

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

**MgO VE CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK FORMLARININ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* SMAR TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Burçin YALÇIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2017

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

**MgO VE CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK FORMLARININ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA SMAR* TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Burçin YALÇIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2016-1044 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MgO VE CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK FORMLARININ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* SMAR TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Burçin YALÇIN

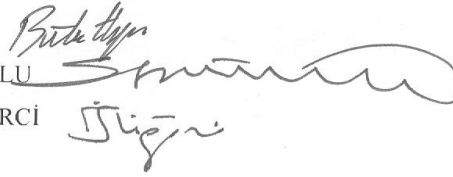
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ~~22/06/2017~~ 22/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Doç. Dr. İbrahim H. CİĞERCİ



ÖZET

MgO VE CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN VE İYONİK FORMLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* SMART TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Burçin YALÇIN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA
Mayıs 2017, 62 sayfa

Metal oksit nanopartiküllerinin (NP) küresel satışlarının her geçen yıl hızlı bir şekilde arttığı dikkate alındığında insanların ve çevrenin bu NP'lere maruziyetinin artması kaçınılmaz bir sonuçtur. Artan bu maruziyet ile beraber ortaya çıkabilecek olumlu veya olumsuz sağlık etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada da *Drosophila melanogaster* üzerinde *in vivo* bir test sistemi olan kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile kullanımı yaygınlaşmaya başlayan seryum oksit (CeO₂) ve magnezyum oksit (MgO) nanopartikülleri ve bunların iyonik formlarının genetik hasar (delesyon, nokta mutasyonu, ayrılmama ve rekombinasyon) yaratma potansiyelleri araştırılmıştır. İki gen bakımından (*mwh* ve *flr*³) transheterozigot olan 72 ± 4 saatlik larvalara CeO₂ ve MgO NP'leri ile iyonik formlarının her biri için 4 farklı konsantrasyonu (1, 2, 5 ve 10 mM) ile uygulaması yapılmıştır. *Drosophila* SMART, kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimler sonucu heterozigotluğun kaybolması ve farklılığın fenotipte gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu nanopartiküllerin de genotoksik etkileri, larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerin sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda CeO₂ iyonik formunun sadece en yüksek dozunda (10 mM) toplam klon sayısını indüklediği saptanırken, CeO₂ NP uygulama sonuçlarının ise tüm dozlarında toplam klon frekansını inhibe ettiği saptanmıştır. MgO NP'nün uygulama sonuçlarında sadece en yüksek dozunda (10mM) toplam klon sayısını arttırarak pozitif sonuç verdiği ve MgO iyonik formunun ise uygulama dozlarından 5mM haricinde diğer dozlarda (1, 2 ve 10mM) toplam klon sayısını kontrol grubuna göre istatistiki olarak arttırarak genotoksisiteyi indüklediği gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Magnezyum oksit, Seryum oksit, Nanopartikül, Genotoksisite, *Drosophila*, SMART

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Doç. Dr. İbrahim H. CİĞERCİ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF MgO AND CeO₂ NANOPARTICLES AND THEIR IONIC FORMS BY *DROSOPHILA* WITH SMART ASSAY

Burçin YALÇIN

MSc. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

May 2017, 62 pages

Global sales of metal oxide nanoparticles (NP) grow rapidly every year. Therefore, increasing exposure of people and the environment to these NPs is an inevitable result. The investigation of positive or negative health effects that may occur with this increased exposure is of great importance. In this study, genetic damage (deletion, point mutation, nondisjunction and recombination) inducing potentials of cerium oxide (CeO₂) and magnesium oxide (MgO) nanoparticles and their ionic forms, which have become widespread, have investigated by wing somatic mutation and recombination test on an *in vivo* test system *Drosophila melanogaster*. 72 ± 4 hour larvae which are trans heterozygous for both genes (*mwh* and *flr*³) were treatment for each of the four different concentrations (1, 2, 5 and 10 mM) of CeO₂ and MgO NPs. *Drosophila* SMART is based on the principle the loss of heterozygosity as a result of genetic changes in the wing imaginal disc cells and observation of the difference in the phenotype. The genotoxic effects of these nanoparticles have been evaluated in relation to mutant trichomes resulting from genetic changes occurring in the wing imaginal disc cells of the larvae.

As a result of the study, only the highest dose (10 mM) of the CeO₂ ionic form induced the total number of clones, whereas CeO₂ NP treatment results inhibited total clone frequency at all doses. It has been observed that MgO NP showed positive results by increasing the total of clones at only the highest dose (10 mM) in the treatment results. The MgO ionic form induced genotoxicity by increasing the total number of clones statistically compared to the control group at other doses (1, 2 and 10 mM) except 5 mM of the treatment doses.

KEY WORDS: Magnesium oxide, Cerium oxide, Nanoparticle, Genotoxicity, *Drosophila*, SMART

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA (Supervisor)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Doç. Dr. İbrahim H. CİĞERCİ

ÖNSÖZ

Nanoteknoloji ve nanoparçacıkların üretimi giderek artan bir ivmeye sahipken, nanoparçacıkların insan sağlığına ve çevreye olan toksik etkileri ve muhtemel tehlikesi ile ilişkili araştırmalar henüz emekleme aşamasındadır. Nanopartikül toksikolojisinin, hücresel seviyedeki mekanizmaları, vücuda giriş yolları ve halk sağlığına olası toksik etkilerini anlamak için nanopartiküllerin doğru karakterizasyonu ve canlı sistemler ile temas halindeyken nanopartikülün davranışının anlaşılması oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca maruz kalınan doz miktarı nanopartikül toksisitesini tanımlama ve risk değerlendirmesi için önemli bir parametredir.

Nanoteknoloji sayesinde endüstri gelişiminde 21. yüzyılda devrim yaşanmış, yaşamımızda mühendislik, bilgi teknolojisi ve teşhis gibi farklı alanlarda avantajlar elde edilmesine olanak sağlamıştır. Ancak yeni taleplerin karşılanması için yeni formülasyonların geliştirilmesi ve yüzey özellikleri ile büyük ölçekli nanopartikül üretimi de gerekmektedir. Bu bağlamda metal oksitler, nanopartiküllerin önemli bir grubudur, çünkü bunlar, kozmetik ve güneşten koruyucular, kendinden temizlenebilen kaplamalar ve tekstilde yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer uygulama alanları arasında su arıtma maddeleri, güneş pilleri ve daha yeni kullanım alanı olarak otomobil katalitik konvertörleri için kullanımı sayılabilmektedir. Nanoteknolojinin bilim, yaşam kalitesi ve potansiyel maddi kazançlar yaratma potansiyeline sahip olduğu genel olarak kabul görmesine rağmen, üretilen metal oksit nanopartiküllerinin yaygın şekilde kullanılması, güvenli ve sürdürülebilir bir nanoteknoloji endüstrisinin büyümesini destekleyebilecek, potansiyel tehditleri ele almak üzere araştırmaların yapılması gerektiği görülmektedir. Yakın zamanlarda bu oksitlerin nano ölçekli parçacıklarının bazı organizmalar için potansiyel olarak tehlikeli sağlık etkileri, toksikologlar ve düzenleyici otoriteler arasında ortaya çıkan sorunlardır.

