

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜMÜŞ VE KOBALT NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK
FORMLARININ GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN KOMET YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Sezgin AKSAKAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜMÜŞ VE KOBALT NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK
FORMLARININ GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN KOMET YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Sezgin AKSAKAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez, 2013.02.0121.023 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜMÜŞ VE KOBALT NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK
FORMLARININ GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN KOMET YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Sezgin AKSAKAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 09/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ

ÖZET

GÜMÜŞ VE KOBALT NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK FORMLARININ GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN KOMET YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Sezgin AKSAKAL

**Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA
Temmuz 2014, 71 sayfa**

Son yıllarda hızla gelişen teknoloji ile birlikte yeni teknolojik ürün olarak nanopartiküllerin (NP, <100 nm) üretimi ve farklı alanlardaki kullanımları hemen her alanda giderek yaygınlaşmıştır. Nano kelime anlamı ile bir metrenin milyarda biri kadar olan bir ölçüdür ve 10 atomluk bir genişliği kapsamaktadır. NP'ler maksimum 100 nm veya 100 nm'den daha küçük çapta ve boyutlarına özgül özelliklere (örneğin elektron tutucu etki ve geçici mıknatıslık özelliği) sahip bileşikler olarak tanımlanmaktadır.

NP'lerin çok farklı alanlarda birçok avantajı nedeniyle yaygın olarak kullanılmalarına karşın insan sağlığına ve çevreye etkileri hakkındaki bilgiler hala çok yetersizdir. Bu nedenle son teknoloji ürünü olan bu maddelerin genotoksik potansiyellerinin tespiti biyo-güvenilirlik bakımından önemlidir. Günümüzde birçok hastalığın gerek farklı mutasyonlar gerekse indüklenmiş rekombinasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu açıdan toplum sağlığı bakımından yoğun maruz kalınan bu tür maddelerin etkilerinin tespiti önemlidir.

Bu sebeple bu çalışmada KOMET ya da SCGE olarak adlandırılan Tek Hücre Jel Elektroforez testi ile nanoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılan Gümüş (Ag) ve Kobalt (Co) NP'lerinin iki farklı partikül büyüklüğünün (Ag: 15 ve 40 nm; Co: 15 ve 50 nm) ve bu NP'lerin iyonik formlarının literatür verileri ışığında konsantrasyon taraması ve ön uygulamaları yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda üç farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Belirlenen bu konsantrasyonların insan periferik kan lenfositlerinde (0.01, 0.1 ve 1 mM) ve *Drosophila melanogaster*'in kan hücreleri olan hemositlerinde (0.1, 1 ve 10 mM) tek iplik DNA hasarına olan etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, KOMET testi ile oksidatif DNA hasarı; bu hasarın bulunmasına özgü bakteriyel enzimler, spesifik olarak okside olmuş pürin bazlarının miktarını gösteren Formamidopirimidin-DNA glikosilaz (FPG) ve yine spesifik olarak okside olmuş pirimidin bazlarının miktarını gösteren Endonükleaz III (Endo III) kullanılarak ayrıca analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, hem insan periferik kan lenfositlerinde hem de *D. melanogaster* hemositlerinde KOMET testi uygulamaları sonucunda Ag ve Co NP'lerinin her iki nanoboyutunun ve iyon formlarının genel olarak en yüksek konsantrasyon uygulamalarında genotoksik ve oksidatif DNA hasar yarattığı gözlemlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Nanopartiküller, Gümüş nanopartikülü, Kobalt nanopartikülü, KOMET testi, Genotoksisite, Oksidatif DNA hasarı, *Drosophila melanogaster*, İnsan periferel kan lenfositleri

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)
Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN
Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ

ABSTRACT

AN INVESTIGATION ON GENOTOXIC POTENTIAL OF SILVER AND COBALT NANOPARTICLES AND THEIR IONIC FORMS WITH COMET ASSAY

Sezgin AKSAKAL

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

July 2014, 71 pages

Due to developing technology in recent years manufacturing of nanoparticles (NP, <100 nm) as a new technological product and their usage in different fields has increased. Nano in literal meaning is one billionth of meter and has width of 10 atoms. NP's define as small particles which have maximum 100 nm or under 100 nm size and special features due to the order of their extent.

In spite of NP's widely usage in very different fields due to their many advantages knowledge about their effects on environment and human health is insufficient. Therefore, it is important to detect these high-tech materials genotoxic potential in terms of their bio-safety. At the present day, it is known that mutations and induced recombination are related to many diseases. Hence, detection of these materials effects is important in point of common health.

For this reason, in this study we determined three different concentrations of two different nano-sized Silver (Ag: 15 and 40 nm) and Cobalt (Co: 15 and 50 nm) NPs' and their ionic forms which commonly used in nanotechnology in consideration of literature data and preliminary application with COMET or also known as SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) assay. We investigated these determined concentrations effects on single strand damage in DNA on human peripheral blood lymphocytes (0.01, 0.1 and 1 mM) and *Drosophila melanogaster* hemocytes (0.1, 1 and 10 mM). Also with the COMET assay, oxidative DNA damage was also analysed by using bacterial enzymes, formamidopyrimidine DNA glycosilase (FPG) which specifically recognizes the number of oxidized purine bases and endonuclease III (endo III) which specifically recognizes the number of oxidized pyrimidine bases.

Consequently, after the COMET assay on both human peripheral blood lymphocytes and *D. melanogaster* hemocytes, it has been observed that both different nano-sized Ag and Co NPs' and their ionic forms the highest concentrations in general would create genotoxic and oxidative DNA damage.

KEYWORDS: Nanoparticles, Silver nanoparticle, Cobalt nanoparticle, COMET assay, Genotoxicity, Oxidative DNA damage, *Drosophila melanogaster*, Human peripheral blood lymphocytes

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA (Supervisor)
Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN
Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ

ÖNSÖZ

Boyutları 100 nm'den küçük olan partiküller nanopartiküller (NP) olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte NP'lerin (<100 nm) üretimindeki artış nanoteknolojinin ilerlemesine yol açmıştır. Nanoteknoloji ilaç-kozmetik, gıda, tekstil, kimya, malzeme, bilişim, otomobil ve metal endüstrileri gibi birçok sektörde her geçen yıl daha fazla uygulama sahası bulmakta ve artık insan hayatının vazgeçilmezi olmaktadır. Bugün bu maddelerin insan sağlığına genotoksik ve karsinojenik etkilerinin ne olduğuna dair ilgi giderek artmakta ve bu etkileri ortaya çıkarmak için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemlerinde çalışmalar yapılmaktadır. Fakat bu nanoboyuttaki partiküllerin organizmalara etkileri ve çevresel riskleri konularında literatürde yeterli ve detaylı bilgi mevcut değildir. Bu bağlamda, NP'ler toksik, genotoksik ve/veya karsinojenik etkiler üretebilir. Bu yüzden *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri ile bu etkilerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

NP'lerin kullanımının artması sonucu bu materyallerin çevreye salınımlarının artacağı düşünülmektedir. Bu materyallerin alıcı ortamlarda ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda çalışmalara son 10 yılda hız verilmesine rağmen hala cevaplandırılması gereken birçok soru ve literatürde eksik noktalar mevcuttur. Bu bağlamda bu proje kapsamında KOMET olarak adlandırılan tek hücre jel elektroforez testi (SCGE) ile Ag ve Co NP'lerinin ve iyonik formlarının *Drosophila melanogaster*'in kan hücreleri olan hemositlerinde (0.1, 1 ve 10 mM) ve insan periferik kan lenfositlerinde (0.01, 0.1 ve 1 mM) genotoksik etkileri çalışılmıştır. Ayrıca bu NP'lerin iyon formlarının da genotoksik potansiyelleri elde edilen sonuçların daha iyi tartışılabilmesi için kullanılan NP boyutları ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *D. melanogaster*'de bu çalışmada kullanılan farklı nanoboyutlara sahip Ag ve Co NP'leri ve iyonik formlarının KOMET yöntemi ile yapılan incelemede *D. melanogaster* hemositlerinde ve insan periferik kan lenfositlerinde bu NP ve iyon formlarının genel olarak en yüksek konsantrasyonlarında hücrelerde genotoksik ve oksidatif DNA hasarına neden oldukları gözlemlenmiştir. Genetik hasar KOMET yöntemi ile değerlendirildikten sonra meydana gelen oksidatif hasar, bakteriyel enzimler olan FPG ve Endo III enzimleri kullanılarak oluşan oksidatif hasarın ağırlıklı olarak okside olmuş pürin bazlarında mı yoksa okside olmuş pirimidin bazlarında mı olduğu tespit edilmiştir. Endo III spesifik olarak okside olmuş pirimidin bazlarının sayısını gösterirken, FPG spesifik olarak okside olmuş pürin bazlarının sayısını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre Ag ve Co NP'leri ve iyonik formlarına maruz kalmış *D. melanogaster* hemositlerine yapılan enzim uygulamaları sonucunda Ag NP'leri ve iyonik formuna maruz kalmış hemositlerde meydana gelen oksidatif DNA hasarının Endo III uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pirimidin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilirken, Co NP'lerine ve iyonik formuna maruz kalmış hemositlerde meydana gelen oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İnsan periferik kan lenfositlerine yapılan enzim uygulamaları sonucunda Ag ve Co NP'leri ve iyonik formlarına maruz kalmış lenfositlerde meydana gelen oksidatif DNA hasarının ise FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında

daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tür çalışmaların toplum sağlığını doğrudan ilgilendirmesi nedeniyle bu NP'lerin neden olduğu genotoksitedeki moleküler mekanizmaların açıklanabilmesi için farklı test sistemleri (*in vivo* ve *in vitro*) ve farklı model organizmalar kullanılarak daha fazla bilimsel çalışmanın yapılması da gerekmektedir.

Ayrıca nanobüyükte olan bu materyallerin farklı partikül boyutlarında olmaları yapılan bilimsel çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesine de neden olabilmektedir. Çünkü çok küçük boyutta olan bu NP'ler büyüklükleri nedeniyle hücreye kolayca girerek DNA gibi makromoleküller ile doğrudan etkileşime girebilmektedirler. Canlı sistemlerde yapılan çalışmalarda kimyasalın normal boyuttaki formu ile NP formu karşılaştırıldığında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu bağlamda bu projede genotoksik etkileri çalışılmış olan NP'ün farklı partikül büyüklükleri ile de çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulguların son yıllarda bütün Dünya'da yaygın olarak kullanılan ve giderek kullanımı farklı alanlara yayılan NP'lerin genotoksik etkileri hakkında literatür verilerine de katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmanın gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutmasını dilerim.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesi sırasında her konuda en içten ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm ve bu tezin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren Akademik Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Bülent KAYA'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), tez çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Fatma TURNA'ya, genetik laboratuvarlarını kullanma imkânını sunan Biyoloji Bölümü'ne, çalışmam sırasında emeği geçen Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma, NP'lerin sentezlenmesinde ve karakteristik özelliklerinin (NP'lerin büyüklük dağılımı (size distribution), zeta potansiyellerinin ölçümü ve yoğunluklarının ölçümü) belirlenmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) ve çalışma ekibine, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 2013.02.0121.023) ve ayrıca tez çalışmamın başından beri maddi ve manevi varlıklarıyla en zor anlarımda her zaman yanımda bulunan ve bulunacak olan sevgili aileme ve sevdiklerime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.2. Nanopartiküller.....	2
1.3. Nanotoksikoloji.....	3
1.4. Nanopartiküllerin Toksikolojisi.....	4
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	6
2.1. Gümüş ve Kobalt Nanopartikülleri.....	6
2.2. KOMET [Tek Hücre Jel Elektroforez (SCGE)] Yöntemi.....	10
2.3. Model Organizma Olarak <i>Drosophila melanogaster</i>	12
3. MATERYAL VE METOT.....	14
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> Yaşam Döngüsü.....	14
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	15
3.3. KOMET Testinde Kullanılan Kimyasal Solüsyonların Hazırlanması.....	20
3.3.1. Lysis ve Lysing solüsyonlarının hazırlanması.....	20
3.3.2. Elektroforez solüsyonunun hazırlanması.....	20
3.3.3. Nötralizasyon solüsyonunun hazırlanması.....	20
3.3.4. Enzim solüsyonunun hazırlanması.....	21
3.3.5. Low melting agaroz (LMA) ve Normal melting agaroz'un (NMA) hazırlanması.....	21
3.3.6. Etidyum bromür'ün (EtBr) hazırlanması.....	21
3.3.7. Fpg ve Endo III enzimlerinin hazırlanması.....	21
3.4. Hücre Canlılık (Cell Viability) Testi.....	21
3.5. KOMET (Tek Hücre Alkali Jel Elektroforez.....	22
3.5.1. İnsan periferel kan lenfositlerinde KOMET testi.....	22
3.5.2. <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerinde KOMET testi.....	24
3.5.3. KOMET testinde enzim uygulaması.....	27
4. BULGULAR.....	30
4.1. Hücre Canlılık Testi.....	30
4.2. KOMET Testinde <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerine ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Gümüş nitrat (AgNO ₃)'ın Uygulanması.....	33
4.3. KOMET Testinde <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerine ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün 15 nm ve 40 nm Nanoboyutlarının Uygulanması.....	35
4.4. KOMET Testinde <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerine ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt klorür (CoCl ₂ .6H ₂ O)'ün Uygulanması.....	38
4.5. KOMET Testinde <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerine ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün 15 nm ve 40 nm Nanoboyutlarının Uygulanması.....	40

4.6. <i>Drosophila melanogaster</i> hemositlerinde ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Bakteriyal Enzim Uygulaması.....	43
4.7. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP - 15 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	47
4.8. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP - 40 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	48
4.9. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP - 15 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	49
4.10. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP - 50 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	56
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER.....	71
Ek-1: Tez Çalışması Kapsamında Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildirilerin Özetleri.....	71
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
%	Yüzde
nm	Nanometre
dk	Dakika
µg	Mikrogram
°C	Santigrat
M	Molarite
V	Volt
mA	Miliamper
g	Yerçekimsel Kuvvet Birimi
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
mV	Zeta Potansiyeli

Kısaltmalar

NP	Nanopartikül
PbS	Kurşun Sülfid
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
SEM	Tarama Elektron Mikroskobu
UV-vis	Optik Spektroskopi
DLS	Dinamik Işık Saçma
Al ₂ O ₃	Alüminyum Oksit
MN	Mikronukleus
Ag	Gümüş
Co	Kobalt
UV	Ultraviyole
KOMET	Tek Hücre Jel Elektroforez Testi
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
KA	Kromozom Aberasyon
ATP	Adenozin Tri Fosfat
MI	Mitotik Index
MLA	Fare Lenfoma Testi
Cr	Krom
Cd	Kadmiyum
Ni	Nikel
As	Arsenik
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
SCE	Kardeş Kromatit Değişikliği Testi
EMS	Etil Metan Sülfonat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit

PBS	Fosfat Tampon Solüsyon
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
Endo III	Endonükleaz III
FPG	Formamidopirimidin-DNA glikosilaz
CoCl ₂ .6H ₂ O	Kobalt Klorür
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
FDA	Fluorescein diasetat
EtBr	Etidium bromid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nanomateryal içeren tüketici ürünleri	4
Şekil 2.1. Ag nanopartikülü ile indüklenen genotoksisite ve sitotoksisitenin olası mekanizması.....	8
Şekil 2.2. Co nanopartikülü ile indüklenen genotoksisitenin olası mekanizması	10
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	15
Şekil 3.2. Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz ile zeta potansiyel ölçümü	17
Şekil 3.3. Sonikatör uygulaması	17
Şekil 3.4. <i>Drosophila melanogaster</i> hemositleri üzerinde KOMET uygulaması	26
Şekil 3.5. KOMET Testinde Görüntü Analizi ile Veri Toplanması	27
Şekil 4.1. <i>Drosophila</i> Hemositlerinde KOMET Testi ile Gümüş Nanopartikülünün (15 ve 40 nm) ve İyonik Formunun (AgNO ₃) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%)	30
Şekil 4.2. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Gümüş Nanopartikülünün (15 ve 40 nm) ve İyonik Formunun (AgNO ₃) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%).....	31
Şekil 4.3. <i>Drosophila</i> Hemositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartikülünün (15 ve 50 nm) ve İyonik Formunun (CoCl ₂ .6H ₂ O) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%).....	31
Şekil 4.4. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartikülünün (15 ve 50 nm) ve İyonik Formunun (CoCl ₂ .6H ₂ O) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%).....	32
Şekil 4.5. Gümüş nanopartikülünün (Ag NP – 15 nm) karakterizasyonu, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri	47
Şekil 4.6. Gümüş nanopartikülünün (Ag NP – 40 nm) karakterizasyonu, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri	49
Şekil 4.7. Kobalt nanopartikülünün (Co NP - 15 nm) karakterizasyonu, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri.....	51
Şekil 4.8. Kobalt nanopartikülünün (Co NP - 50 nm) karakterizasyonu, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. KOMET Testi ile Uygulaması Yapılan Ag ve Co NP'lerinin ve Bu Nanopartiküllerin İyonik Formlarının Özellikleri.....	16
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Diğer Kimyasal Malzemeler	18
Çizelge 3.3. Lysis Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	20
Çizelge 3.4. Elektroforez Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler	20
Çizelge 3.5. Nötralizasyon Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler	20
Çizelge 3.6. Enzim Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	21
Çizelge 4.1. KOMET Testinde <i>D. melanogaster</i> Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün İyonik Formu Olan Gümüş nitrat (AgNO ₃)'ın Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı.....	34
Çizelge 4.2. KOMET Testinde <i>D. melanogaster</i> Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün 15 ve 40 nm Nanoboyutlarının Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı.....	36
Çizelge 4.3. KOMET Testinde <i>D. melanogaster</i> Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün İyonik Formu Olan Kobalt klorür (CoCl ₂ .6H ₂ O)'ün Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı.....	39
Çizelge 4.4. KOMET Testinde <i>D. melanogaster</i> Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün 15 ve 50 nm Nanoboyutlarının Uygulanmasından Meydana Gelen DNA Hasarı	41
Çizelge 4.5. <i>D. melanogaster</i> Hemositlerinde KOMET Testi ile Ag Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (10 mM) Bakteriyal Enzim Uygulaması.....	43
Çizelge 4.6. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Ag Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (1 mM) Bakteriyal Enzim Uygulaması.....	44
Çizelge 4.7. <i>D. melanogaster</i> Hemositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (10 mM) Bakteriyal Enzim Uygulaması.....	45

Çizelge 4.8. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (1 mM) Bakteriyel Enzim Uygulaması	46
--	----

1. GİRİŞ

Organizma yaşadığı çevrede yaşamını olumsuz etkileyen birçok farklı zararlı fiziksel ve kimyasal bileşiğe maruz kalmaktadır. Maruz kalınan zararlı bu bileşikler, hücre zarı, hücresel organeller ve en önemlisi de genetik materyal üzerinde istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Genetik materyalde (DNA) istenmeyen etkiler çeşitli mutasyonlarla sonuçlanmakta hatta hasarın durumuna göre kanserin başlaması da tetiklenebilmektedir. Fakat bu maddelere maruziyetler organizmada çeşitli enzimler yardımıyla detoksifiye edilerek zararlı etkileri indirgenebilmektedir. Ancak savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda maruz kalınan madde hücrede farklı kalıcı hasarlara da neden olabilmektedir. İnsan popülasyonları beslenme, medikal çalışmalar ve yaşam stili alışkanlıkları ile ilişkili birçok faktörün yanı sıra çevresel veya mesleki sebeplerden dolayı çok sayıda zararlı fiziksel ve kimyasal bileşiklere maruz kalmaktadır. Bu nedenle farklı fiziksel ve kimyasal bileşiğe maruz kalma sonucunda hücredeki olası hasarların bilinmesi gerekmektedir. Belirli bir ajanın oluşturabileceği risk test edildiğinde bu ajanın etki gösterebileceği çok önemli hedeflerden birisinin de DNA olduğu dikkate alınmalıdır. Bu bağlamda bu şekildeki maruz kalmaların neden olabileceği genetik hasarın ortaya çıkarılmasında birçok *in vivo* ve *in vitro* test sistemlerinde farklı model organizmalar kullanılmaktadır. Bu tür testler arasında KOMET olarak da bilinen tek hücre alkali jel elektroforezi testi (SCGE) her türlü ökaryotik hücrede uygulanabilmesi ve DNA düzeyinde hasarların belirlenmesi bakımından son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1. Nanoteknoloji

Nano, Yunanca'dan alınmış bir sözcük olup son derece küçük, ufacık veya minnacık anlamına gelmektedir. Ölçü birimi olarak 1 nanometre (nm) metrenin milyarda biridir. Bu çok küçük bir uzunluk olup atomlar ve moleküller dünyasına uzanmaktadır. Nanoteknoloji, nm boyutta maddenin özelliklerini ve dinamiklerini inceleyen bilim ve/veya teknolojidir.

Genel anlamıyla nanoteknoloji ise nano ölçekte bir materyalin gerçek dünyada uygulamaya sahip herhangi bir teknoloji ile uygulanmasıdır. Yani nanoteknoloji, teknolojinin birkaç nm'den sub-mikrona kadar ölçeklerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlere uygulanması ve üretimi ile ilgilidir (Yeşil 2011).

Terim ilk olarak Nario Taniguchi tarafından 1974 yılında kullanılmıştır. Ancak fikrin ortaya çıkışı 1959 yılına dayanır. California Enstitüsünde Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman tarafından verilen bir konferansta moleküler boyutta üretilen malzeme ve cihazlarla yapılabilme potansiyeline sahip uygulamaların bilimsel açıdan büyük işlere olanak sağlayacağından bahsedilmiştir. Ardından Taniguchi tarafından ortaya atılan Nanoteknoloji, mevcut teknolojilerin modifiye edilmesiyle daha ileri düzeyde duyarlılığa sahip bir teknoloji kolu olarak tanımlanmıştır (Yeşil 2011).

Günümüzde nanoteknoloji, 1980'li yıllarda Taramalı Tünelleme Mikroskobu ve Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun geliştirilmesiyle ve bunlara eş zamanlı olarak geliştirilen bilgisayar teknolojileri ile kullanım alanının yaygınlaşmasıyla her türlü endüstriyel alanda karşımıza çıkan bir bilim dalı haline gelmiştir.

1.2. Nanopartiküller

Boyutları 100 nm ve 100 nm'nin altında kalan parçacıklar nanopartiküller (NP) olarak tanımlanmaktadır. Bu partiküller nanoboyutlu malzemelerin, dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadırlar (Miller vd 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).

Nanoteknoloji, nanoboyutlardaki materyallerin boyut spesifik özelliklerinden yararlanma prensibine dayanır. Bazı durumlarda bu özellikler NP'lere özgü kuantum etkilerine dayanır. Aynı zamanda bu özellikler boyut spesifik olarak biyolojik aktiviteyle de ilişkilidir. Benzersizlik kavramı genellikle "nano" nun kimyasal ve fiziksel olarak farklılığı ile ilgili tartışmalarda çoğunlukla kullanılır. Ancak son 20 yılda yapılan çalışmalar göstermektedir ki, NP'ler, büyük formlarıyla aynı fiziksel ve kimyasal yapıda olsalar bile benzersiz biyolojik davranışlar gösterebilmektedirler. Bunlardan en önemlisi bu NP'lerin diğer benzer yapıdaki durumlarına göre geçilmesi imkânsız olduğu düşünülen biyolojik bariyerleri geçebilmeleridir (Lockman vd 2002).

NP'lerin boyut spesifik biyolojik aktiviteleriyle ilgili bu betimlemeler ve tahminler Nanotoksikoloji'yi, Toksikoloji'nin diğer dallarından özellikle ayırmıştır. Bu benzersiz özelliklerin organizmalar ve ekolojik sistemler üzerindeki etkilerinin tespit edilebilmesi için yeni yöntemler ve yeni aletler gerektirmiştir.

NP'ün tüm özellikleri öncelikle boyutlarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle aynı NP'ün farklı nanoboyutları farklı biyolojik etkiler yaratacaktır. Sonra ise kimyasal bileşenleri ve fiziksel çevresi farklı etkilere sebep olmaktadır. Hem kimyasal hem fiziksel özellikler dinamik ve partikülün geçmişi ve lokal çevresi ile ilgili anahtar bilgiler verebilmektedir. Bu bilgiler hem NP ilk elde edildiğinde hem de uygulamalar yapıldığında önemlidir.

NP'ler sergiledikleri bu benzersiz özellikleri nedeniyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bu açıdan nano-malzemelerin tasarlanması, üretimini ve işlevsel olarak kullanımını kapsayan nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için vazgeçilmez olan ilk adım NP'lerin üretimidir (Gürmen ve Ebin 2008).

