

**FARKLI BOYUTLARDAKİ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN  
GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN *Drosophila melanogaster*  
SOMATİK HÜCRELERİ VE  
ALLIUM TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ  
Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ  
DANIŞMAN  
Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran, 2016

Bu tez çalışması 13.FENBİL.22 numaralı proje ile AFYON KOCATEPE  
ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ  
tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**FARKLI BOYUTLARDAKİ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN**  
**GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN *Drosophila melanogaster***  
**SOMATİK HÜCRELERİ VE ALLIUM TEST YÖNTEMİ İLE**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Haziran, 2016**

## TEZ ONAY SAYFASI

Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ tarafından hazırlanan “Farklı Boyutlardaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartiküllerinin Genotoksik Potansiyellerinin *Drosophila melanogaster* Somatik Hücreleri ve Allium Test Yöntemleri ile Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca ...13./06./2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik **Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** :Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

**Başkan** : Prof.Dr. S. Elif KORCAN  
Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri M.Y.O.

**Üye** : Prof.Dr. Murat TOSUN  
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi.

**Üye** : Doç.Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi.

**Üye** : Doç.Dr. Recep LİMAN  
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi.

**Üye** : Yrd.Doç.Dr. Sevgi ULUKÜTÜK  
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Şuhut M.Y.O.

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve  
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....  
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR  
Enstitü Müdürü

**BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI**  
**Afyon Kocatepe Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım  
bu tez çalışmasında;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**13/06/2016**

**Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ**

**ÖZET**  
Doktora Tezi

FARKLI BOYUTLARDAKİ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN GENOTOKSİK  
POTANSİYELLERİNİN *Drosophila melanogaster* SOMATİK HÜCRELERİ VE  
ALLIUM TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Nanopartiküller (NP) doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin tüm biyolojik sistemlerde var olan proteinler gibi metal oksit nanopartikülleri de kolaylıkla üretilmektedir. Benzersiz manyetik özelliklere sahip olan demir oksit nanopartikülleri (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP) birçok biyomedikal, biyomühendislik ve *in vivo* uygulamalarda, doku onarımı da dahil manyetik rezonans görüntüleme, immunoassay, ilaç dağıtımı, hipertermi ve biyolojik sıvıların detoksifikasyonu için yüksek bir potansiyele sahiptir. Nanopartiküller; çeşitli yüzey modifikasyonuna sahip olmasına rağmen biyolojik olarak parçalanamayan biyouyumlu maddelerdir. Ancak nanopartiküllerin toksik potansiyeli hala önemli bir husustur. Bu nedenle nanopartiküllerin etkilerini öğrenmek için daha fazla çalışma yapılması gereklidir.

Bu çalışmada Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün farklı formlarının (<50 nm, <100 nm ve iyonik) muhtemel genotoksik etkisi *Drosophila melanogaster*'de (*D. melanogaster*) kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve Allium test yöntemi kullanarak belirlenmesi amaçlandı. SMART yöntemi için, genomlarında çekinik flare (flr3) ve çoklu kanat kılı (mwh) genlerini taşıyan üçüncü evre transheterozigot larvalar söz konusu Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün NP ve iyonik formunun dört farklı konsantrasyonu (1mM, 2 mM, 5 mM ve 10 mM ) ile kronik olarak beslenmiştir. Söz konusu Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün genotoksik etkileri, larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerin sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirildi. <100 nm NP ve iyonik form

uygulanmasında toplam klonlarda genotoksik etki gözlenmezken; <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 1 ve 10 mM'lık konsantrasyon uygulanması ile elde edilen sonuçlarda toplam klonlarda genotoksik etki gözlenmiştir.

Allium test hızlı, güvenilir, uygulanması kolay ve ekonomik bir test sistemidir. Ayrıca prokaryotik veya ökaryotik canlılarla yapılan diğer, alternatif kısa dönem toksisite test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in farklı formlarının (<50 nm, <100 nm ve iyonik) *Allium cepa* (*A. cepa*) kök ucu hücrelerindeki mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine olan etkileri incelendi. <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü için Allium kök büyüme inhibisyon testinde EC<sub>50</sub> değeri 5 mM olarak belirlendi ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 0,5xEC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> and 2xEC<sub>50</sub> konsantrasyonları soğan kök hücrelerine uygulandı. Distile su ve metil metan sülfanat (MMS, 10 ppm) sırasıyla negatif ve pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı. *A. cepa*'nın hücre döngüsü 24 saat olduğu için uygulama süresi 24 ve 96 saat olarak belirlendi. <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP ve iyonik formunun uygulama süresi 4 saat olarak belirlendi. Mitotik indeks ve mitotik faz frekansları her bir konsantrasyon ve süre için ayrı ayrı hesaplandı. <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde kontrol grubuna göre 24 saatlik uygulamanın 5 mM'lık konsantrasyonu, 96 saatlik uygulamanın ise tüm konsantrasyonlarının faz frekansları istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Ayrıca <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün ve iyonik formunun 4 er saatlik uygulamalarının ise tüm konsantrasyonlarının faz frekansları istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Anafaz telofaz hücrelerinde kalgın kromozom, bozulmuş anafaz telofaz, yapışıklık ve anafaz köprüsü gözlemlendi.

Komet testinde; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 nm boyutunun 24 ve 96 saat'lik uygulama süresine ve konsantrasyon artışına; <50 nm boyutunun ve iyonik formunun 4'er saatlik uygulamanın konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki artış istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu (p<0,05).

Sonuç olarak çalışmamızda kullanılan test sistemlerinde, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün <50 nm boyutunun <100 nm boyutu ve iyonik formuna göre genotoksisiteyi indüklediği gözlemlendi. NP ve iyonik formu kıyaslandığında küçük boyutlu ve geniş yüzeye sahip olan maddelerin daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikül, SMART, *Drosophila melanogaster*, Allium Test, Komet Test, Genotoksisite.

**2016, xiii+ 72 sayfa**

## ABSTRACT

PhD Thesis

### INVESTIGATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF VARIOUS SIZES Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTICLES WITH *Drosophila Melanogaster* SOMATIC CELLS AND ALLIUM TEST METHODS

Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ

Afyon Kocatepe University

Institute of Science and Technology

Department of Molecular Biology and Genetics Department

**Supervisor:** Associate Professor İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Nanoparticles are found very common in nature. For instance, proteins exist in almost all biological systems and metal-oxide nanoparticles are easily produced etc. Iron oxide nanoparticles with unique magnetic properties have a high potential to use in several biomedical, bioengineering and *in vivo* applications, including tissue repair, magnetic resonance imaging, immunoassay, drug delivery, detoxification of biologic fluids, cell sorting, and hyperthermia. Although various surface modifications are being done for making these nonbiodegradable nanoparticles more biocompatible. But their toxic potential is still a major concern. Therefore, it is necessary to use further examination assay systems in order to check nanoparticle's effects.

In this study, genotoxic potential of <50 nm, <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and ionic form were investigated by using Allium test, Comet Assay and wing somatic mutation and recombination test (SMART). In SMART assay, Flare-3 virgin females and mwh males were crossed to get transheterozygous larvae. Different concentrations (1mM, 2 mM, 5 mM and 10 mM) of nanoparticles and ionic form were fed to transheterozygous larvae. No significant genotoxic effect was observed in <100 nm nanoparticles and ionic form while <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles showed genotoxicity at 1 mM and 10 mM concentrations.

*A. cepa* root meristems were exposed with five doses (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 mM) of < 50 nm and ionic form for 4 hour and three doses (2,5, 5, 10 mM) for <100 nm of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for 24 and 96 h. MMS and distilled water were used as a positive and negative control respectively. Mitotic index and mitotic phase frequencies were calculated separately for each concentration and duration. Effect on mitotic phase of <100 nm of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for 24 at 5 mM concentration was observed while there was the statistically significant effect for 96 h at all concentrations of <100 nm of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. Similarly, <50 nm of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and ionic form also showed statistically significant effect on mitotic phase frequencies for all concentrations at 4 h.

Comet assay results showed time and concentration dependent increase in <100 nm nanoparticles at 24 and 96 h. Similarly, application of <50 nm nanoparticles and ionic form for 4 h also showed DNA damage as the concentration increased and it was found statistically significant (p <0.05).

Consequently, the <50 nm of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was found toxic compared to 100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ionic form. It could be deduced that nanoparticles especially <50 nm, were more genotoxic because of its smaller size and large surface area.

**Keywords:** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles, SMART, *Drosophila melanogaster*, Allium test, Comet test, genotoxicity.

**2016, xiii+ 72 pages**

## TEŐEKKÖR

Tezim boyunca bana her türlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni bu çalışmaya teşvik eden değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca fikir ve önerileri ile yardımcı olan ve laboratuvar çalışmalarımda her türlü kolaylığı gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. BÖlent KAYA'ya ve çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Sayın Doç. Dr. Recep LİMAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarımda her zaman bana yardımcı olan Halil TURHAN, Muhammed Muddassir ALİ ve Tuğba TAŐÇAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca hep yanımda olan bana her zaman inanan, güvenen, destek olan, varlığı ile daima güç veren aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin 13.FENBİL.22 numaralı projemi desteklelerinden dolayı teşekkür ederim.

Şöhret YÖKSEK KAYGISIZ

AFYONKARAHİSAR, 2016

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....	5
2.1 Drosophila melanogaster'in Yaşam Döngüsü .....	10
2.1.1 Yumurta .....	11
2.1.2 Larva .....	11
2.1.3 Pupa .....	11
2.1.4 Ergin .....	12
2.2 Kullanılan Hatların Genetik Yapısı .....	14
2.3 Allium test .....	16
2.4 Komet Test .....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar-Test Materyalleri .....	18
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Organizmalar .....	18
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	18
3.2 Metot.....	20
3.2.1 SMART .....	20
3.2.2 Allium Test .....	24
3.2.3 Allium Komet .....	26
3.2.4 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz .....	27
4. BULGULAR .....	29
4.1 Nanopartikül Karakterizasyonu ile İlgili Çalışma .....	29
4.1.1 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikülünün (< 50 nm) Karakterizasyonu .....	30
4.1.2 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikülünün (<100 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri .....	31
4.2 SMART Testine Ait Bulgular .....	33
4.3 Allium Testine Ait Bulgular .....	37

4.3.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi .....	37
4.3.2 Mitotik İndeks ve Mitotik Faz Frekansları .....	38
4.3.3 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikülünün ve İyonik Formunun Neden Olduğu Anormalliklerin Tipleri ve Oranları .....	41
4.3.4 Allium Komet Testine Ait Bulgular .....	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	48
6. KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	71

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

dH <sub>2</sub> O	Distile su
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mg/L	Miligram/Litre
nm	Nanometre
mm	Milimetre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
<	Küçüktür

### Kısaltmalar

---

NP	Nanopartikül
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Demir (III) oksit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
flr3	Çekinik flare geni
mwh	Çoklu kanat kılı geni
NMPA	Normal erime noktalı agaroz
LMPA	Düşük erime noktalı agaroz
HCl	Hidroklorik asit
EMS	Etil Metan Sülfonat

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 <i>Drosophila</i> 'nın yaşam döngüsü .....	13
Şekil 2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> 'in gelişim evreleri .....	13
Şekil 2.3 Kanat trikomlarının görünümü .....	15
Şekil 2.4 a) Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve b) dengeleyici kromozom taşıyan <i>BdS</i> (serrat) bireylerinin kanat fenotipleri .....	15
Şekil 2.5 <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri .....	16
Şekil 3.1 Dengelenmiş heterozigot <i>mwh/BdS</i> ve transheterozigot <i>mwh/flr3</i> bireylerin elde edilebilmesi için <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr3/TM3</i> , <i>BdS</i> bireyleri arasındaki çaprazlamalar .....	21
Şekil 3.2 a.Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü b.İkiz mutant klonların görünümü c. Büyük tek tip <i>flr3</i> mutant klonların görünümü d. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü .....	23
Şekil 4.1 <50 nm $Fe_2O_3$ NP'ünün Joel 21007 HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüsü .....	30
Şekil 4.2 <100 nm $Fe_2O_3$ NP'ünün Joel 21007 HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüsü .....	31
Şekil 4.3 <100 nm $Fe_2O_3$ NP'ünün Zeta Potansiyeli .....	32
Şekil 4.4 <100 nm $Fe_2O_3$ NP'ünün Partikül Büyüklük Dağılımı .....	32

**Şekil 4.5** <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Partikül Büyüklük Dağılımı İstatistik Grafiği .....32

**Şekil 4.6** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile muamele edilen *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anormallikler ...45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanotoksikolojisi .....	9
Çizelge 3.1 Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi .....	27
Çizelge 4.1 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP.....	35
Çizelge 4.1 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> iyonik form .....	35
Çizelge 4.3 <100 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları .....	37
Çizelge 4.4 <100 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi .....	39
Çizelge 4.5 <50 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi .....	40
Çizelge 4.6 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> iyonik formunun <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi .....	41
Çizelge 4.7 < 100 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları .....	42
Çizelge 4.8 <50 nmFe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları ...	43
Çizelge 4.9 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> iyonik formunun neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları ..	45

<b>Çizelge 4.10</b> <100 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün <i>A. cepa</i> kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti .....	46
<b>Çizelge 4.11</b> <50 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ünün <i>A. cepa</i> kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti .....	47
<b>Çizelge 4.12</b> Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> iyonik formununun <i>A. cepa</i> kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti .....	47

## 1. GİRİŞ

Günümüzde teknoloji, insanoğlunun ihtiyaçlarını karşılamak için sürekli gelişmektedir. Bu gelişmelerden biri de boyutların küçültülmesiyle başlayan ve malzemelerin özelliklerini iyileştirmeye yönelik olan “nanoteknoloji”dir (Akdoğan ve Küçükyıldırım 2006).

Nanoteknoloji, malzemelerin nanometre boyutlarında işlenerek pek çok farklı özellik kazanmalarını sağlamıştır. Bu özellikler, malzemelerden yeni nano ürünler üretimine izin vermiştir (Doğan ve Başal 2009).

Boyutları 100 nm ve 100 nm'nin altında kalan parçacıklara NP olarak tanımlanmaktadır. Bu partiküller nanoboyutlu malzemelerin, dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadırlar (Miller *et al.* 2004). NP'ler diğer endüstriyel malzemelerden sahip oldukları spesifik özellikler sebebiyle farklı ve üstün kabul edilmektedirler. Bu özellikler temel olarak, kuantum boyut etkileri, yüzey atomlarının benzeri olmayan karakterleri, yüksek yüzey/hacim oranı ve elektronik yapılarının boyut bağımlılığı olarak belirtilmektedir (Liveri 2006).

NP'lerin tüm özellikleri boyutlarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle aynı NP'ün farklı nano boyutları farklı biyolojik etkiler yaratacaktır. Sonra ise kimyasal bileşenleri ve fiziksel çevresi farklı etkilere sebep olmaktadır. Hem kimyasal hem fiziksel özellikler dinamiktir ve partikülün geçmişi ve lokal çevresi ile ilgili anahtar bilgiler verebilmektedir. Bu bilgiler hem NP ilk elde edildiğinde hem de uygulamalar yapıldığında önemlidir (Aksakal 2014).

Son yıllarda piyasada NP'lerle ilgili ticari, kişisel, medikal ve askeri alanlarda ayrı ayrı kullanılan 200 den fazla tüketimde kullanılan ürün yer almaktadır Güneş kremleri, tekstil, spor malzemeleri, veteriner ilaçları ve kozmetik de dahil olmak üzere şu anda piyasada mevcut yüzlerce nanoteknolojik ürün vardır ((Brumfiel 2006, Griffith *et al.* 2007).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lü dört kristal yapıya sahiptir (Sakurai *et al.* 2009). Kristal yapıda olan ve uygulama alanı bulanlar  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematit) ve  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'tür (Apte *et al.* 2007). Diğer kristal yapıları ise ( $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve  $\beta$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kararsız olduklarından uygulama alanı bulamazlar.

Bilinen en eski Fe oksit minerali olan  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kaya ve toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. Son derece kararlı olan  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, diğer demir oksitlerin transformasyonlarının son halidir. Kırmızı kan hücrelerinde önemli bir pigmenttir. Hematit; demir (III) oksit, demir oksit, kırmızı toprak boyası ve böbrek cevheri olarak da adlandırılmaktadır.  $\gamma$  Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit) NP kırmızı-kahverengi renge sahiptir. Katyon eksikliği olmaksızın ferromanyetik ve izostrüktürel özelliğe sahiptir (Cornell and Schwertmann 2003). Trafik, sanayi ve enerji istasyonlarından emisyon olarak oluşturulabileceği gibi geniş çaptaki uygulamalar için kimyasal olarak da üretilmektedir (Karlsson *et al.* 2008, Faraji *et al.* 2009).

Nanopartiküllere; içme suyunun içilmesi, gıda katkı maddelerinin yenmesi, cilt teması, teneffüs, ve mühendislik nanomalzemelerin enjeksiyonu ile maruz kalınabilmektedir (Oberdörster *et al.* 2005). NP'ler çevreyi üç şekilde etkileyebilir: mikroorganizma, omurgasızlar, balıklar ve diğer canlılar üzerinde (i) doğrudan etki; (ii) kirletici maddelerle etkileşimi ve (iii) cansız çevre yapılarının değişimi (Lead and Smith 2009) ile etkileyebilir.

Nano ürünlerin birçok alanda kullanımının yanında, insan sağlığı ya da çevreye olabilecek zararlı etkileri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Her ne kadar nanoteknolojik ürünler pazarda yerini alsın da toksik yan etkileri hakkında bilgi ve literatür sınırlıdır (Logothetidis 2006). İnsanlarda bu parçacıkların akciğer, bağırsak ve hatta deri yolu ile kolaylıkla kana karışabildiği bilinmektedir (Hoet *et al.* 2004).

SMART genotoksisite ve antijenotoksisite çalışmalarında kullanılan bir yöntemdir ve bu test sisteminde meyve sineği olan *D. Melanogaster* kullanılmaktadır. Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile benzer dizilim gösterdiğinden dolayı; son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *D. melanogaster*'in model

organizma olarak tercih edilmektedir. İnsan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60'ından fazlası *Drosophila* genleri ile benzerdir. Böylelikle; insanlarda meydana gelen mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. (Potter *et al.* 2000). Kansere hassas olan memeli hücreleri, *Drosophila* imajinal diskleri ile biyolojik olarak benzerlik göstermektedir. Sinek ve memeli hücre döngüsü hem genel organizasyon hem de moleküler bakımdan benzerdir. Gelişimsel siklinler (A-, B- ve E- tip) ve onların siklin bağımlı kinaz partnerleri sinek ve insan arasında oldukça korunmuştur (Potter *et al.* 2000). Bu nedenle *Drosophila* kanser çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir.

Mutajenite çalışmalarında bitkilerin kullanımı ilk defa Levan (1938) tarafından kolşisinin *Allium cepa* (*A. cepa*) kök hücrelerinde iğ ipliklerinin dağılmasına ve poliploidiye yol açtığını göstermesiyle başlamıştır. *A. cepa* çeşitli kimyasalların toksik etkisinin belirlenmesinde oldukça sık kullanılan bir materyaldir. *Allium* testi; toksisitenin izlenmesi için uygun olan test sistemlerinden biridir ve birçok laboratuarda kullanılmaktadır. Soğanların saklanması ve kullanılması oldukça kolaydır ve kök ucu hücreleri makroskobik (büyüme, EC<sub>50</sub>) ve mikroskobik parametreler (c-mitoz, yapışıklık, kromozom kırıkları) için uygun bir sistem oluşturur. Ayrıca *Allium* testinin sonuçları ökaryotik ve prokaryotik diğer test sonuçları ile iyi bir korelasyon göstermektedir (Fiskeşjö 1985).