Nanopartiküller, organizma içerisinde diğer materyal veya daha büyük partiküllerden daha fazla oranda hücre zarını geçerek organizmanın birçok bölgesine ulaşabilme potansiyeline sahip olmalarından dolayı güvenliğinin belirlenmesinde proteinler, DNA, lipitler, membranlar, organeller, hücreler, dokular ve biyolojik sıvılar ile etkileşimi de dahil olmak üzere bu maddelerin tüm özellikleri dikkate alınmalıdır. Bu ve bunun gibi ele alınması gereken birçok önemli nokta bulunmaktadır ve bu bağlamda nano-genotoksikolojik çalışmaların yapılması, olası birçok hasarın çözümünde önemli veriler sağlayacaktır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar *in vivo* ve ökaryotik bir submemeli sistem kullanılması bakımından CeO₂ ve MgO NP'lerinin ve iyonik formlarının genotoksitelerinin aydınlatılması için önemlidir. Yapılan çalışmanın CeO₂ ve MgO NP'lerinin toksisitesi hakkındaki bilgi boşluklarının doldurulmasına katkı sağlamasını ve yeni yapılacak çalışmalar için bir basamak oluşturmasını temenni ederim.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren Akademik Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Bülent KAYA'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), nanopartiküllerin karakteristik özelliklerinin (büyüklük dağılımı, zeta potansiyellerinin 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: FYL-2016-1044) ve ayrıca tez çalışmam boyunca yardımları bulunan çalışma arkadaşlarıma ve her zaman desteklerini hissettiğim sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Metal Oksit Nanopartikülleri	4
2.2. Metal Oksit Nanopartikül Toksisitesi	5
2.3. Seryum Oksit Nanopartikülleri (CeO ₂ NP).....	8
2.4. Magnezyum Oksit Nanopartikülleri (MgO NP).....	11
2.5. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)	13
2.6. <i>Drosophila melanogaster</i>	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü.....	16
3.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı.....	18
3.3. <i>Drosophila melanogaster</i> Hatlarının Kültürü	23
3.4. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi.....	24
3.5. Deney Grupları.....	24
3.6. Kimyasal Uygulamaları.....	26
3.7. Kanat Preparatlarının Hazırlanması	28
3.8. Kanat Preparatlarının Analizi.....	29
3.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması	33
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. <i>D. melanogaster</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Kullanılarak Genotoksisitenin Belirlenmesi	35
4.1.1. CeO ₂ NP ve CeO ₂ iyonik form uygulamaları.....	35
4.1.2. MgO NP ve MgO iyonik form uygulamaları	37
4.2. CeO ₂ NP Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	39

4.3. MgO NP Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Bd ^S	Beaded Serrate
flr ³	Flare
gr	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Zeta Potansiyali
mwh	Multiple wing hair
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
°C	Santigrat

Kısaltmalar

CeO ₂	Seryum oksit
DLS	Dinamik Işık Saçma
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMS	Etil Metan Sülfonat
KA	Kromozom Aberasyon
KOMET	Tek Hücre Jel Elektroforez Testi
MgO	Magnezyum oksit
MN	Mikronükleus
NP	Nanopartikül
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanopartikül maruziyetinin yolları ve potansiyel zararlı etkileri.	5
Şekil 2.2. Rat makrofaj hücresi ile nanopartikül boyutları karşılaştırılması.....	6
Şekil 2.3. CeO ₂ NP'lerinin olası genotoksik ve sitotoksik etkisi.	11
Şekil 2.4. Nanopartiküllerin değerlendirilmesinde <i>in vivo</i> model olarak <i>Drosophila melanogaster</i> kullanılan yayımlanmış makalelerin 2006-2015 Kasım ayı arasında yıllık sayısı.	15
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> hayat döngüsü.	17
Şekil 3.2. İmajinal disk hücrelerinin <i>Drosophila</i> larva ve erişkinlerindeki yeri.....	18
Şekil 3.3. <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr³/TM3</i> , <i>Bd^S</i> bireyleri arasındaki çaprazlamala sonucu dengelenmiş heterozigot <i>mwh/Bd^S</i> ve transheterozigot <i>mwh/flr³</i> bireylerin elde edilmesi.....	19
Şekil 3.4. <i>Drosophila melanogaster</i> serrat ve normal kanat görünümü.	20
Şekil 3.5. Kanat trikomlarının görünümü a. normal, b. farklılaşmış fakat ne <i>flr³</i> ne de <i>mwh</i> olarak sınıflandırılmayacak trikomlar, c. <i>mwh</i> trikomlar, d. <i>flr³</i> genotipe ait trikomlar.	21
Şekil 3.6. Tek tip ve ikiz klonların oluşumuna yol açan farklı genotoksik olayları gösteren genetik anomaliler.....	22
Şekil 3.7. Nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümünün yapıldığı Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz.....	26
Şekil 3.8. SMART için çeşitli olası uygulama zamanlamaları.	27
Şekil 3.9. a. Sonikatör uygulaması, b. Kimyasal uygulanmış uygulama tüpleri..	28
Şekil 3.10. Kanat preparatlarının hazırlanması.....	29

Şekil 3.11. Kanat sektörlerinin şematik görünümü.....	30
Şekil 3.12. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü	31
Şekil 3.13. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü	31
Şekil 3.14. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klonların görünümü.....	32
Şekil 3.15. İkiz mutant klonların görünümü	32
Şekil 4.1. CeO ₂ NP'lerinin TEM görüntüleri.....	39
Şekil 4.2. CeO ₂ NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı	39
Şekil 4.3. CeO ₂ NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı	40
Şekil 4.4. CeO ₂ NP zeta potansiyeli.....	40
Şekil 4.5. MgO NP'lerinin TEM görüntüleri	41
Şekil 4.6. MgO NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı	41
Şekil 4.7. MgO NP'lerinin partikül boyut dağılımı	42
Şekil 4.8. MgO NP zeta potansiyeli	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	25
Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	34
Çizelge 4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mwh/flr³</i>) CeO ₂ NP'leri ve iyonik formunun genotoksik etkileri	36
Çizelge 4.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mwh/flr³</i>) MgO NP ve iyonik formunun genotoksik etkileri	38

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1959'da Richard Feynman tarafından, Kaliforniya Teknoloji Enstitüsündeki Amerikan Fizik Topluluğunun yıllık toplantısındaki bir konuşmasında, nesneleri atomik hassasiyetle üretebilecek kadar küçük makineler yapma imkânının olduğunu ileri sürmesiyle ortaya çıkmıştır. Nanoteknoloji terimi ise ilk olarak 1974'te Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır (Singh 2016). O zamandan itibaren nanoteknoloji alanı, tıp, kozmetik, çevresel temizlik, elektronik gibi yeni nano-ürünlerin sentezlenmesi ile artarak gelişmektedir (Singh 2016a).

Nano kelimesi metrik ölçeğinde bir milyarda biri temsil etmek için kullanılan bir önektir. Bir nanometre (nm) bir metrenin milyarda biridir. Bir nanometreyi çok küçük bir birim olması nedeniyle kavramsallaştırmak zordur. Örnek vermek gerekirse; iğnenin başı 1 milyon nm genişliğinde, bakterilerin büyüklüğü yaklaşık 1.000-5.000 nm arasındadır. Yaşamın genetik temelini oluşturan Deoksiribonükleik asit (DNA) ise 1-2 nm büyüklüğündedir. Bununla birlikte, nanoboyuttaki her şey nanoteknoloji alanına dahil değildir. Örneğin, yangınlar ve volkanik patlamalar nanoparçacıkları atmosfere saçılmasına neden olur, ancak bunlar doğal olarak insan faaliyetlerinin sonucunda ortaya çıkmaz ve nanoteknoloji değil nanokütle parçacıklarıdır (Shatkin 2013).

Nanopartikül (NP) ise, üç fiziksel boyuttan en az birinin 1-100 nm aralığında olduğu nano nesnelerden oluşan ve belirli nano-ölçekli özellikler gösterebilen materyal olarak tanımlanmaktadır (Gaffet 2010).

Nanoteknoloji son zamanların fenomeni olarak kabul edilmesine rağmen her ne kadar nanomateriyallerin özellik ve potansiyelini bilmeseler de eski uygarlıklarda da nanoteknolojinin kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 400-100 yılları arasındaki Keltik opak kırmızı camlarında % 5-% 10 bakır ve % 3,4 bakır oksit nanopartikülleri ve Roma mozaiklerinde kullanılan kırmızı-tesseraların çoğu bakır nanokristal içermektedir (Brun vd 1991). Orta çağda (M.S. 1066-1485) metalik nanopartiküllerden elde edilen etkileyici optik özelliklere sahip sırlı seramikler ortaya çıkmıştır (Singh 2016).

Nanoteknoloji, fizikten kimyaya, biyolojiden mekaniğe kadar birçok disiplinin birlikte kullanılabildiği bir çalışma alanıdır. Günümüzde pek çok endüstriyel ve tıbbi uygulamaları büyük oranda geliştirilmektedir ve halen birçok alanda da kullanımdadır (Gaffet 2010). Teknolojideki son gelişmeler yavaş yavaş toplumun ayrılmaz bir parçası olan nanoparçacıkların sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları üzerinde devrim yaratmıştır (Singh 2016a). Bu alandaki gelişmeler sayesinde bugüne kadar mümkün olmayan tanı ve terapötik uygulamaların, artık insanda kullanıma yönelik daha etkin antikanser, anti-enfeksiyon ve anti-alerjik tedavileri geliştirilmeye başlanmıştır (Gürsel 2006). Bu sebeplerden dolayı, nanoteknolojinin ortaya çıkışı 21. yüzyılın endüstriyel gelişiminde bir dönüm noktası olarak düşünebilmektedir (Gaffet 2010).