Ancak NP'ler tam anlamıyla yeni ortaya çıkan materyaller değildir. Doğal olarak pek çok kaynağı vardır ve bu partiküllere doğal olarak maruz kaldığımız sürece ciddi sağlık sorunlarına yol açmamaktadırlar. Yer kabuğu doğal bir matrix ortamı olarak alındığında su, çözünmüş maddeler ve biyolojik aktivite nanomateryallerin sentezi için doğal bir laboratuvar ortamı oluşturmaktadır. Ayrıca bazı NP'ler, kum fırtınaları ve volkanik patlamalar gibi ekolojik doğal süreçlerin sonucunda da ortaya çıkmaktadır.

İnsan yapımı nano-materyallerin kullanımı ise antik çağlara kadar dayanmaktadır. Kurşun-bazlı kimyasal uygulamaların Antik Mısır'da ortalama 4000 yıl önce başladığı ve bazı minerallerin çeşitli yağlar içerisinde çözünmesine dayalı olarak ortalama 5 nm boyutlarında Kurşun Sülfid (PbS) NP'lerinin elde edildiği kanıtlanmıştır (Sciau 2012).

1.3. Nanotoksikoloji

Donaldson ve arkadaşları 2004 yılında Toksikoloji dünyasını yeni bir fikir ile tanıştırdılar. Bu fikir küçük boyutlarda bulunan partiküllerin büyük boyutlu olanlara oranla farklı hareket ettikleri ve bu sebeple bu boyutlarda bulunan partiküllerin araştırılması için yeni bir alt kategoriye ihtiyaç olduğunu belirtmektedir. Bu sebeple Toksikoloji bilimi yeni bir alt kategori edinmiş ve bu yeni kategori "Nanotoksikoloji" olarak adlandırılmıştır (Maynard 2007).

Karşılaşılan zorlukları ve ilerlemeyi anlayabilmek için bir adım geri çekilip bakmak gereklidir. Mikroskobik boyutlardaki dumanın ya da parçaların solunması antik çağlardan bu yana tanımlanmış bir tehlikedir. Ancak 1980'lerin sonlarına varana kadar araştırmacılar tarafından nm niteliğindeki partiküllerin etkilerini sistematik biçimde çalışılmamıştır. 1980'lerin sonunda araştırmacılar karbonun yeni bir formunu keşfetmişlerdir, (karbon nanotüpleri). Bu gelişmenin ardından nano-materyallerin solunması hakkında sağlık ile ilgili endişelerin ortaya çıkarması uzun sürmemiştir.

1990'lar ayrıca partiküllerin solunumu ile solunum ve kardiyovasküler hastalıkların arasında beklenmeyen ilişkilerin açıklanmaya başladığı bir dönem olmuştur. Ancak sadece küçük bir grup toksikolog, sistematik olarak nm boyutlarındaki partiküllerin büyüklük, yapı ve akciğer cevabı ile ilişkili araştırmalar yapmaya başlamış ve bu boyut skalasındaki partiküllerin vücut içerisindeki davranışlarını anlamaya çalışmıştır.

U.K. Royal Society ve Royal Academy of Engineering nanoteknolojinin yararları ve konu hakkındaki emin olmadığımız kısımlar ile ilgili 2004 yılında bir rapor yayınlamıştır. Raporda belirtilen ortak endişe "üretimi yapılan NP'ler ve nanotüplerin sebep olduğu riskler açısından kanıtların eksikliği" olmuştur. 2004'ten bu yana boyut-spesifik NP'lerin etkileri aydınlatılmaya başlanmıştır (Maynard 2007).

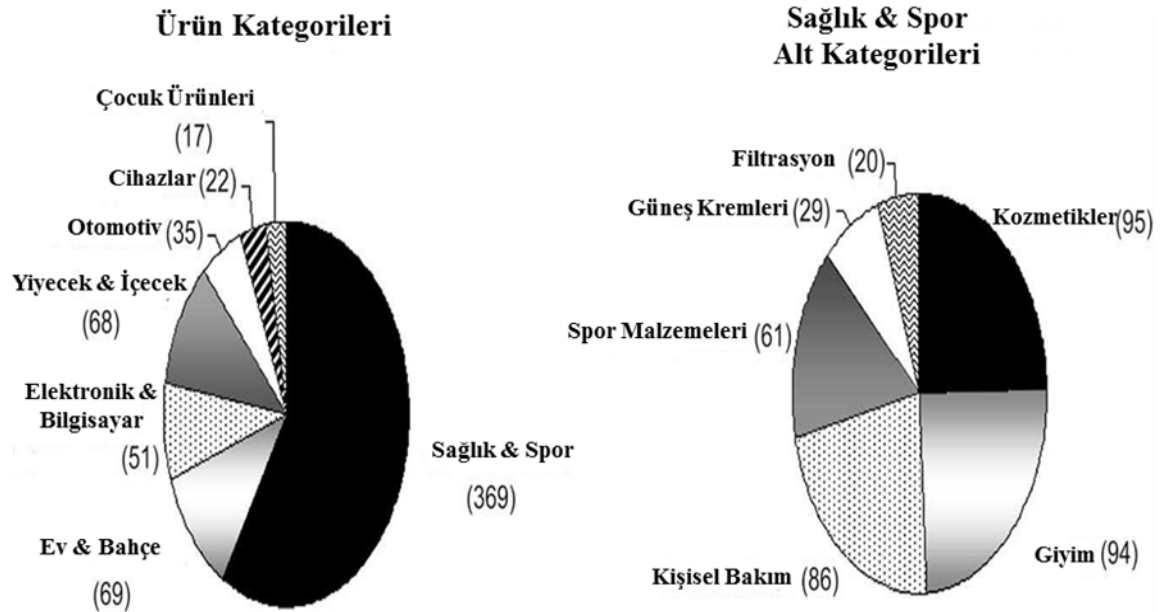
Nano-materyallerin boyut spesifik özelliklerine bağlı olarak etkilerinin araştırılması nano-toksikolojinin en önemli temellerinden biridir. Yaygın olarak kullandığımız bu materyallerin son yıllarda yapılan araştırmalara göre kan-beyin bariyeri ve plasental bariyer gibi daha büyük boyutlarda olan benzerlerinin aşmadığı biyolojik bariyerleri aşabildiği gösterilmiştir (Kulvietis vd 2011, Lockman vd 2002).

NP'lerin boyut spesifik biyolojik aktiviteleriyle ilgili bu betimlemeler ve tahminler nanotoksikoloji dalını, Toksikoloji'nin diğer dallarından özellikle ayırmıştır. Bu benzersiz özelliklerin organizmalar ve ekolojik sistemler üzerindeki etkilerinin tespit edilebilmesi için yeni yöntemler ve yeni aletler gerektirmiştir.

NP'ün tüm özellikleri öncelikle boyutlarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle aynı NP'ün farklı nanoboyutları 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. Bu açıdan NP'ün karakterizasyon işlemleri önemlidir.

1.4. Nanopartiküllerin Toksikolojisi

Son yıllarda NP'lerin endüstriyel teknolojideki kullanımı artmasına rağmen bu partiküllerin insan sağlığındaki olası zararlı etkileri tartışılmaktadır (Colvin 2003, Gogotsi 2003, Nel vd 2006). NP'lerin üretimi ve tüketici kullanımı sonrasında çevre, ekosistem ve sular bu materyaller ile kontamine olmaktadır (Barker vd 2006). Buna bağlı olarak insanlar gıda ürünlerinin tüketimi ile bu materyallere maruz kalmaktadırlar (Louis Theodore 2005). Nano-teknolojinin son zamanlarda girdiği alanlar (kozmetik ve farmasötiklerde olmak üzere klinik uygulamalarda, gıda katkıları, boyar maddeler, kâğıt, plastikler ve boyalar) dikkate alındığında günlük hayatımızın içinde ne oranda yaygın oldukları daha iyi anlaşılacaktır. Amerikan Ulusal Bilim Vakfı'nın araştırma ve tahminine göre 2010-2015 yılları arasında 1 trilyon 100 milyon dolarlık nano-teknoloji pazarı aşağıdaki Şekil 1.1'de gösterildiği gibi olacaktır (www.nanotechproject.org).



Şekil 1.1. Nanomateryal İçeren Tüketici Ürünleri (www.nanotechproject.org)

Birleşik Devletler Ulusal Bilim Kurumu 2015 yılında farmasötik endüstri ürünlerinin yarısının nano-teknolojik olarak tasarlanmış özellikleri içereceğini tahmin etmektedir. Bu yüzden önümüzdeki yıllarda insanların bu ürünlere maruz kalmaları da artacaktır.

Şu an kullanımda olan en az 12 nano-ilaç şimdiden onaylanmıştır (<http://www.pharmameddevice.com/App/homepage.cfm?appname=100485&linkid=23294&moduleid=3162#Nanotechnology>). Ancak bir değerlendirme sistemi sonucunda kullanılan bu nanopartiküllerin doz yanıtları, akut ve kronik maruz kalmalar, fizikokimyasal karakterizasyonları (Warheit 2008) ve hem çeşitli üretim formları hem de yeni teknolojiler içerisine katılmaları bu materyallerin risk ve yarar analizlerinin yapılmasındaki fizyolojik reaktivitelerinin (örneğin moleküler, hücresel, dokusal ve organ toksisitesi) çeşitli seviyeleri için geleneksel farmakoloji ve toksikoloji yaklaşımları iyi bir şekilde düşünülmesi gerekmektedir (Nel vd 2006). NP'lerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra biyolojik olarak bu partiküllere maruz kalma yolları nano-biyouyumluluk testleri ile dikkatlice değerlendirilmelidir. Her bir partikülün büyüklüğü ve formunun farmakolojik ve toksikolojik özellikleri vardır. Bu nedenle maruz kalınma neticesindeki zararlı sonuçlara karşı özgün değerlendirme protokolleri ve kriterlerinin olması gereklidir. Bu bağlamda şu anda bu NP'lere karşı bir güven olmadığı varsayımı yapılmaktadır.

NP ile ilgili çalışmalar başlangıçta optik ve elektronik cihazlar üzerinde yoğunlaşmışken şu an biyo-ölçümler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Partikül boyutlandırma işlemi yaygın olarak transmisyon elektron mikroskobu (TEM), tarama elektron mikroskobu (SEM), optik spektroskopisi (UV-vis), dinamik ışık saçma (DLS) ve floresan polarizasyonu ile yapılmaktadır (Jones ve Grainger 2009, Jacobsen vd 2010). Bu çalışmada da genotoksik etkileri incelenecek NP'lerin karakteristik özellikleri incelenmiştir.

Her organizma için ortak yapı olan genetik materyalin korunması gelecek nesillerin sağlıklı olması bakımından önemlidir. Bu nedenle NP'ler gibi etkisi tam olarak bilinmeyen moleküllerin genetik materyal üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu farklı test yöntemleri ile araştırılması büyük öneme sahiptir. Bu tür etkilerin farklı genotoksikite yöntemleri ile araştırılması her bir testin farklı genetik etkileri değerlendirme potansiyeline sahip olması bakımından önemlidir. Nano-büyükte olan bu materyallerin farklı partikül boyutlarında olmaları yapılan bilimsel çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Çünkü çok küçük boyutta olan bu NP'ler büyüklükleri nedeniyle hücreye kolayca girerek DNA gibi makromoleküller ile doğrudan etkileşime girebilmektedirler. NP'lerin boyutları ve olası olumsuz sonuçları arasında ilişki olduğu bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Clurg vd 1998, Colvin 2003, Oberdörster 2004). Örneğin yapılan bir çalışmada normal boyuttaki alüminyum oksit (Al_2O_3)'in tek başına sıçanların periferik kan hücrelerinde *in vivo* koşullarda KOMET ve mikronükleus (MN) testlerinde herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı halde alüminyum oksit NP'lerin iki farklı partikül boyutunun (Al_2O_3 -30 nm ve Al_2O_3 -40 nm) ise DNA'daki tek iplik kırıklıklarını ve MN oluşum frekansını indükleyebildikleri gösterilmiştir (Balasubramanyam vd 2009). Sharma ve arkadaşları (2009)'nın yaptığı çalışmada, kozmetikler ve diğer dermatolojik preparasyonların hazırlanmasında yaygın bir şekilde kullanılan Çinko oksit NP'ün insan epidermal hücrelerinde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese öncülük edebileceği ve bunun sonucunda genotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

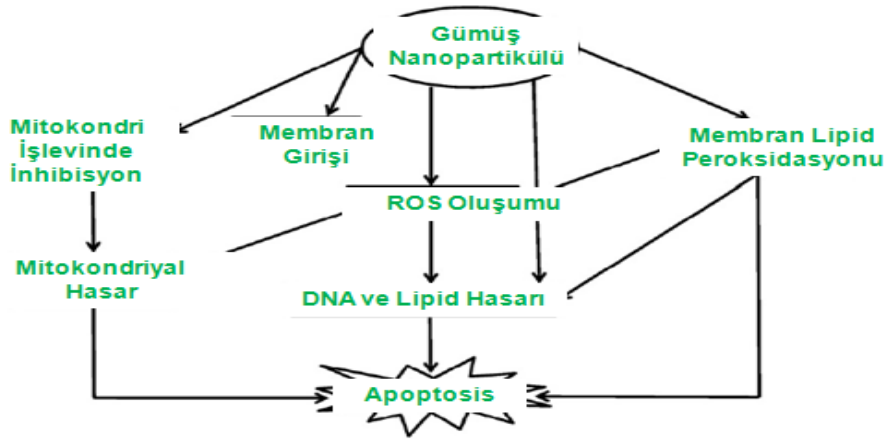
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Gümüş ve Kobalt Nanopartikülleri

Gelişen teknoloji ile birlikte NP'lerin (<100 nm) üretimindeki artış nanoteknolojinin ilerlemesine yol açmıştır. Gümüş (Ag) NP'leri yaygın olarak endüstriyel alanlarda kullanılan nano-ürünlerden bir tanesidir. Antimikrobiyal ve antiviral özellikleri nedeniyle (Chen ve Schluesener 2008, Klaine vd 2008) medikal alanda kateterler, bandajlar ve solüsyonlarda, ayrıca kıyafetler, elektrikli ev aletleri gibi farklı materyallerde kullanılmasının yanı sıra deodorantlar, kozmetik ürünleri ve temizleme solüsyonları gibi günlük tüketim malzemelerinde de geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (Chen ve Schluesener 2008). Böylece Ag bazlı NP'ler 800 tüketim ürününde bulunan en yaygın nano-materyal olmuştur (Woodrow Wilson International Center 2007). Kullanımdaki bu artışa rağmen Ag NP'lerinin genotoksitesisi ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır. Son zamanlarda küçük Ag parçacıklarının serbest radikal oluşturduğu elektron spin rezonans kullanarak tespit edilmiştir (Danilczuk vd 2006). Ayrıca Ag'ün antimikrobiyal mekanizmasının serbest radikal oluşumu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kim vd 2007). Koruyucular, kozmetiklerin formülasyon ve üretim aşamasında mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için kullanılan bileşiklerdir. Fenoksietanol, paraben gibi bileşenler farklı birleşimleri ile koruyucu olarak kullanılmışlardır. Ancak bu antibakteriyel bileşikler geçici olarak deriyi uyardıklarının yanı sıra UV ışınlarına karşı cilt hassasiyetini arttırmışlardır. (Metilparaben'in UV ile karşılaşınca toksik olması gibi) (Handa vd 2006; Ishiwatari vd 2007). Diğer bir yanda ise küçük miktarlardaki Ag benzeri metaller antimikrobiyal özellikleri ilk keşfedildikleri zamandan bu yana pek çok antimikrobiyal süreç ve ürünlerin temel bileşenleri olmuşlardır (Berger vd 1976, Rosenkranz ve Carr 1972). Aynı zamanda materyallerin parçacık boyutunun küçülmesi biyo-uyumluluğu geliştirmiş ve nano-teknolojinin medikal alanda kullanımına olanak sağlamıştır. Ag NP'lerinin oldukça stabil yapıda oldukları gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda gözlemlenen NP'ler bir yılın üzerinde raf bekleme süresi boyunca çökme göstermemişlerdir. Fakat bu bileşiklerin de tuzlar ile birlikte kullanımı kısıtlanmalıdır (Simonetti vd 1992, Jones vd 2004, Silver vd 2006). Yapılan diğer çalışmalarda ise, 0.002-0.02 parçacık/milyon konsantrasyonlarında Ag NP'leri insan cildine penetre olmamış ve bir ölümsüz insan keratosit hattı olan HaCAT hücreleri üzerinde etkisi gözlemlenmemiştir. Ag NP'lerinin insan derisi tarafından absorbe edilip edilmediği konusu ise hala kesinlik kazanmamıştır. Sonuçlar göstermektedir ki, Ag NP'leri insan derisini geçmemektedir ve bu nedenle fonksiyonları koruyucudur ve keratositleri uyardıkları. Ancak eğer bu ürünler ile temas eden insan cildi zarar görmüşse NP'ler derinin koruyucu tabakasını geçebilir (Kokura vd 2010). Aynı zamanda 5-45 nm aralığında boyutlara sahip Ag NP'lerinin genotoksik aktivitesi *in vivo* ve *in vitro* KOMET testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre *in vitro* olarak Ag NP'leri genotoksik etki göstermektedir ancak bu etki zaman ile azalmaktadır. Bunun sebebinin tamir mekanizmaları ile DNA'nın onarılması olduğu düşünülmektedir. *In vivo* çalışmalarda araştırılan her doz ve her zaman aralığında Ag NP'lerinin genotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Bunun sebebinin ROS türevlerinin oluşturduğu strese karşı hücrel antioksidant mekanizmalarının devreye girmesi olabileceği düşünülmektedir (Tavares vd 2012). KOMET testi ile yapılan *in vitro* bir çalışmada insan lenfositlerinde 40-60 nm'lik partikül büyüklüklerine sahip Ag NP'lerinin 50 ve 100 µg/ml dozlarının kısa (5 dk) ve uzun süreli (3 saat)

uygulandığında genetik hasara neden olduğu gözlenirken partikül boyutları 90-180 nm arasında değişen Ag NP'lerinin 25 µg/ml dozunda nekrotik hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir (Flower vd 2012). Aynı çalışma kapsamında *in vivo* olarak bitkilerden *A. cepa*'da, *Nicotiana tabacum* hayvanlardan da Swiss Albino erkek fareler ile yapılan araştırmalarda, kromozomal aberasyon (KA), KOMET ve ROS üretimi belirleme yöntemleri kullanılmıştır ve sonuç olarak genotoksik etki, oksidatif stress indüksiyonu ve kromozom kırıklarına bağlı olarak klastojenik etki gözlenmiştir (Ghosh vd 2012). Yine *A. cepa*'da yapılan bir başka *in vivo* çalışmada da kromozomal hasar gözlenmiştir (Kumari vd 2009). Ag NP'leri, apoptotik cevapları, DNA çift zincir kırıklarını ve p53 protein ekspresyonunu indüklemektedir (Ahamed vd 2008, Arora vd 2008, Hackenberg vd 2011). Bir başka çalışmada ise, özellikle Ag NP'lerinin molibden, alüminyum, demir oksit ve titanyum dioksit gibi NP'lere oranla toksisitesinin çok daha fazla olduğu, bu toksisitenin de glutatyon aktivitesini azaltma, mitokondriyal bozukluklara sebep olma ve ROS türevlerini çoğaltma gibi etkiler olduğu belirtilmektedir (Hussain vd 2005). İnsan normal akciğer fibroblast hücrelerinde ve insan glioblastoma hücrelerinde nişasta kaplı Ag NP'lerinin toksisitesi araştırılmış ve Ag NP'lerinin hücrede Adenozin Tri Fosfat (ATP) miktarını, ROS türevlerinin üretimini ve DNA hasarını arttırdığı bunun yanı sıra G2/M safhasında hücre döngüsünü durdurabildiği (bu bağlamda kanser tedavisinde potansiyel kullanımı için uygun olabileceği) gösterilmiştir (Asharani vd 2009). Ag NP'lerinin DNA hasarını, hücre ölümünü ve insan mezenşimal kök hücrelerinde bozuklukları arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Hackenberg vd 2011). Ayrıca HeLa hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda apoptozis ve oksidatif stresin arttığı gözlemlenmiştir (Miura ve Shinohara 2009). Partikül büyüklükleri 5 nm olan Ag-NP'leri Ames testinde *Salmonella typhimurium*'un 5 farklı suşu üzerinden mutasyon tetikleyici etki göstermemiştir. İnsan lenfoblast TK6 hücreleri üzerindeki MN uygulaması sonucunda ise MN frekansında artış gözlemlenmiştir (Li vd 2012). *Vicia faba* kök ucu hücreleri 4 farklı konsantrasyonda Ag NP'leri ile muamele edilmiş ve KA, mitotik index (MI) ve MN oluşumunu uyarılması açısından incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmayla Ag-NP'lerinin bitkisel sistemler içerisine penetre olduğu gösterilmiştir. Sonuçlara göre Ag NP'leri uygulanmış *V. faba* kök ucu hücrelerinde önemli bir ölçüde MN oranında artış, test kimyasallarının klastojenik olduğunu ve farklı kromozomal kırıklara yol açabileceğini göstermiştir (Patlolla vd 2012). 25 nm boyutundaki Ag NP'leri fare embriyonik kök hücreleri ve fibroblastlarda zamana bağlı olarak hücrelerin yaşayabilirliklerini azaltırken (Ahamed vd 2008) aynı bileşiğin 13 nm boyutu insan karaciğer hücre hattı ve farelerde sitotoksik bulunmamıştır (Cha vd 2008). HepG2 insan hepatoma hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada da MN frekansının artışı iyonik Ag'ye oranla Ag NP uygulanan hücrelerde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Kawata vd 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalar genellikle Ag NP'lerinin *in vitro* modellerde genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalardır (Kiruba vd 2010, Sung vd 2009, Kruszewski vd 2011). Bu çalışmaların sonuçları Ag NP'lerinin ROS üretiminde artış, sitokinlerin salınımı ve heat-shock proteinlerinin up regülasyonu sonucunda sitotoksik ve pro-inflamatuar etkisi olabileceğini göstermiştir. Bazı raporlara göre Ag NP'leri ayrıca nekrozis ve apoptozis oranının arttırmakta, DNA hasarına yol açmakta ve hücre döngüsünün ilerleyişini bozmaktadır (Wijnhoven vd 2009, Lankoff vd 2012). Ayrıca bazı çalışmalara göre Ag NP'leri oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Bouwmeester vd 2011). *In vivo* çalışmalar, *in vitro* çalışmaların sonuçlarını doğrulamış ve aynı zamanda Ag NP'lerinin bazı organlarda birikimini, tekrar dağılımını ve buna bağlı olarak vücut ağırlığında azalma, kan kimyasında

değişim ve inflamasyona sebep olduğunu da göstermiştir (Kim vd 2008, Dziendzikowska vd 2012, Sung vd 2009). Ratlarda yapılan çalışmalardan birinde ise, Ag NP'lerinin, epididimiste bekleyen olgun sperm hücreleri üzerinde seminifer tübüllerdeki spermatozoa'lara göre daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (Gromadzka-Ostrowska vd 2012). Fare lenfoma testi (MLA) kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, memeli hücre hatlarından biri olan L5178Y/Tk1/–3.7.2C fare lenfoma hücre hattında 100 nm partikül büyüklüğüne sahip Ag NP'nin mutajeniteye neden olmadığı fakat, aynı çalışma kapsamında değerlendirilen KOMET testinde kuyruk momentinin istatistiki açıdan kontrol grubu ile farklı olduğu gözlenmiştir (Kim vd 2010). Ayrıca Ag NP'lerinin (10-20 nm) fare germline kök hücrelerinde MTT (Kolorimetrik hücre canlılığı) testi ve LDH (Laktaz dehidrogenaz) testi ile sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Braydich-Stolle vd 2005, Asare vd 2012). Şekil 2.1.'de nano-Ag tarafından indüklenen genotoksite ve sitotoksitenin olası mekanizması gösterilmektedir (Ahamed vd 2010).



Şekil 2.1. Ag Nanopartikülü ile İndüklenen Genotoksite ve Sitotoksitenin Olası Mekanizması (Ahamed vd 2010).