Komet testi düşük seviyelerdeki DNA (Deoksiribonükleik asit) hasarını bile belirleyebilmesinden dolayı diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Dhawan *et al.* 2009). Örnek başına hücre sayısının azlığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve kısa sürede çalışmanın tamamlanabilirliği açısından da avantajı fazladır. Buna ek olarak, hücrelerin hemen hemen her türü üzerinde çalışma yapılabilir. Metot öncelikle alkali ortamlarda uygulandığı için alkali komet analizi ya da alkali tek hücre jel elektroforez şeklinde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, N/N (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve A/N (Alkali gevşeme/Nötr elektroforez) şeklinde de uygulanmaya başlanmıştır (Lin *et al.* 2007). Metodun alkali versiyonu, A/A (Alkali gevşeme/Alkali elektroforez, pH 13) DNA'nın çift ve tek sarmal yapıda olan hasarlarını ölçmek için kullanılmaktadır (Gichner and Plewa 1998, Lin *et al.* 2007). Sadece genotoksik ve

mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, bu çalışma konuları içinde de yer alabilecek önemli bir yöntemdir (Achary *et al.* 2008, Dikilitas *et al.* 2009).

Bu yüzden çalışmamızda NP'lerin muhtemel genotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla genotoksisite test yöntemlerinden olan kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve *Allium* test yöntemi kullanıldı.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

Son yıllarda nanoteknoloji alanında meydana gelen gelişmeler, NP'lerin sentezlenmesine, karakterizasyonuna, fonksiyonel hale getirilmesine ve farklı alanlardaki uygulamalarda kullanılmasına imkan tanımaktadır (Moghimi 2001, Curtis 2001, Panyam 2003). Nano boyuttaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> partikülleri yaklaşık 40 yıldır *in vitro* tanı çalışmalarında kullanılmaktadır (Gupta 2005). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'leri uygulamalarda en çok tercih edilen manyetik partiküller arasında yer almaktadır. Başta maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) olmak üzere birçok demir oksit partikülü üzerine yapılan çalışma bulunmaktadır (Babes 1999).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (manyetik) NP'ü hücresel etiketleme için biyomedikal alanda, ilaç iletimi ve katalizör olarak endüstri alanında kullanımı giderek artmaktadır. Ancak, insan sağlığını ve çevreyi olumsuz etkilemesinin yanı sıra toksik etkide göstermektedir (Hu *et al.* 2012).

Toksikolojik çalışmalar mikrometre boyutu ile NP boyutu (<100 nm) karşılaştırıldığında NP'lerin insan sağlığı üzerinde daha fazla toksik olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bu bilgi her farklı kimyasal kompozisyon ve NP için geçerli değildir. Örneğin; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub> ve CuO'nun nano ve mikrometre parçacıklarının toksik etkisi karşılaştırılmıştır. Partiküller A549 insan hücre hattında, hücre ölümü, mitokondriyal hasar, DNA hasarı ve oksidatif DNA lezyonlarının oluşumuna sebep olmuştur. Bu çalışma; CuO NP'lerinin CuO mikrometre boyutuna göre çok daha toksik olduğunu göstermiştir. Çünkü CuO NP'leri mitokodri üzerinde daha fazla etki göstermektedir. TiO<sub>2</sub> kristal yapısından dolayı mikrometre parçacıkları NP'lerine göre daha fazla DNA hasarı meydana getirmiştir. Demir oksitler düşük toksisite göstermesinin yanı sıra farklı partikül boyutları arasında net bir fark göstermemiştir. Sonuç olarak her NP mikrometre boyutundan daha toksik değildir (Karlsson *et al.* 2009).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü gıdanın maruz kaldığı depolama koşullarını, küçük organik molekülleri, gazları ve mikroorganizma kontaminasyonunu gösteren belirteçlerin üretiminde kullanılabilir (Polat ve Fenercioğlu 2014).

Yapılan bir çalışmada, DMSA (Dimerkaptosüksinik asit) kaplanmış Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *Caenorh abditiselegans* üzerinde farklı deney sistemleri kullanılarak olası öldürücülüğü, geliştirme, üreme, hareket davranışı, yutak pompalama ile dışkılama, bağırsak otofloresans ve reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi üzerine etkisi çalışılmış. 24 saat boyunca 50 mg/L'den fazla konsantrasyonlarda L4-larva üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu saptanmıştır. L1-larva evresinden yetişkin olana kadar olan süreçte, 500 mg/L den fazla konsantrasyon uygulama sonucunda olumsuz etkiler ortaya çıkmıştır. L1-larva evresinden yetişkinliğinin 8. gününe kadar olan süreçte 100 mg/L konsantrasyon uygulama sonucu olumsuz etkiler ortaya çıkmıştır. Bu üç farklı uygulama sonucunda ROT'nin üretimi, öldürücülüğü, geliştirme, üreme, hareket davranışı, yutak pompalama ile dışkılama, bağırsak otofloresans üzerine olumsuz etki yarattığı lineer regresyon tarafından teyit edilmiştir (Wu *et al.* 2012).

Wang vd. (2009)'nin yapmış olduğu çalışmada Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'nün LD<sub>50</sub> dozu belirlenmiş; hemoliz, mikronukleus ve hücre canlılığı testleri uygulamıştır. 20 ile 100 nm arasındaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin fareler üzerindeki LD<sub>50</sub> dozunun 5 g/kg'dan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Dört hafta sonrasında NP'lerin sağlıklı domuz karaciğeri üzerine enjeksiyonun ardından serum aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, serum üre nitrojen ve krom düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Tüm gruplarda belirgin patolojik değişiklikler gözlenmiştir. Alternatif manyetik alana maruz bırakıldıktan sonra tümörlerin inhibisyon oranı kontrol grubunda anlamlı olarak farklı olduğu (sırasıyla % 68,74 ve % 82,79; P<0,01) ortaya konmuştur. Tedavi gruplarındaki farelerin tümörleri nekroz olurken, normal dokuları ve organlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Singh vd. (2013)'nin yapmış olduğu çalışmada dişi Wistar fareleri üzerine 30 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- NP'ü ve iyonik formdaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün genotoksitesi değerlendirilmiştir. Fareler oral yoldan 500, 1000 ve 2000 mg/kg doz ile muamele edilmiştir. Komet testinde lökositler 6, 24, 48 ve 72 saat; mikronükleus testinde periferik kan hücreleri 48 ve 72 saat kemik iliği 24 ve 48 saat; kromozomal aberasyon testinde 18 ve 24 saat muamele edilmiştir. 6, 24, 48 ve 72 saat uygulamalardan sonraki Fe'nin biyolojik dağılımı

karaciğer, dalak, böbrek, kalp, beyin, kemik iliği, ürin ve dışkısı atomik absorpsiyon spektrofotometre ile ölçülmüştür. Komet test sonuçları; mikronükleus ve kromozom aberasyonlarının frekansları tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Yapılan test sonuçlarında 30 nm  $Fe_2O_3$  NP'ünün ve  $Fe_2O_3$ ' ün iyonik formunun genotoksik olmadığı bulunmuştur.

Gaharwar ve Paulraj (2015)'in yapmış olduğu çalışmada *in vivo* koşullarda demir oksit NP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Demir oksit NP'lerinin toksik etkilerini incelemek amacıyla Wistar fareleri intravenöz yoldan 28 gün boyunca haftada bir kez olacak şekilde çeşitli dozlara maruz bırakılmıştır. Ayrıca çeşitli antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT ve GSH), lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve hematolojik aktivite gibi biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Genotoksisitenin belirlenmesinde komet testi kullanılırken oksidatif stres oranının belirlenmesinde antioksidan enzimler kullanılmıştır. Sonuçlar, RBC miktarı, WBC miktarı, nötrofiller, monositler ve hemoglobin gibi hematolojik faktörlerin değiştiğini göstermiştir. Antioksidan enzimlerin doza-bağımlı inhibisyonu ( $p<0,05$ ) bulunmuş ve bu arada MDA düzeyi anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak yüksek bulunmuştur. Fakat demir oksit NP'lerinin komet çalışma sonuçlarında DNA hasarını arttırmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada demir oksit NP'lerinin oksidatif stresi uyardığı ve hücrel aktiviteyi olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

*Ceriodaphnia dubia* üzerine  $Fe_2O_3$ ,  $Fe_2O_3$ -Arsenik (V),  $Al_2O_3$  ve  $Al_2O_3$ -Arsenik (V)'in etkisine bakıldığı çalışmada, NP'ler tek başlarına uygulandıklarında önemli derecede toksik etki göstermezken arsenik ile beraber uygulandıklarında toksik etki göstermişlerdir (Hu *et al.* 2012).

$TiO_2$  ve  $Fe_2O_3$  NP'ünün insan akciğer fibroblastları (IMR-90) ve bronşiyal epitelyal hücreleri (BEAS-2B) üzerine etkisi komet test yöntemi ile araştırılmış,  $Fe_2O_3$  NP'ü DNA hasarına neden olurken;  $TiO_2$  NP'ü DNA hasarı oluşturmamıştır. Her iki NP'de reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olmuşlardır; fakat  $Fe_2O_3$  NP'ünün radikal oluşturması için özel indirgeyici koşulların gerekli olduğu bildirilmiştir (Bhattacharya *et al.* 2009).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü PC12 hücrelerinin fonksiyonunu olumsuz etkilediği yine 0,15-15 mM Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün artan konsantrasyonuna bağlı olarak PC12 hücrelerinin kapasitesini ve canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Pisanic *et al.* 2007).

İnsan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün toksik etkisinin araştırıldığı çalışmada; sitotoksisite mekanizmasının anlaşılması için MTT (3- (4, 5- dimetiltiyazol-2-il) 2, 5-difeniltetrazolyum bromür) ve laktat dehidrogenaz kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde Komet Testiyle DNA zincir kırıklıkları oranı, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artmıştır. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün ROT üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırması; süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz aktivitelerinin azalması nedeniyle oksidatif stresi indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü kaspaz-3 aktivitesini de indüklediği gösterilmiştir (Alarifi *et al.* 2014).

Akciğer epitel hücreleri tek başlarına karbonblack ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü ile maruz bırakıldıkların da protein oksidasyonuna neden olmazken birlikte uygulandıklarında protein oksidasyonunu iki kat arttırdığı gösterilmiştir (Guo *et al.* 2009).

**Çizelge 2.1** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanotoksikolojisi (Suh et al. 2009).

Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP	Hayvan/Hücre Tipi ve Metod	Sonuçlar
5–12 nm	Sıçanın feokromositom hücre hattında (PC12) Floresan canlı / ölü hücre boyama	PC12 hücrelerinde NGF yanıtını ayırt etmek için 0,15- 15 mM NP'lere maruz bırakılmıştır.
5–45 nm	İnsan aortik endotel hücreleri (HAECs) İnflamatuvar belirteçler Ölçülen protein düzeyleri	HAEC'te NP'ler (0.001-50µg / ml) test edilen konsantrasyonlarda herhangi bir enflamatuvar tepkiye yol açmamıştır.
12–50 nm	İnsan mezotelyoma (MSTO); Kemirgen fibroblast hücre hatları(3T3) MTT deneyi, toplam DNA ölçümü	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ü MSTO hücreleri için MTT ve DNA (3 gün boyunca 1-30 ppm) sitotoksik iken 3T3 hücrelerinde (MTT ve DNA), Non-sitotoksiktir.
<100 nm	İnsan mezotelyoma (MSTO); Kemirgen fibroblast hücre hatları(3T3) MTT deneyi, toplam DNA ölçümü	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP'ü MSTO hücreleri için MTT ve DNA (3 gün boyunca 1-30 ppm) sitotoksik iken 3T3 hücrelerinde (MTT ve DNA), Non-sitotoksiktir.

*D. melanogaster* hemositleri (0,1, 1 ve 10 mM) ve insan periferel kan lenfositleri (0,01, 0,1 ve 1 mM) üzerine Ag ve Co NP ve iyon formlarının etkisi Komet testi ile araştırılmıştır. Uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında en yüksek konsantrasyonun hücrelerde genotoksik olduğu ve oksidatif DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Aksakal 2012).

Çinko oksit ve titanyum dioksit NP'lerinin genotoksik etkisine *A. cepa* hücrelerinde Komet testi ile bakılmıştır. İki farklı boyuttaki çinko oksit ve titanyum dioksit NP'lerinin konsantrasyona bağlı olarak genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Kaya et al. 2012).

*A. cepa* kök hücreleri üzerine indiyum tin oksit (İTO)'in muhtemel genotoksik etkisine *Allium* ve Komet testi ile bakılmıştır. *A. cepa* kökleri, 4 saat boyunca İTO'in 5 farklı konsantrasyonuna (12,5, 25, 50, 75 ve 100 ppm) maruz bırakılmıştır. Mitotik indeks ve toplam kromozomal anormalliklerinin arttığı tespit edilmiştir. Komet testi sonuçlarına göre İTO'nun tüm konsantrasyonlarının DNA hasar oranını arttırdığı gösterilmiştir (Ciğerci *et al.* 2015).

Gümüş NP'ünün *D. melanogaster* üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada Gümüş NP'ünün somatik rekombinasyonu önemli derecede etkilediği ve genotoksik aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Demir *et al.* 2011).

## **2.1 Drosophila melanogaster'in Yaşam Döngüsü**

*D. melanogaster*, diploid kromozom sayısına sahiptir ve dört çift kromozom taşımaktadır. Bunlardan üç çifti otozomal kromozom, bir çifti ise cinsiyet kromozomlarıdır. Kromozomları X, Y, 2, 3, 4 şeklinde numaralandırılır (Beria 1990).

İlk kez 1911 yılında Thomas Morgan tarafından deneysel çalışmalarda kullanılmış olan *D. melanogaster*, kullanım açısından pek çok avantaja sahiptir (Graf and Würgler 1996, Lehmann *et al.* 2003, Gui and Grant 2008). Bunlar:

- Kısa generasyon zamanlı ökaryotik bir organizmadır (Yaklaşık 25°C'de % 40-60 bağıl nemde 10 gündür).
- Küçük organizmalar olduklarından dolayı laboratuarda kültür ortamında çok sayıda üretilmeleri oldukça kolay ve ekonomiktir.
- Holometabol canlılardır. Yani gelişimleri tam metamorfozludur.
- Genetik olarak kontrol edilebilen çok çeşitli morfolojik karakterlere ve mutant soylara sahiptir.
- Larvalarının tükrük bezi hücrelerinde kolayca tanınabilen dev kromozomlar bulunur. Bunlar sitogenetik çalışmalar için ideal yapılardır. Kromozom haritaları ve kromozom fonksiyonu analizlerinin yapılmasına imkan sağlamaktadır.

- İnsanlar için kanserojenik olan pek çok madde *Drosophila* testlerinde de pozitif sonuçlar vermektedir. Ayrıca promotajen ve prokarsinojenleri test etmek için ayrıca metabolik aktivasyona gerek yoktur.

*Drosophila* hayat döngüsünde dört farklı evreye sahiptir (Şekil 2.1). Bu evrelerin tipik sırası: yumurta (embriyonik), larva, pupa ve ergin şeklindedir (Gui and Grant 2008).

### 2.1.1 Yumurta

*D. melanogaster* dişileri pupadan çıktıktan 2-3 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Gelişimini tamamlamış bir yumurta dorsalde oval görünüşlüdür ve boyu çeşitli türlerde farklılık göstermektedir. *D.melanogaster* yumurtasının boyu ortalama 0,5 mm kadardır. Dişinin yaşamı boyunca yumurta üretimi sabit değildir, türlere göre 6. ile 10. günler arasında en yüksek seviyeye çıkar ve geometrik olarak hızla düşer. Zigotun embriyonel değişimi yumurtadan larva çıkana kadar sürer ve bu süre 22 saattir (Özata 2006).

### 2.1.2 Larva

Döllenmeden yaklaşık 24 saat sonra, bir *Drosophila* yumurtası larvaya dönüşür (Hamamcı 1993). Beyaz renkli ve saydam olan larvalar sürekli olarak beslenirler ve birkaç gün içerisinde besi ortamını delik deşik ederek, izler oluştururlar. Bu izler kültürün başarılı olduğunu yani besinin kullanıldığını gösteren kanıttır. Yumurtadan çıkan larva gelişmesini gömlek değiştirme ile sürdürür. İki gömlekdeğiştirme arasındaki periyota 'instar' denir. Larval faz iki defa gömlek değiştirme ile üç instara ayrılır. Yumurtadan çıkma ile ilk deri değiştirme I. instar olarak adlandırılır ve süresi bir gündür. İlk deri değiştirme ile ikinci deri değiştirme arası ise II. instar olarak adlandırılır ve süresi yine bir gündür. İkinci deri değiştirmeden sonra pupalaşmaya kadar III. instar olarak adlandırılır ve süresi yaklaşık olarak 2-3 gündür (Bozcuk 2000).

### 2.1.3 Pupa

Larva III. instarın sonunda iken bulunduğu kabın duvarında kuru bir bölgeye kadar tırmanır ve burada sarı-kahve renkte sabitleşerek pupalaşır. Pupa aşamasında bir erginin

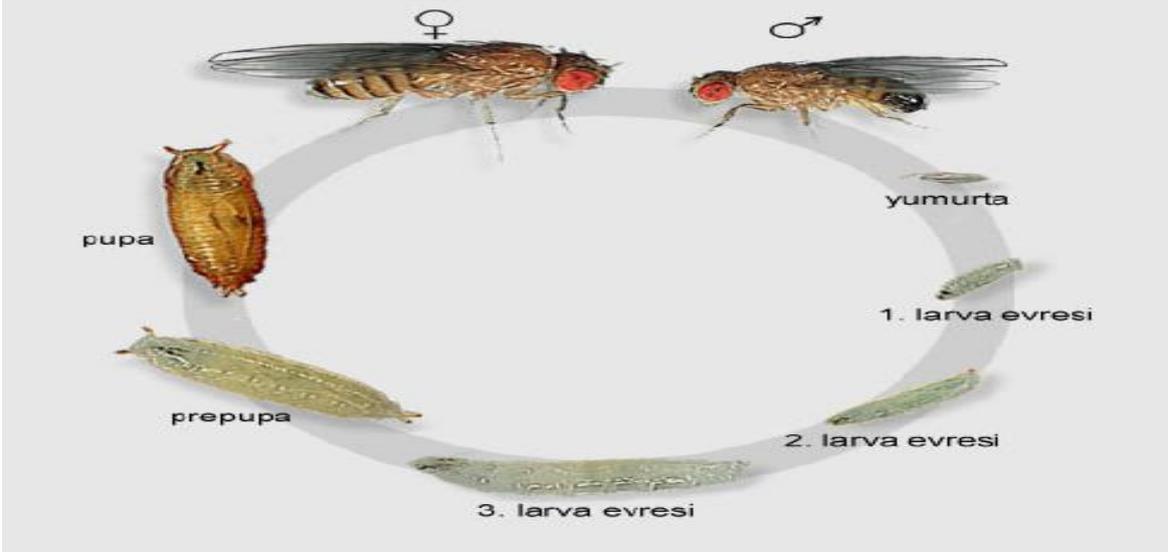
organları ve vücut formuna sahip bir bireyine gelişmesi için gerekli olan dönüşümler gerçekleşir. Pupanın rengi ergin sineğin çıkmasına yakın koyulaşarak kahverengiye dönüşür. Pupadan çıkmadan yaklaşık bir gün önce, kıvrılmış durumda olankanatlar iki koyu eliptik yapı olarak açıkça görülebilir. Göz pigmentleri ise pupada bile fark edilecek ölçüde belirgindir (Doğan 2002).