NP'lerin daha sert, daha kuvvetli, gelişmiş optik özellikler, gelişmiş ısı ve elektrik iletkenliği gibi yararlı fiziko-kimyasal özellikleri endüstride temel öneme sahip olmuştur. NP'ler sahip oldukları geniş yüzey sayesinde katalitik uygulamalar için de son derece uygundur ve yüzeylere tabaka halinde uygulanıp yüzeyin aktivitesini artırır (Cassée vd 2011). Bu NP'ler kimyasal reaksiyonlarda katalizör, hedef hücrelere ilaç taşıyan vektörler olarak ve mikro-elektronikte kullanılmaktadır. Bunun haricinde seramik membranlarda, yakıt hücrelerinde, fotokatalizlerde, patlayıcılarda, termal sprey

kaplamalarda ve otomobil endüstrisinde katalizör uygulamaları için kullanılmaktadır (Gaffet 2010).

Nanomalzemelerin (NM) tüketici ürünlerinde kullanılması küresel bir olgu haline gelmiştir. NM'lerin üretim hacmi her geçen yıl giderek artan bir ivmeye sahiptir ve yakın gelecekte de önemli ölçüde genişleyeceği tahmin edilmektedir (Thomas vd 2014). Joo ve Zhao'nun (2017) aktardıklarına göre Birleşmiş Milletler Çevre Programı tarafından yapılan analize göre NM üretimi sürekli olarak artmakta ve 2020 yılında yılda 58.000 tona ulaşması beklenmektedir.

Tüketici ürünlerindeki NP kullanımı ise elektronik uygulamalar, yakıt katkı maddeleri, inşaat malzemeleri, ilaç, çevre iyileştirme, kişisel bakım ürünlerinde yaygındır ve yayılmaya devam etmektedir (Vance vd 2015, Rundle vd 2016). Nanoteknolojinin günümüzde bu kadar popüler hale gelmesinin başlıca nedeni olarak NM'lere yeni mekanik, optik ve elektronik özellikler kazandıran kuantum mekaniği sayesinde nano ölçekte yüzey alanının hacme oranında büyük bir artışın olmasıyla ilişkilendirilebilmektedir (Sharma vd 2009).

NP'leri sınıflandırmak istediğimizde genel olarak boyutlarına, kökenlerine, kimyalarına ve uygulama alanlarına göre sınıflandırılabilir (Singh 2016). En yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma, nanomalzemelerin dört ana kategoriye ayrılabilirdiği kimyasal bileşime dayalı olan sınıflandırmadır: Karbon bazlı nanomalzemeler, metal/metal oksit nanomalzemeler, kuantum noktalar (QD'ler) ve dendrimerlerdir (Ma vd 2015). NP'ler aynı zamanda morfolojilerine göre küre, çubuk, boru ve prizma gibi farklı şekillerde de sınıflandırılabilir (Ju-Nam ve Lead 2008).

Nanoteknoloji, günlük yaşamlarımızda (gıda, kozmetik, tıp, elektronik ve enerji) yoğun şekilde entegre edilmiş olmasına rağmen yeterli güvenlik bilgisi ve mevzuatı bulunmamaktadır (Singh 2016). Her yeni uygulama toplumun her gün maruz kaldığı yeni bir risk ile ilişkilidir. Yeni kimyasalların üretimi, insanların yaşam kalitesini önemli ölçüde geliştirirken aynı zamanda kirli bir çevreye ve insan sağlığına olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Singh 2016a). Bu sebeple nanoteknoloji, son yıllarda sadece olası yararları için değil aynı zamanda çevre ve insan sağlığı açısından riskleri konusunda da geniş ölçüde ilgi görmektedir (Rosenkranz vd 2012).

NM'lerden kaynaklanan toksikolojik etkilere ilişkin bilgidaki boşlukları gidermek için toksikolojinin yeni bir kolu olarak nanotoksikoloji alanı ortaya çıkmıştır. Nanotoksikoloji, kabaca NM'lerin toksik etkilerinin incelenmesidir. NM'lerin fiziko-kimyasal özelliklerini, maruziyet yollarını, toksikokinetik ve düzenleyici yönlerini kapsar (Ma vd 2015). Çeşitli çalışmalarda bazı NP'lerin kromozomal fragmentasyon, DNA zincir kırılmaları, nokta mutasyonları ve gen ifadelerinde değişiklikler gibi genotoksisiteye neden olduğu ortaya konmuştur. Bazı NP'lerin ise oksidatif hasara karşı biyo-koruyucu etkiye yol açabileceği de dikkate alınmalıdır (Elswaif vd 2009).

NP'lerin üretimi ve kullanımının artması nedeniyle her geçen gün insanların nanopartiküllere maruziyetleri giderek arttığı için, bu partiküllerin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ortaya çıkarılmasını sağlayan nanogenotoksikolojik çalışmaların yapılması, olası birçok hasarın çözümünde önemli veriler sağlayacaktır. Zaten endüstriyel teknolojiye kullanımının artmasının yanında DNA ve çevreye olası zararlı etkileri de daha fazla tartışılmaya başlanmıştır. Bu moleküllere üretim ya da kullanım sırasında

maruz kalmadan dolayı oluşabilecek olası genetik hasarların farklı test yöntemleriyle araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada da metal oksit NP'leri grubunda yer alan, seryum oksit (CeO_2) ve magnezyum oksit (MgO) NP ve iyonik formlarının olası genotoksik etkileri *in vivo* bir test sistemi olan *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile araştırılması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Metal Oksit Nanopartikülleri

Metal oksitler, ticari ve endüstriyel ürünler için ilk olarak kullanılan nano ölçekli malzemeler arasında bulunan NP'lerin bir sınıfıdır (Johnston vd 2010). Nano ürünlerin % 37'sini metal oksit NP'leri oluşturmaktadır (Vance vd 2015). Yarı iletken özelliklerinden dolayı, sensörler, güneş pilleri ve elektronik alanlarında kullanılmaktadırlar. Endüstriyel uygulamaların yanında çeşitli tüketim ürünlerinde de en çok kullanılan NP grubudur (Ivask vd 2015). Gıda, paketlenme, ilaç taşıma sistemleri, biyosensörler, kimyasal ve biyolojik bilimlerde önemli sayıda uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Ju-Nam ve Lead 2008, Kumar vd 2014). Nanoteknolojide en çok kullanılan ana metal oksitler; titanyum dioksit (TiO_2), seryum oksit (CeO_2), silika (SiO_2), alüminyum oksit (AlO), demir oksitler (FeO , Fe_3O_4 vb) ve çinko oksit (ZnO)'dir (Ju-Nam ve Lead 2008, Labille ve Bottero 2010). Tüketici ürünlerinde en yaygın kullanılan metal oksit NP'leri ise ağırlıklı olarak TiO_2 , ZnO ve SiO_2 'dir ve daha çok gıda ürünlerinde dolgu malzemelerinin kullanımlarının yanında pigment ve UV absorpsiyon filtreleri olarak da kullanılmaktadır (Ivask vd 2015).

TiO_2 UV-B'yi, ZnO UV-A'yı engelleme yeteneği ve şeffaflıkları nedeniyle, günümüzde kozmetik ve güneşten koruyucularda kullanılmaktadır (Nowack ve Bucheli 2007, Klaine vd 2008, Johnston vd 2010, Kumar vd 2014). SiO_2 de ortopedi ve diş cerrahisinde dolgu maddelerinde kullanılmaktadır (Balamurugan vd 2006). AlO NP'ler kısmi kristal yapıya sahip oldukları için nano-seramik sınıfına aittir. Ortopedik parçalar, kompozit repellantlar gibi medikal ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Demir oksit NP'leri, ilaç taşıma, manyetik rezonans görüntüleme (MR), kontrast geliştirme ve hipertermi yoluyla tümör dokusunun hedeflenen şekilde imhası gibi biyomedikal uygulamalardaki çeşitli işlevleri nedeniyle nanopartikül endüstrisinde çok dikkat çekmektedir (Kumar vd 2014).