Bu çalışmada kullanılan diğer bir NP olan Kobalt nanopartikülleri (Co NP) ise endüstriyel olarak geniş kullanım alanına sahip bir nano-materyaldir. Biyolojik ve medikal alanlarda da kullanımı yaygın olmasına rağmen Co NP'lerinin genotoksik etkileri hakkında bilgi hala eksik ya da yetersizdir. Ponti ve arkadaşları (2009), hem KOMET hem MN testleri kullanarak Balb/3T4 hücreleri üzerinde Co NP'lerinin genetik hasarı önemli ölçüde arttırdığını ve morfolojik hücre transformasyonunun da indüklendiğini göstermişlerdir. İlgi çekici bir şekilde Co NP'lerinin yerine Co iyonları kullandıklarında hücre transformasyonu üzerinde herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Benzer etkiler daha önce insan kan lenfositleri kullanılarak KOMET testi ile de gözlemlenmiştir (Colognato vd 2008).

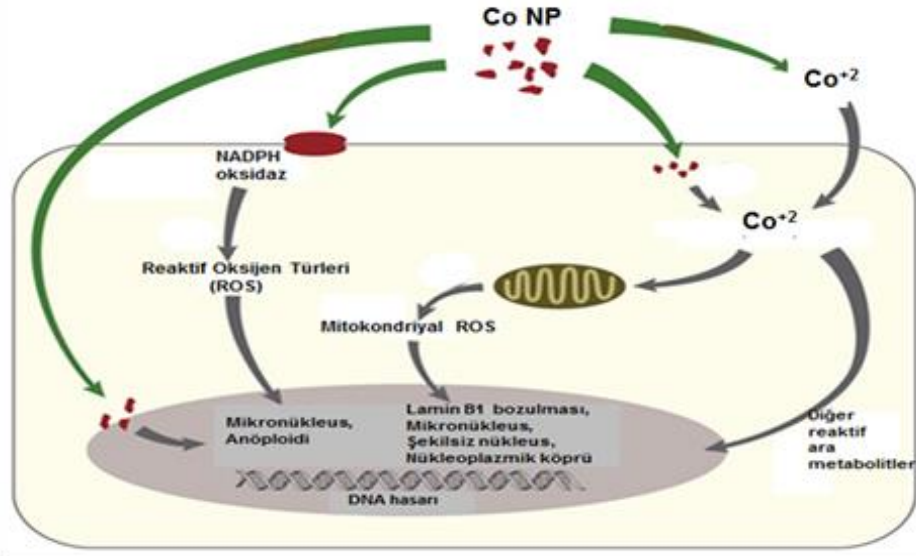
Ponti ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada Co NP'lerinin etkileri Co iyonu uygulanan grup ile karşılaştırılmıştır. Genel olarak, her iki Co formunda birbirine yakın genotoksik etkileri KOMET ve MN testleri ile gözlemlenmiştir. Bununla beraber sadece Co NP'lerinin morfolojik hücre transformasyonu üzerinde etkisi olduğu, Tip III foci formasyonunu arttırdığı saptanmıştır.

Bu farklılık Co NP'lerinin hücre alım oranının daha büyük olan Co iyonlarına göre daha yüksek olmasına bağlanmıştır. Ayrıca bu farklılık Co NP'lerinin kültür besiyeri içerisinde bulunan proteinler ile etkileşime girmiş olmasına ve böylece hücreler tarafından daha kolaylıkla alınabilmesine de bağlanabilir.

Benzer sonuçlar aynı iki Co formunun karşılaştırıldığı önceki çalışmalarda da gözlenmiştir (Colognato vd 2008). Çalışmada insan kan lenfosit kültürleri hedef hücre olarak kullanılmış, KOMET ve MN testlerinde genotoksik etki gözlemlenmiştir. Her iki Co formunun MN testinde MN'lu hücre frekansını arttırmasına rağmen sadece Co NP'lerinin DNA kırıklarına yol açtığı KOMET testi ile gözlemlenmiştir. Yakın zamanda yapılmış olan başka bir çalışmada (Jiang vd 2011), insan T lenfosit hücreleri kullanılarak iki Co formunun genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma, Co NP'lerinin insan T lenfosit hücrelerinde önemli genotoksik etkileri olduğunu göstermiş ancak buna karşın Co iyonlarının genotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. NP ve iyonik form arasındaki sonuçların farklılığı konsantrasyonlar arası farklılıklara ve hücrelerin uygulanan kimyasalları alım potansiyellerine dayanıyor olabilir. Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise 15 nm boyutunda altın (Au) ve Au-Co NP'leri ile fareler üzerinde çalışılmıştır. Deney grupları 7 ile 14 gün arasında bu NP'lere oral yoldan maruz bırakılmıştır ve sonuç olarak her iki NP'e ait uygulama gruplarında tümör ilişkili genlerde hasar, MN oranında artış ve oksidatif DNA ürünlerinde artış gözlenmiştir (Girgis vd 2012).

Co NP'lerinin genotoksik etkilerinin altında yatan mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar pek çok etkinin oksidatif hasarın indüklenmesine bağlı olduğunu göstermiş (Lison vd 2001) ve bu etkilerdeki artışın kültür besiyerindeki antioksidanlara bağlı olduğu düşünülmektedir (Zou vd 2001). Etkilerdeki farklılık Co NP'lerinin hücreler tarafından alım miktarının Co iyonlarına göre daha yüksek oranda olmasına bağlanmaktadır. Limbach ve arkadaşları (2007) Co NP'lerinin hücreler tarafından hızlı özümsemesini Truva atı tipi mekanizma ile açıklamaktadırlar.

Kaya ve arkadaşlarının (2002) çalışmalarında belirttiği gibi Co iyonları elektrolizle kaplamada, boyalarda kurutma ajanı, pigmentlerde ve hayvansal gıdalarda katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Leonard vd 1990). Co ve birçok metal *in vitro* hücre kültüründe hücre zarı lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır ve hücre zarında oluşan bu hasarın hücre ölümünü hızlandırdığı saptanmıştır (Vuillaume 1987). Co partikülleri, hem aktif oksijen türlerini oluşturarak hem de baz kesip çıkarma tamir sistemini inhibe ederek DNA bütünlüğünü etkiler (Lison vd 2001). Serbest radikaller tarafından veya çinko-parmak bölgelerindeki çinkonun değişimi ve redükte glutatyonun seviyesindeki azalma DNA tamir mekanizmasının inhibe olmasına neden olmaktadır. Co partikülü de buna neden olan birkaç metalden (Cr, Cd, Ni, Co, As) birisidir (Desoize 2002). Şekil 2.2'de Co NP'nün indüklediği genotoksitenin olası mekanizması gösterilmiştir (Raghunathan vd 2013).



Şekil 2.2. Co Nanopartikülü ile İndüklenen Genotoksisitenin Olası Mekanizması (Raghunathan vd 2013).

2.2. KOMET [Tek Hücre Alkali Jel Elektropherez (SCGE)] Yöntemi

Genetik biyo-gözlem çalışmaları, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmış populasyonlarda kanser ve genetik hastalıkların tespitinde erken uyarı sistemler olarak işlev görür. Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. DNA tamir kapasitesindeki ve hücresel transformasyondaki değişiklikler, kromozom kırıkları, gen mutasyonu ve DNA hasarı dâhil genetik hasarı indükleyen bileşikler belirleyebilmek için *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri kullanılabilir. Uzun yıllardır farklı alanlarda kullanılmakta olan genotoksisite testleri önemli ve yararlı kazançları olması nedeniyle karsinogenisitenin belirteçleri olarak yaygın kullanım alanı bulan teknikler olmuştur. Bundan dolayı birçok bileşiğin kapsamlı risk değerlendirmesinde genotoksisite verilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çevresel genotoksinlerin etki mekanizmalarının anlaşılmasında birçok sitogenetik testler örneğin *Drosophila melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf vd 1984), KOMET testi (Singh vd 1988), fare lenfoma testi (Lloyd ve Kidd 2012), kromozomal düzensizlik testi (CA) (Kanaya vd 1994), mikronükleus (MN) (Fenech vd 2003) ve kardeş kromatid değişikliği testi (SCE) (Galloway 2000) yaygın olarak kullanılan testlerden bazılarıdır.

Son yıllarda ökaryotik hücrelerde farklı fiziksel ve kimyasal bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir teknik olan KOMET testi ise genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir test sistemidir. Bu test sistemi fiziksel ve kimyasal etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin

ölçülmesini sağlar. İlk kez Ostling ve Johanson (1984), hücrelerde gama radyasyonundan sonra nötral şartlarda DNA hasarını çalışmak için gelişmiş bir mikroelektroforetik yöntem uygulamışlardır. Tek hücre alkali jel elektroforezi olarak bilinen bu yöntem bugün *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite çalışmalarında iyi bilinmektedir. Tek veya çift bağ DNA hasarının ayrı ayrı görülebilmesi, hızlı, basit, hassas, ucuz olması ve verilerin hızlı ve etkili olarak elde edilebilmesi nedeniyle kullanılmaktadır (Fairbairn vd 1995). İnsan periferik lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı kuyruklu yıldız görünümünde olduğu için yöntem "COMET" ismiyle de anılmaktadır. Araştırmalar sonucunda nötral deney şartlarının denatürasyonu hızlandırmadığı ve bunun sadece çift bağ hasarının tanınmasına yol açtığı gözlenmiştir. Bu ise genotoksisite hakkında daha az hassas sonuçlar elde edilmesine yol açmıştır. Bu nedenle konu üzerinde çalışmalar devam etmiş ve yöntemin alkali versiyonu Singh ve arkadaşları (1988) bulunmuştur. Klaude ve Collins kuyruk oluşturmanın altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar (Klaude vd 1996, Collins vd 1997) ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur.

DNA kırıklarının ölçmek için pek çok teknik geliştirilmiştir. Bunlardan her biri bazı avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Tek hücre alkali jel elektroforezi testi DNA hasarı ve tamirinde intersellüler farkları taramak için oldukça önemlidir. Herhangi ökaryotik hücre popülasyonunda uygulanabilir örnek sayısı 1 hücreden 10.000 hücreye kadar değişebilir. Testin sonuçlarını kısa süre içerisinde elde etmek mümkündür. Son yıllarda KOMET testi insan gözlem çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. KOMET, insanlarda hücre seviyesinde DNA'da farklı bileşiklerin hasar etkilerinin bulunmasında kullanılan hızlı ve oldukça duyarlı bir testtir. İnsan popülasyonlarından hazırlanan lenfositlerde gıda katkı maddelerinde lezzet verici olarak kullanılan bazı benzil türevleri (Demir vd 2010), insektisitlere maruz kalmış bitki yapraklarından izole edilen hücrelerde (Demir vd 2011b), iyonize radyasyon (Tice vd 1990), herbisitler (Ribas vd 1995), arsenik bileşikleri (Guillamet vd 2004), pestisitler (Zeljezic ve Garaj-Vrhovac 2001, Bhalli vd 2009) ve ağır metaller (Hartmann ve Speit 1994) tarafından indüklenen genetik hasarın taranmasında tek hücre alkali jel elektroforezi tekniği başarı ile uygulanmıştır.

Bunun yanı sıra birçok epidemiyolojik çalışmalarda da bu test sistemi yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin, kozmik radyasyon ve elektromanyetik dalgalara maruz kalmış hava yollarında çalışan uçuş personellerinde (Cavallo vd 2002, 2009), sigara içen ve içmeyen hamile kadınlardan doğumdan önce ve onların yeni doğan çocuklarından alınan kan örneklerinde sigaranın etkisi (de Assis vd 2009), diş dolgusu olarak kullanılan bileşiklerin etkisi (di Pietro vd 2008), alüminyum endüstrisinde çalışan ve yoğun bir şekilde polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAH) maruz kalmış işçilerde (Crebelli vd 2002), Behçet hastalığına yakalanmış kişilerde (Bilgici vd 2005) ve tekstil endüstrisinde kullanılan boyalar ve beyazlatıcı madde artıklarıyla kirletilmiş suların (Rajaguru vd 2002) genotoksik etkileri bu epidemiyolojik çalışmalardan bazılarıdır. Aynı zamanda KOMET tekniği farklı deneysel koşullar altında bakteriyel enzimler

kullanılarak oksidatif DNA hasarının değerlendirilmesinde de kullanılabilir (Collins vd 1999, El-Yamani vd 2011).

KOMET testi, son zamanlarda *D. melanogaster*'in larvalarından izole edilen kan hücrelerinde (hemositler) çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların indüklediği DNA hasarını tespit etmede de yaygın olarak kullanılmaktadır (Mukhopadhyay vd 2004, Siddique vd 2005, Carmona vd 2011a, b, c, Marcos ve Carmona 2013, Shukla vd 2011, Demir 2012, Demir ve Kaya 2013). Hemolenfdeki hemositler memelilerin kanlarındaki lenfositlere benzer işlevlere sahip kan hücrelerdir (Irving vd 2005). Hemositler toksik bileşiklere doğrudan maruz kalabilmektedir. Bu nedenle, genotoksisite değerlendirmelerinde kullanılan ilginç hedef doku hücreleridir.

2.3. Model Organizma Olarak *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster, Diptera ordosundan Drosophilidae familyasının *Drosophila* cinsine ait meyve sineği olarak bilinen bir sinek türüdür. Charles W. Woodworth tarafından model organizma olarak kullanılmasının önerilmesi ve Morgan tarafından kullanılması ile biyolojik çalışmalarda oldukça yaygın kullanım alanına sahip olmuştur. Model organizma olarak benimsenmesinin en önemli nedenlerinden birisi *D. melanogaster* ile insan genetik yapısının yüksek oranlarda benzerlik göstermesidir. Aynı zamanda 25 °C'de, % 70 nem oranında her iklimde kolaylıkla yetiştirilebilmesi, erkek ve dişi ayrımının kolay olması, 9 ile 11 gün arasında yeni nesil bireylerin elde edilmesi ve fazla sayıda birey elde edilmesi ile bu sayede istatistiksel açıdan verimli olması, virjin bireylerin ayrımının kolay olması, çok sayıda mutant hattı olması ve bu sayede genetik çeşitliliğinin fazla olması ve yine oldukça önemli olarak kromozomlarının genetik haritasının çıkarılmış olması gibi sebepler dolayısıyla *D. melanogaster* bireyleri model organizma olarak yaygın kullanım alanına sahip hale gelmiştir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. *Drosophila* ve insan hücre döngülerinin ve düzenleyici yollarının benzerliği tümör genезis esnasında çoğalma süreci çalışmalarında bir model olarak hizmet eder. (Potter vd 2000). *Drosophila* imajinal disklerinin biyolojik özellikleri, kansere hassas birçok memeli hücresi ile benzerdir. İmajinal diskler ergin sineklerde birçok yapıyı oluşturan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Bu diskler tek hücre tabaka yapısındadır. Larval evrede çoğalarak karakteristik morfolojiye sahip olgun diskleri üretirler ve ergin bireylerde farklılaşırlar. Çoğalmaya ve farklılaşmaya giden özelleşmiş epitel hücreleri diploittir ve memeli hücrelerine benzer hücre döngüsüne sahiptirler (G1, S, G2 ve M safhalarını içerirler). Sinek ve memeli hücre döngüsündeki benzerlik sadece genel organizasyon seviyesi ile sınırlı değildir. Ayrıca moleküler seviyede de korunma vardır. Gelişimsel siklinler (A, B ve E tip) ve onların siklin bağımlı kinaz partnerleri sinek ve insan arasında oldukça korunmuştur (Potter vd 2000). Bu amaçla *Drosophila* biyolojisi

kanser araştırmalarında önemli bir model sağlar. Aynı zamanda *Drosophila*, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzerlik gösteren bir organizma olduğu için çeşitli kimyasalların yanı sıra bu kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılmasında (Guzman-Rincon ve Graf 1995).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada Ag ve Co NP'lerinin ve bu nanopartiküllerin iyonik formlarının, insan periferel kan lenfositleri ve *D. melanogaster* hemositleri üzerinde oluşturduğu DNA hasarı etkisi KOMET testi ile belirlenmiştir. Ag NP'lerinin 15 nm ve 40 nm ile Co NP'lerinin 15 nm ve 50 nm olmak üzere iki farklı nanoboyutuna ve iyonik formlarına ait üç farklı konsantrasyonu insan periferel lenfositleri için 0.01, 0.1 ve 1 mM ve *D. melanogaster* hemositleri için 0.1, 1 ve 10 mM olarak literatür taramaları, ön uygulamalar ve hücre canlılık testi sonucunda sitotoksik olmayan konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir.

3.1. *Drosophila melanogaster* Yaşam Döngüsü

Diptera ordosundan tam başkalaşım gösteren (holometabol) bir böcek olan *Drosophila* diploid kromozom sayısına sahip bir canlıdır ve dört çift kromozom taşımaktadır (Rothwell 1993).

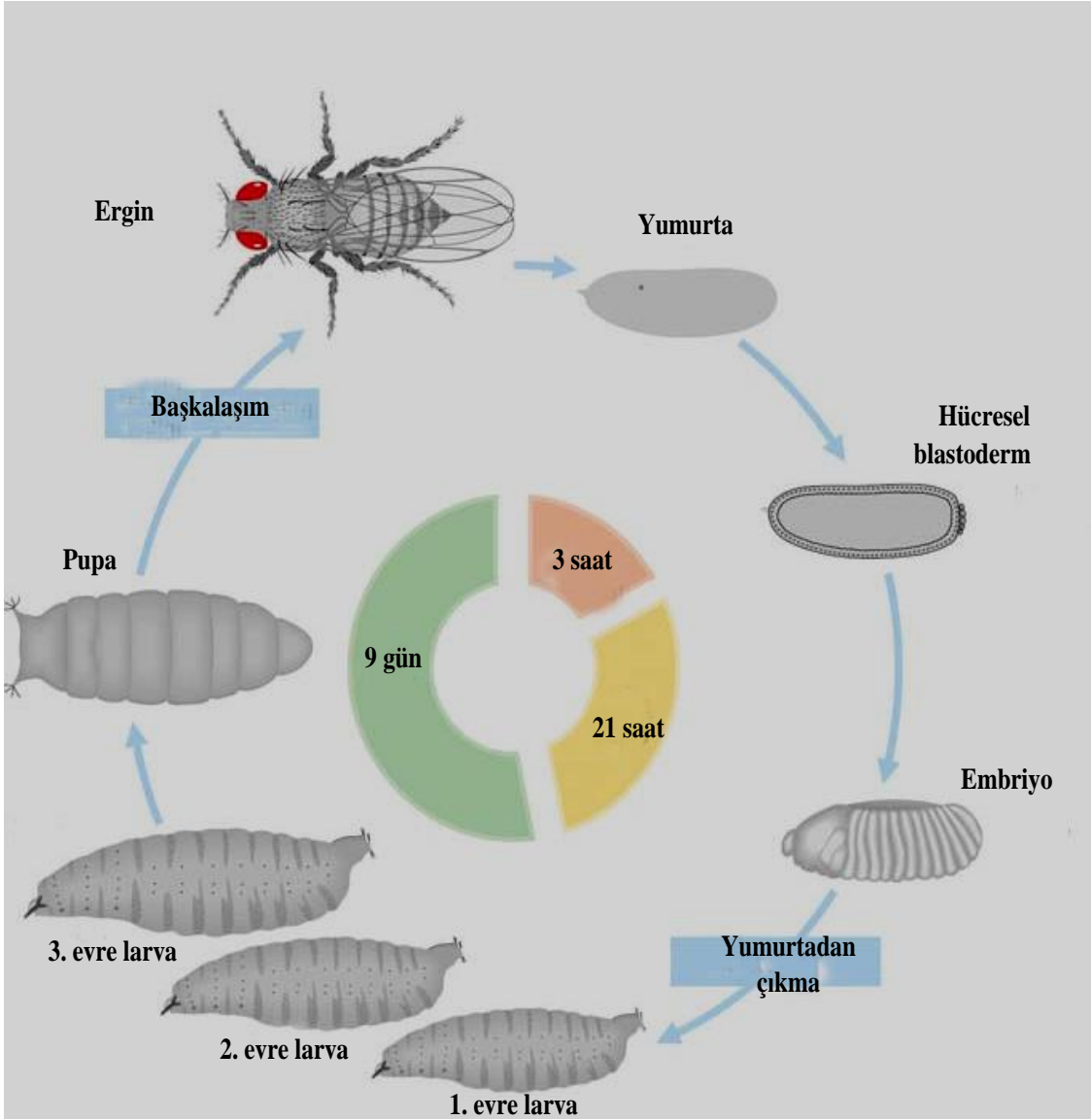
Laboratuar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *D. melanogaster* genetik araştırmalar için oldukça iyi bir model organizmadır. *Drosophila*, ökaryotik bir sistem olması, çalışmaların *in vivo* ortamlarda gerçekleştirilmesi, kısa hayat döngüsü ve yüksek üreme kabiliyetinden dolayı tercih edilen bir model organizma haline gelmiştir. *D. melanogaster*'in genetik çalışmalar için model organizma olarak kullanılması Morgan tarafından 1909 yılında kullanılmaya başlanması itibariyle yaygınlaşmıştır (Falakalı 1990).

İdeal yaşam koşulları olan 25 °C ve % 60 bağıl nem ortamında olgunlaşma süreci 9 ile 11 gün olan *Drosophila*'nın yaşam döngüsü şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmiştir.

Drosophila'nın gösterdiği başkalaşım evreleri ve bu evrelerin süreleri 25 °C sıcaklıkta 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

Pupadan ilk çıktıklarında vücut uzun ve açık renkte, kanatlar kısa ve kıvrık görümlü bir durumdadır, ilerleyen bir kaç saat içinde yeni çıkan bireyler normal görümlü ergin bireyler halini almaktadır. Ergin bireylerin ortalama yaşam süreleri 40-50 gün arasında olmasına karşın 80-90 gün yaşayan bireyler de gözlenmiştir (Graf ve Vanschaik 1992).



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü (Morgan 1999-2007)

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Bu çalışma kapsamında Ag ve Co NP'lerinin ve iyonik formlarının özellikleri Çizelge 3.1'de, çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. KOMET Testi ile Uygulaması Yapılan Ag ve Co NP'lerinin ve Bu Nanopartiküllerin İyonik Formlarının Özellikleri

Kimyasal Adı	Büyüklik (nm)	CAS No. - Saflık Derecesi	Yoğunluk (g/mL) (25 °C) *	Refraktif Index Değeri (RI)	Absorbans Değeri
Gümüş nitrat (AgNO ₃)	İyonik form	7761-88-8 %99	5.35	1.74	
Nano - Gümüş (Ag)	15	7440-22-4 %99	0.986	1.35	0.01
Nano - Gümüş (Ag)	40	7440-22-4 %99	0.990	1.35	0.01
Kobalt klorür (CoCl ₂ .6H ₂ O)	İyonik form	7646-79-9 %99	3.35	1.65	
Nano - Kobalt (Co)	15	7440-48-4 %99	0.570	1.22	0.1
Nano - Kobalt (Co)	50	7440-48-4 %99	0.570	1.22	0.1

*Kullanılan bu kimyasal malzemelerin yoğunluk ölçümleri Anton Paar DMA 4500 4 model spesifik gravite ve konsantrasyon ölçer cihazı ile yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan Ag (15 ve 40 nm) ve Co (15 ve 50 nm) NP'leri belirlenen nanoboyutlarda sentezlendikten sonra, büyüklik dağılımı (size distribution), zeta potansiyellerinin ölçümü ve yoğunluklarının ölçümü ile karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Kullanılan boyutlarda NP'ler JEOL JEM-2011 model cihaz Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Universitat Autònoma de Barcelona'da görüntülemiştir. Bu NP'lerin partikül büyüklik dağılımları ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz (Şekil 3.2) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan NP'lerin ve bu NP'lerin iyonik formlarının yoğunluk ölçümleri ise Anton Paar DMA 4500 4 model spesifik gravite ve konsantrasyon ölçer cihaz ile yapılmıştır. Kullanılan NP'lerin hazırlanması aşamasında ise Ag (15 ve 40 nm) NP'leri distile su, Co (15 ve 50 nm) NP'leri etanol içerisinde çözüldükten sonra 1 saat süreyle sonikatör (Şekil 3.3) içerisinde bekletilmiştir.



