. A., Kumar, D., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A. (2015). Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip—effects of oxidative stress generation and biouptake. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 11057-11066.

- Rajput, V. D., Minkina, T., Sushkova, S., Tsitsuashvili, V., Mandzhieva, S., Gorovtsov, A. and Gromakova, N. (2018). Effect of nanoparticles on crops and soil microbial communities. *Journal of Soils and Sediments*, 18(6), 2179-2187.
- Ramos, A. P., Cruz, M. A., Tovani, C. B. and Ciancaglini, P. (2017). Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical Reviews*, 9(2), 79-89.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S. and Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in Chemistry*, 5, 78.
- Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J. and Prasad, P. N. (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug– carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(26), 7860-7865.
- Sadeghi, L., Tanwir, F. and Babadi, V. Y. (2015). *In vitro* toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on Hep G2 cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(2), 197-203.
- Sadeghi, L. and Espanani, H. R. (2015). Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislavske Lekarske Listy*, 116(6), 373-378.
- Sahoo, S. K., Parveen, S. and Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 20-31.
- Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C., Tariq, M., Daud, M., Baig, N. and Shehzad, F. (2015). Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4122-4143.
- Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 101067.
- Salk, J. J. and Kennedy, S. R. (2020). Next-generation genotoxicology: using modern sequencing technologies to assess somatic mutagenesis and cancer risk. *Environmental and molecular mutagenesis*, 61(1), 135-151.
- Sandhu, S. S., De Serres, F. J., Gopalan, H. N. B., Grant, W. F., Velemínsky, J. and Becking, G. C. (1994). An introduction and study design. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), 169-173.
- Santonastaso, M., Mottola, F., Iovine, C., Cesaroni, F., Colacurci, N. and Rocco, L. (2020). In vitro effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) on cadmium chloride (CdCl₂) genotoxicity in human sperm cells. *Nanomaterials*, 10(6), 1118.
- Santos Filho, R. D., Vicari, T., Santos, S. A., Felisbino, K., Mattoso, N., Sant'Anna-Santos, B. F. and Leme, D. M. (2019). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. *Genetics and Molecular*

Biology, 42(2), 425-435.

- Saquib, Q., Faisal, M., Alatar, A. A., Al-Khedhairi, A. A., Ahmed, M., Ansari, S. M. and Ahmad, J. (2016). Genotoxicity of ferric oxide nanoparticles in *Raphanus sativus*: Deciphering the role of signaling factors, oxidative stress and cell death. *Journal of Environmental Sciences*, 47, 49-62.
- Schaming, D. and Remita, H. (2015). Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry*, 17(3), 187-205.
- Schneider, T., Westermann, M. and Glei, M. (2017). *In vitro* uptake and toxicity studies of metal nanoparticles and metal oxide nanoparticles in human HT29 cells. *Archives of Toxicology*, 91(11), 3517-3527.
- Scown, T. M., Van Aerle, R. and Tyler, C. R. (2010). Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment?. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(7), 653-670.
- Seabra, A. B., and Duran, N. (2015). Nanotoxicology of metal oxide nanoparticles. *Metals*, 5(2), 934-975.
- Selin, Oğuz., Omurtag, G. Z., Arıcıoğlu, F. ve Şardaş, S. (2013). Mutajenik-karsinojenik etkinin ames testi ile araştırılması. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 3(2), 75-82.
- Senapati, V. A., Jain, A. K., Gupta, G. S., Pandey, A. K. and Dhawan, A. (2015). Chromium oxide nanoparticle-induced genotoxicity and p53-dependent apoptosis in human lung alveolar cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(10), 1179-1188.
- Shabani, N., Javadi, A., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mirzaie, H. and Sadeghi, J. (2021). Potential application of iron oxide nanoparticles synthesized by co-precipitation technology as a coagulant for water treatment in settling tanks. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 38(1), 269-276.
- Sharma, V. K. (2009). Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment a review. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44(14), 1485-1495.
- Siddiqi, K. S. and Husen, A. (2017). Plant response to engineered metal oxide nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 12(1), 1-18.
- Siivola, K. M., Suhonen, S., Hartikainen, M., Catalán, J. and Norppa, H. (2020). Genotoxicity and cellular uptake of nanosized and fine copper oxide particles in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 856, 503217.
- Singh, A., Singh, N. A., Afzal, S., Singh, T. and Hussain, I. (2018). Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *Journal of Materials Science*, 53(1), 185-201.
- Singh, D. and Roy, B. K. (2017). Evaluation of malathion-induced cytogenetical effects and oxidative stress in plants using *Allium* test. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(4), 92.