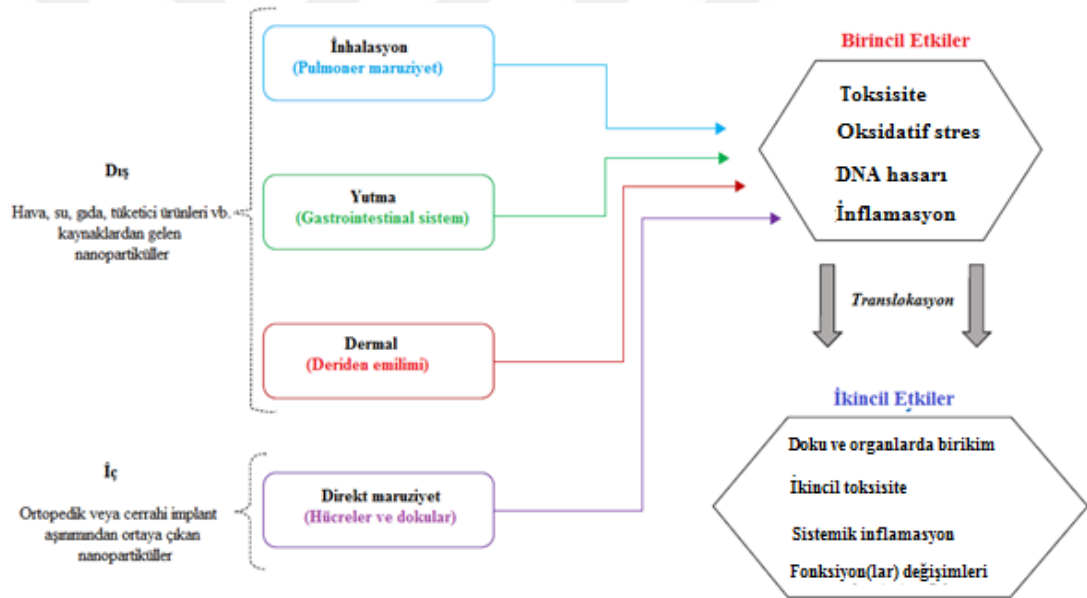
Bu farklı uygulamalarından dolayı metal oksit NP'lerine insan ve çevresel kaynaklı maruziyetin yakın gelecekte büyük oranda artacağı tahmin edilmektedir (Klaine vd 2008, Johnston vd 2010, Ma vd 2015). Metal ve metal oksit NP'lerinin küresel satışlarının her geçen yıl hızlı bir şekilde arttığı dikkate alındığında hacim bakımından global metal ve metal oksit NP pazarının 2026 sonuna kadar 10.000 tona ulaşması beklenmektedir (Future Market Insights 2017).

Metal oksit NP'ler sentetik türlerinin yanında doğal olarak oluşan NP'lere de sahiptir. Trafik, sanayi, kömür yakımı vb. kaynaklı toz fırtınaları, volkanik patlamalar ve orman yangınları gibi doğal olayların sonucunda da üretilebilmektedir. Bu sebeple canlı organizmalar evrim süreci boyunca bir şekilde bu NP'lere maruz kalmaktadır. Ancak sentetik NP'lerin artması beraberinde bu partiküllere artan maruziyeti de getirmiştir (Ma vd 2015). Her insan suyla, soluduğu havayla ve yedikleri de dahil olmak üzere çeşitli şekillerde nanomateryallere maruz kalabilmektedir. Dolayısıyla insan ve diğer biyolojik sistemlerle metal oksit NP'lerinin etkileşim şansı da oldukça yüksektir. Bu da insan ve çevre sağlığında beklenmedik sonuçlara yol açabilmektedir (Kumar vd 2014).

2.2. Metal Oksit Nanopartikül Toksisitesi

İnsanlar evrimsel süreçte doğal yollarla oluşmuş olan ve havayla taşınan nano boyutlu parçacıklara maruz kalmışlar ancak, maruz kalınan nanoparçacıkların zararlı etkileri detoksifikasyon ve tamir sistemi tarafından saf dışı bırakılabilmektedir. Fakat nanoparçacıkların doğal yollarla oluşumunun yanında üretimi ve birçok alanda kullanımının yaygınlaşması ile maruz kalınan partiküllerin çeşidi ve maruz kalınan oranı her geçen gün önemli bir ölçüde artmaktadır (Oberdörster vd 2005). Bu sebeple NP'lerin maruziyet verileri, mekanizmaları ve potansiyel etkileri dikkate alınarak insan sağlığı açısından tehlikelerini tahmin etmek son derece önem taşımaktadır.

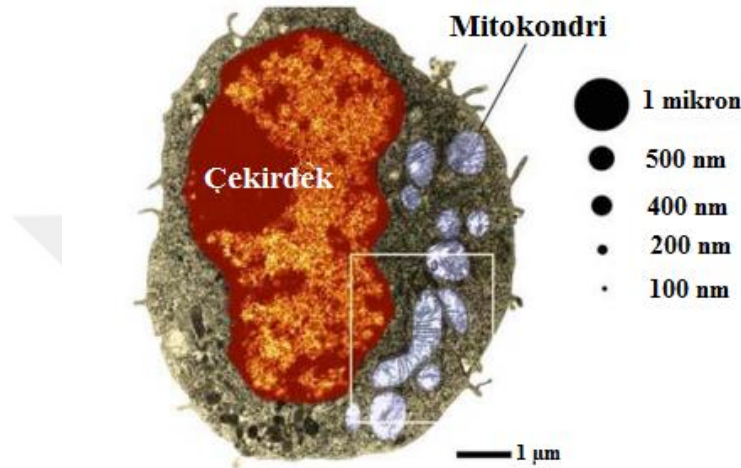
Metaller ve metal oksitler en yaygın nanomateryal bileşim olduğundan, tüketicilerin dermal, yutma (gastrointestinal sistem), inhalasyon (akciğerler) ve intraperitonel (kan dolaşımı enjeksiyonu) yollarıyla normal ürünü kullanırken maruz kalacağı en muhtemel maddelerdir (Oberdörster vd 2005, Kumar vd 2014, Vance vd 2015). Maruziyet yolu, NP'lerin hangi vücut sistemi ya da dokularla etkileşim kurduğunu ve NP maruziyetinin toksik veya fizyolojik fonksiyon bozukluğu gibi etkilerini belirlemektedir (Şekil 2.1) (Armstead ve Li 2016).



Şekil 2.1. Nanopartikül maruziyetinin yolları ve potansiyel zararlı etkileri (Armstead ve Li 2016'den uyarlanmıştır).

NP'ler ile maruziyet sonucunda vücutta maddelerin zararlı etkilerinden kendini korumasını sağlayan, yabancı materyali dışarıda tutmak ve yalnızca belirli özelliklere sahip küçük moleküllerin geçmesini sağlamak için fiziksel, biyokimyasal veya fizyolojik bariyerler bulunmaktadır. Önemli fiziksel bariyerler; hücre membranı, kan-beyin bariyeri, kan-gonad bariyeri, kan-plasenta bariyeri, ince bağırsak, geniz yolu, deri ve ağız mukozasıdır. Önemli biyokimyasal engeller yabancı maddeleri parçalayarak zararsızlaştıran kan ve doku enzimleridir. Fizyolojik engeller ise böbrekler ve safra yolu ile atılımdır. NP toksisitesi için bu bariyerler koruyucu bir rol oynamaktadır (Singh 2016a). Ancak NP'ler küçük boyutlarından dolayı bariyerleri aşır hücre zarından geçip

çekirdeğe ulaşarak doğrudan DNA hasarına yol açabildiği gibi oksidatif strese ve enflamatuar tepkilere neden olarak dolaylı yoldan da DNA hasarına yol açabilmektedir (Rahman vd 2002, Nel vd 2006, Sharma vd 2009, Johnston vd 2010, Karlsson vd 2015). NP'lerin nasıl hücre içine girebildiğini ve çeşitli hücresel bileşenlerle (çekirdek, mitokondri vb.) etkileşim kurabildiğinin anlaşılmasını kolaylaştırmak için Şekil 2.2'de çeşitli boyutlardaki NP'ler ile rat makrofaj hücresi ve organel karşılaştırılması gösterilmektedir. İnsan makrofaj hücrelerinin rat makrofaj hücresine oranla 2 kat daha büyük olması da hem hedefin büyüklüğü hem de kolay ulaşılabilirliği açısından olası tehlikenin boyutunu daha iyi anlatmaktadır (Buzea vd 2007).