Şekil.3.2. Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz ile zeta potansiyel ölçümü



Şekil 3.3. Sonikatör uygulaması

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Diğer Kimyasal Malzemeler

No	Malzemenin cinsi ve özelliği	Kullanım Gerekçesi
1	Ethyl methane sulfonate (EMS); (ethanesulfonic acid ethyl ester veya Ethyl mesylate (sıvı))	KOMET testi için testin çalıştığını gösteren pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.
2	<i>Drosophila</i> Instant Medium	<i>D. melanogaster</i> larvaları üzerinde test edilen kimyasalların uygulama ortamı olarak kullanılmıştır.
3	Eter (Diethyl ether) (Saflık 99+%, anhydrous)	Çalışmada kullanılan <i>D. melanogaster</i> erginlerini gerek duyulduğu zamanlarda bayılmak için kullanılmıştır.
4	Etil alkol (% 80 v/v)	Kobalt NP'leri ve Kobalt klorür'ün çözücüsü olduğu için negatif kontrol amacıyla kullanılmıştır.
5	PBS-Dulbecco Solution without Ca ⁺² , Mg ⁺²	Hemositlerin ayrımı ve lenfositlerin izolasyonu aşamasında kullanılmıştır.
6	Trizma Baz	Nötralizasyon ve lysis tamponlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.
7	Triton X-100	Lysing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
8	Sodium chloride (NaCl) Molecular biology grade	Lysis solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
9	EDTA disodium salt dihydrate Molecular biology grade	Lysis solüsyonu ve elektroforez tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
10	Agarose Low Melt Large DNA grade	DNA kırıklarının incelenmesi amacıyla hazırlanan preparatların kaplanmasında kullanılmıştır.
11	Agarose Low EEO (Agarose Standart-NMA)	DNA kırıklarının incelenmesi amacıyla hazırlanan preparatların kaplanmasında kullanılmıştır.
12	Biocoll-Separating Solution, density 1.077 g/ml isoton	Lenfositlerin izolasyonu aşamasında kullanılmıştır.
13	Dimethyl sulfoxide (DMSO) Molecular biology grade	Lysing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
14	Sodium hydroxide (NaOH)	Elektroforez tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
15	Etidyum bromid (EtBr)	KOMET yönteminde uygulaması yapılmış preparatların boyanıp Floresan mikroskopta sayılabilmesinde amacıyla kullanılmıştır.
16	<i>N</i> -phenylthiourea (PTU)	KOMET testinde <i>Drosophila</i> hemositlerinin izole edilmesinde kullanılmıştır.

Devamı arka sayfadadır.

Çizelge 3.2'nin devamı

17	<i>N</i> -lauroylsarcosine sodium salt solution	Lysing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.
18	Fluorescein diacetate (FDA)	KOMET yönteminde hücre canlılık oranlarının hesaplanması için kullanılmıştır.
19	Fpg Protein from <i>Escherichia coli</i> $\geq 90\%$ (SDS-PAGE), recombinant, expressed in <i>E. coli</i> , buffered aqueous glycerol solution, $>20,000$ units/mg protein (1 Ad.)	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılmıştır.
20	Endonuclease III from <i>Escherichia coli</i> $\geq 90\%$ (SDS-PAGE), recombinant, expressed in <i>E. coli</i> overproducing strain, buffered aqueous glycerol solution, $>10,000$ units/mg protein (1 Ad.)	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılmıştır.
21	HEPES, Biotechnology Performance Certified, $\geq 99.5\%$ (titration), cell culture tested	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılan enzim solüsyonunun hazırlanması aşamasında kullanılmıştır.
22	Albumin from bovine serum (BSA), $\geq 98\%$ (agarose gel electrophoresis), lyophilized powder	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılan enzim solüsyonunun hazırlanması aşamasında kullanılmıştır
23	Potasyum hidroksit $\geq 85\%$ KOH basis, pellets	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılan enzim solüsyonunun pH'sını ayarlama aşamasında kullanılmıştır
24	Potasyum klorid, KCl	KOMET testinde indüklenen oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılacak enzim solüsyonunun hazırlanması aşamasında kullanılmıştır.

3.3. KOMET Testinde Kullanılan Kimyasal Solüsyonların Hazırlanması

3.3.1 Lysis ve Lysing solüsyonlarının hazırlanışı

Çizelge 3.3. Lysis Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	300 ml
2.5 M	NaCl	58.44 g/mol	43.8 g
0.1 M	EDTA	372.24 g/mol	11.2 g
0.01 M	Trizma baz	121.14 g/mol	0.4 g

10 M NaOH ile pH = 10'a ayarlanır.

Lysis solüsyonu yukarıda belirtilen kimyasal maddelerle verilen oranlarda hazırlanır. Hazırlandıktan sonra NaOH ile pH değeri 10'a ayarlanır. KOMET uygulaması sırasında lysis solüsyonundan lysing solüsyonu hazırlanır.

300 ml Lysing solüsyonu hazırlanırken: insan periferik kan lenfositleri üzerinde KOMET uygulaması yapılırken; 267 ml Lysis solüsyonu + 3 ml Triton-X + 30 ml DMSO kullanılır. *D. melanogaster* hemositleri üzerinde KOMET uygulaması yapılırken; 294 ml Lysis solüsyonu + 3 ml Triton-X + 3 ml *N*-lauroylsarcosine sodium salt solution kullanılır.

3.3.2. Elektroforez solüsyonunun hazırlanışı

Çizelge 3.4. Elektroforez Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	2 Litre
0.3 M	NaOH	40 g/mol	24 g
0.001 M	EDTA	372.24 g/mol	0.74 g

HCl ile pH = 13.2'ye ayarlanır.

Elektroforez solüsyonu yukarıda belirtilen kimyasal maddelerle verilen oranlarda hazırlanır. Hazırlandıktan sonra pH değeri HCl kullanılarak 13.2'ye ayarlanır.

3.3.3. Nötralizasyon solüsyonunun hazırlanması

Çizelge 3.5. Nötralizasyon Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	600 ml
0.4 M	Trizma baz	121.14 g/mol	29.1 g

HCl ile pH = 7.5'e ayarlanır.

Nötralizasyon solüsyonu yukarıda belirtilen kimyasal maddelerle verilen oranlarda hazırlanır. Hazırlandıktan sonra pH değeri HCl kullanılarak 7.5'e ayarlanır.

3.3.4. Enzim solüsyonunun hazırlanması

Çizelge 3.6. Enzim Solüsyonu Hazırlanırken Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	500 ml	Litre
0.04 M	HEPES	238.31 g/mol	4.766 g	9.53 g
0.1 M	KCl	74.55 g/mol	3.728 g	7.46 g
0.0005 M	EDTA	372.24 g/mol	0.093 g	0.19 g
0.2 mg/ml	BSA		0.1 g	0.2 g
10 M KOH ile pH = 8'e ayarlanır.				

Enzim solüsyonu yukarıda belirtilen kimyasal maddelerle verilen oranlarda hazırlanır. Hazırlandıktan sonra pH değeri KOH kullanılarak 8'e ayarlanır.

3.3.5. Low melting agaroz (LMA) ve Normal melting agaroz'un (NMA) hazırlanması

% 0.65 g LMA 10 ml için 0.065 g tartıldıktan sonra distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülerek hazırlanır.

% 0.65 g NMA 100 ml için ise, 0.65 g tartılıp distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülerek hazırlanır.

3.3.6. Etidyum bromür'ün (EtBr) hazırlanması (100 µg/ml)

0.01 g EtBr 100 ml distile suda çözülerek ana stok hazırlanır. Kullanmadan önce ana stoktan 750 µl alınıp üzerine 500 µl distile su eklenerek 3/5 oranında sulandırılır.

3.3.7. Fpg ve Endo III enzimlerinin hazırlanması

5 µl Fpg ve Endo III + 500 µl enzim solüsyonu (% 10 gliserol içerecek) eklenerek enzim 100X seyreltilir. Daha sonra buz üzerinde ependorflar içerisine 10 µl enzim konularak ependorflar -20 veya -80 °C'ye kaldırılır. Kullanılacakları zaman 10 µl enzim üzerine 300 µl enzim solüsyonu (gliserolsüz) eklenerek enzim 30X daha seyreltilir (Toplamda enzim 100X . 30X = 1/3000 oranında seyrelmiş olur).

3.4. Hücre Canlılık (Cell Viability) Testi

Hücre canlılık testinde, NP konsantrasyonlarının ve bu NP'lerin iyonik formlarının sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücre canlılığı oranı, her bir uygulama grubu için Fluorescein diacetate (FDA) ve Etidium bromid (EtBr) boyaının (600 µl PBS+25µl EtBr+3.75µl FDA) bir karışımı (1:1, 20 µl hücre/20 µl boya) ile floresan mikroskopta değerlendirilmiştir (Strauss 1991). Her bir uygulama grubunda canlı ve ölü olmak üzere toplamda iki yüz hücre Floresan mikroskopta 40X

büyütmede sayılmıştır. KOMET testinde sitotoksik olmayan NP konsantrasyonlarının ve bu NP'lerin iyonik formlarının çalışılabilmesi için uygulama ve kontrol gruplarındaki hücre canlılık oranı için % 70 ve üzeri dikkate alınmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde bir yanlışlık olmaması için, KOMET testinde ölü hücrelerin verdiği kuyruk dağılımı ile apoptosis sonucu oluşan kuyruk oluşumunun ayırt edilebilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, hücre DNA'sının baş kısmı yoksa veya kontrol grubuna göre baş ve kuyruk kısımları çok fazla dağılmış ise apoptosise uğramış hücre olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir. Her bir uygulama grubundaki hücre canlılık testi için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Henderson vd 1998).

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Toplam Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı (Canlı + Ölü)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5. KOMET (Tek Hücre Alkali Jel Elektrofrezisi) Testi

3.5.1. İnsan periferel kan lenfositlerinde KOMET testi

İnsan periferel kan lenfositlerinde Ag NP'lerinin 15 nm ve 40 nm ile Co NP'lerinin 15 nm ve 50 nm olmak üzere iki farklı nanoboyutuna ve iyonik formlarına ait 0.01, 0.1 ve 1 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonunun genotoksik etkisi KOMET yönteminde aşağıdaki uygulamalar sonucunda değerlendirilmiştir.

i. Alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı önlemek amacıyla K₂EDTA içeren tüplerde +4° C'de çalışmanın başlangıcına kadar saklanmıştır.

ii. Çalışmada Ag NP'lerinin iki farklı nanoboyutunun ve Co iyon formunun çözündüğü ortam olan distile su ve Co NP'lerinin iki farklı nanoboyutunun çözündüğü ortam olan etanol negatif kontrol olarak; EMS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

iii. Uygulama başlangıcında 1'er ml PBS ependorflara konulmuştur. 100'er µl kan yavaşça ependorfun kenarından sızdırılarak her bir ependorfa eklenmiştir. Kan ve PBS süspansiyonu edilmiş ve 10 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra uygulamalara ışıktan etkilenmemesi amacıyla karanlık ortamda devam edilmiştir.

iv. Ardından 100'er µl lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) kan ve PBS karışımlarına ilave edilmiştir. Bu ilave ependorfun tam dibine yavaşça yapılmıştır

v. +4 °C'de 1100 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

vi. Santrifüj sonrası ependorflar tekrar buz içerisine konulmuştur. Ependorflarda görüntü olarak en altta kırmızı, onun üzerinde pembe bir katman görülmüştür. En üst pembe katmanın 100 µl'si ayrı ependorflara aktarılarak soğuğa yerleştirilmiştir.

vii. Alınan lenfositler 100 µl uygulama yapılacak kimyasallar ile karıştırılmış ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

viii. İnkübasyon sonrasında ependorflar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

ix. Santrifüj sonrası süpernatantın 100 µl'si atılmış ve üzerine 100 µl PBS eklenerek resüspanse edilmiştir.

x. LMA'nın 80 µl'si alınarak 100 µl lenfosit ile hızlı bir şekilde karıştırılmış ve NMA ile daha önceden kaplanmış olan lamalar üzerine yayılmıştır. Sonra üzeri 24x60 mm'lik lamelle kapatılmıştır. 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra lameller kaldırılarak 3. katman olarak tekrar LMA'dan 80 µl eklenmiştir.

xi. Lamelle tekrar kapatılan preparatlar 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir.

xii. Süre sonunda preparatların üzerindeki lameller kaldırılarak ve içerisinde lising solüsyonu bulunan etrafı ışık almayan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu halde buzdolabında +4° C'de en az 1 saat bekletilmiştir.

xiii. Lising sonrası preparatlar şale içerisinden çıkartılmıştır.

xiv. Preparatların üzerlerindeki lameller kaldırılarak preparatlar elektroforez tankında bulunan solüsyon içerisine konulmuştur ve burada 30 dakika bekletilmiştir.

xv. Süre sonunda 30 dakika 25 V, 300 mA'de yürütülmüştür.

xvi. Elektroforezden sonra lamalar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu bulunan şale içerisine alınmıştır. Burada soğukta 5 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem 2 kez daha tekrar edilmiş ve daha sonra preparatlar soğuk su içerisine alınıp burada da 5 dakika daha bekletilmiştir.

xvii. İşlemler sonunda her bir lama 50 µl EtBr eklenerek üzerine lamel kapatılmıştır.

xviii. Boyanan preparatlar 20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar üzerindeki buharın uçması için 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

xix. Elde edilen preparatlarda her bir preparat için 100 hücre 400X büyütmede Floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E200), KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm alınarak sayılmıştır.

xx. Değerlendirme parametresi olarak kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity, %), kuyruk momenti (Tail Moment, µm) ve kuyruk uzunluğu (Tail Length, µm) kullanılmıştır.

i. Elde edilen sonuçların öncelikle sonuçların normal dağılıp gösterip göstermediği Kolmogorov-Simironov (K-S) testi kullanılarak kontrol edilmiştir. Değerlendirme sonucunda uygulama sonuçlarının normal dağılım gösterdiği belirlenmiş ve parametrik bir test olan Paired-Samples T-Testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda alkali şartlarda KOMET yönteminin özellikle

tek iplik DNA hasarını belirtmesi sebebiyle değerlendirilen kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı genotoksik etki tek iplik DNA hasarı olarak verilmiştir (Klaude vd 1996, Collins vd 1997).

3.5.2. *Drosophila melanogaster* hemositlerinde KOMET testi

D. melanogaster türünün Oregon R Wild tip hattı üzerinde Ag NP'lerinin 15 nm ve 40 nm ile Co NP'lerinin 15 nm ve 50 nm olmak üzere iki farklı nanoboyutuna ve iyonik formlarına ait 0.1, 1 ve 10 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonunun genotoksik etkisi KOMET yönteminde aşağıdaki uygulamalar sonucunda değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).

ii. *D. melanogaster* bireylerinden 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır. Ag ve Co NP'lerinin iki farklı nanoboyutunun ve iyonik formlarının belirlenen 3 farklı konsantrasyonuna (0.1, 1 ve 10 mM) maruz bırakılmıştır.

iii. Kuru halde bulunan *Drosophila* hazır besininin (*Drosophila* Instant Medium) yaklaşık 4.5 gramı hazırlanan Ag ve Co NP'lerinin iki farklı nanoboyutunun ve iyonik formlarının belirlenen 3 farklı konsantrasyonunun (0.1, 1 ve 10 mM) 9 ml'si ile ıslatılmıştır. Toplanan yumurtalar 72±4 saatlik (3. larval evre) olduklarında 24 saat boyunca bu besiyerinde bekletilmiştir.

iv. *Drosophila* larvaları 96±4 saatlik olduklarında her bir uygulama grubundaki larvalar bir elek yardımı ile musluk suyu altında toplanmıştır. Daha sonra toplanan larvalar suda yıkanıp % 5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde steril edildikten sonra kurutma kağıdı yardımıyla kurutulmuştur.

v. Negatif kontrol grubunda Ag NP'lerinin ve Co iyon formunun içerisinde çözüldüğü distile su ile Co NP'lerinin içerisinde çözüldüğü etanol (%3) uygulaması yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak 4 mM'lık EMS uygulaması yapılmıştır.

vi. Her bir uygulama grubundan toplanan 40-60 larvadan *D. Melanogaster* hemositlerinin toplanması Irving ve arkadaşları (2005) metoduna göre yapılmıştır.

vii. İki ince uçlu pens yardımı ile larvalardan kutikula tabakasının ayrılması sağlanarak içerisinde feniltiyoüre bulunan fosfat bufersalin (PBS) solusyonu içerisinde *D. Melanogaster* hemolenfi ve hemositleri toplanmıştır.

viii. İzole edilen hemositler 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri içerisinde alınıp +4 °C'de 10 dakika 300 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak soğuk PBS solusyonu ile süspanse edilmiştir.

ix. Daha sonra Singh ve arkadaşları (1988) belirlediği KOMET prosedürüne göre PBS solusyonu ile süspanse edilen hemositler düşük erime ısısına sahip agaroz (LMA)'un 80 µl'si alınarak 100 µl hemositle hızlı bir şekilde karıştırılmıştır ve normal erime ısısına sahip agaroz (NMA)'lu lamlar üzerine yayılmıştır.

x. Sonrasında üzeri 24x60 mm'lik lamelle kapatılmıştır. 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra lameller kaldırılarak 3. katman olarak tekrar LMA'dan 80 µl eklenmiştir.

xi. Lamelle tekrar kapatılan preparatlar 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir.

xii. Süre sonunda preparatların üzerindeki lameller kaldırılarak ve içerisinde lising solüsyonu bulunan etrafı ışık almayan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu halde buzdolabında +4° C'de en az 1 saat bekletilmiştir.

xiii. Lising sonrasında preparatlar elektroforez tankında bulunan elektroforez solüsyonu içerisine konulmuş ve burada 30 dakika bekletilmiştir.

xiv. Süre sonunda 30 dakika 25 V (1 V/cm), 300 mA'de yürütülmüştür.

xv. Elektroforezden sonra lamalar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu bulunan şale içerisine alınmıştır. Burada soğukta 5 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra preparatlar soğuk su içerisine alınıp burada da 5 dakika bekletilmiştir.

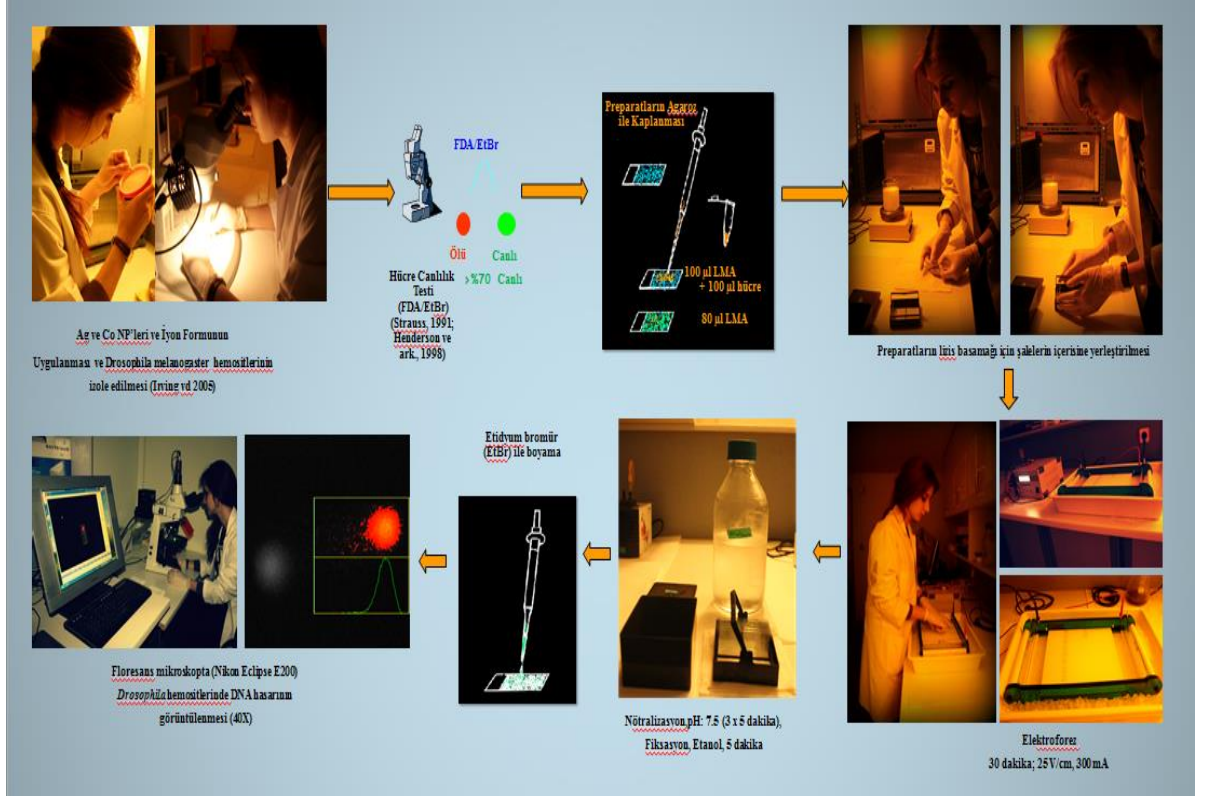
xvi. İşlemler sonunda her bir lama 50 µl EtBr eklenerek üzerine lamel kapatılmıştır.

xvii. Boyanan preparatlar 20 dakika buzdolabında +4° C'de bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar üzerindeki buharın uçması için 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

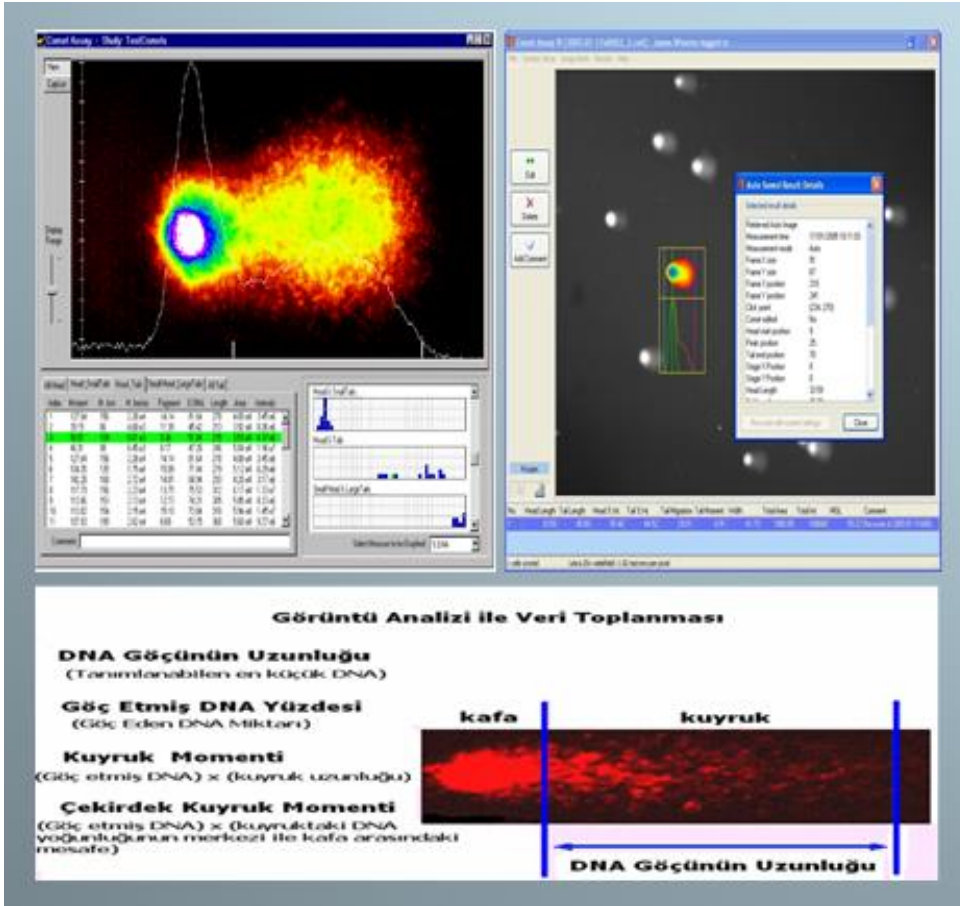
xviii. Elde edilen preparatlarda her bir preparat için 50 hücre 400X büyütmede Floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E200), KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm alınarak sayılmıştır.

xix. Değerlendirme parametresi olarak kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity, %), kuyruk momenti (Tail Moment, µm) ve kuyruk uzunluğu (Tail Length, µm) kullanılmıştır (Şekil 3.5).

xx. Elde edilen sonuçların öncelikle sonuçların normal dağılıp gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov (K-S) testi kullanılarak kontrol edilmiştir. Değerlendirme sonucunda uygulama sonuçlarının normal dağılım gösterdiği belirlenmiş ve parametrik bir test olan Paired-Samples T-Testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda alkali şartlarda KOMET yönteminin özellikle tek iplik DNA hasarını belirtmesi sebebiyle değerlendirilen kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı genotoksik etki tek iplik DNA hasarı olarak verilmiştir (Klaude vd 1996, Collins vd 1997).