#### **2.1.4 Ergin**

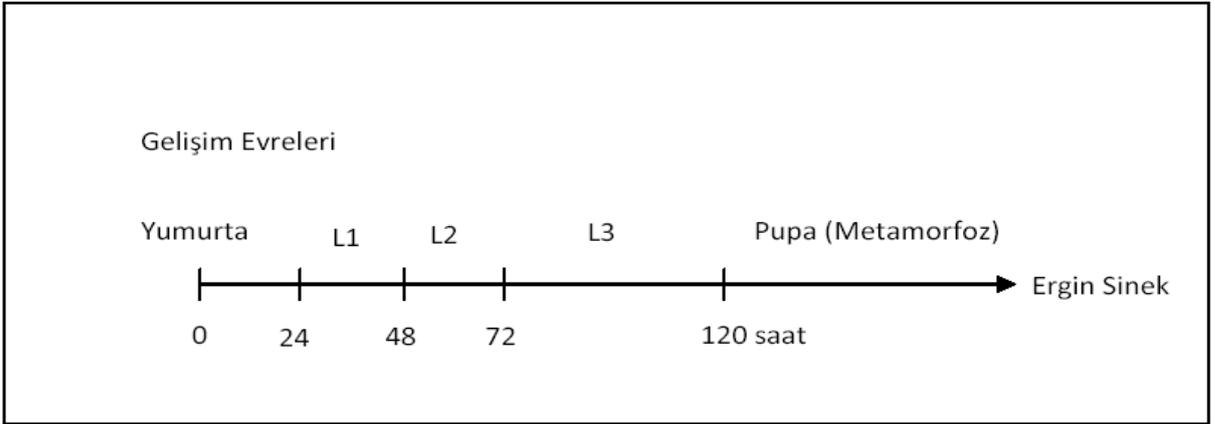
Diğer böceklerde olduğu gibi *Drosophila*'da da gelişme iki aşamada olur (Şekil 2.1-Şekil 2.2). Birincisi embriyonik dönemdir. Bu dönem yumurtanın döllenmesiyle başlar ve genç larvaların yumurtadan çıkmasına kadar devam eder. İkinci dönem ise postembriyonik dönemdir ve genç larvanın yumurtadan çıktığı andan itibaren başlayarak, larvanın ergin hale gelinceye kadar geçirdiği bütün değişiklikleri içerir (Özata 2006). Ayrıca *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü ve ömür uzunluğu; sıcaklık, beslenme, populasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon ve nem gibi çeşitli faktörler tarafından farklı şekillerde etkilenmektedir (Osaba *et al.* 2002).

Yeni çıkan ergin bireyler ilk önce açık renklidirler fakat birkaç saat içinde koyulaşır ve başlangıçta kırışık olan kanatları açılarak normal ergin görünümüne bürünürler. Erkek ve dişiler birkaç saat içinde çiftleşebilecek duruma gelirler. Dişiler virjin olmasına veya çiftleşmesine bağlı olmaksızın yumurta bırakırlar ancak döllenmemiş yumurtalar açılmaz. Dişiler pupadan çıktıktan sonra 2. veya 3. günde yumurtlamaya başlarlar (Özata 2006).

Döllenme ve zigot oluşumunu takiben ergine gelişmesi süre bakımından ortam sıcaklığına bağımlılık gösterir (Hamamcı 1993). Yumurtadan ergine geçiş, 25 °C'de yaklaşık 10 gün alır (Bozcuk 2000). Bir ergin dişi tüm yaşamı boyunca 300'e kadar varan sayıda yumurta bırakabilir. Genelde bunların %95'i olgunlaşıp açılabilir. Optimum şartlarda bir genetikçi yılda maksimum 30 generasyon elde edebilir.



Şekil 2.1 Drosophila'nın yaşam döngüsü (Ayar 2008).



Şekil 2.2 Drosophila melanogaster'in gelişim evreleri (Graf et al. 1984).

Drosophila'nın gösterdiği başkalaşım evreleri ve bu evrelerin süreleri aşağıdaki gibidir.

Embriyonik gelişim :	1 gün
Birinci larval evre (L1) :	1 gün
İkinci larval evre (L2) :	1 gün
Üçüncü larval evre (L3) :	2 gün
Prepupa evresi :	4 saat
Pupa evresi :	4-5 gün
Yetişkin evresi :	40-50 gün

## 2.2 Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

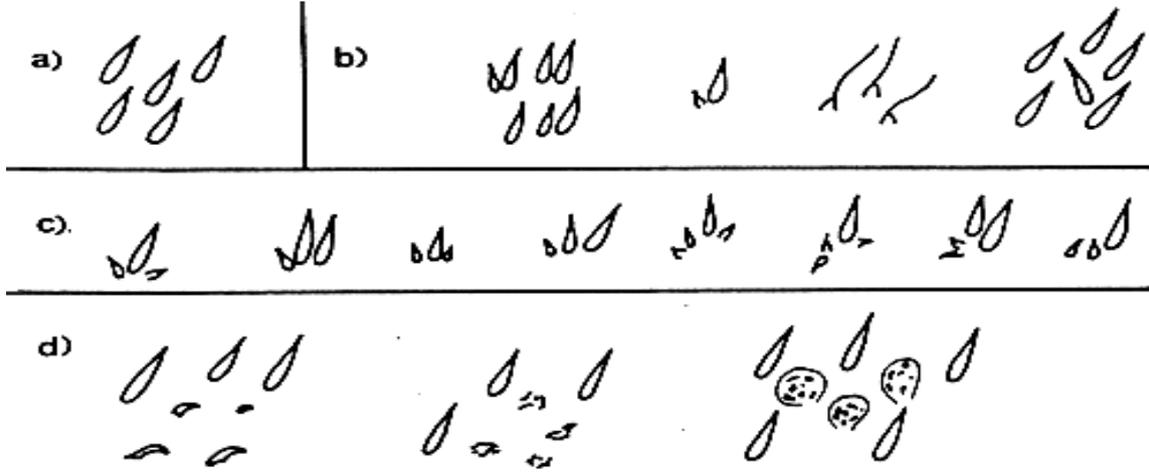
Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için bu hatların üçüncü kromozomları üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanıldı. Bireylerin genetik yapısı şu şekildedir;

- mwh / mwh (çoklu kanat kılı geni)
- flr3 (çekinik flare geni)/ In (3LR) TM3, ri pp sep bx34e e s Bd s bu kısaca
- flr3 / TM3, Bds olarak gösterilmektedir.

Belirleyici genlerden biri olan flare geni, sineklerin kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine, kısalmış nokta şeklinde, koyu renkli balon şeklinde veya kalın ve düzgün olmayan bir şekilde olmak üzere çok çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.3) (Würgler and Vogel 1986).

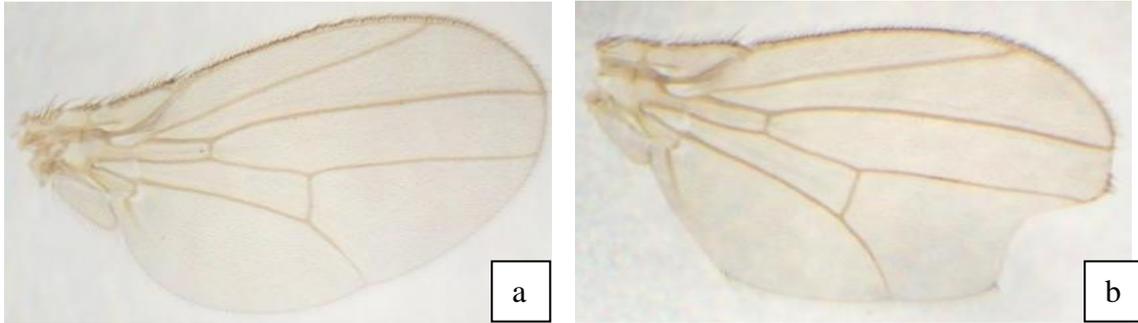
Belirleyici flare 3 (flr3, 3-38,8) geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir (Graf *et al.* 1996, Graf *et al.* 1998). Bireyleri flare geninin embriyonik letal etkisinden korumak ve rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici TM3 kromozomu kullanılmaktadır. Sonuçların güvenilirliği için gerçek mutant klonların olası varyasyonlarından ayrılması gerekmektedir.

Diğer gen ise mwh'tır (mwh, 3-0,3). mwh geni, normal tek trikomların yerine kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla çıkması şeklinde kendini ifade etmektedir (Şekil 2.3) (Würgler and Vogel 1986, Graf *et al.* 1996).



**Şekil 2.3** Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne *flare* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) *mwh* trikomlar d) *flare* genotipe ait trikomlar (Graf *et al.* 1984).

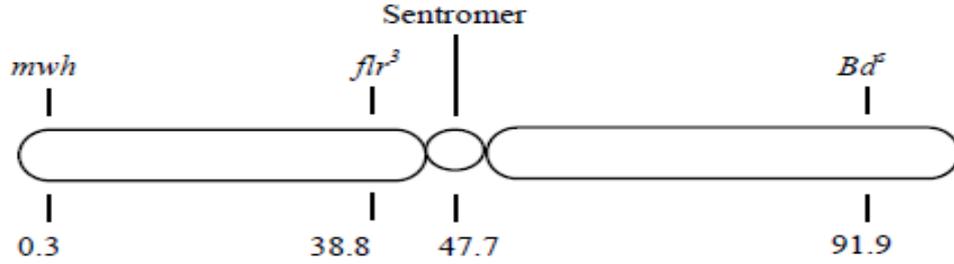
Normal fenotipteki kanatların kenarları düzgün bir yapı gösterirken, *BdS* (Beaded Serrat) genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün değildir (Şekil 2.4). Homozigot halde letal etki gösteren dominant *BdS* geni, TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle TM3 dengeleyici kromozomuna sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer bireylerden kolaylıkla ayrılabilir (Graf *et al.* 1984).



**Şekil 2.4** a) Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve b) dengeleyici kromozom taşıyan *BdS* (serrat) bireylerinin kanat fenotipleri (Kocaoğlu Cenkçi 2010).

Üçüncü kromozomun en büyük kromozom olması ve belirleyici genler arasındaki mesafenin de oldukça uzak olması gerek rekombinasyonun ve gerekse mutasyonların büyük bir aralıkta incelenmesi açısından bir avantaj oluşturmaktadır. SMART için kullanılan genetik hatların taşıdığı TM3 dengeleyici kromozomu çalışmada belirleyici olarak kullanılan *flr*, *mwh* ve *BdS* genleri ile birlikte *Drosophila*'nın üçüncü kromozom

üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.5) ve bu kromozom üzerindeki rekombinasyonların baskılanması açısından önemlidir (Graf *et al.* 1984).



Şekil 2.5 *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri (Kaya 2000).

### 2.3 Allium test

*Allium* test, çeşitli maddelerin sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Yüksek yapılı bitkiler kromozomlarının boyutlarından dolayı sitolojik analizler için uygundur (Fiskesjö 1985). Bu bitkiler; genetik materyallerinin korunmuş olmasından dolayı genotoksisite testlerinde tercih edilmiştir (Leme and Marin-Morales 2009, Özkara *et al.* 2011, Rodríguez *et al.* 2015). Ayrıca bitkiler; köklerinin meristematik yapısı ve kromozomlarının boyutları sebebiyle genotoksisite testlerinde tercih edilen sitogenetik materyallerdir (Fiskesjö 1985, Ma *et al.* 1995).

*Allium* test kullanılması kolay ve ucuz bir testtir ve özellikle memeli test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir (El-Shabhaby *et al.* 2003). *Allium* testinin sonuçları, ortamdaki canlı organizmalar için direkt veya indirekt riskleri temsil eden belirli sitotoksik/genotoksik veya mutajenik maddelerin varlığını işaret edebilir. *Allium* testinde büyümedeki gerileme genellikle toksisite ve temel kromozom aberasyonları ise genotoksisite ile açıklanmaktadır (Kovalchuk *et al.* 1998). *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormallikler ve kromozom aberasyonları ile belirlenebilmektedir. Mitotik indeksteki azalma, kontrole göre %22'nin altına düşerse subletal etki (Antonsie-wiez 1990), %50'nin altına düşerse letal etki (Panda and Sahu 1985) değeri olarak kabul edilmektedir. Bu değerler, sitotoksik sınır değerleridir

(Sharma 1983). Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom aberasyonları kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden olduklarını göstermektedir (Saxena *et al.* 2005). Kromozom aberasyonları ve mikronükleus analizleri genotoksisitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir analizler olarak gösterilmektedir (Rieger *et al.* 1990, Angelis *et al.* 2000, Patra *et al.* 2003, Liman *et al.* 2011).

## **2.4 Komet Test**

Ostling ve Johanson (1984) hücrelerin DNA hasarı ölçmek için ilk kez “ tek hücre jel elektroforezi veya komet assay” olarak bilinen mikrojel elektroforez tekniğini kullanmışlardır. Bu yöntemde, hücreler lam üzerindeki agaroz gömülür ve proteinlerin uzaklaştırılması için lizis solüsyonunda bekletilerek elektroforez aşamasına geçilir. Bir florokrom ile DNA boyanır ve elektriksel alanda pozitif kutba yönelmesi ile kromatinin baş ve kuyruk oluşumu sağlanır. Hasarı fazla olan DNA’da kuyruk uzunluğu daha fazla ve/veya kuyruktaki DNA yoğunluğu daha fazladır. Ancak nötr koşullarda sadece çift iplikli DNA kırıklıklarına bakılabilir. Daha sonra farklı hücrelerdeki çeşitli hasar tiplerini belirleyebilmek için bazı değişiklikler (lizis, elektroforez) yapılmıştır (Collins 2004). Bu yüzden, Singh vd. (1988), komet testini alkali ortamda uygulamış ve hem tek iplik hem de çift iplik kırıklıklarını belirleyebilmişlerdir (Dhawan *et al.* 2009). Komet testi şu an bireysel hücrelerde niteliksel olarak DNA hasar ve tamirini belirleyebilmek için kullanılan basit, çok yönlü, hızlı, görsel, hassas ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Dhawan *et al.* 2009, Collins 2004). DNA çapraz bağlantıları (örneğin, timidindimerleri) ve oksidatif DNA hasarı gibi diğer bazı DNA hasar lezyonları spesifik DNA tamir enzimleri ve lezyon-spesifik antikoru kullanılarak komet testi ile belirlenebilir.

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün farklı boyutları ile Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun genotoksitelerini belirlemek için SMART ve *Allium* test kullanıldı. Araştırmada, Sigma, Merck ve Fluka analitik grade ürünleri kullanılmıştır.

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar-Test Materyalleri

Çalışmada Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 ve <50 nm boyutları ile Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formu kullanıldı.

##### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Organizmalar

###### *D. melanogaster*

Bu çalışmada ökaryotik bir sistem olması, çalışmaların *in vivo* ortamlarda gerçekleştirilmesi, kısa hayat döngüsü ve yüksek üreme kabiliyetinden dolayı genetik araştırmalar için iyi bir model organizma olan *D. melanogaster* kullanıldı.

###### *A. cepa*

*A. cepa*; çok iyi çimlenmesi, elde edilmesinin kolay ve ucuz olması, kromozom sayısının azlığı, kromozomlarının büyüklüğü ve yıl boyunca köklenerek bolca mitotik hücre elde edilebilmesinden dolayı, birçok mutajenite deneylerinde olduğu gibi bu çalışmada da tercih edildi (Badr ve İbrahim1987, Topaktaş ve Rencuzoğulları 2010).

##### 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

**Lewis besini:** Mısır unu: 104 g; şeker: 94 g; maya: 19 g; agar: 5 g; asit karışımı (propionik asit, ortofosforik asit ): 6 mL ve dH<sub>2</sub>O: 1020 mL. Verilen ölçülerdeki mısır unu, şeker, maya, agar ve distile su ateş üzerinde karıştırılarak kaynatıldı. Kaynamaya

başladıktan 1-2 dakika sonra ateş üzerinden alınan karışım üzerine asit karışımı eklenerek karıştırıldı ve asit karışımının homojen olarak dağılması sağlandı. Hazırlanan standart *Drosophila* besini daha önceden steril edilen şişelere 1-1,5 cm kalınlığında düzgünce döküldü.

**Faure solüsyonu:** Gum arabic: 30 g, gliserol: 20 mL, kloral hidrat: 50 g, dH<sub>2</sub>O: 50 mL karıştırılıp kapalı bir kap içerisine alındı.

**%70'lik Etil Alkolün Hazırlanması (100 mL):** %96'lık etil alkolden 72,9 mL alınıp üzeri dH<sub>2</sub>O ile 100 mL'ye tamamlandı.

**1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanması (25 mL):** 2,1 mL dH<sub>2</sub>O üzerine 22,9 mL %37'lik saf HCl eklendi.

**%45'lik Glacial Asetik Asitin Hazırlanması (100 mL):** 55 mL dH<sub>2</sub>O üzerine 45 mL %100'lük saf glacial asetik asit eklendi.

**Feulgen Boyasının Hazırlanması:** 1g kristal halinde fuksin bazik (parafuksin) alındı. Bu fuksin bazik, küçük bir havanda veya 8-10 cm çapında bir saat camı içerisinde ezildi. 500 cm<sup>3</sup>'lük bir erlenmayerin dip kısmına toz haline getirilmiş fuksinbazik, kabın etrafına bulaştırmadan konuldu. Bir başka erlenmayerde 200 cm<sup>3</sup>'lük damıtık su kaynatılıp; kaynamış damıtık su toz halindeki fuksin bazik üzerine yavaşça döküldü. Bir yandan da cam çubuk ile boya devamlı olarak karıştırıldı. Boyanın sıcaklığı 50 °C oluncaya kadar karıştırmaya devam edildi. 20 cm<sup>3</sup> N HCl ilave edilir. Oluşan karışım süzüldü. 2 g potasyum metabisülfid (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ilave edilip; boya ağzı kapaklı bir şişeye alındı. Karanlık bir ortamda en az bir gece olmak üzere 24 saat kadar dolapta bekletildi. Böylece vişne çürüğü rengindeki boya, açık çay rengini aldı. Boya 4°C'da buzdolabında muhafaza edildi (Elçi 1982).

**Pozitif Kontrol Çözeltisinin Hazırlanması:** 10 ppm MMS çözeltisi hazırlamak için; 0,005 g metilmetanosülfonat tartılıp üzeri 500 mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

**Normal erime noktalı agaroz (NMPA) çözeltisi:** 0,02 gr NMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayıldı.

**Düşük erime noktalı agaroz (LMPA) çözeltisi:** 0,016 gr LMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ısıtılarak % 0,8'lik LMPA çözeltisi hazırlandı.

**Nükleus İzolasyon Tamponu:** 4 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, % 0,5' lik TritonX ve 0,2 M Tris tartılıp son hacim istenilen miktarda dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı ve pH 7,5 olarak ayarlandı.

**Lizis tamponu:** 1 M NaCl, % 0,5 SDS, 30 mM NaOH tartılıp pH 12,3 olarak ayarlandı.

**Elektroforez tamponu:** Alkali elektroforez çözeltisi 1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit tartılıp 500 ml'ye tamamlandı ve pH > 13 olacak şekilde ayarlandı.