Şekil 2.2. Rat makrofaj hücresi ile nanopartikül boyutları karşılaştırılması (Buzea vd 2007'den uyarlanmıştır).

Metal oksit NP'leri küçük parçacık boyutu nedeniyle hücre zarından kolayca geçebildiği ve *in vitro* hücre ölümünü doğrudan indükleyebildiği, ayrıca geniş yüzey alanı sayesinde biyomoleküllerin artan reaktivitesine neden olduğu Ivask vd (2015) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Daha da önemlisi organizmada bulunan bariyerleri aşarak vücuda girdikten sonra *in vivo* ortamda organlara zarar verebilmektedir. NP toksisitesinin başka bir yolu da biyolojik çevredeki malzemelerin partikül çözülmesiyle toksik iyonların salınımına yol açmasıdır. Örn: ZnO NP'leri sulu koşullarda hidrat Zn^{2+} katyonlarını oluşturmak üzere çözünmeye başlamaktadır. Bu iyon salınımı asidik koşullarda (amino asit ve peptidler gibi biyolojik bileşiklerin varlığında) daha da artmaktadır (Xia vd 2008). Ancak metal oksit NP'lerinin toksisitesinin kendisinden mi yoksa salınan iyonlardan mı kaynaklandığı sorusu hâlâ tartışmalıdır. Wang vd (2016) yaptıkları çalışmada sulu ortamda CuO, Fe₂O₃, ZnO, Co₃O₄, Cr₂O₃ ve NiO NP'lerin metal iyonu salınımı araştırmışlardır. Sulu ortamdaki metal oksit NP'lerinin hem çözünme hem de adsorpsiyon süreçlerine bağlı olarak sonuçların metal oksit NP'leri arasında farklılık gösterdiğini saptamışlardır. ZnO NP'lerin toksisitesinin yalnızca serbest bırakılmış Zn^{2+} iyonlarına, CuO NP'lerin toksisitesinin hem salınmış Cu^{2+} iyonlarına hem de CuO nanoparçacıklarına ve Fe₂O₃, Co₃O₄, Cr₂O₃ ve NiO NP'lerin toksisitesinin direkt olarak nanoparçacıklara bağlı olduğunu göstermişlerdir.

Temelde metal oksitlerin toksisite mekanizması esas olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve ROS-aracılı olmayan toksisite olarak iki gruba ayrılabilir. ROS aracılı toksisite, metal oksit NP'lerin en çok kabul gören toksisite mekanizmalarından biridir.

ROS, hücre zarı hasarına, protein denatürasyonuna, DNA hasarına ve mitokondriyal membran geçirgenlik değişimine neden olan oksidatif stresi etkinleştirir. Ayrıca, ROS kaspaz-9 ve -3'ü aktive edebilir ve apoptotik yolu tetikleyebilir. Ek olarak araştırmacılar NP'lerin spesifik ölüm reseptörlerine bağlanması, hücre yüzeyinde aşırı birikimi ve salınan iyonların etkileri gibi ROS aracılı olmayan mekanizmaların varlığını da ortaya koymuşlardır (Wang vd 2017). Bunlara ek olarak metal oksit NP'ler biyolojik sistemlerde hücre, biyokimyasal ve genetik düzeyde çeşitli süreçlerin aktivitelerini değiştirmektedir. Bunlar onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre döngüsü kontrol noktalarının değiştirilmesi, DNA tamirinin bozulması gibi etkilerdir (Kumar vd 2014). Bununla beraber DNA hasarının onarılmamasının da karsinogeneze yol açtığı bilinmektedir.

Metal oksit NP'lerinin hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde toksisiteye neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Baek ve An 2011, Ge vd. 2011, Kumar vd 2011, Shukla vd 2013, Ali vd 2014). Bu sebeple biyolojik sistemlerdeki NP'lerin hem yararlı hem de toksik etkilerinin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. ZnO NP'lerinin RAW 264,7 (fagositik hücre hattı) ve BEAS-2B (insan bronşiyel epitel hücre hattı) hücre hatlarında sitotoksik ve oksidatif strese sebep olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışma sonucunda, ZnO NP'lerinin her iki hücre hattında da toksisiteyi ROS üretimi, oksidatif hasar, enflamasyon ve hücre ölümünün uyarılmasına yol açarak indüklediği saptanmıştır (Xia vd 2008). Sharma vd (2009) KOMET testi kullanarak yaptıkları çalışmada kozmetikte yaygın olarak kullanılan ZnO NP'lerinin genotoksitesini insan epidermal hücre hattında araştırmışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda glutatyonun tükenmesi ile hücrelerde oksidatif stresin arttığı ve artan oksidatif strese bağlı olarak 6 saatlik maruziyet sonucunda düşük konsantrasyonlarda bile kontrol grubuna göre kuyruk uzunluğu bakımından anlamlı derecede DNA hasarı oluştuğunu göstermişlerdir. Rahman vd (2002) Suriye hamster embriyolarında (SHE) yaptıkları çalışmalarında ince TiO_2 ile ultra ince TiO_2 (<20nm)'in toksisitesini mikronükleus (MN) testi ile karşılaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada 12, 24, 48, 66 ve 72 saat ultra ince TiO_2 maruziyetinden sonra SHE hücrelerinde MN frekansının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını tespit etmişlerdir. Baek ve An (2011), *E. coli*, *B. subtilis* ve *S. aureus* mikroorganizmaları ile yaptıkları çalışmalarında 4 tane metal oksit NP'ün (CuO , NiO , ZnO ve Sb_2O_3) toksisitesini değerlendirmişlerdir. Kullandıkları metal oksit NP'leri üç tür üzerinde de mikrobiyal toksisite göstermiştir. Test edilen NP'ler içerisinde en toksik olanın CuO NP'leri ve ardından ZnO (*S. aureus* hariç), NiO ve Sb_2O_3 NP'leri olduğunu saptamışlardır. Ivask vd (2015) 10-20 nm arasında 11 metal oksit NP'ün (Al_2O_3 , Co_3O_4 , CuO , Fe_3O_4 , MgO , Mn_3O_4 , Sb_2O_3 , SiO_2 , ZnO , TiO_2 , WO_3) toksisitesini üç farklı memeli hücre hattı üzerinde (A549, Caco-2 ve Balb/c 3T3 fibroblast hücre hattı) araştırmışlardır. NRU (Neutral Red Uptake) testi ile elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda sadece 5 NP'ün (CuO , ZnO , Sb_2O_3 , Mn_3O_4 , Co_3O_4) kullanılan konsantrasyonlarda 100 $\mu\text{g/ml}$ 'nin altında toksik olduğunu, geri kalan 6 NP'ün (Al_2O_3 , Fe_3O_4 , MgO , SiO_2 , TiO_2 , WO_3) 100 $\mu\text{g/ml}$ 'nin altında toksik etki göstermediklerini kanıtlamışlardır. Horie vd (2012) 24 metal oksit NP'ün (ZnO , CuO , NiO , Sb_2O_3 , CoO , MoO_3 , Y_2O_3 , MgO , Gd_2O_3 , SnO_2 , WO_3 , ZrO_2 , Fe_2O_3 , TiO_2 , CeO_2 , Al_2O_3 , Bi_2O_3 , La_2O_3 , ITO ve kobalt mavisi pigmentleri) toksisitesini hücre canlılığı ve oksidatif stres parametrelerini kullanarak araştırmışlardır. ZnO , CuO , NiO , MgO ve WO_3 NP'leri kültür ortamında büyük miktarda metal iyonu salınımı göstermiştir. Bu çözünür nanoparçacıkların hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinin çözünmeyen NP'lerden daha

büyük olduğunu göstermişlerdir. Kullandıkları metal oksit NP'lerinin hücrel etkilerinin çözeltideki serbest metallerin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu bulmuşlardır. Buradan, metal oksit NP'lerinin en önemli sitotoksik faktörünün metal iyonu salınımı gerçekleştirmeleri olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Son olarak, Chusuei vd (2013) BeAS-2B (insan bronşiyal epitel hücreleri) ve A549 (insan akciğer karsinoma hücreleri) hücre hattı üzerinde TiO_2 , Cr_2O_3 , Mn_2O_3 , Fe_2O_3 , NiO , CuO , ve ZnO NP'lerinin sitotoksitesini araştırmışlardır. Sonuçlar sitotoksitesinin partikül yüzey boyutu, mevcut yüzey bağlanma alanlarının göreceli sayısı ve NP'lerden metal iyonu salınımının bir fonksiyonu olduğunu göstermiş.