Şekil 3.4. *Drosophila melanogaster* hemositleri üzerinde KOMET uygulaması



Şekil 3.5. KOMET Testinde Görüntü Analizi ile Veri Toplanması

- ✓ Kuyruk yoğunluğu: Kuyrukta bulunan DNA parçacıklarının yüzdesi
- ✓ Kuyruk momenti: Kuyrukta gışc etmiş DNA oranı x kuyruk uzunluğu
- ✓ Kuyruk uzunluğu: Toplam kuyruk uzunluğu

3.5.3. KOMET Testinde Enzim Uygulaması

İnsan periferel kan lenfositleri ve *D. melanogaster* hemositleri üzerinde Ag NP'lerinin 15 nm ve 40 nm ile Co NP'lerinin 15 nm ve 50 nm olmak üzere iki farklı nanoboyutuna ve iyonik formlarına ait üç farklı konsantrasyonunun genotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla KOMET yöntemi uygulanmıştır. Uygulamalar sonrasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonrasında karşılaştırılan kontrol gruplarına oranla istatistiksel açıdan pozitif etki gözlemlenmiştir.

İstatiksel değerlendirme sonucunda belirlenen pozitif etki, pozitif etki gösteren en yüksek konsantrasyon üzerinden hasarın oksidatif etki sonucu olup olmadığını hatta böyle bir etki varsa hasarın pürin bazların da mı yoksa pirimidin bazlarında mı yoğunlaştığını tespit etmek amacıyla bakteriyel enzimler Formamidopirimidin-DNA glikosilaz (FPG) ve Endonükleaz III (Endo III) kullanılarak analiz edilmiştir. Endo III spesifik olarak okside olmuş pirimidin bazlarının miktarını gösterirken Fpg spesifik olarak okside olmuş pürin bazlarının miktarını göstermektedir (Collins 2005). Spesifik olarak ise FPG enzimi fapy adenin ve fapy guanin olarak adlandırılan okside olmuş

veya alkilleyici bir ajanın adenin ve guanin bazlarında bulunan imidazol halkasına hasar oluşturulmasıyla oluşan halka-açık pürinlere (Tudek 2002) ve AP bölgeleri olarak adlandırılan pürin ya da pirimidin bazı bulundurmeyen tek iplik DNA hasarı sonucu oluşmuş özel bölgelere bağlanırlar (Dusinska 2000). Endo III enzimi ise yine bu AP bölgeleri ile oksidatif stres sonucu okside olmuş pirimidinlere spesifik olarak bağlanırlar (Xing vd 1995).

Enzim uygulamasında ise, KOMET testi sırasında hem insan periferel kan lenfositleri hem de *D. melanogaster* hemositleri üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar sonucu hazırlanan preparatlar lising solüsyonundan çıkartıldıktan sonra uygulama aşığıdaki basamaklar ile devam edilmiştir.

✓ Lising sonrası preparatlar başka bir şale içerisine alınmıştır ve üzerlerine enzim solüsyonu eklenmiştir. Bu şekilde 10 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda enzim solüsyonu dökülüp, üzerine tekrar enzim solüsyonu eklenip yine 10 dakika buzdolabında bekletilmiştir.

Enzim uygulama basamağı:

✓ -20 °C veya -80 °C'den içerisinde 10 µl enzim bulunan Fpg ve Endo III ependorfları alınıp, buz üzerine konularak üzerlerine 300 µl enzim solüsyonu eklenmiştir. İkinci 10 dakika enzim solüsyonunda bekletmeden sonra enzim solüsyonu dökülerek her bir preparat üzerine 100 µl Fpg ve Endo III enzimleri eklenmiştir. Kontrol grubu olarak da enzim solüsyonu preparatları üzerine aynı şekilde 100 µl enzim solüsyonu eklenerek preparatların üzeri lamelle kapatılmıştır. Daha sonra enzim solüsyonu, Fpg ve Endo III preparatları bir kap içerisine alınarak 30 dakika 37 °C'lik etüve kaldırılmıştır.

✓ Enzim uygulamasından sonra preparatların üzerlerindeki lameller kaldırılarak preparatlar elektroforez tankında bulunan elektroforez solüsyonu içerisine konulmuştur ve burada 30 dakika bekletilmiştir.

✓ Süre sonunda 30 dakika 25 V 300 mA'de yürütülmüştür.

✓ Elektroforezden sonra lamalar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu bulunan şale içerisine alınmıştır. Burada soğukta 5 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra preparatlar soğuk su içerisine alınıp burada da 5 dakika daha bekletilmiştir.

✓ İşlemler sonunda her bir lama 50 µl EtBr eklenerek üzerine lamel kapatılmıştır.

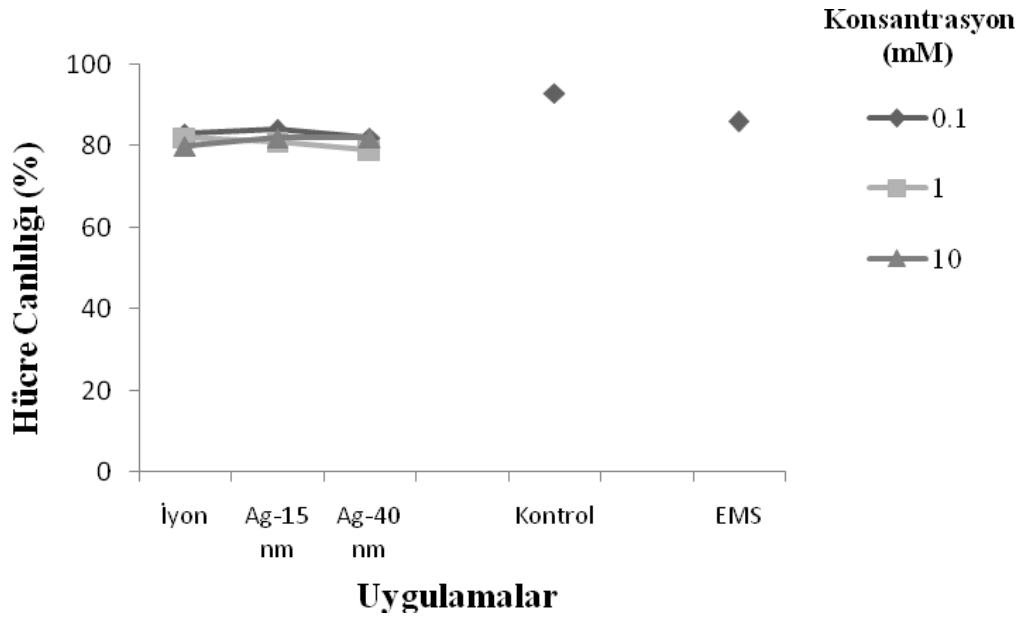
✓ Boyanan preparatlar 20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar üzerindeki buharın uçması için 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

✓ Elde edilen preparatlarda her bir preparat için insan periferal kan lenfositleri için rastgele seçilmiş 100 hücre, *D. melanogaster* hemositleri için ise rastgele seçilmiş 50 hücre 400X büyütmede Floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E200), KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm alınarak sayılmıştır (Şekil 3.5).

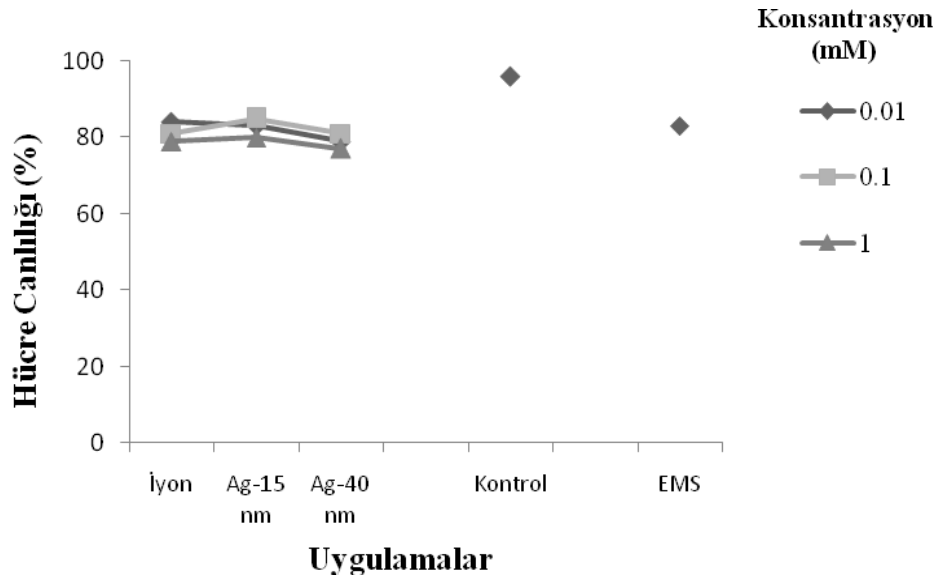
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi Sonuçları

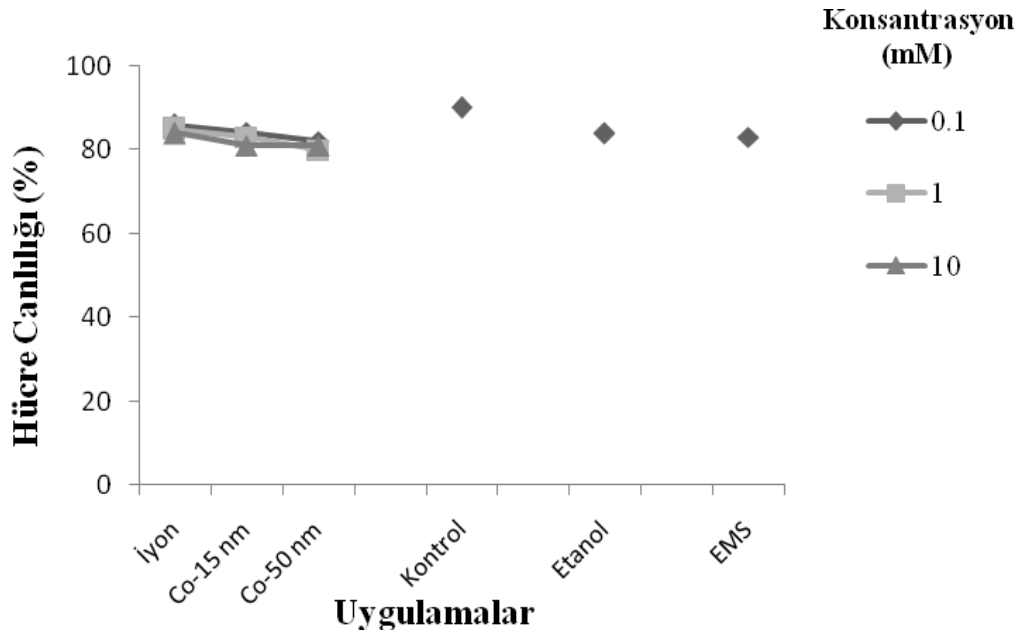
Tez çalışmasında kullanılan Ag ve Co NP'lerinin ve bu NP'lerin iyonik formlarının sitotoksik olmayan konsantrasyonları *D. melanogaster* hemositleri ve insan periferel kan lenfositleri üzerinde hücre canlılık testiyle belirlenmiştir. Her bir uygulama grubunda hücre canlılık testi için canlı ve ölü olmak üzere toplamda iki yüz hücre Floresan mikroskopta 40X büyütmede sayılmıştır. KOMET testinde sitotoksik olmayan NP konsantrasyonlarının ve bu NP'lerin iyonik formlarının çalışılabilmesi için uygulama ve kontrol gruplarındaki hücre canlılık oranı % 70 ve üzerinde olmalıdır. Bu kapsamda % 70 ve üzerinde hücre canlılık oranına sahip konsantrasyonlar çalışılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde bir yanlışlık olmaması için, KOMET testinde ölü hücrelerin verdiği kuyruk dağılımı ile apoptosis sonucu oluşan kuyruk oluşumunun ayırt edilebilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, hücre DNA'sının baş kısmı yoksa veya kontrol grubuna göre baş ve kuyruk kısımları çok fazla dağılmış ise apoptosise uğramış hücre olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir.



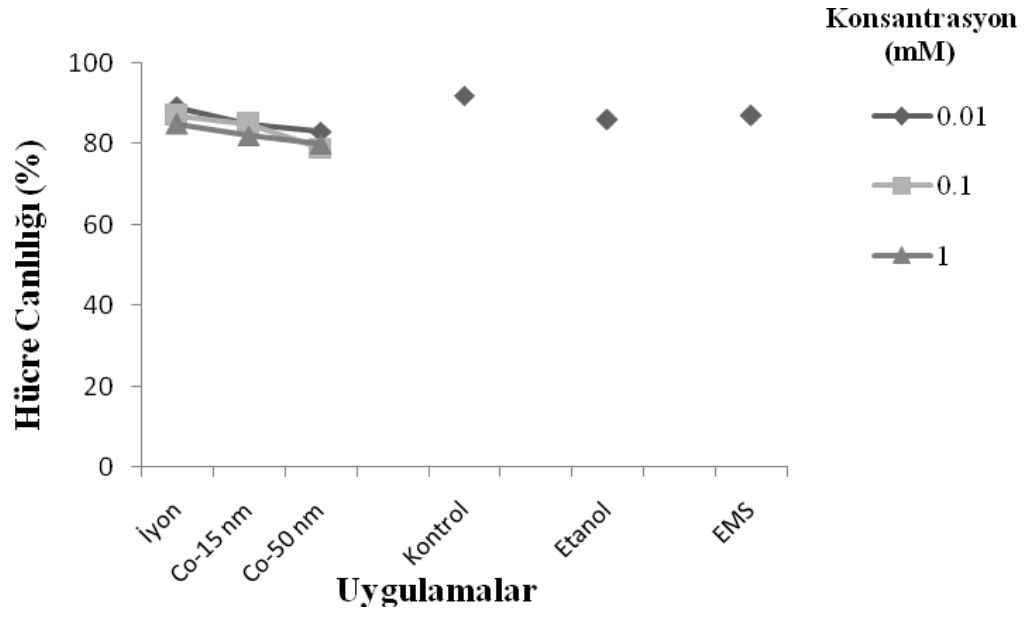
Şekil 4.1. *Drosophila* Hemositlerinde KOMET Testi ile Gümüş Nanopartikülünün (15 ve 40 nm) ve İyonik Formununun (AgNO₃) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%)



Şekil 4.2. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Gümüş Nanopartikülünün (15 ve 40 nm) ve İyonik Formunun (AgNO_3) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%)



Şekil 4.3. *Drosophila* Hemositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartikülünün (15 ve 50 nm) ve İyonik Formunun ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%)



Şekil 4.4. İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartikülünün (15 ve 50 nm) ve İyonik Formunun ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) FDA/EtBr Boyası Kullanılarak Yapılan Hücre Canlılık Testi (%)

4.2. KOMET Testinde *Drosophila melanogaster* hemositlerine ve İnsan Periferal Kan Lenfositlerine Gümüş nitrat (AgNO₃)'ın Uygulanması

KOMET testinde Gümüş (Ag) NP'ünün iyonik formu olan Gümüş nitrat (AgNO₃)'ın *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarının, insan periferal kan lenfositlerine ise 0.01, 0.1 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ve negatif kontrol olarak su ile pozitif kontrol olarak EMS'nin uygulanmasından sonra *D. melanogaster* hemositlerinde ve insan periferal kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, pozitif kontrol olarak kullanılan EMS için *D. melanogaster* hemositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri açısından, insan periferal kan lenfositlerinde ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. *D. melanogaster* hemositlerinde, AgNO₃'ın uygulanan en yüksek ve en düşük konsantrasyonunda (0.1 ve 10 mM) değerlendirilen tüm parametreler (kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu) dikkate alındığında KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir.

İnsan periferal kan lenfositlerinde ise sonuçlara göre AgNO₃'ın uygulaması yapılan en düşük ve en yüksek konsantrasyonları olan 0.01 ve 1 mM konsantrasyonlarında yine değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlemlenirken, 0.1 mM konsantrasyonunda ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi açısından KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. KOMET Testinde *D. melanogaster* Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün İyonik Formu Olan Gümüş nitrat (AgNO₃)'ın Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı

Konsantrasyon (mM)	Kuyruk Yoğunluğu (%) ^a	Kuyruk Momenti (μm) ^a	Kuyruk Uzunluğu (μm) ^a
<i>D. melanogaster</i> hemositlerinde,			
Distile su	1.17 ± 0.49	0.16 ± 0.07	22.76 ± 0.93
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	4.66 ± 1.49 *	0.77 ± 0.35	29.30 ± 1.01 ***
İyon - AgNO ₃			
0.1	3.71 ± 0.81 *	0.59 ± 0.14 **	30.36 ± 1.02 ***
1	2.04 ± 0.69	0.22 ± 0.07	25.12 ± 0.96
10	3.71 ± 0.83 *	0.50 ± 0.11 *	25.98 ± 1.05 *
İnsan periferel kan lenfositlerinde,			
Distile su	5.19 ± 0.83	1.40 ± 0.22	55.29 ± 0.97
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	21.68 ± 3.25 ***	6.32 ± 1.04 ***	53.36 ± 1.80
İyon - AgNO ₃			
0.01	11.19 ± 2.15 *	4.06 ± 0.98 *	65.48 ± 1.47 ***
0.1	7.87 ± 1.12	2.25 ± 0.36	59.63 ± 1.11 **
1	16.49 ± 3.04 ***	7.36 ± 1.58 ***	66.25 ± 2.11 ***

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

^a Deneyden elde edilen ortalama ± standart hata (deney setinde *D. melanogaster* hemositleri için toplam 50 hücre, insan periferel kan lenfositleri için toplam 100 hücre sayılmıştır).

4.3. KOMET Testinde *Drosophila melanogaster* hemositlerine ve İnsan Periferal Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün 15 nm ve 40 nm Nanoboyutlarının Uygulanması

KOMET testinde Gümüş (Ag) NP'ünün 15 ve 40 nm nanoboyutlarının *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarının, insan periferal kan lenfositlerine ise 0.01, 0.1 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ve negatif kontrol olarak su ile pozitif kontrol olarak EMS'nin uygulanmasından sonra *D. melanogaster* hemositlerinde ve insan periferal kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, pozitif kontrol olarak kullanılan EMS için *D. melanogaster* hemositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri açısından, insan periferal kan lenfositlerinde ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. *D. melanogaster* hemositlerinde Ag (15 nm) NP'ünün en yüksek konsantrasyonu olan 10 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 0.1 ve 1 mM konsantrasyonunda ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi için KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. Ag (40 nm) NP'ünün ise 10 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken 0.1 mM konsantrasyonunda sadece kuyruk uzunluğu parametresi için, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir.

İnsan periferal kan lenfositleri üzerinde yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlara göre ise, Ag (15 nm) NP'ünün uygulanan en düşük ve en yüksek konsantrasyonları olan 0.01 ve 1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 0.1 mM konsantrasyonunda kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. Ag (40 nm) NP'ünün ise 0.01 ve 0.1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk uzunluğu parametresi dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. KOMET Testinde *D. melanogaster* Larvalarına ve İnsan Periferal Kan Lenfositlerine Gümüş (Ag) Nanopartikülünün 15 ve 40 nm Nanoboyutlarının Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı

Konsantrasyon (mM)	Kuyruk Yoğunluğu (%) ^a	Kuyruk Momenti (μm) ^a	Kuyruk Uzunluğu (μm) ^a
<i>D. melanogaster</i> hemositlerinde,			
Distile su	1.17 ± 0.49	0.16 ± 0.07	22.76 ± 0.93
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	4.66 ± 1.49 *	0.77 ± 0.35	29.30 ± 1.01****
Nano - Ag (15 nm)			
0.1	4.62 ± 2.60	1.16 ± 0.75	28.22 ± 1.52**
1	2.25 ± 0.58	0.28 ± 0.09	29.02 ± 1.16****
10	4.53 ± 1.29 *	0.71 ± 0.22 *	31.02 ± 1.09****
Nano - Ag (40 nm)			
0.1	2.54 ± 0.73	0.43 ± 0.15	27.64 ± 1.03****
1	3.14 ± 0.78 *	0.47 ± 0.15	27.28 ± 1.20**
10	4.17 ± 0.98 **	0.64 ± 0.17 **	30.86 ± 1.21****
İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde,			
Distile su	5.19 ± 0.83	1.40 ± 0.22	55.29 ± 0.97
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	21.68 ± 3.25 ****	6.32 ± 1.04 ****	53.36 ± 1.80
Nano - Ag (15 nm)			
0.01	12.17 ± 1.84 ****	4.33 ± 0.74 ****	71.93 ± 1.59****
0.1	8.60 ± 1.75	3.12 ± 0.76 *	67.44 ± 1.51****
1	10.41 ± 1.51 **	3.52 ± 0.55 **	62.32 ± 2.02**

Devamı arka sayfadadır.

^a Deneden elde edilen ortalama ± standart hata (deney setinde *D. melanogaster* hemositleri için toplam 50 hücre, insan periferal kan lenfositleri için toplam 100 hücre sayılmıştır).

Çizelge 4.2'nin devamı

Nano - Ag (40 nm)			
0.01	9.34 ± 1.38 *	3.37 ± 0.54 ****	69.14 ± 1.69 ****
0.1	9.41 ± 1.19 **	3.16 ± 0.42 ****	66.38 ± 1.46 ****
1	5.60 ± 1.23	2.04 ± 0.55	61.40 ± 1.35 ****

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

4.4. KOMET Testinde *Drosophila melanogaster* hemositlerine ve İnsan Periferal Kan Lenfositlerine Kobalt klorür (CoCl₂.6H₂O)'ün Uygulanması

KOMET testinde Kobalt (Co) NP'ünün iyonik formu olan Kobalt klorür (CoCl₂.6H₂O)'ün *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarının, insan periferal kan lenfositlerine ise 0.01, 0.1 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ve negatif kontrol olarak su ve Co NP'lerinin çözücüsü olan etanol ile pozitif kontrol olarak EMS'nin uygulamalarından sonra *D. melanogaster* hemositlerinde ve insan periferal kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan EMS için *D. melanogaster* hemositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri açısından, insan periferal kan lenfositlerinde ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, *D. melanogaster* hemositlerinde Co NP'lerinin çözücüsü olan etanol için kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiş, ancak insan periferal kan lenfositlerinde etanol için herhangi bir parametre açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmemiştir. *D. melanogaster* hemositlerine yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen sonuçlara göre CoCl₂.6H₂O'ün 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmemiştir.

İnsan periferal kan lenfositleri üzerinde yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen sonuçlara göre ise CoCl₂.6H₂O'ün 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 0.01 mM konsantrasyonlarında ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. KOMET Testinde *D. melanogaster* Larvalarına ve İnsan Periferal Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün İyonik Formu Olan Kobalt klorür ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ün Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı

Konsantrasyon (mM)	Kuyruk Yoğunluğu (%) ^a	Kuyruk Momenti (μm) ^a	Kuyruk Uzunluğu (μm) ^a
<i>D. melanogaster</i> hemositlerinde,			
Distile su	1.17 ± 0.49	0.16 ± 0.07	22.76 ± 0.93
Etanol (% 3)	4.06 ± 0.86 ^{***}	0.63 ± 0.18 [*]	24.34 ± 1.69
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	4.66 ± 1.49 [*]	0.77 ± 0.35	29.30 ± 1.01 ^{***}
İyon - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			
0.1	1.14 ± 0.29	0.15 ± 0.04	23.24 ± 0.94
1	1.21 ± 0.30	0.14 ± 0.04	23.88 ± 1.02
10	2.56 ± 1.62	0.47 ± 0.36	23.54 ± 1.12
İnsan periferal kan lenfositlerinde,			
Distile su	5.19 ± 0.83	1.40 ± 0.22	55.29 ± 0.97
Etanol (% 3)	8.04 ± 1.58	2.55 ± 0.55	57.84 ± 1.26
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	21.68 ± 3.25 ^{***}	6.32 ± 1.04 ^{***}	53.36 ± 1.80
İyon - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			
0.01	14.96 ± 2.56 ^{***}	5.49 ± 1.15 ^{***}	59.63 ± 2.23
0.1	11.78 ± 2.25 ^{**}	4.22 ± 1.00 ^{**}	61.19 ± 1.90 ^{**}
1	18.10 ± 2.55 ^{**}	6.39 ± 1.17 ^{***}	64.80 ± 1.99 ^{***}

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

^a Deneiden elde edilen ortalama ± standart hata (deney setinde *D. melanogaster* hemositleri için toplam 50 hücre, insan periferal kan lenfositleri için toplam 100 hücre sayılmıştır).