**Etidyum bromür çözeltisi:** 10 mg etidyum bromür 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok etidyum bromür çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 mL alınıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak 20 µg/L'lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

## **3.2 Metot**

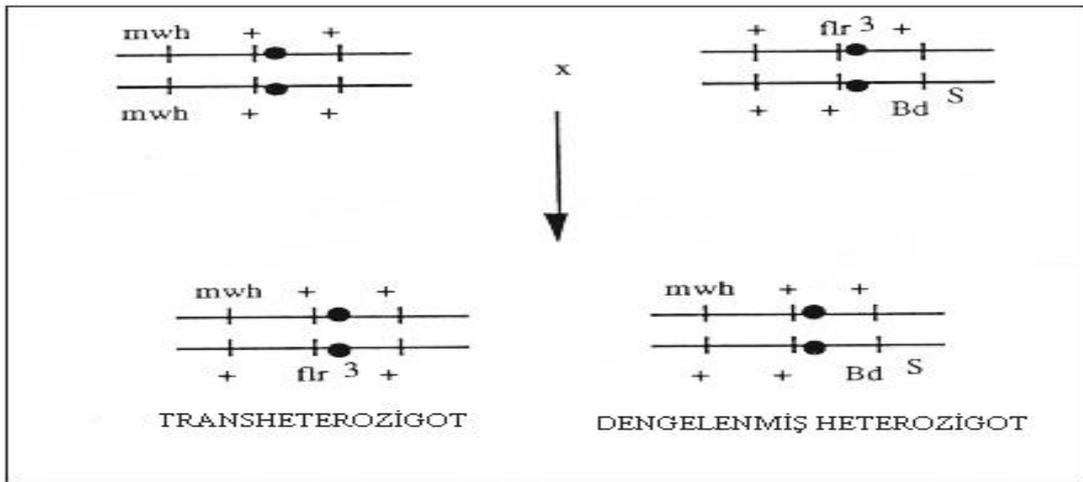
### **3.2.1 SMART**

#### **3.2.1.1 Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi**

Transheterozigot larvaları elde etmek için, döllenmemiş dişi flare ve erkek mwh bireylerin çaprazlaması gerekmektedir. Bu nedenle yeni besin ortamına 4'er saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplandı. Üreme verimliliği arttırmak için en ideal yaş olan 3-7 günlük bireyler tercih edildi. Yeterince birey toplandıktan sonra transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 dişi flare ve 40 erkek mwh birey olacak şekilde çaprazlamalar yapıldı. Döllenmenin ve embriyogenezin

gerçekleşebilmesi için bireyler en az bir gün süre ile çaprazlama şişesinde bırakıldı (Graf *et al.* 1984).

Uygulama yapılacak olan larvaların tamamının aynı evrede olabilmesi için döllenme ve embriyogenezi gerçekleştirmiş olan bireyler yeni bir besin ortamına alınarak 8 saat süreyle burada bırakılarak yumurta bırakmaları sağlandı. Böylece aynı larval evrede olan transheterozigot larvalar elde edilmiş oldu. Çaprazlama şişesine eksilen bireylerin yerine yeni *mwh* erkekler ve bakire flare dişiler belli zaman aralıklarında eklenerek ortam zenginleştirildi (Graf *et al.* 1984). Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanıldı. Larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama Şekil 3.1’de gösterilmektedir (Graf *et al.* 1984, Schaik and Graf 1991).



**Şekil 3.1** Dengelenmiş heterozigot *mwh/BdS* ve transheterozigot *mwh/flr3* bireylerin elde edilebilmesi için *mwh/mwh* ve *flr3/TM3, BdS* bireyleri arasındaki çaprazlamalar (Graf *et al.* 1984).

### 3.2.1.2 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün Nanopartikül ve İyonik Formlarının Uygulanması

Sekiz saat boyunca toplanan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvalar üçüncü larval evreye ulaştığında, besinler musluk suyu altında yıkanarak larvalar ince gözenekli metal elekten geçirilerek ayrıldı.  $72 \pm 4$  saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan plastik tüpler içerisine birer ölçü (4.5 gr) hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co. Burlington, NC, ABD) konuldu ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış kimyasal derişimlerinin 9

mL'si ile nemlendirildi. Her bir tüp içerisine musluk suyualtında ayrılan larvalardan 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konuldu ve tüplerinağızları sünger tıkaçlarla kapatıldı. Kimyasal uygulanan tüpler  $25 \pm 0,5$  °C'deki inkübatöre (Sanyo) konuldu. Böylece larvaların, farklı boyutlardaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün ve iyonik formunun farklı konsantrasyonları ile nemlendirilmiş hazır besinle beslenerek kronik olarak kimyasala maruz kalmaları sağlandı. Genotoksik etkinin tespit edilebilmesi için aşağıdaki gibi bir deneysel yol izlenmiştir:

Birinci grupta, 72±4 saatlik transheterozigot larvalar <50 nm ve <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2mM, 5mM ve 10mM) maruz bırakıldı. Bu gruptaki larvalar normal kontrol olarak distile su; pozitif kontrol olarak ise 1 mM EMS'ye maruz bırakıldı.

İkinci grupta, 72±4 saatlik transheterozigot larvalar Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2mM, 5 mM ve 10 mM) maruz bırakıldı. Bu gruptaki larvalar ise normal kontrol olarak %10 Etil alkol; pozitif kontrol olarak ise 1mM EMS'ye maruz bırakıldı.

### **3.2.1.3 Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması**

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün NP ve iyonik formlarının uygulamasından sonra farklılaşarak pupadan çıkan ergin bireyler eterle bayıltılarak toplandı. Bu işleme yeterli sayıda birey elde edilinceye kadar devam edildi. Toplanan bireyler, kanat preparatları hazırlanmaya kadar % 70'lik etil alkole alınarak +4 °C'de saklandı.

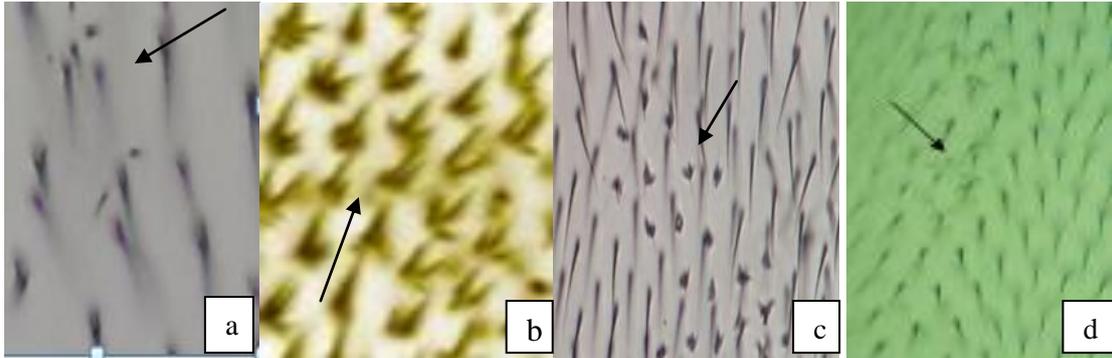
Öncelikle uygulamalardan elde edilen normal kanatlı bireyler distile su içerisine alındı. Çukur lam üzerine 1-2 damla Faure solüsyonu damlatılarak distile su içerisindeki bireyler birer birer solüsyon içerisine alındı. Daha sonra ince uçlu pens ve iğne yardımıyla Nikon SMZ645 model stereo mikroskop altında bireylerin kanatları vücutlarından ayrıldı. Ayırma işleminde, kanada ve üzerindeki kıllara zarar verilmemesine dikkat edildi. Aynı bireye ait kanatlar çiftler halinde düzgün bir şekilde lam üzerine yerleştirildi. Hazırlanan preparatlar bir gün süre ile tozsuz bir ortamda

kuruması için bekletildi. Kuruyan preparatların üzerine 1-2 damla Faure solüsyonu damlatılarak lamel (24X60 mm) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Preparatlar kurutma kağıdına sarıldıktan sonra üzerlerine metal bloklar konarak en az iki gün kurumaya bırakıldı. Preparatlar tamamen kuruduktan sonra kenarlarına taşmış olan fazla Faure solüsyonu distile su ve kurutma kâğıdı yardımıyla temizlenerek sayıma hazır hale getirildi.

### 3.2.1.4 Kanat Preparatlarının Mikroskop Analizi

Hazırlanmış olan kanat preparatları ışık mikroskopunda 40x10 büyütmede incelendi. Kolaylık olması açısından kanat üzerindeki sektörler A, B, C, C<sub>1</sub>, D, D<sub>1</sub>, E olarak bölümlere ayrıldı. Kanatlar incelenirken dorsal ve ventral yüzdeki hücre tabakalarının her ikisi de mikrovida yardımıyla mutant klonların olup olmadığı incelendi. Kanat yüzeyindeki her bir sektör ayrı ayrı taranarak mwh ve/veya flr<sup>3</sup> mutant fenotipler sayılarak kayıtları tutuldu. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar:

- Küçük tek tip klon ( 1-2 mwh hücre)
- Büyük tek tip klon ( $\geq 3$  mwh veya  $\geq 4$ flr<sup>3</sup> hücre)
- İkiz klon (mwh ve flr<sup>3</sup> hücrelerin ikisini de yan yana aynı klonda içeren klonlar)



**Şekil 3.2** a.Küçük tek tip mwh mutant klonların görünümü b.İkiz mutant klonların görünümü c. Büyük tek tip flr<sup>3</sup> mutant klonların görünümü d. Büyük tek tip mwh mutant klonların görünümü

### 3.2.1.4 Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesapladı (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NxC} \times 10^5$$

Sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdeki “ f ” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “ n ” gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, “ N ” analiz edilen kanat sayısını ve “ C ” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarla bu sayının 24 400 olduğu belirlenmiştir (Garcia-Bellido and Merriam 1971).

### 3.2.2 Allium Test

#### 3.2.2.1 Büyüme Engelleme Testi

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 nm'lik boyutunun sitogenetik etkilerinin incelenmesinde kullanılacak konsantrasyonları belirlemek amacıyla öncelikle büyüme engelleme testi yapıldı. Bunun için önce EC<sub>50</sub> değeri belirlendi. EC<sub>50</sub> değerini belirlemek için aynı büyüklükteki soğanlar (3-4 cm çapında) alınarak dış kabukları çıkarıldı ve kök primordialarına zarar vermeyecek şekilde çimlenmiş olan köklerinden temizlendi. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 nm'lik boyutunun 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,1, 0,01 ve 0,001 mM'lık konsantrasyonları hazırlandı. Negatif kontrol grubu olarak ise saf su kullanıldı. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubunda beşer adet soğan kullanıldı. Oda sıcaklığında (~21°C ± 4 °C) karanlık ortamda dört gün çimlendirilen soğanlardan her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için aynı soğan yumrusundan en iyi filizlenmiş onar adet kök alınarak ortalama kök uzunlukları bulundu. Bu süre zarfında çimlenen soğanların bulunduğu ortamdaki çözeltiler azaldıkça gerekli ilaveler yapıldı.

EC<sub>50</sub> değerini belirlemek için kök uçlarının büyümesini negatif kontrol grubuna göre % 50 azaltan doz esas alındı. Uygulama dozlarının belirlenmesinde 2xEC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, 1/2xEC<sub>50</sub> değerleri kullanıldı. Buna bağlı olarak <100 nm'lik Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 10, 5 ve

2,5 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı. Kontrol grubu olarak saf su, pozitif kontrol grubu için 10 ppm MMS kullanıldı. Uygulama süresi 24 ve 96 saat olarak belirlendi. *A. cepa* kök uçlarına Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 nm'lik boyutunun yukarıda verilen konsantrasyonları belirlenen sürelerde uygulamak için, her bir konsantrasyon için beşer soğan 1 gün boyunca saf suda çimlenmeye bırakıldı. En iyi köklenen 5 tane soğan her bir konsantrasyon için kullanıldı. Bütün kök uçları aynı gün sabah saat 9<sup>00</sup>'da alındı. Bütün uygulamalardan sonra alınan kök uçları ayrı ayrı tüplere alınarak absöütalkol: glasial asetik asit (3:1) fiksatif i içerisinde buzdolabında +4 °C'de 1 gece bekletilerek tespit edildi. Daha sonra kök uçları % 70'lik alkol içerisinde alınarak +4°C'de buzdolabında depolandı. Mitotik indeks ve mitoz bölünmedeki anormalliklerin belirlenmesinde bu kök uçları kullanıldı. Mitotik anormalliklerin, mitotik indeks (mitotik hücre sayısı/sayılan toplam hücre sayısı X 100) ve faz frekanslarının belirlenmesi için her dozun uygulama süreleri için farklı soğanlardan beşer kök ucu alınarak ezme preparatlar hazırlandı. Mitotik anormalliklerin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için mümkünse 100 anafaz-telofaz hücresi, mitotik indeks ve faz frekanslarının hesaplanmasında 5000-6000 hücre sayıldı.

### **3.2.2.2 Feulgen Boyası İle Preparatların Hazırlanışı**

Kök uçları buldukları % 70'lik alkolden çıkartılıp bir tüp i içerisine alınarak üzerine 1-2 mL 1N HCl çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 60 °C'deki su banyosunda 8-10 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkartılan kök uçları her 5 dakikada bir distile suda bekletilerek HCl'nin etkisi seyreltilmiş oldu. Bu işlem üç kez uygulandı. Kök uçları Feulgen boyası içerisine alınarak oda sıcaklığında 25-30 dakika boyanmaya bırakıldı. Kök uçlarının koyu boyanan kısımları 1-2 mm uzunluğunda kesilerek bir lamın üzerine 1 damla % 45'lik asetik asit konularak jiletle parçalandı. Daha sonra üstleri lamelle kapatılarak ezme preparatları hazırlandı. Preparatları yarı daimi hale getirmek için lamellerin etrafı tırnak cilası ile kapatıldı.

Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeksin belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde mitoz giren hücreler sayıldı (MI=Mitoza girmiş hücre sayısı -

Toplam hücre sayısı  $\times 100$ ). Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları her preparatta 100 anafaz veya telofaz hücresi olmak üzere her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlendi. Mitotik anormallikler saptanarak en sık görülen anormalliklerin fotoğrafları x40 ve x100 objektifte çekildi.

### 3.2.3 Allium Komet

Örnek başına hücre sayısının azlığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı, düşük seviyelerdeki DNA hasarını belirleme ve kısa sürede çalışmanın tamamlanabilmesinden dolayı *Allium* Komet testi tercih edildi.

- 1) Gerekli sayıda soğan 24 saat süre ile distile suda köklendirildi.
- 2) 24. saatin sonunda soğanlar önceden hazırlanan konsantrasyonlara alınarak kök uzamaları belli sürelerle devam ettirildi ( $< 50$  nm ve iyonik form için 4 saat;  $< 100$  nm için 24 ve 96 saat).
- 3) Soğanlar belirlenen süreler de farklı konsantrasyonlara ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 'ün  $< 50$  nm nanopartikülü ve iyonik formu için 0,001, 0,01, 0,1, 1 ve 10 mM;  $< 100$  nm nanopartikül için 2,5 5 ( $\text{EC}_{50}$ ), ve 10 mM; pozitif kontrol 10 ppm MMS) maruz bırakıldıktan sonra her bir konsantrasyon için 3-5 adet soğandan 2'şer 3'er kök meristem uçlardan kesildi.
- 4) Soğuk cam petri kabının içine alınan kökler üzerine soğuk nükleus izolasyon tamponundan 0,5 ml ilave edildi ve bir jilet yada bisturi yardımıyla parçalandı. Bu işlem sonunda nükleuslar tampon sıvısına geçmiş oldu.
- 5) Nükleus içeren tampon pipet yardımıyla filtreden geçirilerek ependorf tüpe alındı. Bu işlem sırasıyla tüm konsantrasyon için uygulandı.
- 6) İçerisinde örneklerin bulunduğu ependorflar 1200 rpm de 7 dk + 4 °C de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Bu sırada %0,8'lik LMA hazırlandı.
- 7) 20  $\mu\text{L}$  örnek, 80  $\mu\text{L}$  LMPA ile karıştırılıp önceden NMPA yayılmış lamaların üzerlerine yayıldı. Üzerleri lamelle kapatılarak buz kasetlerinin üzerinde 2-3 dk bekletildi.
- 8) Lameller lamaların üzerlerinden yavaşça çekilerek alındı. Preparatlar bir kap içerisine alınarak +4 de liziz çözeltisinde 1 saat bekletildi.

9) Lizizden çıkarılan örnekler elektroforez tankına alınarak, elektroforez tampon çözeltisi içerisinde cihaz çalıştırılmadan +4 de 20 dk bekletildi. Ardından 25V, 20 dk, 300 mA de yürütüldü.

10) İşlem sonunda preparatlar nötralizasyon tamponuyla nötralize edildi ve preparatlar etidyum bromür ile boyandı ve lamelle üzerleri kapatılarak değerlendirme aşamasına geçildi. Her lamda 100 hücre floresan mikroskobunda değerlendirilerek DNA hasar derecesi (0-4), kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü olarak değerlendirildi.

### 3.2.4 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler SMART testi için hazırlanmış olan bilgisayar programı (MICROSTA) yardımıyla değerlendirildi. Öncelikle iki farklı hipotez kuruldu. Orijinal (null) hipotez ( $H_0$ )’da uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez ( $H_A$ )’da ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan  $m$  defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezler binomial şartlı test kullanılarak hesaplandı. Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (nt) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse  $H_0$  red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (nc)mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse  $H_A$  red edildi. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesinde karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden yararlanıldı. Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 3.1’de gösterildi

**Çizelge 3.1** Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi (Selby and Olson1981, Frei and Würzler 1988).

HİPOTEZLERLER		$H_A$	
		KABUL( $1-\beta$ )	RED( $\beta$ )
$H_0$	KABUL ( $1-\alpha$ )	<b>ÖNEMSİZ FARK</b> $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	<b>NEGATİF</b> $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED ( $\alpha$ )	<b>POZİTİF</b> $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	<b>ZAYIF POZİTİF</b> $P=\alpha\beta$

Bu değerlendirmelerle sonuçlar;  $H_0$  ve  $H_A$ 'nın kabul veya red edilmesine göre izelge 3.1 kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