2.3. Seryum Oksit Nanopartikülleri (CeO_2 NP)

Seryum, nadir toprak elementlerinin lantanid üyesidir. Son derece reaktiftir ve güçlü bir oksitleyici maddedir. Seryum ve seryum oksit (CeO_2) bir süredir endüstriyel amaçlar için kullanılmasına rağmen nano-boyutlu CeO_2 'in son yıllarda geniş uygulama alanları bulunmaktadır (Cassée vd 2011). Rundle vd (2016)'nın bildirdiklerine göre CeO_2 NP'lerinin küresel üretimi yılda yaklaşık 10.000 ton olarak tahmin edilmektedir.

CeO_2 NP'leri çevre gözlem sensörlerinde elektrot malzemesi olarak, katı oksit yakıt hücrelerinde oksijen iletkeni olarak, kozmetikte UV engelleyici bileşen olarak ve yüksek sıcaklıkta süper iletken olarak geniş bir uygulama alanına sahiptir (Karlsson vd 2015). CeO_2 NP'leri küçük enerji girişiyle +4 değerlikli durumdan (CeO_2), +3 değerlikli duruma (Ce_2O_3) dönüşerek yanma reaksiyonlarında oksidatif katalizörler gibi hareket edebilmektedir (Rundle vd 2016). Bunun yanında otomotiv sektöründe hem yanma sonrası partikül egzoz içeriğini azaltmak için dizel yakıt katkı maddesi olarak hem de otomobil emisyon sistemlerinde kirleticileri oksitlemek için katalitik konvertörlerin bir unsuru olarak giderek artan bir kullanıma sahiptir (Karlsson vd 2015). Yakıt katkı maddelerinde kullanıldığından hava kalitesi, iklim değişikliği ve halk sağlığı üzerine etkileri açısından önemlidir ve etkileri henüz belirsizdir. Tüm bunların yanında CeO_2 NP'leri sigara katkı maddesi olarak ve terapötik olarak da tüketici ürünlerinin çeşitli uygulamalarında kullanılabilmektedir. Güçlü UV radyasyonu absorbe etmesi nedeniyle ve ayrıca görünür ışık için saydam olduğundan güneş kremlerinde kullanılabilmektedir (Cassée vd 2011, Fourches ve Tropsha 2014). Ayrıca hücrelerin radyasyondan korunmasını sağlamanın yanı sıra kanser ve inflamasyon tedavisi için biyomedikal sektöründe kullanılmaktadır (Taylor vd 2015). Bu nedenlerle bu maddenin çevresel etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu da hayvan modelleri kullanarak farklı hücre temelli testlerin uygulanmasına dayanmaktadır.

Mikro ölçekli CeO_2 maruziyetinin en muhtemel yolunun solumayla gerçekleştiği düşünülmektedir. Seryuma mesleki olarak maruz kalmış insanların akciğer dokularında ve alveolar makrofajlarda seryum tespit edilmiştir. Mikro ölçekli CeO_2 yutulması solunmasından daha az endişe vericidir çünkü bağırsaklardan az absorbe olmaktadır (Cassée vd 2011).

CeO_2 NP'lerin çevreye salınımları sonucunda akıbeti, biyotaya etkileri ve toksisitesi de dahil olmak üzere potansiyel etkileri yeterince aydınlatılamamıştır ve riskini değerlendirmek için yeterli nicel veriler bulunmamaktadır (Taylor vd 2015). CeO_2 NP maruziyetinin biyolojik etkileri hakkında bilgiler mevcuttur ancak bulgular biraz çelişkilidir (Fourches ve Tropsha 2014, Taylor vd 2015). Farklı koşullar altında oksidatif strese neden olabilmelerine rağmen son zamanlarda CeO_2 NP'leri, biyolojik sistemlerde

oksidatif stresin azaltılması için bir serbest radikal süpürücü olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Ju-Nam ve Lead 2008).

CeO₂ NP'leri ile ilgili literatür bilgilerine baktığımızda; Park vd (2008) yaptıkları çalışmayla BEAS-2B (insan bronşiyel epitel hücre hattında) hücreleri üzerinde farklı boyutlardaki (15, 25, 30, 45 nm) CeO₂ NP'lerinin sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Kültüre alınmış BEAS-2B hücrelerinin CeO₂ NP'lerine maruziyetleri (5, 10, 20, 40 µg/ml) sonucunda hücre ölümü, ROS artışı, GSH düşüşü ve oksidatif stresle ilgili genlerin indüklenmesine yol açtığını tespit etmişlerdir. Ayrıca CeO₂ NP'leri tarafından artan ROS, kromatin yoğunlaşmasını ve sitozolik kaspaz-3'ün aktivasyonunu tetiklemiştir. Bu da CeO₂ NP'lerinin apoptoza neden olarak sitotoksikite yarattığını gösteren bir sonuçtur. Lin vd (2006), A549 hücre hattında (kültüre edilmiş insan akciğer kanser hücrelerinde) 20 nm boyutundaki CeO₂ NP'lerinin sebep olduğu sitotoksikite ve oksidatif stresi araştırmışlardır. Yapılan çalışmada sulforhodamin-B yöntemi ile 24, 48 ve 72 saat CeO₂ NP'lerinin farklı dozlarına maruz bırakıldıktan sonra hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Hücre canlılığının NP'lere maruziyet süresine ve dozuna bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. CeO₂ NP'lerine maruziyeti sonucu ROS oluşumunun tetiklendiği gösterilmiştir ve elde edilen sonuçlara göre CeO₂ NP'lerin hücrede oksidatif stres artırdığı sonucuna varılmıştır. Oksidatif stresin artması malondialdehit ve laktat dehidrojenaz üretimini arttırmaktadır ki bu da lipid peroksidasyonu ve hücre hasarının göstergeleridir. Rosenkranz vd (2012) yaptıkları çalışmada farklı boyutlarda iki CeO₂ NP ve mikro ölçekli CeO₂ parçacığını H4IIE sıçan hepatoma hücre hattı ve RTG-2 gökkuşağı alabalık gonadal hücrelerinde standart sitotoksikite testleri ile test etmişlerdir. H4IIE hücre hattında, MTT sitotoksikite testinde mikro boyutlu CeO₂ parçacığında negatif bir sonuç gözlenmezken nano boyutlu CeO₂'lere maruziyetten sonra, partikül boyutu ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma saptamışlardır. Çalışma sonucunda nano ölçekli parçacıkların mikro boyutlu parçacıklara göre daha erken veya daha belirgin toksik cevaba neden olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada CeO₂ NP'lerinin (7nm) insan dermal fibroblastları üzerine sitotoksikite ve genotoksikitesi araştırılmıştır. KOMET ve MN testleri sonucunda düşük dozlarda bile NP'lerin oksidatif strese bağlı kromozom hasarına ve güçlü DNA lezyonlarına yol açtığını göstermişlerdir. Genotoksikitenin, yüzey atomlarının bir kısmının indirgenmesinden dolayı kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (Auffan vd 2009). Önceki çalışmalar göstermektedir ki CeO₂ NP'lerinin bitki büyümesi ve üretimi üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır (Rossi vd 2016). Lopez-Moreno vd (2010) soya fidelerinde CeO₂ NP'lerinin doza bağlı olarak DNA hasarına neden olduğunu RAPD testi ile saptamışlardır. Yine aynı ekibin başka bir çalışmasında 4 yenilebilir bitki (mısır, yonca, domates ve salatalık) tohumlarını CeO₂ NP'leri ile maruz bıraktıkları çalışma sonucunda yonca ve domateste kök gelişimi azalırken salatalık ve mısırdaki arttığını, bunun yanı sıra mısır, domates ve salatalık çimlenmesinin de azaldığını tespit etmişlerdir (Lopez-Moreno vd 2010a).