4.5. KOMET Testinde *Drosophila melanogaster* hemositlerine ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün 15 ve 50 nm Nanoboyutlarının Uygulanması

KOMET testinde Kobalt (Co) NP'ünün 15 ve 50 nm nanoboyutlarının *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarının, insan periferel kan lenfositlerine ise 0.01, 0.1 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ve negatif kontrol olarak su ve Co NP'lerinin çözücüsü olan etanol ile pozitif kontrol olarak EMS'nin uygulamalarından sonra *D. melanogaster* hemositlerinde ve insan periferel kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan EMS için *D. melanogaster* hemositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri açısından, insan periferel kan lenfositlerinde ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, *D. melanogaster* hemositlerinde Co NP'lerinin çözücüsü olan etanol için kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiş, ancak insan periferel kan lenfositlerinde etanol için herhangi bir parametre açısından kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmemiştir. *D. melanogaster* hemositleri üzerinde yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen sonuçlara göre Co (15nm) NP'ünün 1 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 0.1 ve 10 mM konsantrasyonlarında ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi için KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. Co (50 nm) NP'ünün ise 0.1 ve 10 mM konsantrasyonlarında kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk uzunluğu parametresi dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir.

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde yapılan uygulamaların sonucunda elde edilen sonuçlara göre ise Co (15 nm) NP'ünün 0.1 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 1 mM konsantrasyonunda kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti, 0.01 mM konsantrasyonunda ise kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında KOMET testinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir. Co (50 nm) NP'ünün ise, 0.01 mM konsantrasyonunda kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenirken, 0.1 mM konsantrasyonunda kuyruk momenti, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. KOMET Testinde *D. melanogaster* Larvalarına ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerine Kobalt (Co) Nanopartikülünün 15 ve 50 nm Nanoboyutlarının Uygulanmasından Sonra Meydana Gelen DNA rı

Konsantrasyon (mM)	Kuyruk Yoğunluğu (%) ^a	Kuyruk Momenti (μm) ^a	Kuyruk Uzunluğu (μm) ^a
<i>D. melanogaster</i> hemositlerinde,			
Distile su	1.17 ± 0.49	0.16 ± 0.07	22.76 ± 0.93
Etanol (% 3)	4.06 ± 0.86 ^{**}	0.63 ± 0.18 [*]	24.34 ± 1.69
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	4.66 ± 1.49 [*]	0.77 ± 0.35	29.30 ± 1.01 ^{***}
Nano - Co (15 nm)			
0.1	2.75 ± 0.68	0.45 ± 0.13	28.48 ± 1.31 ^{***}
1	4.78 ± 1.26 [*]	0.82 ± 0.25 [*]	28.54 ± 1.14 ^{***}
10	2.41 ± 0.66	0.38 ± 0.12	27.86 ± 0.96 ^{***}
Nano - Co (50 nm)			
0.1	2.74 ± 0.62 [*]	0.40 ± 0.10 [*]	24.96 ± 1.20
1	2.39 ± 0.66	0.31 ± 0.10	25.84 ± 1.20 [*]
10	6.89 ± 1.86 ^{**}	1.11 ± 0.32 ^{**}	26.22 ± 1.73
İnsan periferel kan lenfositlerinde,			
Distile su	5.19 ± 0.83	1.40 ± 0.22	55.29 ± 0.97
Etanol (% 3)	8.04 ± 1.58	2.55 ± 0.55	57.84 ± 1.26
Pozitif kontrol (4 mM EMS)	21.68 ± 3.25 ^{***}	6.32 ± 1.04 ^{***}	53.36 ± 1.80

^a Deneiden elde edilen ortalama ± standart hata (deney setinde *D. melanogaster* hemositleri için toplam 50 hücre, insan periferel kan lenfositleri için toplam 100 hücre sayılmıştır).

Çizelge 4.4'ün devamı

Nano - Co (15 nm)			
0.01	8.22 ± 1.98	3.28 ± 0.99	62.65 ± 1.71***
0.1	10.59 ± 1.80**	3.71 ± 0.80**	63.90 ± 1.46***
1	9.67 ± 1.88*	3.37 ± 0.87*	58.27 ± 1.54
Nano - Co (50 nm)			
0.01	9.20 ± 1.95	3.73 ± 1.04*	65.00 ± 1.87***
0.1	9.43 ± 2.04	3.59 ± 1.01*	57.32 ± 1.67
1	5.86 ± 1.06	1.44 ± 0.27	48.00 ± 1.03***

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's *t*-testi).

4.6. *Drosophila melanogaster* hemositlerinde ve İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Bakteriyal Enzim Uygulaması

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulaması yapılan konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı gözlemlenen pozitif etki ile belirlenen genotoksisitenin oksidatif etki sonucu olup olmadığı ve bu oksidatif etkinin meydana getirdiği hasarın pürin bazların da mı yoksa pirimidin bazların da mı yoğunlaştığı bakteriyal enzimler Formamidopirimidin-DNA glikosilaz (Fpg) ve Endonükleaz III (Endo III) kullanılarak insan periferel kan lenfositlerinde ve *D.melanogaster* hemositlerinde uygulanan en yüksek konsantrasyon için KOMET testi ile analiz edilmiştir. Endo III spesifik olarak okside olmuş pirimidin bazlarının miktarını gösterirken Fpg spesifik olarak okside olmuş pürin bazlarının miktarını göstermektedir (Collins 2005). Yapılan analizler sonucunda bu hasarı değerlendirmek amacıyla KOMET testinde değerlendirilmesi yapılan konsantrasyonlar bakımından kuyruk yoğunluğu (%) parametresi(Collins vd. 1999, Dusinska 2000, Demir vd 2013, Demir vd 2014) kullanılmıştır.

D.melanogaster hemositlerinde KOMET testi ile Ag NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının Endo III uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pirimidin bazlarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *D. melanogaster* Hemositlerinde KOMET Testi ile Ag Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (10 mM) Bakteriyal Enzim Uygulaması

<i>D.melanogaster</i> hemositlerinde	Kuyruk Yoğunluğu(%) ^a		
	Enzim Buffer	Endo III	FPG
Su	3.22±1.09	2.04±1.00	7.57±2.45
EMS	22.21±4.20 ^{***}	16.16±3.95 ^{***}	17.56±3.44 [*]
İyon(AgNO ₃)	13.16±3.11 ^{**}	13.66±3.58 ^{**}	14.19±3.32
Ag (15 nm)	13.33±3.26 ^{**}	9.11±2.78 [*]	18.82±3.80 [*]
Ag (40 nm)	7.69±2.64	12.24±2.75 ^{***}	15.18±3.39

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

^a Elde edilen ortalama \pm standart hata (toplam 50 hücre sayılmıştır).

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi ile Ag NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyel enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Ag Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (1 mM) Bakteriyel Enzim Uygulaması

İnsan periferel kan lenfositlerinde	Kuyruk Yoğunluğu(%) ^a		
	Enzim Buffer	Endo III	FPG
Su	1.86±0.50	3.57±1.40	1.82±0.60
EMS	26.77±3.60 ^{***}	25.53±3.42 ^{***}	18.24±3.04 ^{***}
İyon(AgNO ₃)	4.60±0.78 ^{**}	6.76±1.64	5.47±1.93
Ag (15 nm)	5.33±1.56 [*]	7.13±1.89	6.82±1.32 ^{***}
Ag (40 nm)	8.90±1.18 ^{***}	7.54±1.71	9.97±2.10 ^{***}

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

^a Elde edilen ortalama \pm standart hata (toplam 100 hücre sayılmıştır).

D. melanogaster hemositlerinde KOMET testi ile Co NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Co NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.7)

Çizelge 4.7. *D. melanogaster* Hemositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (10 mM) Bakteriyal Enzim Uygulaması

<i>D.melanogaster</i> hemositlerinde	Kuyruk Yoğunluğu(%) ^a		
	Enzim Buffer	Endo III	FPG
Su	3.22±1.09	2.04±1.00	7.57±2.45
EMS	22.21±4.20 ^{***}	16.16±3.95 ^{***}	17.56±3.44 [*]
Etanol	2.60±1.56	4.94±2.13	7.56±2.54
İyon(CoCl ₂ .6H ₂ O)	7.25±3.09	6.64±2.65	19.44±5.12 [*]
Co (15 nm)	7.54±2.90	9.26±3.49	23.04±5.43 ^{**}
Co (50 nm)	7.92±2.85	14.31±4.62 [*]	40.39±6.49 ^{***}

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

^a Elde edilen ortalama ± standart hata (toplam 50 hücre sayılmıştır).

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi ile Co NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyel enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Co NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde KOMET Testi ile Kobalt Nanopartiküllerinin ve İyon Formunun İyon Formunun En Yüksek Konsantrasyonuna (1 mM) Bakteriyel Enzim Uygulaması

İnsan periferel kan lenfositlerinde	Kuyruk Yoğunluğu(%) ^a		
	Enzim Buffer	Endo III	FPG
Su	1.86±0.50	3.57±1.40	1.82±0.60
EMS	26.77±3.60 ^{***}	25.53±3.42 ^{***}	18.24±3.04 ^{***}
Etanol	2.57±0.45	3.51±0.98	3.51±1.02
İyon(CoCl ₂ .6H ₂ O)	5.16±1.43 [*]	6.87±1.50	4.09±0.80 [*]
Co (15 nm)	6.01±1.29 ^{**}	7.63±1.60	7.47±1.86 ^{**}
Co (50 nm)	6.70±1.27 ^{***}	12.20±2.37 ^{**}	8.88±1.58 ^{***}

EMS, Etil Metan Sülfonat.

* Distile suya göre $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

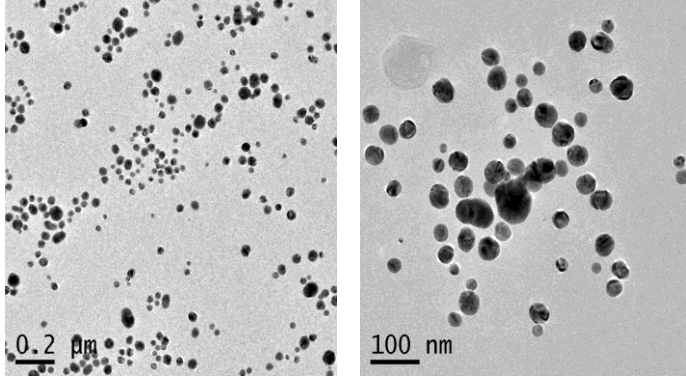
** Distile suya göre $P \leq 0.01$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

*** Distile suya göre $P \leq 0.001$ düzeyinde anlamlı (Student's t-testi).

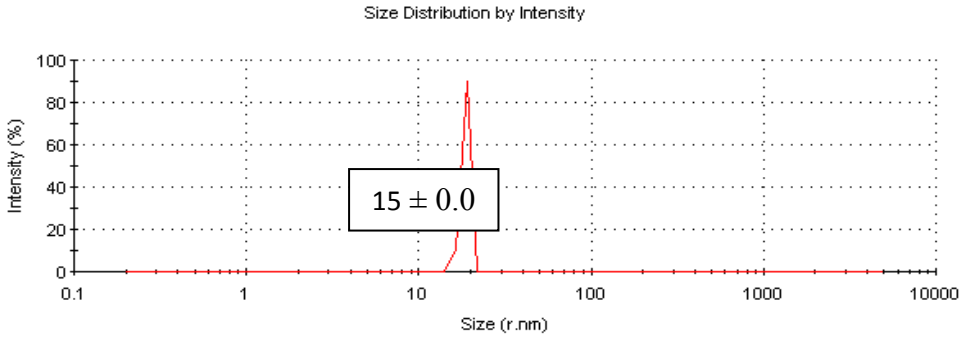
^a Elde edilen ortalama ± standart hata (toplam 100 hücre sayılmıştır).

4.7. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP - 15 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

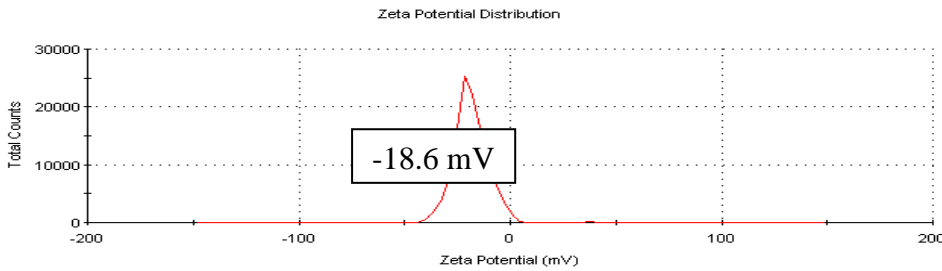
A. *



B.



C.

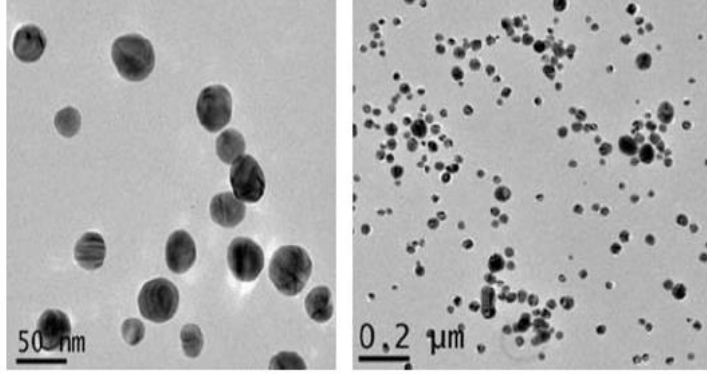


Şekil 4.5. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP - 15 nm) Karakterizasyonu. (A) Ag NP'nün JEOL JEM-2011 Model Cihaz ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü (B) Partikül Büyüklük Dağılımı ve (C) Zeta Potansiyeli

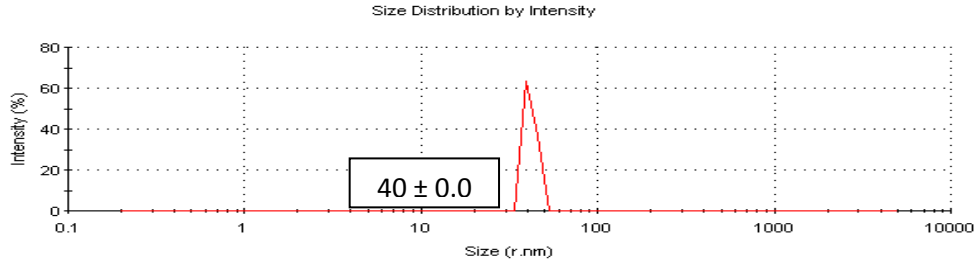
* Ag 15 nm NP'nün JEOL JEM-2011 model cihaz ile Transmisyon Elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü, Universitat Autònoma de Barcelona'da görüntülemiştir.

4.8. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP – 40 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

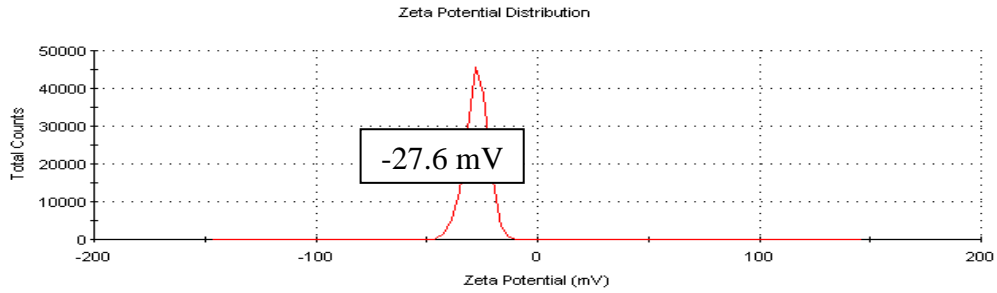
A. *



B.



C.

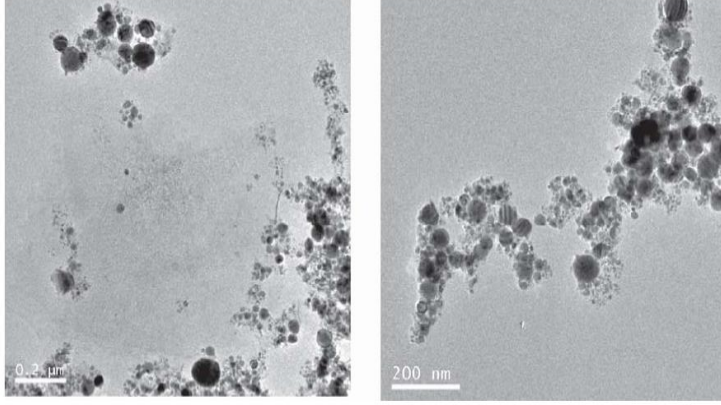


Şekil 4.6. Gümüş Nanopartikülünün (Ag NP - 40 nm) Karakterizasyonu. (A) Ag NP'nün JEOL JEM-2011 Model Cihaz ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü (B) Partikül Büyüklük Dağılımı ve (C) Zeta Potansiyeli

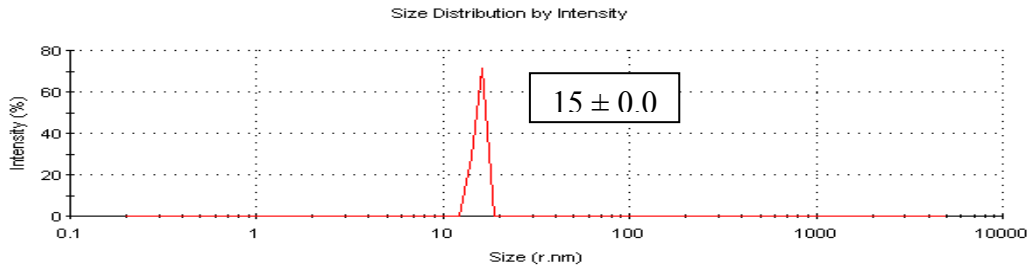
* Ag 40 nm NP'nün JEOL JEM-2011 model cihaz ile Transmisyon Elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü, Universitat Autònoma de Barcelona'da görüntülenmiştir.

4.9. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP – 15 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

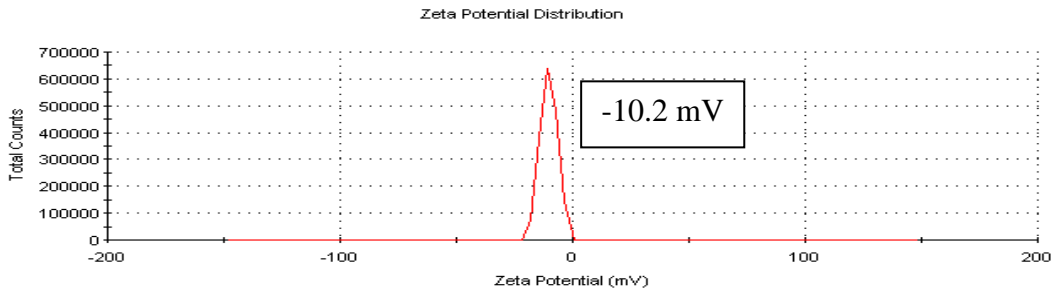
A. *



B.



C.

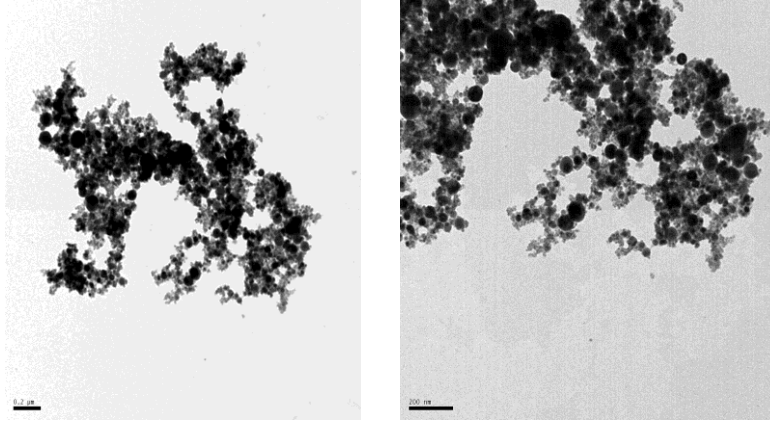


Şekil 4.7. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP - 15 nm) Karakterizasyonu. (A) Co NP'nün JEOL JEM-2011 Model Cihaz ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü (B) Partikül Büyüklük Dağılımı ve (C) Zeta Potansiyeli

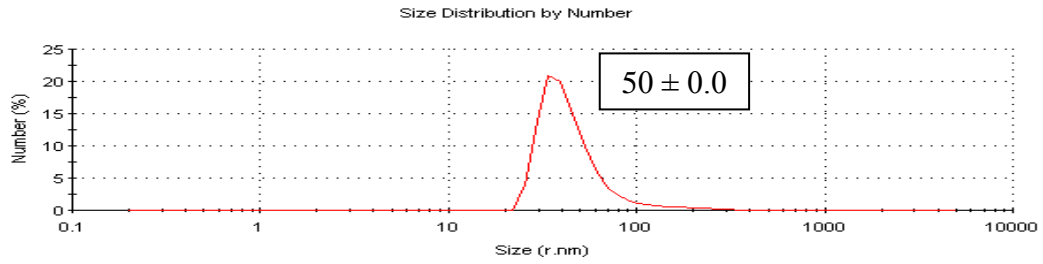
* Co 15 nm NP'nün JEOL JEM-2011 model cihaz ile Transmisyon Elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü, Universitat Autònoma de Barcelona'da görüntülemiştir.

4.10. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP – 50 nm) Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

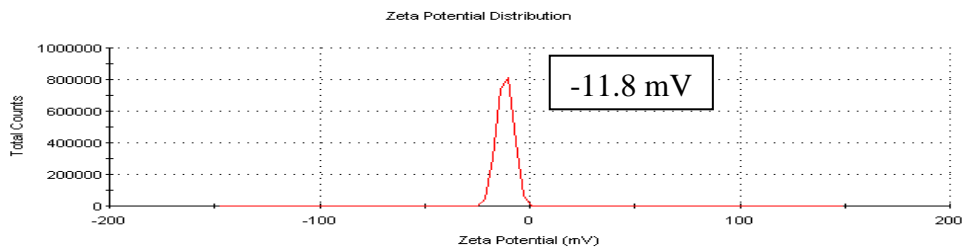
A. *



B.



C.



Şekil 4.8. Kobalt Nanopartikülünün (Co NP - 50 nm) Karakterizasyonu. (A) Co NP'nün JEOL JEM-2011 Model Cihaz ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü (B) Partikül Büyüklük Dağılımı ve (C) Zeta Potansiyeli

* Co 50 nm NP'nün JEOL JEM-2011 model cihaz ile Transmisyon Elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü, Universitat Autònoma de Barcelona'da görüntülemiştir.

5. TARTIŞMA

Hücre birçok farklı fiziksel ve kimyasal ajana maruz kaldığında, bu ajanların genotoksisiteyi indükleyebilme yetenekleri vardır. Bu tür maruziyetlere karşı insan vücudu, çeşitli enzimler vasıtasıyla detoksifikasyon mekanizması gibi yanıtlarla meydana gelen hasarı düzeltme yoluna gitmektedir. Ancak savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda maruz kalınan madde canlı yapısında çeşitli genetik etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Genetik materyalin hasar görmesi sonucunda çeşitli mutasyonlar, hücre döngüsü kontrolünün bozulmasını takiben kontrolsüz hücre bölünmesiyle kanserleşme ve bunların yanı sıra hücre ölümü gerçekleşebilmektedir. Bu bağlamda bu şekildeki maruz kalmaların neden olabileceği genetik hasarın ortaya çıkarılmasında birçok *in vitro* ve *in vivo* test sistemlerinde farklı model organizmalar kullanılmaktadır. Belirli bir ajanın oluşturabileceği risk araştırılırken bu ajanın etki gösterebileceği en önemli hedeflerinden birisinin de genetik materyal olduğu dikkate alınmalıdır. Bu nedenle fiziksel ve kimyasal ajanların insan yapısıyla ilişkilerine göre KOMET testi ile *in vitro* (insan periferel kan lenfositlerinde) ve *in vivo* (*D. melanogaster* kan hücreleri olan hemositleri) ökaryotik organizmaların kullanılması önemli bir ilişki sağlamaktadır.