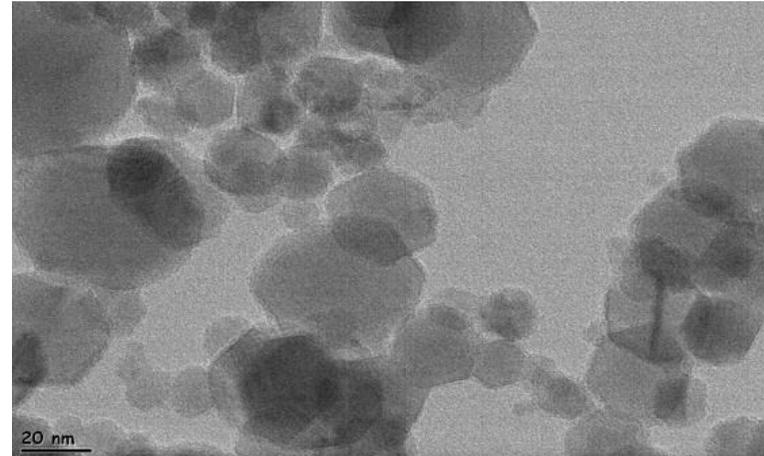
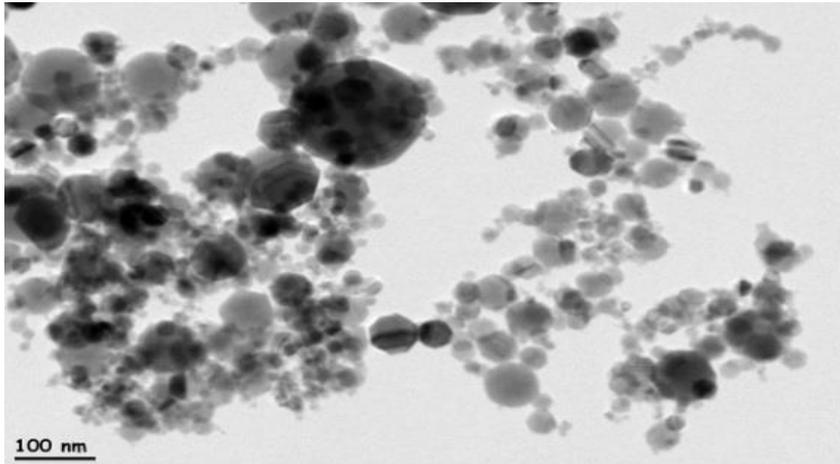
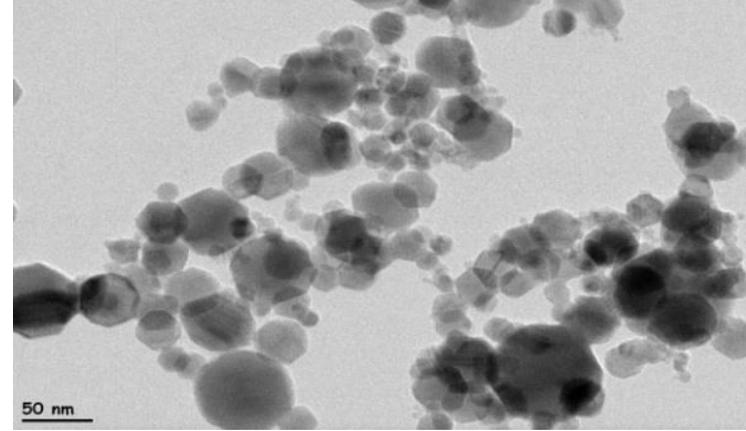
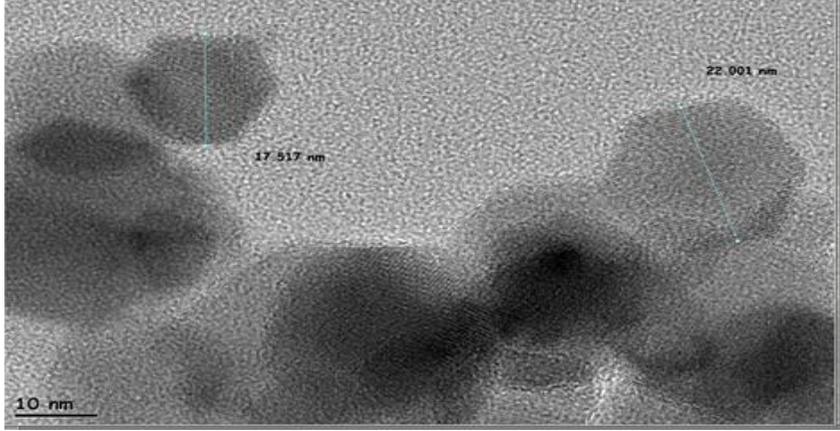
*Allium* testinde elde edilen sonuçların değerlendirilmesi SPSS 15.0 for Windows paket programında, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan testi ile yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Nanopartikül Karakterizasyonu ile İlgili Çalışma

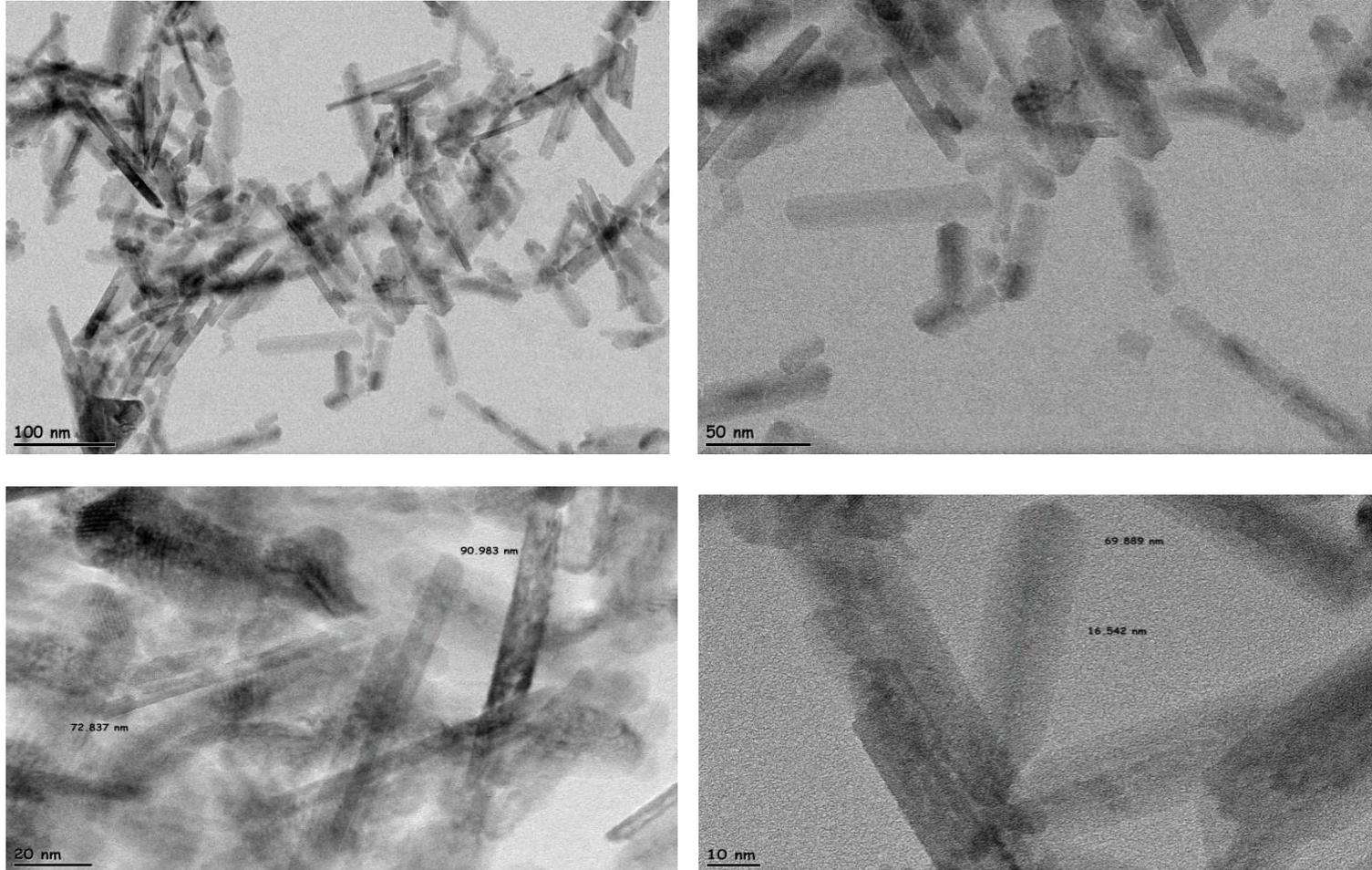
Çalışmada kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <50 nm için karakterizasyonu ve <100 nm için; karakterizasyonu, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri belirlendi. Kullanılan NP'ler Jeol 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2). <100 nm NP'ünün partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümü Parçacık Boyut Analiz Cihazı ve Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.5). Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı ve Ölçme Merkezinde görüntülendi.

#### 4.1.1 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikülünün (< 50 nm) Karakterizasyonu

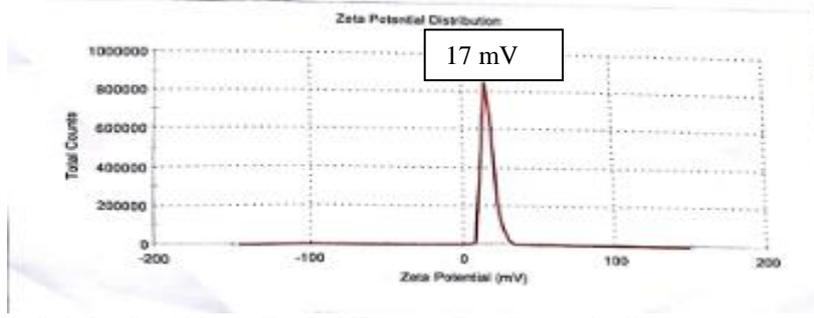


Şekil 4.1 <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Jeol 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüsü

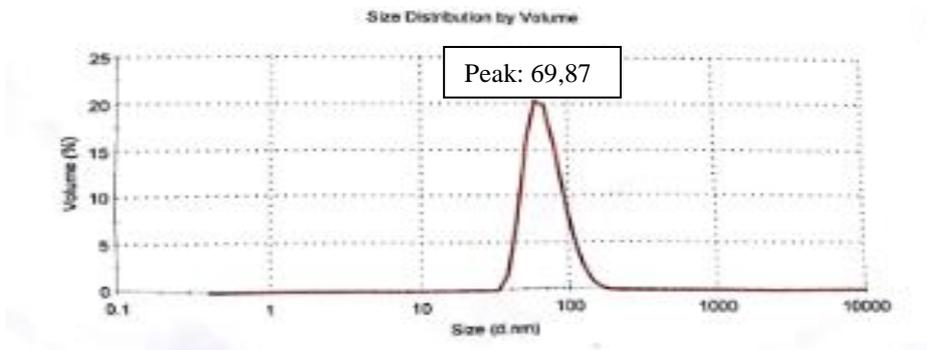
#### 4.1.2 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikülünün (<100 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri



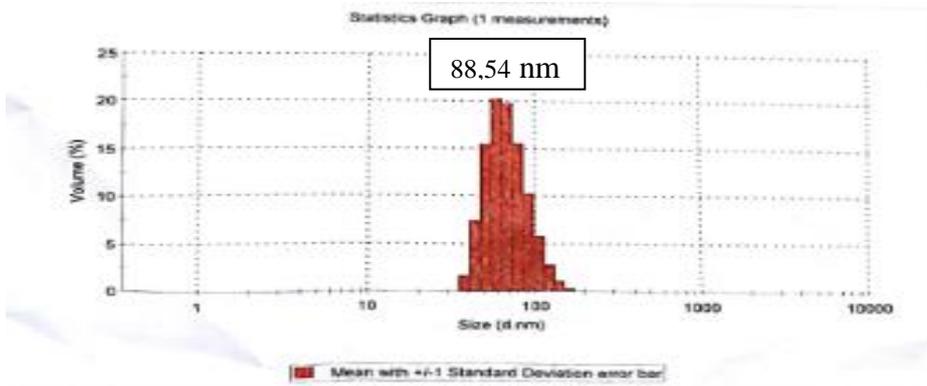
Şekil 4.2 <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Jeol 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu Görüntüsü



Şekil 4.3 <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Zeta Potansiyeli



Şekil 4.4 <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Partikül Büyüklük Dağılımı



Şekil 4.5 <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün Partikül Büyüklük Dağılımı İstatistik Grafiği

## 4.2 SMART Testine Ait Bulgular

SMART ile genotoksik özellikleri değerlendirilen  $Fe_2O_3$ 'ün iyonik ve NP formlarının (<50 nm ve <100 nm) uygulamalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterildi.  $Fe_2O_3$ 'ün genotoksik etkileri değerlendirilirken her bir konsantrasyon için, normal kanatlı bireylerden kanat preparatları hazırlanarak incelendi.

$Fe_2O_3$  NP'ünün  $72\pm 4$  saatlik distile su uygulamasında, preparatı yapılan 80 kanatta 13 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 15 adet klon belirlendi. Ayrıca toplam mwh klon sayısı ise 15 olarak bulundu. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 0,76 (Çizelge 4.1) olarak hesaplandı.

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucu, distile su uygulama sonuçları ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlemlendi.

$72\pm 4$  saatlik 3. evre trans-heterozigot larvaları <50 nm ve <100 nm boyutundaki  $Fe_2O_3$  NP'ünün 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2mM, 5mM ve 10mM) maruz bırakıldı. <50 nm  $Fe_2O_3$  NP'ünün 1mM ve 10 mM'lık konsantrasyon uygulanması ile elde edilen sonuçlarda toplam mwh klonlarda pozitif sonuç gözlemlendi (Çizelge 4.1). Ayrıca <50 nm  $Fe_2O_3$  NP'ünün 10 mM'lık konsantrasyon uygulanması ile elde edilen sonuçlarda küçük tek tip klonlarda pozitif sonuç gözlemlendi. Ancak; <50 nm  $Fe_2O_3$  NP'ünün 2 mM ve 5 mM'lık uygulamaları ve <100 nm  $Fe_2O_3$  NP'ünün tüm konsantrasyon uygulamaları sonucu elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan distile su ile karşılaştırıldığında farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu (Çizelge 4.1). Ayrıca; NP uygulama sonuçlarına göre toplam klon indüksiyon frekansında doz artışına bağlı olarak belirli oranda herhangi bir artış yada azalış olmadığı bulundu.

$72\pm 4$  saatlik 3. evre transheterozigot larvalar  $Fe_2O_3$ 'ün iyonik formunun 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2mM, 5 mM ve 10 mM) maruz bırakıldı. Bu gruptaki larvalar normal kontrol olarak %10'luk etil alkol; pozitif kontrol olarak ise 1mM EMS'ye maruz bırakıldı.  $Fe_2O_3$  iyonik formunun farklı konsantrasyonlarının uygulanması ile elde

edilen sonuçlar ile kontrol grubu olan %10'luk Etil alkol uygulamasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığı gözlemlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan EMS uygulamalarının sonucu, %10'luk etil alkol uygulama sonuçları ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlemlendi. Toplam klon indüksiyon frekansında doz artışına bağlı olarak belirli oranda herhangi bir artış yada azalış olmadığı görüldü. Ayrıca; tüm konsantrasyonların uygulama sonuçları elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan %10'luk etil alkol ile karşılaştırıldığında farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu.

**Çizelge 4.1** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) ( <i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) ( <i>m</i> =5)			İkiz klonlar ( <i>m</i> =5)			Toplam mwh klonlar ( <i>m</i> =2)			Toplam klonlar ( <i>m</i> =2)		
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.
Normal Kanat																
Distile Su (72h)	80	13	(0,16)		2	(0,02)		0	(0,00)		15	(0,19)		15	(0,19)	0,76
1 mM EMS (72h)	31	71	(2,29)	†	27	(0,87)	†	9	(0,29)	†	105	(3,39)	†	108	(3,48)	† 5,38
72±4 h <50 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 'ün uygulaması (mM)																
1	80	22	(0,27)	i	5	(0,06)	i	1	(0,01)	i	27	(0,33)	†	28	(0,35)	† 1,38
2	80	20	(0,25)	i	5	(0,06)	i	0	(0,00)	i	25	(0,31)	i	25	(0,31)	i 1,28
5	80	14	(0,17)	i	6	(0,07)	i	1	(0,01)	i	20	(0,25)	i	21	(0,26)	i 1,02
10	80	31	(0,38)	†	3	(0,03)	i	2	(0,02)	i	31	(0,38)	†	36	(0,45)	† 1,59
72±4 h <100 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 'ün uygulaması (mM)																
1	80	15	(0,18)	i	5	(0,06)	i	0	(0,00)	i	20	(0,25)	i	20	(0,25)	i 1,02
2	80	6	(0,07)	-	2	(0,02)	i	0	(0,00)	i	8	(0,10)	-	8	(0,10)	- 0,41
5	80	1	(0,01)	-	2	(0,02)	i	0	(0,00)	i	3	(0,03)	-	3	(0,03)	- 0,15
10	80	6	(0,07)	-	2	(0,02)	i	2	(0,02)	i	10	(0,12)	-	10	(0,12)	- 0,51

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; †, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi=0,05.

**Çizelge 4.2** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik form

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
%10 Etil alkol (72h)	80	22	(0,28)		3	(0,04)		1	(0,01)		26	(0,32)		26	(0,32)		1,33
1 mM EMS (72h)	80	67	(0,84)	+	24	(0,30)	+	9	(0,11)	+	86	(1,08)	+	100	(1,25)	+	4,40
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 'ün iyonik formunun dozları (mM)																	
1	80	33	(0,41)	i	2	(0,02)	-	1	(0,01)	i	36	(0,45)	i	36	(0,45)	i	1,84
2	80	18	(0,22)	-	5	(0,06)	İ	0	(0,00)	i	23	(0,29)	-	23	(0,29)	-	1,18
5	80	25	(0,31)	-	0	(0,00)	-	0	(0,00)	i	25	(0,31)	-	25	(0,31)	-	1,28
10	80	17	(0,21)	-	2	(0,02)	-	0	(0,00)	i	19	(0,24)	-	19	(0,24)	-	0,97

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü olasılık düzeyi=0,05.

### 4.3 Allium Testine Ait Bulgular

#### 4.3.1 Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi

<100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün EC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi için büyümeyi engelleme testi yapıldı. Bunun için <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,1, 0,01 ve 0,001 mM'lık konsantrasyonları hazırlandı, negatif kontrol grubu olarak da saf su kullanıldı. (Çizelge 4.3). Her bir konsantrasyon ve negatif kontrol grubu için 5'er adet soğan kullanıldı. Soğanlar 4 gün boyunca çimlendirilmiş olup azalan konsantrasyonlara ilaveler yapıldı. 4. gün sonunda her bir konsantrasyon için her bir soğandan en iyi filizlenmiş 10 kök alınarak toplam 50 kök ucundan her bir konsantrasyon için ortalama kök uzunluğu değerlendirildi (Çizelge 4.3). Negatif kontrolde çimlendirilen soğanların ortalama kök uzunluğu olan 5,04 cm uzunluğunun yarısı olan 2,52 cm veya buna en yakın olan büyüme araştırıldı. <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün EC<sub>50</sub> değeri olarak 5 mM bulundu.

**Çizelge 4.3** <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP'ünün *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları

<b>Konsantrasyon</b>	<b>Ortalama Uzunluk</b>	<b>% Büyüme</b>	<b>% Büyümede azalma</b>
<b>10 mM</b>	1,062	21,07	78,9
<b>8 mM</b>	1,438	28,5	71,5
<b>6 mM</b>	2,248	44,6	55,4
<b>4 mM</b>	2,886	57,2	42,8
<b>2 mM</b>	3,778	74,9	25,1
<b>1 mM</b>	3,868	76,7	23,3
<b>0,1 mM</b>	3,994	79,2	20,8
<b>0,01 mM</b>	4,072	80,7	19,3
<b>0,001 mM</b>	4,628	91,8	8,2
<b>Kontrol</b>	5,04	100	0

### 4.3.2 Mitotik İndeks ve Mitotik Faz Frekansları

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün (<50 nm için 4 saat; <100 nm için 24 ve 96 saat uygulama süresi)ve iyonik formunun (4 saat uygulama süresi) *A. cepa* kök uçlarına uygulanmasıyla mitotik indeks ve mitotik fazlarda meydana getirdiği değişimler Duncan çoklu dağılım testi ile belirlenmiştir.

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 5 mM'lık konsantrasyonunun 24 saatlik uygulaması ve 96 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonlarının mitotik indeks değeri kontrol grubuna ve MMS'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. 24 saatlik uygulamada en düşük mitotik indeks değeri 2,5 mM konsantrasyonda (17,9±1,25), en yüksek mitotik indeks değerine ise 5 mM'lık konsantrasyonda (19,99±1,46) rastlanıldı. 96 saatlik uygulamada en düşük mitotik indeks değeri 2,5 mM konsantrasyonda (28,16±2,28), en yüksek mitotik indeks değerine ise 10 mM'lık konsantrasyonda (34,55±1,48) rastlanıldı. <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün mitotik faz indeks etkisi incelendiğinde kontrol grubuna göre 24 saatlik uygulamanın 5 mM'lık konsantrasyonu, 96 saatlik uygulamanın ise tüm konsantrasyonlarının faz frekansları istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu. Ayrıca; 96 saatlik uygulamanın konsantrasyon artışına bağlı olarak düzenli bir artış gözlemlendi (Çizelge 4.4).