Yapılan çalışmalardan elde edilen genotoksik ve sitotoksik bulguların aksine CeO₂ NP'nün, materyalin elektronik özelliklerine göre artmış ROS üretimine karşı koruyucu hücresel yanıtı indüklediği ve bu nedenle oksidatif stresi azalttığı veya serbest radikal süpürücü olarak hareket ederek sitotoksikiteyi azalttığı bildirilmiş bu sebeple sitokoruyucu ve antioksidan etkilere sahip olabildiği de çeşitli çalışmalarla ileri sürülmüştür (Chen vd 2006, Schubert vd 2006). Bir çalışmada makrofaj ve epitelium hücrelerinde ZnO ve CeO₂ NP'leri oksidatif hasar paradigmasına göre karşılaştırılmıştır

ve CeO₂'in antioksidan özelliği nedeniyle 25 mg/L'de sitokoruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Xia vd 2008). Rubio vd (2016) oksidatif stres indükleyici ajan (KBrO₃)'a karşı CeO₂ NP'lerin antioksidan özelliğini BEAS-2B (insan bronşiyel epitel hücre hattı) hücrelerinde araştırmışlardır. CeO₂ NP'lerinin KBrO₃ tarafından indüklenen ROS'un hücre içi üretimini önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. KOMET testi sonucunda da oksidatif DNA hasarının azaldığı gösterilmiştir. Tarnuzzer vd (2005) normal meme hücreleri ile yaptıkları *in vitro* çalışmada CeO₂ NP'lerinin radyasyona karşı koruyucu olduğu göstermişlerdir. Rosenkranz vd (2012) yaptıkları çalışmada CeO₂'in toksik ya da yararlı etkilerinin parçacıkların bulunduğu hücre bölümlerinin pH değerine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Yang vd (2017) bir agar ortamında yetiştirilen *Arabidopsis thaliana*'daki CeO₂ NP'lerin fitotoksitesini ve alımını araştırmışlardır. Düşük konsantrasyonlarda CeO₂ NP'in bitki büyümesinde uyarıcı etkilerinin olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda (2000 veya 3000 mg/L) büyümeyi azalttığı ve antioksidan sistemler üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Bununla birlikte toksisitenin çözülmüş Ce iyonlarından çok NP'lerden kaynaklandığını göstermişlerdir.

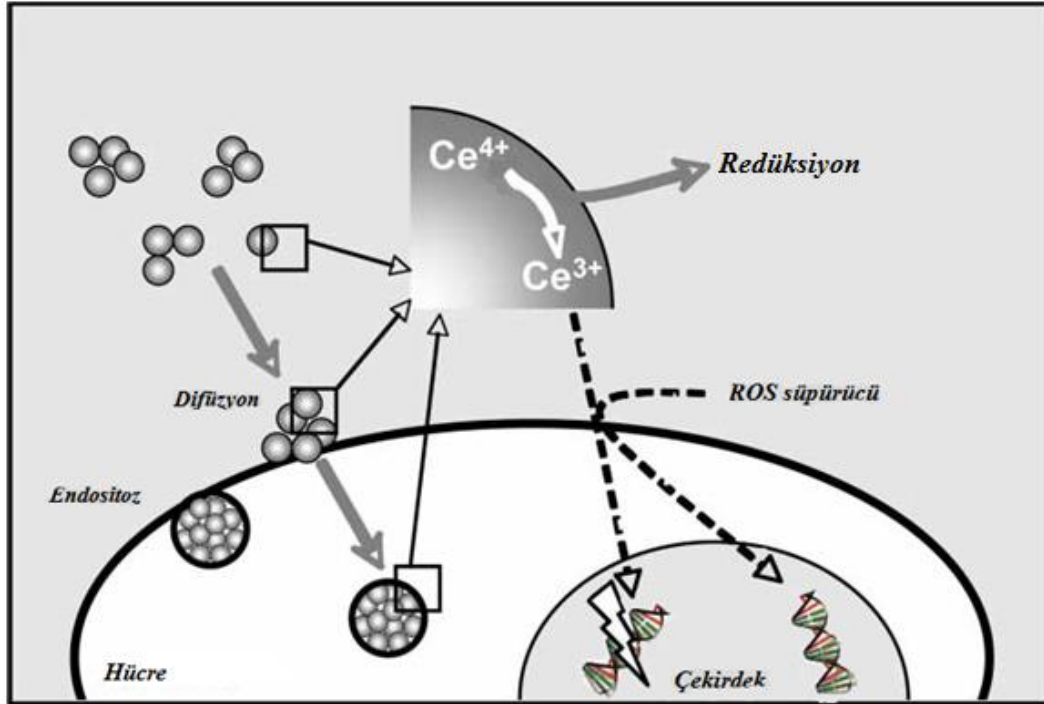
Sucul ortam çalışmalarında da benzer çelişkiler vardır. CeO₂'in atık sularla akarsulara karışarak birikim gösterdiği ve buradaki organizmalara zarar verebildiği bilinmektedir (Baker vd 2016). Johnston vd (2010) yaptıkları çalışmada Zebra balığının TiO₂, ZnO ve CeO₂ maruziyeti sonucunda biyolojik birikim seviyelerini tespit etmişlerdir. CeO₂ NP'nün 500 µg L⁻¹'de karaciğerde birikim yaptığı diğer konsantrasyonlarda ve diğer dokularda (solungaç, beyin ve deri) anlamlı bir sonuç vermediğini bulmuşlardır. Bununla birlikte CeO₂ NP'lerinin balıkta TiO₂ ve ZnO NP'lerinden daha çok biriktiğini göstermişlerdir. Van Hoecke vd (2009), tek hücreli alg *Pseudokirchneriella subcapitata*'da, iki kabukluda (*Daphnia magna* ve *Thamnocephalus platyurus*) ve *Danio rerio* embriyolarında farklı boyutlarda (14, 20 ve 29 nm) CeO₂ NP'lerinin akut toksisitesini incelemişlerdir. *T. platyurus* ve *D. rerio* için akut toksisitenin olmadığını tespit etmişken tek hücreli algde kronik toksisitenin partikül boyutu azaldıkça arttığını gözlemişlerdir. Lee vd (2009) *Cophylaxus riaparius* ve *D. magna*'da CeO₂, TiO₂ ve ZnO NP'lerinin genotoksik etkisini KOMET yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında TiO₂ ve ZnO NP'leri maruz bırakılan iki türde de genotoksik etki yaratmamıştır ancak CeO₂ NP'leri iki tür üzerinde de artan DNA iplik kırılmaları ile genotoksik etkisini göstermiştir. Aynı zamanda NP boyunun küçüldükçe DNA kırıklarının da arttığını tespit etmişlerdir. Rundle vd (2016) yaptıkları çalışmada Tekir Balığı'nı (*Catostomus commersoni*) CeO₂ NP'lerine akut olarak maruz bırakmışlar ve 25 saat süreyle kalp hızı değişkenliğini takip etmişlerdir. Çalışma sonuçlarında antioksidan etkilere dair bir kanıt bulunamamasına rağmen ROS üretiminin indüklenmediği ve oksidatif hasar gerçekleştirmediğinden CeO₂'in koruyucu olma görüşünü desteklemektedir.

Bunların yanında CeO₂ NP'lerinin bakteriyel ekotoksitesini araştıran çeşitli çalışmalar da yapılmıştır. NP'ler nötr pH değerinde pozitif yüklüdür ve bu nedenle bakteri dış zarlarına karşı güçlü bir elektrostatik çekim göstermektedirler. Thill vd (2006) 7 nm boyutundaki CeO₂ NP'lerinin Gram-negatif bakteriye (*Escherichia coli*) etkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada nanoparçacıklar bakteriyel hücre yüzeyinde adsorbe edildiğinde bir oksidatif tepki nedeniyle *E. coli* için toksik olduğunu göstermişlerdir. Aynı şekilde Pelletier vd (2010) yaptıkları çalışmada CeO₂ NP'lerinin *S. oneidensis*'nin aksine *E. coli* ve *B. subtilis* üzerinde büyüme engelleme özelliği gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *E.*

coli üzerindeki başka bir çalışmada da 7 mg/L üzerinde, bakteriyel yaşam oranında % 50 düşüş görülmüştür (Houdy vd 2011).