Nanoteknoloji alanındaki hızlı gelişmelerden dolayı şu anda Dünya çapında 20'den fazla ülkede özellikle kozmetik alanı olmak üzere birçok alanda NP kullanılmak üzere üretilmekte ve satılmaktadır. NP'lerin günümüzde fiziksel olarak davranışlarındaki değişim nedeniyle günlük hayatımızda birçok alandaki kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Nanoteknolojinin son zamanlarda girdiği alanlar (kozmetik ve farmasötiklerde olmak üzere klinik uygulamalarda, gıda katkıları, boyar maddeler, kâğıt, plastikler ve boyalar) dikkate alındığında günlük hayatımızın içinde ne oranda yaygın oldukları daha iyi anlaşılacaktır. Son yıllarda NP'lerin endüstriyel teknolojideki kullanımının artmasına rağmen önemli hedeflerden olan genetik materyal ve çevreye olası zararlı etkileri tartışılmaktadır (Lux Report 2008). Bu moleküllere gerek üretim gerekse de kullanım sırasında maruz kalmalarından dolayı bu partiküllerin meydana getirebilecekleri olası genetik hasarların da farklı test yöntemleri ile araştırılması gerekmektedir. Bugün bu maddelerin genotoksik potansiyellerinin ne olduğu konusuna ilgi giderek artmakta ve hem *in vivo* hem de *in vitro* test sistemlerinde bu NP'lerin genotoksik etkileri incelenmektedir. NP'ler boyutları sebebiyle daha büyük moleküllere oranla farklı özelliklere sahiptirler. Bu farklılıklar bir maddenin karakterini tanımlayan özellikler açısından gözlemlenmektedir. Özellikle yüzey atomlarının oranının artışı materyallerin davranışsal özellikleri üzerinde belirgin değişiklikler meydana getirdiğinden oldukça önemlidir. Örneğin, normal boyutlarda altın elementinin rengi belirgin bir sarı olarak gözlemlenirken, nanoboyutlarda altın kırmızı renkte gözlemlenmektedir. Artan yüzey/hacim oranı maddenin katalitik özelliklerini değiştirdiğinden maddeyi tanımlayan renk, elektriksel geçirgenlik ya da adhezyon kuvveti gibi özellikler nanoboyutlarda tamamen değişebilmektedir. Yine nanoboyutlarda, normal koşullarda bir madde üzerinde etkili olan Newton fiziği kuralları yerini Kuantum fiziği kurallarına bırakmaktadır. Bu sebeple nanoboyutlarda bir materyal parçacık yerine dalga özelliği gösterebilmekte, yerçekimsel kuvvetin bağlayıcı durumlarından kurtulabilmekte ya da elektriksel olarak iletkenlik kazanabilmektedir (Filipponi ve Sutherland, 2010). Biyolojik olarak ise NP'lerin boyutları ve bu boyutlara bağlı olarak kazandığı fiziksel ve kimyasal özellikler sebebi

ile neden olabileceği olumsuz sonuçlar arasında bir ilişki olduğu bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Clurg vd 1998; Colvin vd 2003, Oberdörster 2004).

NP'lerin günlük yaşamda çok farklı alanlarda kullanılmasından dolayı son zamanlarda NP'lerin genotoksikolojisi ile ilgili olası zararlı etkilerinin ortaya çıkarılmasına ilişkin yapılan bilimsel çalışmaların yoğunluğu dikkat çekmektedir (Landsiedel vd 2009, Singh vd 2009, Demir vd 2011a). NP'ler insan vücudu içerisine çeşitli yollarla (solunum, beslenme ve enjeksiyon gibi) girebilmektedir (Koeneman vd 2010). Bu bağlamda NP'lerin insan ve çevre sağlığı üzerinde oluşturabileceği etkileri araştırmak amacıyla toksikolojik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Wiesner 2006, Demir vd 2011a, Demir vd 2014, Vales vd 2013). NP'lerin toksik özellikleri kimyasal kompozisyonu, miktarı, çözünürlüğü, şekli, yüzey alanı ve yüzey yükleri gibi parametrelere bağlıdır. Ayrıca NP'lerin üretimi sırasında kaynaklanan safsızlıklar da toksisitesini etkilemektedir. Farklı canlı türleri ve bitkiler NP'lere farklı hassasiyetler göstermektedir. NP'lerin genotoksitesisi ile ilgili farklı çalışmalar mevcuttur. Ancak, *in vivo* test yöntemi olan tek hücre alkali jel elektroforezi testi (KOMET) ile *D. melanogaster* hemositleri ve insan periferik kan lenfositleri üzerinde bu çalışma kapsamında kullanılan farklı nano boyutlara sahip Ag (15 ve 40 nm) ve Co (15 ve 50 nm) NP'leri ve bu nanopartiküllerin iyonik formuna dair yapılmış herhangi bir bilimsel çalışma mevcut değildir.

NP'lerin çok farklı alanlarda özellikle insan ve çevre açısından maruziyetin fazla olduğu medikal ve endüstriyel alanlarda çeşitli avantajları sebebiyle yaygın olarak kullanımlarına rağmen insan sağlığına ve çevreye karşı olumlu ya da olumsuz etkileri hakkındaki bilgiler hala oldukça yetersizdir. Özellikle kullanım alanları bu kadar yaygın olan bu NP'lerin insan sağlığı ve gelecek nesilleri üzerinde ne gibi etkileri olabileceği gündemde yer alan önemli bir tartışma konusudur (Colvin 2003, Gogotsi 2003, Nel vd 2006).

Bu nedenle son teknoloji ürünü bu maddelerin genotoksik potansiyellerinin tespiti bu maddelerin biyo-güvenilirliği bakımından önemlidir. Günümüzde birçok hastalığın gerek farklı mutasyonlar gerekse indüklenmiş rekombinasyon ile ilintili olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda toplum sağlığı bakımından yoğun maruz kalınan bu tür maddelerin olası etkilerinin tespiti önemlidir. Son yıllarda bu konu üzerinde çalışmaların yoğunlaşması sebebiyle bu alanda özgün bilimsel toplantıların organize edilmesi yaygınlaşmıştır.

Bu sebeple son yıllarda deodorantlar, bandajlar, temizleme solüsyonları, kateterler, kıyafetler, elektrikli ev aletleri, elektrolizle kaplamada, boyalarda kurutma ajanı, pigmentlerde ve hayvansal gıdalarda katkı maddesi ürünlerde her geçen gün kullanımı yaygınlaşan Ag ve Co NP'lerinin potansiyel genotoksik etkilerini değerlendirmek önemli hale gelmiştir. Bu amaçla araştırmacılar Ag ve Co NP'lerinin *in vivo* ve *in vitro* etkilerini araştırmak amacıyla bu alanda çalışmalara önem vermişlerdir (Demir vd 2011a, Flower vd 2012, Ghosh vd 2012, Vales vd 2013). Bu bağlamda tez çalışması kapsamında Ag ve Co NP'lerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla *D. melanogaster* hemositleri ve insan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır.

D. melanogaster hemositleri üzerinde yapılan uygulamaların değerlendirme sonuçlarına bakıldığında hem Ag NP'lerinin her iki nanoboyutunun hem de bu NP'lerin iyonik formu olan AgNO₃'ün istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla genotoksik etki meydana getirdiği gözlemlenmiştir. İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde yapılan uygulamaların değerlendirme sonuçlarına bakıldığında yine hem Ag NP'lerinin her iki nanoboyutunun hem de bu NP'lerin iyonik formu olan AgNO₃'ün genotoksik etki meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Ancak iki uygulama grubunun sonuçlarında doza bağımlı olarak artan ya da azalan bir etkiye rastlanmamıştır. Literatürde daha önce yapılan çalışmalara baktığımızda Ghosh ve arkadaşlarının (2012) insan periferel kan lenfositleri kullanılarak KOMET yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada 90-180 nm arasında boyutlara sahip Ag NP'lerinin neden olduğu genotoksik hasarı araştırmış ve sonuçta uygulanan bazı Ag NP konsantrasyonlarında (25, 50 ve 200 µg/mL) genotoksik etkinin olduğu ve bazı konsantrasyonlarda (100 ve 150 µg/mL) ise herhangi bir genotoksik etkinin olmadığı gözlemlenmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada ise, insan periferel kan lenfositleri kullanılarak KOMET yöntemi ile 40-60 nm arasında boyutlara sahip Ag NP'lerinin 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının genotoksik hasara neden olduğu belirtilmiş ancak doza bağlı bir etki gözlemlenmemiştir (Ghosh vd 2012, Flower vd 2012). Bu bağlamda bizim çalışmamızda gözlemlediğimiz doza bağımlı olmayan genotoksik etki sonuçları literatürde yer alan bu çalışmalar ile örtüşmektedir. İki ayrı hedef hücre üzerinde meydana gelen genotoksik etkiyi karşılaştırdığımızda ise insan periferel kan lenfositleri üzerinde meydana gelen istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı DNA hasarının *D. melanogaster* hemositleri üzerinde meydana gelen istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı DNA hasarına göre istatistiksel olarak oranla daha fazla olmasının sebebinin *in vivo* uygulama grubunda meydana gelen oksidatif stresin bir kısmının hücresel antioksidan mekanizmalarının aktivasyonu sonucunda ortadan kaldırılması olduğu düşünülmektedir (Tavares vd 2012, Koca ve Karadeniz 2003).

Ayrıca bu çalışmada Ag ve Co NP'lerinin iki farklı nanoboyutu çalışılmış ve bu farklı nanoboyutlarda NP'lerin genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Tez kapsamında çalışılan Ag 15 nm ve Ag 40 nm NP'leri ile Co 15 nm ve Co 50 nm NP'lerinin neden olduğu genotoksisite kendi aralarında boyutları bakımından karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirilmeler sonucunda iki farklı nanoboyutta Ag ve Co NP'lerinin neden olduğunu genotoksisitenin boyutlarına bağımlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç literatür taramasında karşılaştığımız farklı nanoboyutlarda Ag NP'lerinin neden olduğu DNA hasarının KOMET testi ile araştırıldığı başka bir çalışmanın boyut bağımlı olmayan DNA hasarının gözlemlendiği sonuçları ile paralellik göstermektedir (Gluga vd 2014).

Meydana gelen istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla anlamlı olan DNA hasarının literatür bilgilerine dayanarak, ROS türevlerinin artışı (Hussain vd 2005), ATP sentezinin engellemesi (Asharani vd 2009), sitokinlerin salınımı ve heat-shock proteinlerinin up regülasyonu (Kiruba vd 2010, Sung vd 2009, Kruszewski vd 2011), oksidatif stresi indüklenmesi (Mei vd 2012) gibi mekanizmalar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında farklı test metodları ve farklı organizmalar kullanılarak yapılan araştırmalarda Ag NP'lerinin genotoksik etkileri sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir. (Ahamed vd 2008, Arora vd 2008, Hackenberg vd 2011, Li vd 2012, Patlolla vd 2012, Wijnhoven vd 2009,

Lankoff vd 2012, Kim vd 2008, Dziendzikowska vd 2012, Sung vd 2009, Bouwmeester vd 2011, Braydich-Stolle vd 2005, Asare vd 2012).

Bu çalışmada kullanılan diğer bir NP olan Co NP'leri ve bu NP'ün iyonik formu olan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ile *D. melanogaster* hemositleri üzerinde yapılan uygulamaların değerlendirme sonuçlarına göre $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ uygulanan hemositlerde istatistiksel olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pozitif genotoksik etkiye rastlanmazken Co NP'lerinin 15 ve 50 nm boyutlarında istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla pozitif genotoksik etki gözlemlenmiştir. İnsan periferik kan lenfositleri üzerinde Co NP'ü ve bu NP'ün iyonik formu olan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ün uygulanmasının ardından değerlendirilen sonuçlarda ise hem $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hem de Co 15 ve 50 nm NP'lerinin uygulandığı gruplarda istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla genotoksik etki gözlemlenmiştir. Hem insan periferik kan lenfositleri üzerinde yapılan uygulamanın sonuçları, hem de *D. melanogaster* hemositleri üzerinde yapılan uygulamanın sonuçları incelendiğinde gözlemlenen genotoksik etkinin doza bağımlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda yapılan literatür taramasında karşılaştığımız yapılan bir çalışmada 100-500 nm boyutlara sahip Co NP'lerinin genotoksik etkileri insan periferik kan lökositlerinde KOMET yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuçta doza bağımlı olarak Co NP'lerinin genotoksik etkiye neden olduğu gözlenmiş (Colognato vd 2008), ancak başka bir çalışmada ise Co NP'lerinin genotoksitesisi 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında MN ve KOMET testleriyle Balb/3T3 fare fibroblast hücrelerinde değerlendirilmiş hem KOMET hem de MN testlerinin sonucunda genotoksitesite gözlemlenmiş ancak bunun doza bağımlı olmadığı belirtilmiştir (Ponti vd 2009). Bu açıdan bizim sonuçlarımız doza bağımlı olmayan genotoksitesinin gözlemlendiği çalışma ile paralellik göstermektedir.

İki ayrı uygulama grubu karşılaştırıldığında *D. melanogaster* hemositleri üzerinde özellikle $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ uygulaması sonrasında istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı DNA hasarının olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin *D. melanogaster* larvalarında NP'lere ve iyonik formlarına maruziyet sonrasında oluşan oksidatif stresin hücrel antioksidan savunma sistemleri (Koca ve Karadeniz 2003) aracılığıyla ortadan kaldırılması olduğu düşünülmektedir .

Co NP'leri ve $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ uygulamasından sonra meydana gelen istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla anlamlı olan DNA hasarının literatür bilgilerine dayanarak, bu hasarı meydana getiren pek çok etkinin oksidatif hasarın indüklenmesine (Lison vd 2001), serbest radikaller tarafından veya çinko-parmak bölgelerindeki çinkonun değişimi ve redükte glutatyonun seviyesindeki azalmanın DNA tamir mekanizmasının inhibe olmasına (Desoize 2002) ve Co NP'lerinin reaktif oksijen türleri oluşturması ve buna bağımlı olarak oksidatif DNA hasarına sebep olması (Alarifi vd 2013, Papis vd 2009, Sabbioni vd 2014) olduğu düşünülmektedir.

Genel olarak baktığımızda Ag NP'lerinin Co NP'lerine oranla istatistiksel olarak daha pozitif sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin literatürde yapılan başka bir çalışmaya göre, Ag NP'lerinin diğer bazı NP'lere oranla toksisitesinin fazla olduğu, mitokondriyal bozukluklara sebep olduğu, ROS türevlerini arttırdığı, DNA hasarını, hücre ölümünü artırma potansiyelinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Hackenberg vd 2011).

İstatistiksel değerlendirme sonucunda pozitif etki gözlenmesinin ardından insan periferel kan lenfositleri ve *D. melanogaster* hemositleri üzerinde Ag ve Co NP'lerinin ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının ağırlıklı olarak okside olmuş pürin bazlarında mı yoksa okside olmuş pirimidin bazlarında mı olduğunun gözlemlenebilmesi için Endo III ve FPG bakteriyal enzimlerinin KOMET testi ile uygulamaları sonucunda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Endo III spesifik olarak okside olmuş pirimidin bazlarının miktarını gösterirken Fpg spesifik olarak okside olmuş pürin bazlarının miktarını göstermektedir (Collins 2005).

Sonuç olarak insan periferel kan lenfositlerinde Ag ve Co NP'lerinin ve bu NP'lerin iyonik formlarının uygulamaları sonucunda meydana gelen oksidatif DNA hasarının ağırlıklı olarak okside olmuş pürin bazlarında, *D. melanogaster* hemositlerinde ise Ag NP'lerinin ve bu NP'ün iyonik formunun uygulaması sonucunda meydana gelen oksidatif DNA hasarının ağırlıklı olarak okside olmuş pirimidin bazlarında, Co NP'lerinin ve bu NP'ün iyonik formunun uygulamaları sonucunda meydana gelen oksidatif DNA hasarının ise ağırlıklı olarak okside olmuş pürin bazlarında meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu bağlamda Ag ve Co NP'lerinin ve bu NP'lerin iyonik formlarının oluşturduğu oksidatif tek iplik DNA hasarının ağırlıklı olarak pürin bazlarının okside olması sebebiyle gerçekleştiği söylenebilir. Ancak her iki grup bakteriyal enzimde okside olmuş pürin ve pirimidinlere bağlandığından bakteriyal enzim uygulamaları sonucunda oksidatif hasarın varlığı desteklenmiştir (Dusinska 2000). Tez çalışması oksidatif tek iplik DNA hasarının hangi baz gruplarında daha fazla gerçekleştiğinin gösterilmesi açısından dikkat çekicidir.

NP'ler genel bilgiler kısmında da ifade edildiği gibi ilaç-kozmetik, gıda, tekstil, kimya, malzeme, bilişim, otomobil ve metal endüstrileri gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu nanoboyuttaki partiküllerin alıcı ortamlarda ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda çalışmalara son 10 yılda hız verilmesine rağmen hala cevaplandırılması gereken birçok soru ve literatürde NP'lerin organizmalara etkileri konularında güvenilir ve yeterli sayıda araştırma bulunmamaktadır. Çevresel uygulamalarında birçok avantajları olmasına rağmen NP'ler ciddi sağlık sorunlarına sebep olabilmektedir. Potansiyel sağlık ve ekolojik etkilerinden dolayı gittikçe popüler hale gelen nanoteknoloji konusunda özellikle gelişmiş ülkelerde toplum baskısı artmaktadır. Bundan dolayı NP'lerin organizmalara olan etkilerinin daha iyi tayini için gelişmiş *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da yapılmalıdır.

Sonuç olarak yapılan çalışmanın, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda KOMET testi ile *Drosophila* hemositleri ve insan periferel kan lenfositlerinde farklı genetik sonuçları örneğin tek iplik DNA hasarını kapsamaması ve bunun yanı sıra DNA hasarı sonucu KOMET testi ile ağırlıklı olarak hasarın hangi baz gruplarında (pürin veya pirimidin) daha fazla olduğunu saptayabilen yöntemler ile değerlendirilmiş olması, literatürde bu çalışma kapsamında olduğu gibi iki farklı nanoboyutta Ag ve Co NP'lerinin *Drosophila* hemositleri ve insan periferel kan lenfositlerinde genotoksik etkisinin KOMET yöntemi ile test edildiği bir araştırmaya rastlanılmamış olması nedeniyle önemlidir. Bu bakımdan, sonuçların orijinalliği ve *in vivo-in vitro* koşullarda elde edilmiş olması ve elde edilen sonuçların KOMET testi için pozitif olması da nanoteknoloji bakımından önemlidir ve daha farklı test sistemleri ve organizmalarla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Nanopartiküller (NP) boyutları 100 nm ve 100 nm'nin altında kalan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Bu partiküller nanoboyutlu malzemelerin temelini oluşturduklarından dolayı nanoteknolojinin en önemli unsurlarından kabul edilmektedir. NP'ler boyutları sebebiyle benzersiz özelliklere sahiptirler ve bu özellikleri kendilerine özgü kuantum etkileri ile ilişkilidir. Bu benzersiz özelliklerinin getirdiği avantajlar sebebiyle NP'ler, yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bu nedenle bu partiküller insan hayatının hemen her alanında yer alan teknolojik materyaller haline gelmiştir. Ancak NP'lerin çok farklı alanlarda bu kadar yaygın kullanılmasına karşın insan sağlığına ve çevreye etkileri hakkındaki bilgiler hala oldukça yetersizdir. Bu sebeple bu çalışmada KOMET ya da SCGE olarak adlandırılan Tek Hücre Jel Elektroferez testi ile nanoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılan Gümüş (Ag) ve Kobalt (Co) NP'lerinin iki farklı partikül büyüklüğünün (Ag: 15 ve 40 nm; Co: 15 ve 50 nm) ve bu NP'lerin iyonik formlarının *D. melanogaster* hemositleri ve insan periferik kan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan Ag (15 ve 40 nm) ve Co (15 ve 50 nm) NP'leri belirlenen nanoboyutlarda sentezlendikten sonra, büyüklük dağılımı (size distribution), zeta potansiyellerinin ölçümü ve yoğunluklarının ölçümü ile karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Kullanılan NP'ler JEOL JEM-2011 Model Cihaz ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Bu NP'lerin partikül büyüklük dağılımları ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan NP'lerin ve bu NP'lerin iyonik formlarının yoğunluk ölçümleri ise Anton Paar DMA 4500 4 model spesifik gravite ve konsantrasyon ölçer cihaz ile yapılmıştır.

Ag NP (15 ve 40 nm)'lerinin ve iyon formunun *D. melanogaster* hemositleri üzerinde KOMET testi ile 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında hücre canlılık testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında, hücre canlılık oranının uygulaması yapılan her konsantrasyon grubunda sitotoksik olmayan dozlar için uluslararası çalışmalarda eşik değer olarak kabul edilen % 70'in üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

D. melanogaster hemositleri üzerinde Ag NP'ünün iyonik formu olan Gümüş nitrat (AgNO₃) 'in 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında KOMET testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında, AgNO₃'in en yüksek ve en düşük konsantrasyonlarında (0.1 ve 10 mM) değerlendirilen tüm parametreler (kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu) açısından genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Ag NP'lerinin 15 ve 40 nm nano boyutlarında *D. melanogaster* hemositleri üzerinde 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında KOMET testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında ise, Ag NP'nün 15 nm boyutunun 10 mM konsantrasyonunda, 40 nm boyutunun yine en yüksek konsantrasyon olan 10 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Ag (15 nm) NP'ünün 0.1 ve 1 mM

konsantrasyonlarında kuyruk uzunluğu parametresi, Ag (40 nm) NP'ünün ise 0.1 mM konsantrasyonunda kuyruk uzunluğu, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir.

D. melanogaster hemositlerinde KOMET testi ile Ag NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının Endo III uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pirimidin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ag NP (15 ve 40 nm)'lerinin ve iyon formunun insan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi ile 0.01, 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında hücre canlılık testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara göre, hücre canlılık oranının uygulaması yapılan her konsantrasyon grubunda sitotoksik olmayan dozlar için uluslararası çalışmalarda eşik değer kabul edilen % 70'in üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde Ag NP'ünün iyonik formu olan Gümüş nitrat (AgNO₃)'ın 0.01, 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında KOMET testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında, AgNO₃'ün 0.01 ve 1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiş, 0.1 mM konsantrasyonunda da sadece kuyruk uzunluğu parametresi göz önüne alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir.

Ag NP'lerinin 15 ve 40 nm nanoboyutlarının insan periferel kan lenfositleri üzerinde 0.01, 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarının KOMET testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında ise, Ag (15 nm) NP'ünün uygulaması yapılan en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar olan 0.01 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Ag (15 nm) NP'ünün 0.1 mM konsantrasyonunda da kuyruk moment ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir. Ag (40 nm) NP'ünün ise uygulaması yapılan en düşük konsantrasyon olan 0.01 mM ve 0.1 mM konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk uzunluğu parametresi dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir.

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi ile Ag NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Co NP (15 ve 50 nm)'lerinin ve iyon formunun *D. melanogaster* hemositleri üzerinde KOMET testi ile 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında hücre canlılık testi uygulamasıyla elde edilen sonuçları incelediğimizde, hücre canlılık oranının uygulaması yapılan her konsantrasyon grubunda sitotoksik olmayan dozlar için uluslararası çalışmalarda eşik değer kabul edilen % 70'in üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

KOMET testinde *D. melanogaster* hemositleri üzerinde Co NP'nün iyonik formu olan Kobalt klorür (CoCl₂.6H₂O)'ün 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında

uygulanmasından sonra elde edilen sonuçlara bakıldığında, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ün çalışılan tüm konsantrasyonlarında değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etkiye rastlanmamıştır.

D.melanogaster hemositleri üzerinde KOMET testinde Co NP'lerinin 15 ve 50 nm nanoboyutlarının 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında uygulanmasından sonra elde edilen sonuçlara bakıldığında ise, Co (15 nm) NP'ü için 1 mM konsantrasyonunda değerlendirilen tüm parametreler dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenirken, 0.1 ve 10 mM konsantrasyonlarında ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir. Co (50 nm) NP'ü için ise 0.1 ve 10 mM konsantrasyonlarında kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından, 1 mM konsantrasyonunda ise sadece kuyruk uzunluğu parametresi açısından genotoksik etki gözlemlenmiştir.

KOMET testi ile *D. melanogaster* hemositlerinde Co NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde Co NP (15 ve 50 nm)'lerinin ve iyon formunun KOMET testi ile 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında hücre canlılık testi uygulamasıyla elde edilen sonuçları incelediğimizde ise, hücre canlılık oranı uygulaması yapılan her konsantrasyon grubunda sitotoksik olmayan dozlar için uluslararası çalışmalarda eşik değer kabul edilen % 70'in üzerindedir.

Co NP'nün iyonik formu olan Kobalt klorür ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ün 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında insan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlara göre, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ün en düşük konsantrasyonu olan 0.01 mM'da kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir. 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında ise değerlendirilen tüm parametreler açısından genotoksik etki gözlemlenmiştir.