- Singh, S. P., Rahman, M. F., Murty, U. S. N., Mahboob, M. and Grover, P. (2013). Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(1), 56-66.
- Singh, S., Vishwakarma, K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Singh, V. K. and Chauhan, D. K. (2017). Understanding the plant and nanoparticle interface at transcriptomic and proteomic level: a concentric overview. *Plant Gene*, 11, 265-272.
- Sinha, V. S. and Kumar, N. (2014). Assessment of Mito-inhibitory and Genotoxic effects of two Organophosphate Pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L. *Annals of Plant Sciences*, 3, 699-703.
- Soykan, H. and Serdar, K. O. C. A. (2014). Dichlorvos' un (DDVP) *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkileri. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 35(3), 36-45.
- Speit, G. and Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). In DNA repair protocols. *Humana Press*, 203-212.
- Stark, W. J. (2011). Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(6), 1242-1258.
- Sun, D., Zhao, T., Wang, T., Wu, M. and Zhang, Z. (2020). Genotoxicity assessment of triclocarban by comet and micronucleus assays and Ames test. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), 7430-7438.
- Sun, L., Li, Y., Liu, X., Jin, M., Zhang, L., Du, Z. and Sun, Z. (2011). Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in vitro*, 25(8), 1619-1629.
- Sun, Z., Xiong, T., Zhang, T., Wang, N., Chen, D. and Li, S. (2019). Influences of zinc oxide nanoparticles on *Allium cepa* root cells and the primary cause of phytotoxicity. *Ecotoxicology*, 28(2), 175-188.
- Szalay, B., Tatray, E., Nyiro, G., Vezér, T. and Dura, G. (2012). Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in *in vivo* and *in vitro* experiments. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), 446-453.
- Şekeroğlu, Z. A. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Tabei, Y., Sugino, S., Nakajima, Y. and Horie, M. (2018). Reactive oxygen species independent genotoxicity of indium tin oxide nanoparticles triggered by intracellular degradation. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 264-271.
- Tarafdar, J. C., Sharma, S. and Raliya, R. (2013). Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. *African Journal of Biotechnology*, 12(3).

- Tarantola, M., Pietuch, A., Schneider, D., Rother, J., Sunnick, E., Rosman, C. and Janshoff, A. (2011). Toxicity of gold-nanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology*, 5(2), 254-268.
- Teow, Y., Asharani, P. V., Hande, M. P. and Valiyaveetil, S. (2011). Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chemical Communications*, 47(25), 7025-7038.
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Duran, N., Diez, M. C., Martinez, M., Parada, J. and Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of hazardous materials*, 390, 121974.
- Türkoğlu, Ş. (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3), 224-230.
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204.
- Ueda, M. (2020). Alkali comet assay in genotoxicity tests. In DNA Electrophoresis (pp. 73-78). *Humana*, New York.
- Ünal, F., Helvacı Tülek, N., Yüzbaşıoğlu, D., and Çelik, M. (2020). Methidathion İnsektisit/Akarisitinin Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin Allium Testi ile İncelenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1, 1-12.
- Valdiglesias, V., Fernandez-Bertolez, N., Kılıç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S. and Laffon, B. (2016). Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 53-63.
- Valdiglesias, V., Kılıç, G., Costa, C., Fernandez-Bertolez, N., Pasaro, E., Teixeira, J. P. and Laffon, B. (2015). Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56(2), 125-148.
- Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., Suravajhala, P. and Bhatnagar, P. (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Biol. Protoc*, 8, 32763.
- Wang, L., Wang, L., Ding, W. and Zhang, F. (2010). Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), 8617-8624.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J. and Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699-712.
- Yang, S. T., Wang, X., Jia, G., Gu, Y., Wang, T., Nie, H. and Liu, Y. (2008). Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology Letters*, 181(3), 182-189.
- Yang, W., Wang, L., Mettenbrink, E. M., DeAngelis, P. L. and Wilhelm, S. (2020). Nanoparticle toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61.

- Youssef, M. S. and Elamawi, R. M. (2020). Evaluation of phytotoxicity, cytotoxicity, and genotoxicity of ZnO nanoparticles in *Vicia faba*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 18972-18984.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Fatma, Ünal. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak, C. and Kasap, R. (2003). Cytological effects of the herbicide racer “flurochloridone” on *Allium cepa*. *Caryologia*, 56(1), 97-105.
- Zakerzadeh, A., Esnaashari, E. and Dadfar, S. (2017). In vitro comparison of cytotoxicity and genotoxicity of three vital pulp capping materials. *Iranian endodontic journal*, 12(4), 419.
- Zeb, A., Liu, W., Wu, J., Lian, J. and Lian, Y. (2020). Knowledge domain and emerging trends in nanoparticles and plants interaction research: A scientometric analysis. *NanoImpact*, 100278.
- Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 841, 43-48.
- Zhang, W. (2014). Nanoparticle aggregation: principles and modeling. *Nanomaterial*, 19-43.
- Zhao, L., Peralta-Videa, J. R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C., Zhang, J. and Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 225, 131-138.
- Zhu, Z. J., Carboni, R., Quercio Jr, M. J., Yan, B., Miranda, O. R., Anderton, D. L. and Vachet, R. W. (2010). Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. *Small*, 6(20), 2261-2265.
- Zhu, Z. J., Wang, H., Yan, B., Zheng, H., Jiang, Y., Miranda, O. R. and Vachet, R. W. (2012). Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. *Environmental Science ve Technology*, 46(22), 12391-12398.
- Zijno, A., De Angelis, I., De Berardis, B., Andreoli, C., Russo, M. T., Pietraforte, D. and Barone, F. (2015). Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicology in vitro*, 29(7), 1503-1512.
- Zivari Fard, M., Fatholahi, M., Abyadeh, M., Bakhtiarian, A., Mousavi, S. E. and Falahati, M. (2020). The Investigation of the Cytotoxicity of Copper Oxide Nanoparticles on Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nanomedicine Research Journal*, 5(4), 364-368.

Zoroddu, M. A., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I. and Peana, M. (2014). Toxicity of nanoparticles. *Curr Med Chem*, 21(33), 3837-3853.



GAZİ GELECEKTİR...