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 24 ve 96 saatlik konsantrasyon uygulamalarının mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde; faz frekanslarının kontrole göre düzenli olarak artış ya da azalış göstermediği bulundu. 10 mM'lık konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasının metafaz safhası hariç artan ve azalan faz safhaları istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. Bu durumun sebebi chfr (profaz ve metafaz arasındaki kontrol noktası) noktasının engellenmesinden olabilir. (Scolnic and Halazonetis 2000) mitotik strese karşı hücrelerin metafaza geçişini geciktiren chr1 kontrol noktasını tanımlamışlardır. 96 saatlik uygulamada; 2,5 ve 10 mM'lık konsantrasyonun profaz safhası, ve anafaz safhasının tüm konsantrasyon uygulama sonuçları istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulundu.

**Çizelge 4.4** <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon mM	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Standard sapma*	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Standard sapma*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
<b>Kontrol- 24 saat</b>	5271	16,44±1,86a	72,55±3,34a	5,92±2,46a	12,06±3,42ab	9,45±1,48a
<b>MMS-10 mg/L</b>	5377	2,94±0,73b	64,28±8,25b	9,64±3,05b	6,3±5,65c	19,76±4,34b
<b>2,5</b>	5222	17,9±1,25a	67,98±3,73ab	9,99±1,79b	9,22±2,36ac	12,8±1,71ac
<b>5</b>	5099	19,99±1,46c	61,69±3,56b	7,15±1,43ab	15,82±1,89b	15,32±1,75c
<b>10</b>	5164	18,18±0,92a	66,46±1,79ab	6,19±1,71a	8±2,29ac	19,33±3,95b
<b>Kontrol- 96 saat</b>	5262	30,84±2,03a	90,41±1,77ab	4,37±1,96a	1,88±0,57a	3,33±0,48a
<b>MMS-10 mg/L</b>	5412	6,26±1,55b	64,52±3,61c	14,48±2,85b	3,8±2,43b	17,2±2,99b
<b>2,5</b>	5270	28,16±2,28c	89,82±1,04ab	4,01±1,08a	2,9±0,61ab	3,25±0,62a
<b>5</b>	5246	29,47±1,22ac	88,83±1,82a	4,19±1,17a	2,84±0,74ab	4,12±0,63a
<b>10</b>	5126	34,5±1,48d	92,5±1,82b	2,84±0,93a	2,37±0,54ab	2,27±0,53a

\*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün tüm konsantrasyon uygulamalarındaki mitotik indeks değeri kontrol grubuna ve MMS'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. En düşük mitotik indeks değerine 0,001 mM konsantrasyonunda (40,85±2,48), en yüksek mitotik indeks değerine ise 0,1'lik konsantrasyonunda (65,24±3) rastlanıldı. Ayrıca; uygulamanın konsantrasyon artışına bağlı olarak düzenli bir artış ya da azalış gözlenmedi (Çizelge 4.5).

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün konsantrasyon uygulamalarının mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde; faz frekanslarının kontrole göre düzenli olarak artış ya da azalış göstermediği bulundu. Ayrıca; tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulamasının faz safhalarına etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

**Çizelge 4.5** <50 nmFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon mM	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma*	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
<b>Kontrol- 4 saat</b>	5095	23,92±1,84a	88,55±2,42a	4,29±0,8a	3,12±1,86a	4,03±1,34a
<b>MMS-10 mg/L</b>	5211	15,74±1,49b	78,03±1,29b	19,67±1b	0,96±0,29b	1,32±0,15b
<b>0,001</b>	5200	40,85±2,48c	95,95±0,93c	1,35±0,43c	1,45±0,34b	1,22±0,43b
<b>0,01</b>	5249	51,14±2,15d	96,4±0,78c	1,03±0,38c	1,26±0,31b	1,31±0,59b
<b>0,1</b>	5151	65,24±3e	95,57±1,13c	1,27±0,28c	1,57±0,69b	1,58±0,38b
<b>1</b>	5067	54,59±3,24f	95,33±0,89c	1,64±0,66cd	1,74±0,23b	1,27±0,44b
<b>10</b>	5281	42,33±1,4c	94,5±1,84c	2,34±0,81d	1,87±0,52b	1,28±0,28b

\*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulamalarındaki mitotik indeks değeri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. En düşük mitotik indeks değerine 10 mM'lık konsantrasyonunda (10,06±0,47), en yüksek mitotik indeks değerine ise 0,001'lik konsantrasyonunda (16,35±1,27) rastlanıldı. Ayrıca Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun tüm konsantrasyonlarının mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde kontrol grubuna göre faz frekanslarının istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ancak; düzenli bir artış veya azalış şeklinde değişiklikler gözlenmedi (Çizelge 4.6).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun konsantrasyon uygulamalarının mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde; faz frekanslarının kontrole göre düzenli olarak artış ya da azalış göstermediği bulundu. Ayrıca; tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulamasının faz safhalarına etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

**Çizelge 4.6** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik formunun *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon mM	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± Stantard sapma*	Mitotik Faz Safhaları (%) ± Stantard sapma*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
<b>Kontrol- 4 saat</b>	5095	23,92±1,84a	88,55±2,42a	4,29±0,8a	3,12±1,86a	4,03±1,34a
<b>MMS-10 mg/L</b>	5211	15,74±1,49bc	78,03±1,29b	19,67±1b	0,96±0,29b	1,32±0,15b
<b>0,001</b>	5185	16,35±1,27b	70,53±3,57cd	10,83±1,83c	6,89±1,54cd	11,74±1,49c
<b>0,01</b>	5240	14,15±1,16c	72,27±2,16cde	9,18±2,18cd	6,41±1,68cd	12,12±0,63c
<b>0,1</b>	5190	15,6±0,85bc	73,67±1,71de	8,6±2,05cd	5,69±1,18c	12,02±1,33c
<b>1</b>	5145	15,21±2,65bc	75,16±2,42be	7,51±0,75d	7,47±1,83cd	9,85±1,15d
<b>10</b>	5230	10,06±0,47d	69,88±2,99c	10,6±2,3c	8,49±1,9d	11,02±0,89cd

\*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli

#### 4.3.3 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikülünün ve İyonik Formunun Neden Olduğu Anormalliklerin Tipleri ve Oranları

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları çizelge 4.7'de gösterildi. <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ün 24 saatlik uygulanmasında anafaz-telofaz safhalarında araştırılan en fazla anormallik olayına 10 mM'lik konsantrasyonda (% 19±3,31), en az anormallik olayına ise 2,5 mM'lik konsantrasyon uygulanmasında (% 18,2±1,92) rastlanıldı. Anafaz-telofaz safhalarında araştırılan <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 96 saatlik uygulamasında ise en fazla anormallik olayı 10 mM'lik konsantrasyonda % 28,6±2,5; en az anormallik olayı 2,5 mM'lik uygulamasında % 24,6±2,19 olarak bulundu. Kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP'ünün konsantrasyon artışına ve uygulama süresine bağlı olarak anafaz-telofaz anormalliklerinin % oranının arttığı bulundu. Kontrol grubu ile 24 saatlik uygulama sonucu oluşan anormallikler karşılaştırıldığında incelenen bütün konsantrasyonlar istatistiksel açıdan anlamlı (p<0,05) bulunmazken; 96 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonları istatistiksel açıdan anlamlı (p<0,05) bulundu.

Kalgın kromozom (Çizelge 4.7) olayına en fazla % 19,8 oranında 2,5 mM'lik dozun 96 saatlik uygulamasında en az olarak da 2,5 mM'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (% 11,4) rastlanıldı.

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu diğer bir anormallik de yapışıklıktır (Çizelge 4.7). En fazla % 2,6 oranında 10 mM'lık konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasında; en az % 1,4 oranında 2,5 ve 5 mM'lık konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasında bulundu. Bir diğer anormallik olan anafaz köprüsü en fazla % 6,6 oranında 10 mM'lık konsantrasyonun 96 saatlik uygulamasında; en az % 2,2 oranında 10 mM'lık konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasında görüldü (Çizelge 4.7).

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün bütün konsantrasyon ve uygulama sürelerinde anafaz-telofaz safhalarında neden oldukları anormallikler bozulmuş anafaz-telofaz, kalginkromozom, yapışıklık ve anafaz köprüsüdür. Kalgın kromozom en fazla görülen anormallik olup % 19,8 oranında 2,5 mM'lık dozun 96 saatlik uygulamasında tespit edildi. Bunu % 6,6 oranında anafaz köprüsü (10 mM'lık konsantrasyonun 96 saatlik uygulaması) ve % 2,6 oranında yapışıklık (5 mM'lık konsantrasyonun 96 saatlik uygulaması) izlemektedir.

**Çizelge 4.7** < 100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları

Konsantrasyon mM	İncelene n Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler ( % )*					Toplam Anormallikle r ( %± SS )
		Bozulmuş anafaz- telofaz	Kalgın kromozom	Yapışık an Lık	Anafaz köprüsü		
<b>Kontrol- 24 saat</b>	500	0,6	12,4	1,6	5	19,6±0,89a	
<b>MMS-10 mg/L</b>	500	10,2	8	14,4	4	36,6±0,81b	
<b>2,5</b>	500	0,4	11,4	1,4	5	18,2±1,92a	
<b>5</b>	500	0,2	14,2	1,4	3	18,8±1,78a	
<b>10</b>	500	0,6	13,6	2,6	2,2	19±3,31a	
<b>Kontrol- 96 saat</b>	500	-	15,2	1,4	3,6	20,2±2,38a	
<b>MMS-10 mg/L</b>	500	17,6	6,6	19,2	12	44,4±1,74b	
<b>2,5</b>	500	0,4	19,8	1,6	2,8	24,6±2,19c	
<b>5</b>	500	0,6	18	2,6	4,6	25,8±2,28cd	
<b>10</b>	500	0,6	19,2	2,2	6,6	28,6±2,5d	

\* Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları çizelge 4.8'de gösterildi. <50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün anafaz-telofaz safhalarında araştırılan en fazla anormallik olayına 10 mM'lık konsantrasyonun 4 saatlik uygulanmasında (% 39,8±1,92), en az anormallik olayına ise 0,001 mM'lık konsantrasyonun 4 saatlik uygulanmasında (% 16±2,12) rastlanıldı. Kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün konsantrasyon artışına bağlı olarak anafaz-telofaz anormalliklerinin % oranını

arttırdığı bulundu. Kontrol grubuna göre artış şeklinde gerçekleşen anormalliklerden 0,1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyon uygulaması istatistiksel açıdan anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulundu.

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulama süresinde anafaz-telofaz safhalarında neden oldukları anormallikler bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışıklık ve anafaz köprüsüdür. Kalgın kromozom en fazla görülen anormallik olup % 27,4 oranında 10 mM'lık konsantrasyonun 4 saatlik uygulamasında tespit edilmiştir. Bunu % 9,4 oranında yapışıklık (10 mM'lık konsantrasyon uygulaması), % 4,8 oranında anafaz köprüsü (1 mM'lık konsantrasyon uygulaması) ve % 0,6 oranında bozulmuş anafaz-telofaz (0,1 mM'lık konsantrasyon uygulaması) izlemektedir.

Kalgın kromozom (Çizelge 4.8) olayına en fazla % 27,4 oranında 10 mM'lık konsantrasyon uygulamasında en az olarak da % 10,4 oranında 0,001 mM'lık konsantrasyon uygulamasında rastlanıldı. Bir diğer anormallik olan yapışıklık en fazla % 9,4 oranında 10 mM'lık konsantrasyon uygulamasında; en az % 3,2 oranında 0,001 ve 0,01 mM'lık konsantrasyon uygulamasında bulundu. Anafaz köprüsü ise en fazla % 4,8 oranında 1 mM'lık konsantrasyon uygulamasında; en az % 2,2 oranında 0,001 mM'lık konsantrasyon uygulamasında görüldü.

**Çizelge 4.8** <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları

Konsantrasyon mM	İncelen en Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler ( % )*				Toplam Anormallikler ( %± SS )
		Bozulmuş anafaz- telofaz	Kalgın kromozo m	Yapış kanlık	Anafaz köprüsü	
<b>Kontrol- 4 saat</b>	500	-	12	1,4	2	15,4±2,07a
<b>MMS-10 mg/L</b>	142	4,2	40,22	0,87	-	45,28±3,83b
<b>0,001</b>	500	0,2	10,4	3,2	2,2	16±2,12a
<b>0,01</b>	500	0,2	11,8	3,2	2,6	17,8±1,78a
<b>0,1</b>	500	0,6	18,6	5	2,8	27±3,74c
<b>1</b>	500	0,2	18,6	7	4,8	30,6±2,3d
<b>10</b>	500	-	27,4	9,4	3	39,8±1,92e

\* Sütunlardaki farklı küçük harfler  $p < 0.05$  düzeyinde önemli; SS: Standart Sapma

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları çizelge 4.9'de gösterildi. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun anafaz-telofaz safhalarında araştırılan en

fazla anormallik olayına 10 mM'lik konsantrasyonun 4 saatlik uygulanmasında (% 9,4±1,67), en az anormallik olayına ise 0,001 mM'lik konsantrasyonun 4 saatlik uygulanmasında (% 4,6±1,51) rastlanıldı. Kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun konsantrasyon artışına bağlı olarak anafaz-telofaz anormalliklerinin % oranını arttırdığı bulundu. Kontrol grubuna göre artış şeklinde gerçekleşen anormalliklerin tüm konsantrasyon uygulaması istatistiksel açıdan anlamlı (p<0,05) bulundu.

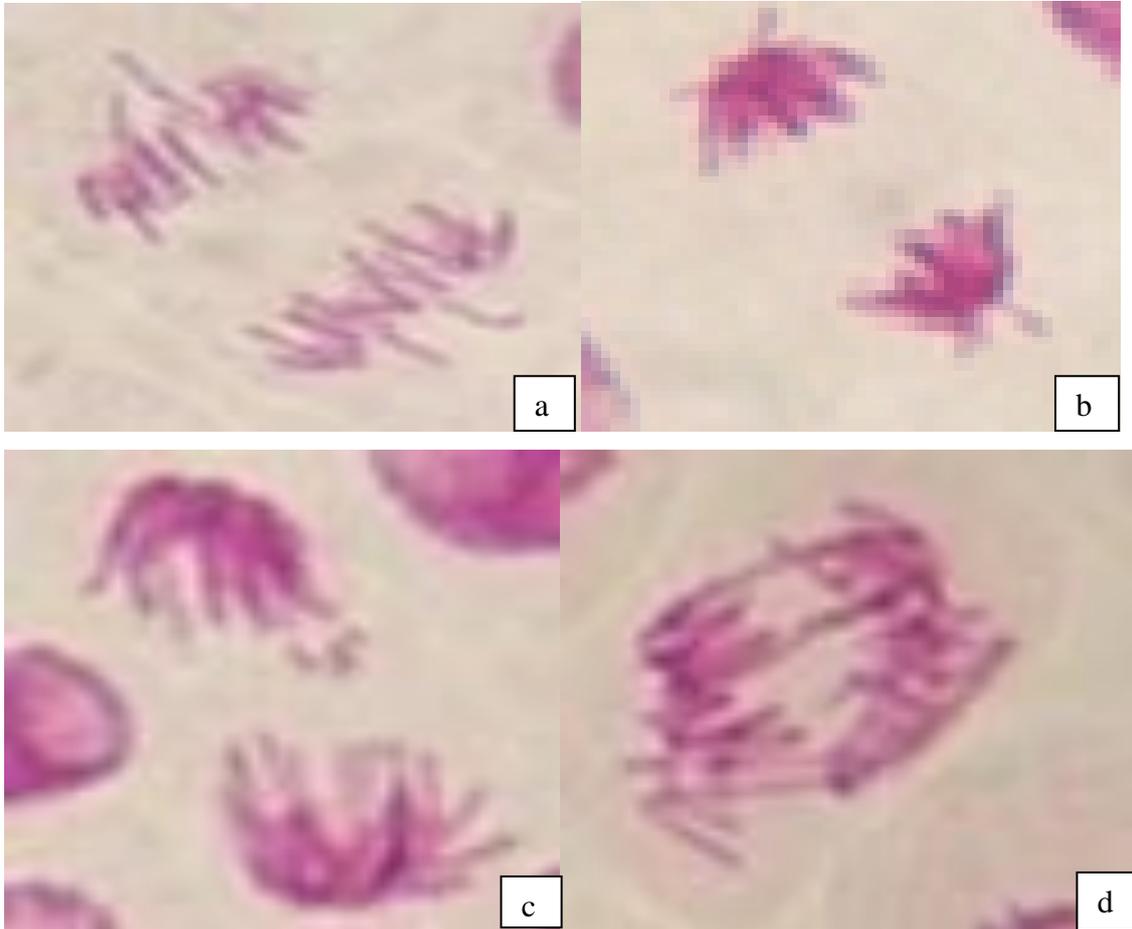
Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulama süresinde anafaz-telofaz safhalarında neden oldukları anormallikler bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışıklık ve anafaz köprüsüdür. Kalgın kromozom en fazla görülen anormallik olup % 6,6 oranında 1 mM'lik konsantrasyon uygulamasında tespit edildi. Bunu % 5 oranında anafaz köprüsü (10 mM'lik konsantrasyon uygulaması), % 2,8 oranında yapışıklık (0,001 mM'lik konsantrasyon uygulaması) ve % 0,4 oranında bozulmuş anafaz- telofaz (1 mM'lik konsantrasyon uygulaması) olduğu bulundu.

Kalgın kromozom (Çizelge 4.9) olayına en fazla % 6,6 oranında 1 mM'lik konsantrasyon uygulamasında en az olarak da % 1,8 oranında 0,001 mM'lik konsantrasyon uygulamasında rastlanıldı. Bir diğer anormallik olan anafaz köprüsü en fazla % 5 oranında 10 mM'lik konsantrasyon uygulamasında görülürken 0,001 mM'lik konsantrasyon uygulamasında hiç görülmedi. Yapışıklık ise en fazla % 2,8 oranında 0,001 mM'lik konsantrasyon uygulamasında; en az % 0,2 oranında 0,1 mM'lik konsantrasyon uygulamasında görüldü.

Çizelge 4.9 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik formun neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları

Konsantrasyon mM	İncelen en Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler ( % )*				
		Bozul muş anafaz- telofaz	Kalgin kromozo m	Yapış kan lık	Anafaz köprü sü	Toplam Anormallikler ( %± SS )
<b>Kontrol 4-saat</b>	500	-	12	1,4	2	15,4±2,07a
<b>MMS-10mg/L</b>	142	4,2	40,22	0,87	-	45,28±3,83b
<b>0.001</b>	500	-	1,8	2,8	-	4,6±1,51c
<b>0.01</b>	500	0,2	3,4	1,4	0,2	5,2±1,3c
<b>0.1</b>	500	-	3,2	0,2	2	5,4±1,51c
<b>1</b>	500	0,4	6,6	0,6	1,2	8,8±1,3d
<b>10</b>	500	-	2,2	2,2	5	9,4±1,67d

\* Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli; SS: Standart Sapma



Şekil 4.6 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile muamele edilen *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anormallikler a) Kalgin kromozom b) Yapışıklık c) Bozulmuş anafaz-telofaz d) Anafaz köprüsü

#### 4.3.4 Allium Komet Testine Ait Bulgular

Çalışmamızda Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün farklı boyutlarının <100 nm için 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının 24 ve 96 saat uygulama süresi <50 nm ve iyonik formu için 0,001 mM, 0,01mM, 0,1 mM, 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının 4'er saat uygulamaları çalışıldı. Pozitif kontrol olarak ise 10 ppm MMS kullanıldı.