KOMET testinde insan periferel kan lenfositleri üzerinde Co NP'lerinin 15 ve 50 nm nanoboyutlarının 0.01, 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında uygulanmasından sonra elde edilen sonuçlara bakıldığında, Co (15 nm) NP'ü için 0.1 mM değerlendirilmesi yapılan tüm parametreler açısından genotoksik etki tespit edilmiştir. Ayrıca Co (15 nm) NP'ünün 0.01 mM konsantrasyonunda kuyruk uzunluğu, 1 mM konsantrasyonunda ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri dikkate alındığında genotoksik etki gözlemlenmiştir. Co (50 nm) NP'ünün uygulamaları sonucunda en düşük konsantrasyon olan 0.01 mM konsantrasyonunda uygulamasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu, 0.1 mM konsantrasyonunda kuyruk momenti, 1 mM konsantrasyonda ise kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alındığında genotoksik etki tespit edilmiştir.

İnsan periferel kan lenfositleri üzerinde KOMET testi ile Co NP'lerinin ve iyonik formunun en yüksek konsantrasyonu için bakteriyal enzim uygulaması sonucunda elde edilen verilere göre, Ag NP'leri ve iyonik formunun sebep olduğu oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa, KOMET testinde farklı nanoboyutları çalışılan Ag ve Co NP'lerinin *D. melanogaster* hemositleri ve insan periferel kan lenfositleri üzerinde DNA tek iplik hasarına sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sonuçlara göre Ag ve Co NP'leri ve iyonik formlarına maruz kalmış *D. melanogaster* hemositlerine yapılan enzim uygulamaları sonucunda Ag NP'lerinin ve iyonik formunun meydana getirdiği oksidatif DNA hasarının Endo III uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pirimidin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilirken, Co NP'leri ve iyonik formunun meydana getirdiği oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İnsan periferel kan lenfositlerine yapılan enzim uygulamaları, Ag ve Co NP'leri ve iyonik formlarına maruziyet sonucunda meydana gelen oksidatif DNA hasarının FPG uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu yani meydana gelen oksidatif hasarın pürin bazlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada test edilen farklı nanoboyuttaki Ag ve Co NP'lerinin KOMET yöntemi ile *Drosophila* hemositleri ve insan periferel kan lenfositlerine uygulamaları açısından sınırlı sayıda çalışma vardır. Model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in genetik yapı olarak insana büyük oranda benzerlik göstermesi, ökaryotik bir organizma olması ve insan periferel kan lenfositleri ile birlikte çalışılmış ve değerlendirilmiş olması bulgular açısından oldukça önemlidir. Bu bakımdan, sonuçların orijinalliği ve *in vivo-in vitro* koşullarda elde edilmiş olması ve elde edilen sonuçların KOMET testi için pozitif olması da nanoteknoloji bakımından önemlidir ve daha farklı test sistemleri ve organizmalarla çalışmaların yapılması da gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AHAMED, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J. and Hong, Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 233: 404-410.
- AHAMED, M., AlSalhi, M.S. and Siddiqui, M.K.J. 2010. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin. Chim. Acta.*, 411: 1841-1848.
- ALARIFI, S., Ali, D., Al Omar Suliman, Y., Ahamed, M., Siddiqui, M.A. and Al-Khedhairi, A.A. 2013. Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *Int. J. Nanomed.*, 8: 189-99.
- ARORA, S., Jain, J., Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicol. Lett.*, 179: 93-100.
- ASARE, N., Instanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M. and Brunborg, G. 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 291:65-72.
- ASHARANI, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P. and Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3: 279-290.
- BALASUBRAMANYAM, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Hussain, S.M. and Grover, P. 2009. In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, 24 (3): 245-251.
- BARKER, P.E., Butler, T., Dawley, J.M., Herran, P., King, B., Nathanson, K.L., Patel, K., Wedeking, J., Weiss, H., Wubinger, J. And Ziesmann, S. 2006. Nanotechnology Briefing Paper: Clean Water Act, in Section of Environment, Energy, and Resources. *American Bar Association*, Chicago, IL, pp. 13.
- BERGER, T.J., Spadaro, J.A., Chapin, S.E. and Becker, R.O. 1976. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9: 357-358.
- BHALLI, J.A., Ali, T., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M. and Khan, Q.M. 2009. DNA Damage in Pakistani Agricultural Workers Exposed to Mixture of Pesticides. *Environ. Mol. Mutagen.*, 50: 37-45.
- BİLGİCİ, B., Bedir, A., Şentürk, N., Alvur, M., Aydin, F. and Turanli, A.Y. 2005. Genotoxicity assessment using comet assay in Behcet's disease patient. *Mutat. Res.*, 578: 170-174.
- BOUWMEESTER, H., Poortman, J., Peters, R.J., Wijma, E., Kramer, E., Makama, S., Puspitaninganindita, K., Marvin, H.J., Peijnenburg, A.A. and Hendriksen, P.J. 2011. Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an *in vitro* intestinal epithelium coculture model. *ACS Nano*, 5: 4091-4103.

- BRAYDICH-STOLLE, L., Hussain, S., Schlager, J.J. and Hofmann, M.C. 2005. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.*, 88: 412–419.
- CARMONA, E.R., Guescheva, T., Creus, A. and Marcos, R. 2011a. Proposal of an *in vivo* Comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 165-169.
- CARMONA, E.R., Creus, A. and Marcos, R. 2011b. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 718: 33-37.
- CARMONA, E.R., Creus, A. And Marcos, R. 2011c. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 724: 35-40.
- CAVALLO, D., Tomao, P., Marinaccio, A., Perniconi, B., Setini, A., Palmi, S. and Iavicoli S. 2002. Evaluation of DNA damage in flight personnel by Comet assay. *Mutat. Res.*, 516: 148-152.
- CAVALLO, D., Ursini, C.L., Rondinone, B. and Iavicoli, S. 2009. Evaluation of a Suitable DNA Damage Biomarker for Human Biomonitoring of Exposed Workers. *Environ. Mol. Mutagen.*, 50: 781-790.
- CHA, K., Hong, H.W., Choi, Y.G., Lee, M.J., Park, J.H., Chae, H.K., Ryu, G. and Myung, H. 2008. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.*, 30: 1893-1899.
- CHEN, X. and Schluesener, H.J. 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol.Lett.*, 176: 1-12.
- CLURG, A., Stevens, B. and Wright, J.L. 1998. Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am. J. Physiol.*, 274: L81-L86.
- COLLINS, A.R., Dobson, V.L., Duinska, M., Kennedy, G. and Tina, R. 1997. The comet assay: What can it really tell us? *Mutat. Res.*, 375 (2): 183-193.
- COLLINS, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L. 1999. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735.
- COLLINS, A.R. 2005. Assays for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 261-267.
- COLOGNATO, R., Bonelli, A., Ponti, J., Farina, M., Bergamaschi E. and Sabbioni E. 2008. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutagenesis*, 23: 377-82.
- COLVIN, V. 2003. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnol.*, 21: 1166-1170.

- CREBELLI, R., Carta, P., Andreoli, C., Aru, G., Dobrowolny, G., Rossi, S. and Zijno, A. 2002. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutat. Res.*, 516: 63-70.
- DANILCZUK, M., Lund, A., Sadlo, J., Yamada, H. and Michalik, J. 2006. Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 63: 189-191.
- DE ASSIS, K.R.C., Ladeira, M.S.P., Bueno, R.C.A., dos Santos, B.F., Dalben, I. and Salvadori, D.M.F. 2009. Genotoxicity of cigarette smoking in maternal and newborn lymphocytes. *Mutat. Res.*, 679: 72-78.
- DEMİR, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B. 2010. Assessment of genotoxic effects of benzyl derivatives by the comet assay. *Food Chem. Toxicol.*, 48 (5): 1239-1242.
- DEMİR, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A. and Marcos, R. 2011a. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology*, 5 (3): 417-424.
- DEMİR, E., Kaya, N., Kaya, B. 2011b. Evaluation of DNA Damage in *Capsicum annuum L.* Exposed to Spinosad in the Comet Assay. *Fresen. Environ. Bull.*, 20 (8): 1926-1930.
- DEMİR, E. 2012. In vivo genotoxicity assessment of diflubenzuron and spinosad in *Drosophila melanogaster* with the comet assay using haemocytes and the SMART assay. *Fresen. Environ. Bull.*, 21 (12): 3894-3900.
- DEMİR, E. and Kaya, B. 2013. Studies on the genotoxic properties of four benzyl derivatives in the *in vivo* Comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Fresen. Environ. Bull.*, 22 (5): 1590-1596.
- DEMİR, E., Burgucu, D., Turna, F., Aksakal, S. And Kaya, B. 2013. Determination of TiO₂, ZrO₂, and Al₂O₃ nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 76 (16): 990-1002, DOI: 10.1080/15287394.2013.830584.
- DEMİR, E., Akça, H., Kaya, B., Burgucu, D., Tokgün, O., Turna, F., Aksakal, S., Vales, G., Creus, A., Marcos, R. 2014. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *Journal of Hazardous Materials*, 264: 420-429.
- DESOIZE, B. 2002. Cancer and Metals and Metal Compounds: Part I-Carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, 42: 1-3.
- DI PIETRO, A., Visalli, G., La Maestra, S., Micale, R., Baluce, B., Matarese, G. and Cingano, L. Scoglio. 2008. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat. Res.*, 650: 115-122.

- DUSINSKA, Maria. The Comet Assay modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair endonucleases. 2000. <http://cometassayindia.org/>
- DZIENDZIKOWSKA, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., Sadowska-Bratek, M., Chajduk, E., Wojewódzka, M., Dusinska, M. and Kruszewski, M. 2012. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.*, 32 (11): 920-928.
- EL-YAMANI, N., Zúñiga, L., Stoyanova, E., Creus, A. and Marcos, R. 2011. Chromium-induced genotoxicity and interference in human lymphoblastoid cell (TK6) repair processes. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 74 (15-16): 1030-1039.
- FAIRBAIRN, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37-59.
- FALAKALI, B. 1990. *Drosophila* Genetiği. Ege Üniversitesi Basımevi Basımevi, İzmir. 44 s.
- FENECH, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. And Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2):65-75.
- FILIPPONI, L. and Sutherland, D. 2010. Fundamental nano effects. NANOYOU Teachers Training Kit in nanoscience and nanotechnologies. Chapter 4, 1-24. <http://nanoyou.eu/>
- FLOWER, N.A.L., Brabu, B., Revathyb, M., Gopalakrishnana, C., Rajaa, S. V.K., Murugan, S. and Kumaravel, T.S. 2012. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat. Res.*, 742: 61-5.
- GALLOWAY, S.M. 2000. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35(3): 191-201.
- GLIGA, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Faadel, B. And Karlsson, H.L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11:11
- GHOSH, M., Sinha, M.J.S., Chakraborty, A., Mallick, K.S., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res.*, 749: 60-69.
- GIRGIS, E., Khalil, W.K., Emam, A.N. and Rao, K.V. 2012. Nanotoxicity of gold and gold-cobalt nanoalloy. *Chem. Res. Toxicol.*, 25: 1086-1098.

- GOGOTSI, Y. 2003. How safe are nanotubes and other nanofilaments. *Mater. Res. Innov.*, 7: 192-194.
- GRAF, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153–188.
- GRAF, U. and Vanschaik, N. 1992. Improved highbioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńskad, M., Instanes, C., Brunborge, G., Gajowikd, A., Radzikowskad, J., Wojewodzkab, M. and Kruszewskib, M. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol. Lett.*, 214: 251-258.
- GUILLAMET, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbiani, E., Fortaner, S. and Marcos, R. 2004. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19 (2): 129-135.
- GUZMAN-RINCON, J. and Graf, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, pp. 169-81, New York
- GÜRMEŒEN, S. Ve Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri -1. *Metalurji Dergisi*, 150: 31-38.
- HACKENBERG, S., Scherzed, A. and Kessler, M. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.*, 201: 27-33.
- HANDA, O., Kokura, S., Adachi, S., Takagi, T., Naito, Y. and Tanigawa, T. 2006. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*, 227: 62-72.
- HARTMANN, A. and Speit, G. 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23: 299-305.
- HENDERSON, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bournier, C. and Windebank, S. 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagen.*, 13: 89-94.
- HUSSAIN, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. and Schlager, J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19: 975-983.
- IRVING, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C. and Meister, M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol.*, 7: 335-350.

- ISHIWATARI, S., Suzuki, T., Hitomi, T., Yoshino, T., Matsukuma, S. and Tsuji, T. 2007. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.*, 27: 1-9.
- JACOBSEN, N. R., Pojano, G., Wallin, H. and Jensen, K. A. 2010. Nanomaterial dispersion protocol for toxicological studies in ENPRA. 2010. Internal ENPRA report, National Research Centre for the Working Environment, 8 p. Denmark.
- JIANG, H., Liu F., Yang, H. and Li, Y. 2011. Effects of cobalt nanoparticles on human T cells *in vitro*. *Biol Trace Elem Res.*, Epub ahead of print; PMID: 21968949.
- JONES, S.A., Bowler, P.G., Walker, M. and Parsons, D. 2004. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. *Wound Repair Regen.*, 12: 288-294.
- JONES, C.F. and Grainger, D.W. 2009. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 61: 438-456.
- KANAYA, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S. and Andersson, H.C. 1994. Vicia faba chromosomal aberration assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2): 231-247.
- KAWATA, K., Osawa, M. and Okabe, S. 2009. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.*, 43 (15): 6046-6051.
- KAYA, B., Creus, A., Velazquez, A., Yanikoglu, A. and Marcos, R. 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid- Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 520 (1-2): 93-101.
- KIM, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J. and Lee, H.J. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3: 95-101.
- KIM, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I. H., Jeong, J., Han, B.S. and Yu, I.J. 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.*, 20: 575-583.
- KIM, Y.S., Song, M.Y., Park, J.D., Song, K.S., Ryu, H.R., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Oh, K.H., Kelman, B.J., Hwang, I.K. and Yu, I.J. 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.*, 7: 1-20.
- KLAUDE, M., Eriksson, S., Nygren J. and Ahnström, G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA repair*, 363 (2): 89-96.
- KIRUBA, S.C.G., Tharmaraj, V., Sironman, T.A. and Pitchumani, K. 2010. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles. *Applied Clay Science*, 48: 547-551.

- KLAINÉ, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra S., McLaughlin, M.J. and Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27: 1825-1851.
- KOKURA, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y. and Yoshikawa, T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomed. Nanotechnol.*, 6: 570-74.
- KOCA, N. ve Karadeniz, F. 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32-37.
- KOENEMAN, B.A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J.C. and Capco, D.G. 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide, *Cell Biology and Toxicology*, 26 (3): 225-38.
- KRUSZEWSKI, M. et al. 2011. Toxicity of silver nanomaterials in higher eukaryotes In: Fishbein. *Advances in Molecular Toxicology*, 5: 179-218, Amsterdam.
- KULVIETIS, V., Zalgevicene, V., Didziapetriene, J. and Rotomkis, R. 2011. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Toboku J. Exp. Med.*, 225: 225-234.
- KUMARI, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.*, 407 (19): 5243-5246.
- LANDSIEDEL, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K. and Oesch, F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat. Res.*, 681 (2-3): 241-258.
- LANKOFF, A., Sandberg, W.J., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Rafsnes, M., Sartowska, B., Schwarze, P.E., Meczynska-Wielgosz, S., Wojewodzka, M. and Kruszewski, M. 2012. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response in HepG2 A549 and THP-1 cells. *Toxicol. Lett.*, 3: 197-213.
- LEONARD, A. And Lauwerys, R. 1990. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239(1): 17-27.
- LI, Y., Chen, D.H., Yana, J., Chena, Y., Mittelstaedta, R. A., Zhang, Y., Biris, A.S., Heflich, R.H. and Chen, T. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 745: 4-10.
- LIMBACH, LK., Wick, P., Manser, P., Grass, RN., Bruinink, A. and Stark, WJ. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (11): 3791-3792.

- LISON, D., De Boeck, M., Verougstraete, V. and Kirsch-Volders, M. 2001. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.*, 58: 619-25.
- LIVERI, V. T. 2006. Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems. Springer Science&Business Media, Inc. New York.
- LLOYD, M. and Kidd, D. 2012. The mouse lymphoma assay. *Methods Mol. Biol.*, 817: 35-54.
- LOCKMAN, P.R., Mumper, R. J., Khan, M.A. and Allen, D.D. 2002. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (1): 1-13.
- LOUIS THEODORE, R.G.K. 2005. Nanotechnology/Environmental overview, in Nanotechnology: Environmental implications and solutions. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-60, USA.
- LUX REPORT. 2008. Nanomaterials state of the market: stealth success, broad impact. Available from: <http://portal.luxresearchinc.com/research/document/3735>.
- MARCOS, R. and Carmona, E.R. 2013. The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays Detecting Genotoxicity in *Drosophila*. *Methods Mol. Bio.*, 1044: 417-427.
- MAYNARD, A.D. 2007. Nanotoxicology: Laying a Firm Foundation for Sustainable Nanotechnologies. Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects, Informa Healthcare USA, Inc, pp. 1-4, USA.
- MEI, N., Zhang, Y., Chen, Y., Guo, X., Ding, W., Ali, S.F., Biris, A.S., Rice, P., Moore, M.M. and Chen, T. 2012. Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 53: 409-419.
- MILLER, J. C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J.M. and Kundahl, G. 2004. The handbook of Nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- MIURA, N., Shinohara, Y. 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390 (3): 733-737.
- MORGAN, D.O. 1999-2007. The Cell Cycle: Principles of Control. New Science Press, England.
- MUKHOPADHYAY, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M. and Dhawan, A. 2004. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 19: 85-90.
- NEL, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761): 622-627.

- OBERDORSTER, E. 2004. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.*, 112: 1058-1062.
- OSTLING, O. and Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 123 (1): 291-298.
- PAPIS, E., Rossi, F., Raspanti, M., Dalle-Donne, I., Colombo, G., Milzani, A., Bernardini, G. and Gornati, R. 2009. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. *Toxicol. Lett.*, 189:253–9.
- PATLOLLA, A.K., Berry, A., May, L. and Tchounwou, P.B. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: A pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9: 1649-1662.
- PONTI, J., Sabbioni, E., Munaro, B., Broggi, F., Marmorato, P. and Franchini, F. 2009. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an *in vitro* study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis*, 24 (5): 439-445.
- POTTER, C.J., Turenchalk, G.S. and Xu, T. 2000. *Drosophila* in cancer research. *TIG*, 16: 33-9.
- RAGHUNATHAN, V.K., Devey, M., Hawkins, S., Hails, L., Davis, S.A., Mann, S., Chang, I.T., Ingham, E., Malhas, A., Vaux, D.J., Lane, J.D. and Case, C. 2013. Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity. *Biomaterials*, 34: 3559-3570.
- RAJAGURU, P., Vidya L., Baskarasethupathi, B., Kumar, P.A., Palanivel, M. and Kalaiselvi, K. 2002. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutat. Res.*, 517: 29-37.
- RIBAS, G., Frenzilli, G., Barale, R. and Marcos, R. 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat. Res.*, 344: 41-54.
- ROSENKRANZ, H.S. and Carr, H.S. 1972. Silver sulfadiazine: effect on the growth and metabolism of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 367-72.
- ROTHWELL, V.N. 1993. Understanding Genetics, A Molecular Approach. John Wiley & Sons, Inc. 556 p. USA.
- SABBIONI, E. et al. 2014. Cytotoxicity and morphological transforming potential of cobalt nanoparticles, microparticles and ions in Balb/3T3 mouse fibroblasts: an *in vitro* model. *Nanotoxicology*, 8: 456–64.
- SCIAU, P. 2012. Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval Ceramics, The Delivery of Nanoparticles. Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-delivery-of-nanoparticles/nanoparticles-in-ancientmaterials-the-metallic-lustre-decorations-of-medieval-ceramics>.

- SIDDUQUE, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K. and Dhawan, A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 20: 285-290.
- SHARMA, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M. and Dhawan, A. 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.*, 185 (3): 211-218.
- SHUKLA, A.K., Pragma, P. and Kar Chowdhuri, D. 2011. A modified alkaline Comet assay for *in vivo* detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 726: 222-226.
- SILVER, S., Phung, L.T. and Silver, G. 2006. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 627-634.
- SIMONETTI, N., Simonetti, G., Bounol, F. and Scalzo, M. 1992. Electrochemical Ag⁺ for preservative use. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3834-3836.
- SINGH, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175 (1): 184-191.
- SINGH, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G., Wright, C.J. and Doak, S.H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30 (23-24): 3891-3914.
- STRAUSS, G.H. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.*, 252: 1-15
- SUNG, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Yoon, J.U., Kim, D.S., Jeon, K.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Cho, M.H., Kelman, B.J., Yu, I.J., 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.*, 108: 452-461.
- TAVARES, P., Balbinot, F., Martins de Oliveira, H., Fagundes, G.E., Venancio, M., Ronconi, J.V.V., Merlini, A., Streck, E.L., Marques da Silva Paula, M. And Moraes de Andrade, V. 2012. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) *in vitro* and *in vivo*. *J Nanopart Res.*, 14:791.
- TICE, R.R., Andrews, P.W. and Singh, N.P. 1990. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In Sutherland, B.M. and Wordhead, A.D. (eds) DNA Damage and Repair in Human Tissues. Plenum, pp. 291-302, New York.
- TUDEK, B. 2003. Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 12-19.
- WARHEIT, D.B. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci.*, 101 (2):183-185.

- WIESNER, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. and Biswas, P. 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.*, 40(14): 4336-4345.
- WIJNHOFEN, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van de Meent, D., Dekkers, S., DeJong, W.H., Van Zijverden, M., Sips, A.J.A.M. and Geertsma, R.E. 2009. Nanosilver a review of available data and knowledge gaps in human. *Nanotoxicology*, 3: 109-138.
- WOODWOW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS. 2007. A nanotechnology consumer products inventory. Available from the website: www.nanotechproject.org/consumerproducts.
- www.nanotechproject.org/consumerproducts/
- <http://www.pharmameddevice.com/App/homepage.cfm?appname=100485&linkid=23294&moduleid=3162#Nanotechnology>
- XING, D., Dorr, R., Cunningham, R.P. and Scholes, C.P. 1995. Endonuclease III interactions with DNA substrates. 2. The DNA repair enzyme Endonuclease III binds differently to intact DNA and to apyrimidinic/apurinic DNA substrates as shown by tryptophan fluorescence quenching. *Biochemistry*, 34: 2537-2544.
- VALES, G., Demir, E., Kaya, B., Creus, A. and Marcos, R. 2013. Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in *Drosophila*. *Nanotoxicology*, (Baskıda).
- VUILLAUME, M. 1987. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation, *Mutat. Res.*, 186: 43-72.
- YEŞİL, Z. 2011. Nano seryumdioksit partiküllerinin sentezi ve yüzey modifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi, 88 s.
- ZELJEZIC, D. and Garaj-Vrhovac, V. 2001. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*, 16: 359-363.
- ZOU W., Yan M., Xu W., Huo H., Sun L., Zheng Z. 2001. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation, *J. Neurosci. Res.*, 64: 646-53.

8. EKLER

8.1. Tez Çalışması Kapsamında Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildirilerin Özetleri

“ Gümüş Nanopartikülünün ve İyon Formunun Genotoksik Potansiyelinin In Vivo *Drosophila* KOMET Yöntemi ile Araştırılması. ” II. Toksikolojii Sempozyumu: Toksikolojide Güncel Konular, 3-4 Mayıs 2013, ss.6, Eskişehir.

Bu çalışmada *D. melanogaster*'in kan hücreleri olan hemositlerinde tek hücre alkali jel elektroforezi testi (KOMET) kullanılarak in vivo koşullarda son yıllarda yaygın olarak kullanılan Gümüş nanopartiküllerinin (Ag NP) ve Gümüş iyonunun genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. *Drosophila* hemositleri ile çalışılmış KOMET yönteminde yabancı tip Wild hattı kullanılmıştır. Konuyla ilgili literatür taramaları ile *Drosophila*'nın 72±4 saatlik (3. larval evre) yabancı tip larvalarında KOMET yöntemi kullanılarak Ag (40 nm) NP'ünün ve iyonunun üç derişimi (0.1, 1 ve 10 mM) tespit edilmiştir. Daha sonra 72±4 saatlik larvalar Ag (40 nm) NP'ünün ve iyonunun belirlenen derişimlerine maruz bırakılmıştır. Uygulamaları yapılan yabancı tip Wild hattı *Drosophila* larvaları 96±4 saatlik olduklarında bu larvaların hemositleri izole edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme Paired-Sample T Testi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Ag NP'ünün en yüksek derişimde (10 mM) genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Sezgin AKSAKAL, 1989 yılında Antalya ilinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya ilinde tamamladı. 2009 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında Biyoloji Bölüm Birincisi derecesine hak kazanarak Biyolog unvanı ile mezun oldu. 2012 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Kasım 2013'de Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen öğrenimini sürdürmekte olup Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.