<100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 24 ve 96 saat uygulama sonrası elde edilen veriler 10 ppm MMS ile oluşturulan hasar ile karşılaştırıldığında 24 saatlik uygulamada DNA hasar skorları 16,33± 2,08 ile 23,33±2,3 arasında bulundu. 96 saatlik uygulamada ise 20,66±1,52 ve 32±3,46 arasında bulundu (Çizelge 4.10). Uygulama süresine ve konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki artış istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu (p<0,05).

**Çizelge 4.10** <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *A. cepa* kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) Ortalama ± Standart sapma	
		24 saat	96 saat
Negatif Kontrol	-	11±1,73a	14±1,73a
MMS	10 ppm	23,33±1,52b	30±2b
	2,5 mM	16,33±2,08c	20,66±1,52c
	5 mM	19,33±1,15c	28±2,64b
	10 mM	23,33±2,3b	32±3,46b

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli.

<50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün farklı konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulama sonuçlarına göre en yüksek DNA hasar skoru 10 mM'da 32,66±4,16 olarak bulundu (Çizelge 4.11). Konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki gözlenen artış kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu (p<0,05).

**Çizelge 4.11** <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *A. cepa* kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) Ortalama ± Standart Sapma
Negatif Kontrol	-	13,33±1,15a
MMS	10 ppm	24,66±1,52b
	0,001 mM	15,33±1,15ac
	0,01 mM	18,66±2,3c
	0,1 mM	21±3,6b
	1 mM	22,33±2,08b
	10 mM	32,66±4,16d

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik formunun farklı konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulama sonuçlarına göre en yüksek DNA hasar skoru 10 mM'da 24,06±2,68 olarak bulundu (Çizelge 4.12). Konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki gözlenen artış kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu (p<0,05).

**Çizelge 4.12** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik formunun *A. cepa* kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) Ortalama ± Standart Sapma
Negatif Kontrol	-	13,33±1,15a
MMS	10 ppm	24,66±1,52b
	0,001 mM	12,4±2,6a
	0,01 mM	14,33±1,51a
	0,1 mM	16,66±3,02c
	1 mM	18,33±3,13c
	10 mM	24,06±2,68b

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı canlı türleri ve bitkiler NP'lere farklı hassasiyetler göstermektedir. Farklı boyutlardaki nano ürünler birçok alanda kullanılmakta ancak; insan sağlığı ve çevreye olabilecek zararlı etkileri hakkında bilgi ve literatür sınırlıdır (Logotheidis 2006). İnsanlarda bu parçacıkların akciğer, bağırsak ve hatta deri yolu ile kolaylıkla kana karışabildiği bilinmektedir (Hoet *et al.* 2004). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü manyetik rezonans görüntüleme cihazında kullanılarak, inflamatuvar lenfonotlarda meydana gelen metastatik tanımlamalar, tümör anjiyogenezi, tehlikeli ateroskleroz plaklar yanı sıra sağlıklı ve patolojik dokuların ayırt edilmesinde kullanılmıştır (Hafeli *et al.* 2009). Bu yüzden çalışmamızda farklı boyutlardaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün ve iyonik formunun muhtemel genotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla genotoksisite test yöntemlerinden olan SMART ve Allium test yöntemi kullanıldı.

Çeşitli maddelerin ve karışımların genotoksik özelliğinin değerlendirilmesi için kullanılan SMART; *in vivo* bir test olması ve ayrılmama (non-disjunction), kromozomdan parça kopması (delesyon), kromozomun bir parçasının yer değiştirmesi (translokasyon) ve rekombinasyon gibi birçok genetik hasarı belirleyebilmektedir (Turna 2012). Genetik hasarın oluşumu NP'lerin geniş bir yüzeye ve yüksek oranda reaktiviteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı NP uygulamaları sonrası ROT'lerinin oluşumu artmakta ve mutajenik potansiyeli olan 8-OHdG lezyonlar oluşmaktadır (Singh *et al.* 2009, Flower *et al.* 2012).

72±4 saatlik 3. evre trans-heterozigot larvaları <50 nm ve <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2 mM, 5 mM ve 10 mM) maruz bırakıldı. <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP'ünün 1mM ve 10 mM'lık konsantrasyon uygulanması ile elde edilen sonuçlarda toplam mwh klonlarda pozitif sonuç gözlemlendi. Ayrıca <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 10 mM'lık konsantrasyon uygulanması ile elde edilen sonuçlarda küçük tek tip klonlarda pozitif sonuç gözlemlendi. Ancak; <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 2 mM ve 5 mM'lık uygulamaları ve < 100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün tüm konsantrasyon uygulamaları sonucu elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan distile su ile karşılaştırıldığında farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu.

72±4 saatlik 3. evre transheterozigot larvalar, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun 4 farklı konsantrasyonuna (1mM, 2 mM, 5 mM ve 10 mM) maruz bırakılmıştır. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iyonik formunun farklı konsantrasyonlarının uygulanması ile elde edilen sonuçlar ile kontrol grubu olan % 10'luk Etil alkol uygulamasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucu, %10'luk etil alkol uygulama sonuçları ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlenmiştir. Toplam klon indüksiyon frekansında doz artışına bağlı olarak belirli oranda herhangi bir artış yada azalış olmadığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerinin genel olarak genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Ancak <50 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün, <100 nm Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP ve iyonik formuna göre genotoksik olduğu bulunmuştur. Yine sonuçlara göre NP'lerdeki boyut ve yapı farklılıklarının, hücresel düzeyde farklı etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. NP ve mikrometre formu kıyaslandığında küçük boyutlu ve geniş yüzeye sahip olan maddelerin daha toksik olduğu düşünülmüş fakat bunun kesin bir bilgi olmadığı için, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub> ve CuO'in nano ve mikrometre parçacıklarının toksik etkisi karşılaştırılmıştır. NP formunun mikrometre partikül formundan daha toksik olmadığı ancak NP formlarının başka maddelerle beraber uygulandığında mikrometre partikül formuna göre daha toksik olacağı düşünülmüştür (Karlsson *et al.* 2009).

*A. cepa* çeşitli kimyasalların toksik etkisinin belirlenmesinde oldukça sık kullanılan bir materyaldir. *Allium* test hızlı, güvenilir, uygulanması kolay ve ekonomik bir test sistemidir. Ayrıca prokaryotik veya ökaryotik canlılarla yapılan diğer, alternatif kısa dönem toksisite test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir (Fiskeşjö 1985, Marco *et al.* 1986).

EC<sub>50</sub> değerini belirlemek için kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün <100 nm boyutunun uygulanan bütün konsantrasyonlarında, konsantrasyona bağlı olarak saçak köklerin renklerinin koyulaştığı, kök uçlarındaki büyümenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

azaldığı görülmüştür. Soğan kök uçlarındaki büyümenin kontrol grubuna göre %45'den daha fazla azalması, bitkiler üzerinde büyük bir olasılıkla subletal etkiye sahip toksik maddelerin varlığına işaret etmektedir (Fiskesjö 1985, Hidalgo 1989, Wierzbicka 1988, Antonsiewicz *et al.* 1990). Bu bilgiye dayanarak <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 5 mM ve üzerindeki dozların, *A. cepa* kök uçlarına subletal etkisinin olduğu sonucuna varılabilir. Kök büyümesinin inhibisyonu genellikle apikal meristematik aktivite ve farklılaşma sırasında hücrenin uzaması (Fusconi 2006) ile ilgilidir.

EC<sub>50</sub> değeri yaklaşık olarak 5 mM olarak belirlendikten sonra uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesinde 2xEC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> ve 1/2xEC<sub>50</sub> değerleri kullanılmıştır. Buna bağlı olarak <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 10, 5 ve 2,5 mM'lık konsantrasyonları kullanılmıştır. Saf su negatif kontrol grubu olarak, MMS ise pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Seçilen bu konsantrasyonlar *A. cepa*'nın hücre döngüsünü 24 saatte tamamlamasından dolayı (Rank and Nielsen 1994, Yüzbaşıoğlu vd. 2003) uygulama süresi olarak 24 ve 96 saat seçilmiştir. Ancak literatürde farklı uygulama sürelerine de rastlanılmaktadır. 4 ve 8 saat (Öbek 1993), 12 ve 24 saat (İnceer 2000), 6 ve 24 saat (Kara 1994), 3gün (Özen *et al.* 2011), 2 ve 6 gün (Metin 2006) ve 7 gün (Smaka-Kincl *et al.* 1996) gibi değişik uygulama süreleri kullanılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

*Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormalliklerle belirlenebilmektedir.

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün 24 saatlik uygulama süresinin 5 mM'lık konsantrasyonunun mitotik indeks değerlerindeki değişiklikler kontrol grubuna ve MMS'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Ayrıca; 96 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonlarının da istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve konsantrasyon artışına bağlı olarak mitotik indeks değerinin düzenli olarak arttığı bulunmuştur.

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün konsantrasyon artışına ve uygulama süresine bağlı olarak anafaz-telofaz anormalliklerinin yüzdesi artmıştır. Kontrol grubu ile 24

saatlik uygulama sonucu oluşan anormallikler karşılaştırıldığında çalışılan bütün konsantrasyonlara ait değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmazken; 96 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonlarına ait değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlılık ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

Bu araştırmada,  $<100$  nm boyutundaki  $Fe_2O_3$  NP'ünün *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde anafaz-telofaz evrelerinde meydana getirdiği ve en sık rastlanan kromozom aberasyonu “kalgın kromozom” (% 19,8 oranında 2,5 mM'lık dozun 96 saatlik uygulamasında)'dur. Kalgın kromozomların varlığı, kardeş hücrelere farklı sayıda kromozomların geçişi ve sonrasında interfazda eşit olmayan boyutta veya düzensiz şekildeki nükleuslu kardeş hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır (El-Ghamery *et al.* 2003).

Araştırmamızda, *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerinde  $<100$  nm boyutundaki  $Fe_2O_3$  NP'ünün 96 saatlik uygulamasında konsantrasyon artışına bağlı olarak indüklediği anafaz-telofaz kromozom aberasyonları içerisinde anafaz köprüsünün oranı % 6,6 olarak bulunmuştur. Kromozomların kırılması ve yeniden bir araya gelmesi ile köprü ve/veya köprülerin oluşabileceği bildirilmiştir (Soliman 2001). Kromozomların yapışması kromatidlerin birbirlerinden ayrılmasını engellemekte ve köprülerle birbirlerine bağlı kalmalarına neden olmaktadır (Kabarity *et al.* 1974, Badr *et al.* 1992). Yapışık köprülerin, replikasyon enzimlerinin kusurlu olması veya aktivasyonunun az olması yüzünden kromozomların tamamlanmamış replikasyonunun sonucu olduğu bulunmuştur (Sinha 1979). Ayrıca telomerik heterokromatinin DNA sekanslarının gecikmiş replikasyonunun bir sonucu olabileceği rapor edilmiştir (De-Faria and Jaworska 1972, Bennet 1977).

Nükleus bölünmeye hazır olduğunda heterokromatin blokları DNA replikasyonunu bitirmediyse köprü oluşumları meydana gelebilir (Kaltsikes *et al.* 1984). Araştırmamızda da kullanılan  $Fe_2O_3$ 'ün muhtemelen nükleus bölünmesini etkilediği ve anafaz-telofazda tekli köprüler oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir.

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün uygulandığı *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerinde anafaz-telofazda % 2,6 oranında yapışıklık (5 mM'lık konsantrasyonun 96 saatlik uygulaması) gözlenmiştir. Yapışıklık, inter-kromozomal kromatin ipliklerin dolaşmasının sonucu olarak kromozomlar arasında subkromatid bağlantıların oluşmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Mc Gill *et al.* 1974, Chauhan *et al.* 1986). Yapışık kromozomlar, kimyasalların toksik etkilerini yansıtmakta ve genellikle geri dönüşümsüz olup, muhtemelen hücrelerde ölüme neden olmaktadır (Liu *et al.* 1992).

<100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün konsantrasyon ve uygulama süresinin artışına bağlı olarak hücre bölünmesini etkilediği bununla birlikte fizyolojik ve hücreyel faaliyetlerin de olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulamasında mitotik indeks değerlerindeki artışlar kontrol grubu ve MMS grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Ayrıca; uygulamanın konsantrasyon artışına bağlı olarak düzenli bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. Kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün konsantrasyon artışına bağlı olarak anafaz-telofaz anormalliklerinin yüzde oranı da artmıştır. Kontrol grubuna göre artış şeklinde gerçekleşen anormalliklerden 0,1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyon uygulaması istatistiksel açıdan anlamlı (p<0,05) bulunmuştur.

<50 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerine uygulanması sonucunda görülen anormallik en fazla % 27,4 oranında (10 mM'lık konsantrasyonun 4 saatlik uygulamasında) kalgın kromozom; daha sonra % 9,4 oranında yapışıklık (10 mM'lık konsantrasyon uygulaması), % 4,8 oranında anafaz köprüsü (1 mM'lık konsantrasyon uygulaması) ve % 0,6 oranında bozulmuş anafaz-telofaz (0,1 mM'lık konsantrasyon uygulaması) izlemektedir.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün iyonik formunun tüm konsantrasyonlarının 4 saatlik uygulamasında mitotik faz frekanslarına etkisi incelendiğinde kontrol grubuna göre faz frekanslarının istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ancak; düzenli bir artış veya azalış şeklinde değişiklikler gözlenmemiştir. Anafaz-telofaz anormalliklerinin yüzde oranı

artmıştır. Kontrol grubuna göre artış şeklinde gerçekleşen anormalliklerin tüm konsantrasyon uygulaması istatistiksel açıdan anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

$Fe_2O_3$ 'ün iyonik formunun *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerine uygulanması sonucunda görülen anormallik en fazla % 6,6 oranında (1 mM'lık konsantrasyonun 4 saatlik uygulamasında) kalgın kromozom; daha sonra % 5 oranında anafaz köprüsü (10 mM'lık konsantrasyon uygulaması), % 2,8 oranında yapışıklık (0,001 mM'lık konsantrasyon uygulaması) ve % 0,4 oranında bozulmuş anafaz- telofaz (0,1 mM'lık konsantrasyon uygulaması) izlemektedir.

$Fe_2O_3$ 'ün  $< 50$  nm boyutundaki NP formu ile iyonik formunun 4 saatlik uygulama sonuçları kıyaslandığında;  $< 50$  nm boyutundaki  $Fe_2O_3$  NP'ünün mitotik indeks ve anofaz-telofaz anormalliklerinin iyonik forma oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Tüm uygulama gruplarında kendi içerisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak yüzde anofaz-telofaz anormalliklerinin oranı artmıştır.  $Fe_2O_3$ 'ün  $< 50$  nm boyutundaki NP formunun iyonik formuna oranla daha sitotoksik olduğu söylenebilir.

Dünya çapında çeşitli hastalıklar ve kanser indüksiyon tehlikeleri üzerinde endişeler vardır. Bu nedenle kimyasalların toksisitesinin belirlenmesinde genotoksisite önemli bir parametredir. Komet yöntemi DNA hasar ve tamirini belirleyebilmek için kullanılan basit, çok yönlü, hızlı, görsel, hassas ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Collins 2004, Dhawan *et al.* 2009). DNA çapraz bağlantıları (örneğin, timidin dimerleri) ve oksidatif DNA hasarı gibi diğer bazı DNA hasar lezyonları spesifik DNA tamir enzimleri ve lezyon-spesifik antikorları kullanılarak Komet yöntemi ile belirlenebilir. NP'ler tarafından meydana gelen serbest radikaller DNA ve protein arasındaki çapraz bağlara, deoksiriboz ve fosfat iskeleti arasında hasara, ve pürin ve pirimidin bazları arasında spesifik modifikasyona, tek veya çift zincir kırıkları neden olabilir (Shigenaga and Ames 1991). Meydana gelen kırıklıklar Komet test kullanılarak belirlenebilir (Singh *et al.* 1988, Dhawan *et al.* 2009).

Çalışmamızda  $Fe_2O_3$  NP'ünün farklı boyutlarının  $< 100$  nm için 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının 24 ve 96 saat uygulama süresi  $< 50$  nm ve iyonik formu için

0,001 mM, 0,01mM, 0,1 mM, 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının 4'er saat uygulamaları çalışıldı. Pozitif kontrol olarak ise 10 ppm MMS kullanıldı.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün iki farklı boyutu ve iyonik formunun uygulama sonuçlarına göre konsantrasyon artışının DNA hasarını arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca <100 nm boyutundaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün uygulama süresinin artışına bağlı olarak da DNA hasar oranında arttığı gözlemlenmiştir. NP formunun iyonik formuna göre daha etkili olduğu hatta <50 nm boyutunun <100 nm boyutuna göre daha genotoksik olduğu düşünülmektedir.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü IMR-90 ve BEAS-2B hücrelerinde DNA kırıklıklarının indüklediği Komet yöntemiyle belirlenmiş ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün klastojenik olduğu ortaya konmuştur (Bhattacharya *et al.* 2009). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü A549 hücreleri üzerine uygulandığında DNA hasarını indüklediği ve düşük oranda toksisite gösterdiği bulunmuştur (Karlsson *et al.* 2009). BEAS-2B hücrelerine uygulanan nano ve mikro ölçekli Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> partikülü iyonik formuna göre daha genotoksik olduğu Komet yöntemi ile bulunmuştur (Bhattacharya *et al.* 2012). Öte yandan Suriye hamster embriyo hücrelerine uygulanan nano ve iyonik formdaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün önemli derecede DNA hasarı yaratmadığı Komet yöntemi ile gösterilmiştir (Guichard *et al.* 2012).

Akciğer epitel hücreleri tek başlarına karbon black ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü ile maruz bırakıldıklarında da protein oksidasyonuna neden olmazken birlikte uygulandıklarında protein oksidasyonunu iki kat arttırmıştır (Guo *et al.* 2009).

*Ceriodaphnia dubia* üzerine Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Arsenik (V), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Arsenik (V)'in etkisine bakılmıştır. NP'ler tek başlarına uygulandıklarında önemli derecede toksik etki göstermezken arsenik ile beraber uygulandıklarında toksik etkisi göstermişlerdir (Hu *et al.* 2012).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü ticari olarak önemli olsa da bunlarla ilişkili toksisite riskleri hala bilinmemektedir. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP'ünün toksik olduğu ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalar

ortaya konmuştur. Yine Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün PC12 hücrelerinin fonksiyonlarını olumsuz etkilediği rapor edilmiştir(Pisanic *et al.* 2007).

J774 hücreleri; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ünün yüksek konsantrasyonuna uzun süreli maruz bırakıldığında hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Hücrelerin daha yüksek konsantrasyonlara (300-500 ug / ml) maruz kalması sonucu ROT'nin oluşumuna, hücre hasarı ve hücre ölümü H2DCFDA deneyi ile gösterilmiştir. (Naqvi *et al.* 2010).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ü sıçanlarda 8,5 mg / kg uygulandığında akut inhalasyon toksisitesi göstermiştir. (Wang *et al.* 2010).

Nano ve sub micron boyuttaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sıçanlara 1, 7 ve 30 gün boyunca trakelelerinden verilmiş ve uygulama sonrasında sıçanların akciğer hasarını indüklediği ortaya konmuştur (Zhu *et al.* 2008).

Nanoteknolojideki başdöndürücü ve hızlı gelişmeler göz önüne alındığında, nanoteknolojinin insan sağlığı için bir nanotehlike olmasını önlemek amacıyla ülkemizde de nanogenotoksikoloji alanında bilimsel araştırmaların yapılması zorunlu hale gelmiştir. Nanopartiküllerin neden olduğu genetik hasarın karsinogeneze yol açabileceği düşünülürse, nanopartiküllerinin olası epigenetik etkilerini ve etki mekanizmalarını anlayabilmek için, hücre döngüsü ve DNA tamiri konularını da kapsayan detaylı *in vivo* ve *in vitro* sitotoksikite ve genotoksikite araştırmalarının yapılması insan sağlığı bakımından önem arz etmektedir. Araştırmalar sonucunda elde edilen veriler ile bu nanopartiküllerin güvenilirliği test edilecek, tedavide bu nanopartiküllerin kullanıldığı bireylerin karsinogenite açısından ne ölçüde risk taşıdığı değerlendirilebilecek ve NP'lerin kullanımına dair uygulamalara yön verilebilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K. ve Panda, B.B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 300–310.
- Akdoğan, A. ve Küçükyıldırım, B. O. (2006). Nanomalzemeler ve Uygulamaları. *MakinaTek*, **99**: 114-117.
- Aksakal S. (2014). Gümüş ve Kobalt Nanopartiküllerinin ve İyonik Formlarının Genotoksik Potansiyellerinin Komet Yöntemi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S. and Alhader, M. S. (2014). Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line *Biological Trace Element Research*, **159**: 416-24.
- Angelis, K. J., McGuffie, M., Menke, M. and Schubert, I. (2000). Adaptation to alkylating damage in DNA measured by comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **36**: 146-150.
- Antonsie-wiecz, D. (1990). Analysis of the cell cycle in root meristem of *Allium cepa* under the influence on Ledakrin, *Folia Histochem. Cytobiology*, **28**: 79-86.
- Ayar, A. (2008). *Drosophila melanogaster*'in Oregon R yabanıl ve vestigial mutant Soylarında Ekstrem Sıcaklık Şartlarının Ömür Uzunluğu Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Badr, A. ve İbrahim, A.G. (1987). Effect of herbicide Glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytologia*, **52**: 293-302.
- Badr, A., Ghareeb, A. and El-Din, H.M. (1992). Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *V. faba* roots. *Egyptian Journal of Applied Science*, **7**: 457-468.
- Bennet, M.D. (1977). Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shriveling in wheat-rye genotypes. *Heredity*, **39**: 411-419.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P.F., Hoffmann, E. and Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 17.
- Bhattacharya, K., Hoffmann, E., Schins, R.F., Boertz, J., Prantl, E.M., Alink, G.M., Byrne, H.J., Kuhlbusch, T.A., Rahman, Q., Wiggers, H., Schulz, C., Dopp, E. (2012). Comparison of micro- and nanoscale Fe<sup>+3</sup>-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicological Sciences*, **126**: 173–182.
- Brumfiel, G. (2006). Consumer products leap aboard the nano band-wagon. *Nature*, **16**: 440-262.
- Bozcuk, A. N. (2000). Genetik. Palme Yayıncılık, 3. Baskı, Ankara, Türkiye.
- Chauhan, L.K.S., Dikshith, T.S.S. and Sundararaman, V. (1986). Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects of deltamethrin on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Mutation Research*, **17**: 25-30.
- Ciğerci, İ.H., Liman, R., Özgül, E., Konuk, M. (2015). Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests. *Cytotechnology*, **67**: 157.

- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular. Biotechnology*, **26**: 249-61.
- Cornell R.M, Schwertmann U. (2003). The iron oxides – Structure, Properties, reactions, Occurrences and Uses. Wiley vch Publishing, 2. edition, Winheim, Germany.
- De-Faria, L. and Jaworska, H. (1972). The relation between the chromosome size gradient and the sequence of DNA replication in rye. *Hereditas*, **70**: 39-58.
- Demir, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B. (2008). Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the Drosophila wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 1034-1041.
- Demir, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A. and Marcos, R. (2011). Genotoxic analysis of silver nanoparticles in Drosophila. *Nanotoxicology*, **5**: 417–424.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, **25**: 5-32.
- Dikilitas, M., Kocyigit, A. ve Yigit, F. (2009). A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, **8**: 3118-3127.
- Doğan, G. ve Başal, G. (2009). Elektrolif Yöntemine Göre Çekilen Biyopolimer Nanoliflerin İlaç Salınım Sistemleri, Yara Örtüsü ve Doku İskelesi Olarak Kullanımı. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **3**: 58-70.
- Doğan, E. E. (2002). Bazı Astrozon Grubu Tekstil Boyalarının Genotoksik Etkisinin Drosophila melanogaster Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

- Elçi, Ş. (1982). Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Uğurel Matbaası, Elazığ, Türkiye.
- El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A. and El-Yousser, A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn<sup>2+</sup> in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research*, **537**: 29-41.
- El-Shabhaby, O.A., Abdel Migid, H.M., Soliman, M.I. and Mashaly, I.A. (2003). Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **6**: 23-28.
- Faraji A.H. and Wipf P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**: 2950-2962.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as standart in enviromental monitoring. *Hereditas*, **102**: 99-112.
- Flower, N.A.L., Brabu, B., Revathy, M., Gopalakrishnan, C., Raja, S.V.K., Murugan, S.S., Kumaravel, T.S. (2012). Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **742**: 61–65.
- Frei, H. and Wurgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, **203**: 297-308.
- Frei, H. and Wurgler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, **334**: 247-258.

- Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E. and Berta, G. (2006). Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. Cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, **58**: 253-260.
- 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**: 274-286.
- Garcia-Bellido, A. and Merriam, J.R. (1971). Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, **24**: 61- 87.
- Gichner, T. and Plewa, M.J. (1998). Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, **401**: 143-152.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, **51**: 168-173.
- Graf, U., Abraham S. Guzman-Rincon K., J. and Wurgler F.E. (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **402**: 203-209.
- Graf, U., Spano, M.A., Rincon, J.G., Abraham, S.K. and Andrade, H.H. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African Newsletter*, **1**: 9-13.
- Graf, U. and Würgler, F.E. (1996). The somatic white-ivory eye spot does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and

recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **27**: 219-226.

Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A. J., Frei, H., Juan, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, **6**: 153-188.

Griffitt, R. J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D. and Barber, D.S. (2007). Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, **41**: 8178-86.

Gui, Y. and Grant, A. (2008). Joint effects of density dependence and toxicant exposure on *Drosophila melanogaster* populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 236-243.

Guichard, Y., Schmit, J., Darne, C., Gaté, L., Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R., Witschger, O., Martin, A., Fierro, V., Binet, S. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Annals of Occupational Hygiene*, **56**: 631-644.

Guo, B., Zebda, R., Drake, S.J. and Sayes, C.M. (2009). Synergistic effect of co-exposure to carbon black and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress in cultured lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 4.

Hamamcı D. (1993). *Drosophila melanogaster* Oregon Yabanıl Tipi Vestigial Mutantı Arasında Ömür Uzunluğu; Antioksidatif Enzimlerin ve ACE Vitamin Kompleksinin Yaşlanma İle Olan İlişkileri. Yüksek lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

- Hidalgo, A., Gonzales, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios*, **57**: 7-17.
- Hoet, P., Hohlfeld, I. and Salata, O. (2004). Nanoparticles—known and Unknown Health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, **2**: 1–15.
- Hu, J., Wang, D., Forthaus, B. and Wang, J. (2012). Quantifying the effect of nanoparticles on as(v) ecotoxicity exemplified by nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (magnetic) and nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31**: 2870–2876.
- İnceer, H. ve Beyazoğlu, O. (2000). Bakır Klorür'ün *Vicia hirsuta* (L.) S.F. Gray Kök Ucu Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri. *Turkish Journal of Biology*, **24**: 553-559.
- Kabarity, A., El-Bayoumi, A.S. and Habib, A.A. (1974). Effect of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, **16**: 275-282.
- Kaltsikes, P.J. (1984). Breeding vegetable varieties resistant to diseases. Proc. 3rd Meeting on Protected Vegetables and Flowers, Heraklion, Crete, 9-11 May, 60.
- Kara, M., Sanda, M.A., ve Ateş, A. (1994). Cytogenetics effect of the insecticide cypermethrin on the root meristems of *Allium cepa*. *Turkish Journal of Biology*, **18**: 323-331.
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. and Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, **188**: 112–118.
- Karlsson H.L, Holgersson A, Moller L. (2008). Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources. *Chemical Research in Toxicology*, **21**: 726-31.

- Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, **9**: 527-549.
- Kaya, B. (2000). Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* Hatlarında Mutajenik ve Rekombinojenik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Kaya, N., Turna, F., Demir, E. and Kaya, B. (2012). Çinko Oksit ve Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin *Allium cepa* Kök Meristem Hücrelerindeki Genotoksik Etkilerinin KOMET Yöntemi ile Araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir, 03–07 Eylül, 1372.
- Kocaoğlu Cenkcı, S. (2010). İki Heterosiklik Amin'in Genotoksitesine Karşı Klorofil a ve Klorofil b'nin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B. and Kovalchuk, L. (1998). The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutation Research*, **415**: 47-57.
- Lead J.R, Smith E. (2009). Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology, John Wiley and Son, Ltd., Publication 1. edition, , Wiltshire, UK.
- Lehmann, M., Franco, A., de Souza Prudente Vilar, K., Luçza Reguly, M., and de Andrade H.H. (2003). Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutation. *Mutation Research*, **539**: 167-75.

- Leme, D.M. and Marin-Morales, M.A. (2009). Allium cepa Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application. *Mutation Research*, **682**: 71-81.
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitosis in Allium. *Hereditas*, **24**: 471-486.
- Lewis, E.B. and Bacher, F. (1968). Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to Drosophila males. *Drosophila Information Service*, **43**: 193.
- Liman, R., Cigerci, I.H., Akyl, D., Eren, Y. and Konuk, M. (2011). Determination of genotoxicity of fenaminosulf by Allium and Comet Tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **99**: 61–64.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, **19**: 596-602.
- Liu, D., Jiang, W. and Li, M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, **117**: 23-29.
- Liveri, V.T. (2006). Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems. Springer Science & Business Media, Incorporation, 1. Edition, New York, USA.
- Logothetidis, S. (2006). Nanosistem ve Nanometroloji. *Hippokratia*, **10**: 7- 21.
- Marco, A.D., Romanelli, M., Stazi, A. and Vitagliano, E. (1986). “Introduction of micronucleated cells in Vicia faba and Allium cepa root tips treated with nitrilotiacetic acid (NTA). *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **171**: 145-184.

- McGill, M., Pathak, S. and Hsu T.C. (1974). Effect of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. *Chromosoma*, **47**: 157-167.
- Metin, A., Uysal, G., Güven, A., Uylu, A. and Öztürk, M.H. (2004). Tuberculous brain abscess in a patient with hyper IgE syndrome. *Pediatrics International*, 46: 97-100.
- Miller, J.C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J.M. and Kundahl, G. (2004). The Handbook of Nanotechnology: Business, Policy, and Intellectual Property Law. John Wiley & Sons, Incorporation. 1. edition, New york, USA.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M.Z., Ahmed, F.J., Maitra, A.N., Prashant, C.K., Dinda, A.K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, **5**: 983–989.
- Osaba, L., .Rey, M.J., Aguirre, A., Alonso, A. and Graff, U. (2002). Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* role of nitrosation. *Mutation Research*, **518**: 95-106.
- Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123**: 291-298.
- Öbek E. (1993). Bazı Böcek Öldürücü Sentetik Pyrethroidler'in Soğan (*Allium cepa* L.) Da Hücre Bölünmesi ve Kromozomların Yapısına Etkileri. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Van.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, **113**: 823-839.

- Özata L. (2006). Bazı tekstil boyalarının Drosophila melanogaster üzerinde toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Malatya.
- Özen, E., Çiçek, B., Gür, B., Aydın, N., Akıncı, B., Topal, M., Keser, G. ve Çavuşoğlu, K. (2011). Paraquat'ın Allium cepa'da Bazı Sitotoksik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. *Journal of Science*, **23**: 117-124.
- Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S.F., Konuk, M. (2011). Evaluation of Germination, Root Growth and Cytological Effects of Wastewater of Sugar Factory (Afyonkarahisar) using Hordeum vulgare Bioassays. *Environmental Monitoring Assessment*, **183**: 517–524.
- Panda, B.B. and Sahu, U.K. (1985). Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of Allium cepa by the organophosphorus insecticide fensulfotion. *Cytobios*, **42**: 147-155.
- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B. (2003). Persistence and prevention of aluminium-and paraquat-induced adaptive response to methyl mercuric chloride in plant cells in vivo. *Mutation Research*, **538**: 56-61.
- Pisanic, T.R., Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Finones, R.R., Jin, S. (2007). Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, **28**: 2572–2581.
- Potter, C. J., Trenchalk, G. S. and Xu, T. (2000). Drosophila in cancer research. *Trend in genetics*, **16**: 33-39.
- Polat, S. ve Fenercioglu, H. (2014). Gıda Ambalajlamasında Nanoteknoloji Uygulamaları: İnorganik Nanopartiküllerin Kullanımı. *GIDA/ The journal of food*, **39**: 187-194.

- Prakash, N.S., Lakshmi, N. and Harini, I. (1988). Cytological effects of agricultural chemicals II. Effects of fungicides “bavistin” and “deltan” on chilli (*Capsicum annum* L.). *Cytologia*, **53**: 709-715.
- Rank, J. and Nielsen M.H. (1994). Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, **312**: 17-24.
- Rieger, R., Michaelis, A. and Takehisa, S. (1990). Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag, 1. Edition, Berlin, Germany.
- Rodríguez, Y.A., Christofolletti, C.A., Pedro, J., Bueno, O.C., Malaspina, O., Ferreira, R.A.C., Fontanetti, C.S., (2015). *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* Bioassays to Evaluate Effects of the Insecticide Imidacloprid. *Chemosphere*, **120**: 438–442.
- Sakurai, S., Namai, A., Hashimoto, K. and Ohkoshi, S. (2009). First Observation of Phase Transformation of All Four Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Phases ( $\gamma \rightarrow \epsilon \rightarrow \beta \rightarrow \alpha$ -Phase). *Journal of the American Chemical Society*, **131**: 1829-18303.
- Saxena, P.N., Chauhan, L.K.S. and Gupta, S. K. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, **216**: 244-252.
- Scolnic, D. and Halazonetis, T. (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, **406**: 430–435.
- Selby, P. B. and Olson, W.H. (1981). Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, **203**: 297-308.
- Sharma, C.B.S.R. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Current Science*, **52**: 1000-1002.

- Shigenaga, M.K., Ames, B.N. (1991). Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, **10**: 211-216.
- Singh, N. P., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G., Wright, C.J., Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, **30**: 3891–3914.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**: 184-191.
- Singh, S.P., Rahman, M.F., Murty U.S.N., Mahboob, M., Grover, P. (2013). Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **266**: 56–66.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. and Toman and M.J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutation Research*, **368**: 171-179.
- Soliman, M.I. (2001). Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the Allium cepa chromosome aberration assay. *Journal of Biological Sciences*, **1**: 1021-1027.
- Suh, W.H., Suslick, K.S., Stucky, G.D. and Suh, Y.H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in neurobiology*, **87**: 133-170.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejja, G. (1983). Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sexlinked recessive lethal tests. *Mutation Research*, **113**: 117-133.

- Topaktaş, M., Rencuzoğulları, E. (2010). Sitogenetik. Nobel Yayınları, 2. Baskı, Adıyaman, Türkiye.
- Turna, F. (2012) Resvratrol'ün *Drosophila Melanogaster*'de Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Van Schaik, N. and Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **260**: 99-104.
- Wang, B., Feng, W.Y., Wang, M., Shi, J.W., Zhang, F., Ouyang, H., Zhao, Y.L., Chai, Z.F., Huang, Y.Y., Xie, Y. N. (2007a). Transport of intranasally instilled Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles into the brain: Micro-distribution, chemical states, and histopathological observation. *Biological Trace Element Research*, **118**: 233–243.
- Wang, L., Wang, L., Ding, W., Zhang, F. (2010b). Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, **10**: 8617–8624.
- Wang, Z. Y., Song, J. and Zhang, D. S. (2009). Nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> complexes combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, **15**: 2995-3002.
- Wierzbicka, M. (1988). Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia*, **41**: 143-163.
- Wu, Q., Li, Y., Tang, M. and Wang, D. (2012). Evaluation of Environmental Safety Concentrations of DMSA Coated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs Using Different Assay Systems in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plos One*, **7**: 43729.

Würgler, F.E. and Vogel, E.W. (1986). Principles and Methods for their Detection. Plenum Press, 1. edition, New York, USA.

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak C. ve Kasab, R. (2003). Cytological effects of herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*. *Caryologia*, **56**: 97-105.

Zhu, M.T., Feng, W.Y., Wang, B., Wang, T.C., Gu, Y.Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y.L., Chai, Z.F. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, **247**: 102–111.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ  
Doğum Yeri ve Tarihi : Sandıklı/AFYONKARAHİSAR -03 Ekim 1986  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim : s-yukse@hotmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzmir Buca Gürçeşme Lisesi( Süper) 2000-2004  
Lisans : Biyoloji-Afyon Kocatepe Üniversitesi 2005-2009  
Y.Lisans : Biyoloji-Afyon Kocatepe Üniversitesi 2009-2011  
Doktora : Moleküler Biyoloji ve Genetik-Afyon Kocatepe Üniversitesi 2011-2016

### Yayınlar

Yüksek Ş. (2010). *Nigella sativa* ekstraktlarının oksidatif DNA hasarına etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

M. Konuk, İ.H. Ciğerci, Ş. Yüksek, D. Yağız, A Afyon, Yenebilen bazı mantarların oksidatif DNA hasarına etkileri, XX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Denizli.

Konuk, M. Ciğerci, İ.H. Yüksek, Ş. (2011). Protective effect of *Nigella sativum*'s aqueous extract on oxidative DNA damage, Medicinal and aromatic plants in generating new values in 21st century, 9-12, November, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Aslan Koşar P, Aşçı H, Ciğerci İH, Saygın M, Calapoğlu M, Yüksek Ş. Cankara N. (2014). Assessment with Comet Assay of induced DNA damage by Amikacin on nephrotoxicity. 5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi: Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları (5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative

Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels). Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 9-12 Eylül.

İ.H Ciğerci, Ş. Yüksek Kaygısız. Investigation of genotoxic potential of various sizes Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with comet assay (2015). ICAW. Antwerp, Belgium.

Ciğerci, I.H. Ali, M.M., Yüksek Kaygısız, S., Liman, R. (2016). Genotoxicity assessment of cobalt chloride in Eisenia hortensis earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, **144**: 754-757.

Aslan Koşar, P., Asçcı, H., Ciğerci, I.H., Saygın, M., Calapoğlu, M., Yüksek, Ş., Cankara, F.N. The Effect of Alpha-Lipoic Acid on Preventing Amikacin-Induced DNA Damage in Rat (2016). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, **5**: 1-7.

Farklı Boyutlardaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartiküllerinin Genotoksik Potansiyellerinin Drosophila melanogaster Somatik Hücreleri ve Allium Test Yöntemleri ile Araştırılması" Afyon Kocatepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Fen Bilimleri Enstitüsü.

Farklı Boyutlardaki Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartiküllerinin Genotoksik Potansiyellerinin *Drosophila melanogaster* Somatik Hücreleri ve Allium Test Yöntemleri ile Araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 13.FENBİL.22, Araştırmacı.

*Drosophila melanogaster* ve *Saccharomyces cerevisiae* 'de Farklı Ajanlar Tarafından Uyarılan Genotoksosite Üzerine Curcuminin Etkisi, TÜBİTAK-3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı, 115Z014, Bursiyer.

### **Diğer :**

İzmir Bölge Hıfzısıhha Enstitüsü, 2007 (mikrobiyoloji, nefelometre, parazitoloji laboratuvarları).

Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı, 2010.

Şuhut Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi, 2011-2013 (Ücretli Öğretmen).