Tüm bu çalışmalar ışığında CeO_2 NP'in toksisitesinin genel olarak Ce^{4+} 'ün Ce^{3+} 'e redüksiyonu ile ROS kaynaklı olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 2.3.). CeO_2 NP kaynaklı hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) gibi reaktif türleri aşağıdaki 1, 2, 3 ve 4 reaksiyonları tarafından üretilmektedir. Ayrıca lipid peroksitten (LOOH) alkol radikalleri de üretilebilmektedir (5. Reaksiyon). Reaksiyon 1'deki A_{red}^- askorbat ve tiol bileşikleri gibi önemli indirgeyicilerdir, A_{ox} ise oksitlenmiş halidir (Lin vd 2006, Houdy vd 2011). CeO_2 NP'leri tarafından üretilen oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu için muhtemel kimyasal reaksiyonlar;

1. $\text{Ce}^{4+} + \text{A}_{\text{red}}^- \rightarrow \text{Ce}^{3+} + \text{A}_{\text{ox}}$
2. $\text{Ce}^{3+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Ce}^{4+} + \text{O}_2^-$
3. $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
4. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$
5. $\text{LOOH} + \text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+} + \text{LO} + \text{OH}^-$



Şekil 2.3. CeO_2 NP'lerinin olası genotoksik ve sitotoksik etkisi (Auffan vd 2009'den uyarlanmıştır).

2.4. Magnezyum Oksit Nanopartikülleri (MgO NP)

Magnezyum (Mg) biyolojik olarak parçalanabilir bir biyomalzemedir. Ayrıca insan biyolojisinde birçok hayati rol oynamaktadır. Mg, MgO ve MgOH şeklinde bir besin takviyesi olarak oral yolla alınır. Magnezyumun oral olarak alınan farklı formları suda çözünmez, fakat mide suyu içinde kolaylıkla çözünebilir ve Mg iyonları midede çözünerek biyolojik olarak kullanılabilir hale gelmektedir. MgO ve MgOH bezelye gibi konserve sebze üretiminde ve süt ürünlerinde pH kontrolünde görev yapmaktadır

(Mirhosseini ve Afzali 2016). Son zamanlarda da MgO NP'leri nano kriyoterapi ve hipertermi olarak kanser terapisinde uygulamaları için giderek artan bir şekilde tanınmaya ve kullanılmaya başlamıştır (Krishnamoorthy vd 2012). MgO NP dünya pazarında 2015-2022 yılları arasında fırın kaplamaları, inşaat ve seramik, ilaç ve gıda katkı maddelerinde talebin artmasından dolayı güçlü bir büyüme yaşayacağı beklenmektedir (Grand View Research Inc. 2017). Grand View Research Inc. tarafından yapılan araştırmaya göre, küresel MgO NP pazarı 2020 yılına kadar 42,3 milyon dolara ulaşması beklenmektedir. Küresel MgO NP piyasa talebinin ise 2013 yılında 111.3 ton iken 2020 yılında 185.5 tona ulaşması beklenmektedir (Focus On Powder Coatings 2014).

MgO NP'leri cilt, akciğerler ve sindirim sistemi yoluyla absorbe edilebilmekte ve hedef dokularda birikebilmektedir. Bu NP'lerin toksik etkilerinin araştırılması önemlidir, çünkü hücreler ve organlar üzerindeki etkileri şu an net olarak bilinmemektedir (Ghobadian vd 2015). Literatürdeki MgO NP'lerinin toksisitesi ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Yapılmış olan çalışmalarda da MgO NP'lerine farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. MgO NP'leri ile ilgili literatür bilgilerine baktığımızda; Kiranmai ve Reddy (2012) çalışmalarında MgO NP maruziyetinden sonra rat serumunda MgO NP'lerinin toplam antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif strese yol açtığını göstermişlerdir. Virgilio vd (2011) Mg partiküllerinin (58.9 μm) olası sitotoksik ve genotoksik etkilerini rat osteosarkom UMR106 hücrelerinde MN ve KOMET testi ile değerlendirmişlerdir. KOMET testi ile değerlendirilmesi sonucu doza bağlı sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır. Sun vd (2011) çalışmalarında MgO NP sitotoksitesinin insan kalp mikrovasküler endotel hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak arttığını tespit etmişlerdir (24 saatlik maruziyette 50 $\mu\text{g/ml}$ 'de ve 12 saatlik maruziyette 100 $\mu\text{g/ml}$ 'de). Krishnamoorthy vd (2012) yaptıkları çalışmada, normal akciğer fibroblast hücreleri ve farklı kanser hücre hatlarına karşı, MgO NP'lerinin sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. MgO NP'lerinin HeLa, AGS ve SNU-16 gibi kanserli hücreleri öldürme yeteneği sergilediğini göstermişlerdir. Sonuçta MgO NP'lerinin kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonuna neden olduğu bu sebeple de kanser tedavilerinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Kanser hücrelerinde ölüme neden olması MgO NP'lerinin ROS üretimine neden olarak sitotoksiteyi indüklemesinden kaynaklanmaktadır. Ge vd (2011) yaptıkları çalışmada, MgO NP sitotoksitesini insan göbek kordon endotelial hücrelerde *in vitro* olarak incelemişlerdir. MgO NP'lerinin düşük konsantrasyonda (200 mg/ml altında) MTT testinde sitotoksik etkisine rastlamamışlardır. Ancak 500 mg/ml ve daha fazla konsantrasyonlarda sitotoksite gözlemişlerdir. Deney sonuçları MgO NP'lerinin sitotoksitesinin temas süresi ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Lai vd (2008)'nin çalışmalarında insan astrositom U87 karşı MgO NP'lerinin ZnO ve TiO₂ NP'lerine göre daha düşük sitotoksite gösterdiği belirtilmiştir. Nodeh vd (2016) ratların pankreas adacıkları üzerine MgO NP'lerinin (<10nm) etkisini araştırdıkları çalışmada, MgO NP'lerine 24 saat süre ile maruz bırakılan pankreas adacıklarında hücre canlılığını MTT testi ile ve bunun yanında kaspaz aktivitesinin seviyesi ve insülin salınımının seviyesini ELISA testi ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda MgO NP'lerinin 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda kaspaz-9 aktivitesini inhibe ederek apoptotik hücre oranında önemli bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu konsantrasyondaki MgO NP'leri insülin seviyesinin önemli artışına neden olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda MgO NP'lerinin anti-apoptotik ve anti-diyabetik olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir. Öte yandan, MgO NP'lerinin hücrelerde ve hayvanlarda toksik etkilere sebep olmadığını

gösteren sonuçlar da bulunmaktadır (Moeini-Nodeh vd 2016). Thomas vd (2014) yaptıkları bir çalışmada MgO NP'lerinin (<50nm) Tilapia ve Zebra balığı üzerindeki toksik potansiyelini araştırmışlar ve elde ettikleri sonuçlarla MgO NP'nün her iki balıkta da ölüm oranındaki artışa neden olmadığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada MgO NP sulu çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksitesisi laktat dehidrojenaz salınımının standart ölçülmesiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda kullanılan MgO NP'leri uygulanan tüm konsantrasyonlarda da sitotoksik etki göstermemiştir (Monzavi vd 2015). Bir diğer çalışmada SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki MgO NP'lerinin sitotoksitesisi ve nörotoksitesisi araştırılmıştır ancak toksisiteye neden olduğu sonucuna ulaşılmamıştır (Hasbullah vd 2013).

MgO NP'leri ayrıca anti-bakteriyel madde olarak da önemli bir potansiyele sahiptir ve bu anti-bakteriyel etkisini araştıran çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Mirhosseini ve Afzali (2016) çalışmalarında *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı MgO NP'lerinin diğer antimikrobiyallerle birlikte sütteki antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. Sonucunda MgO NP'lerinin diğer antimikrobiyallerle sinerjik etki göstererek sütte antibakteriyel etki gösterdiğini saptamışlardır. MgO NP'lerinin *E. coli* ve *S. aureus*'da yapılan çalışma sonucu bakteriyel yaşam oranının partikül boyutuna bağlı olduğunu gösterilmiştir (Makhluf vd 2005). *Bacillus subtilis*'de yapılan başka bir çalışmada ise partikül boyutu küçüldükçe bakterisidal etkinin arttığı saptanmıştır (Huang vd 2005).

2.5. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Genetik toksikolojide vurgu genel olarak gen mutasyonu, KA (kromozomal aberasyon) ve yakın zamanda anöploidi gibi klasik genetik değişikliklerin incelenmesi üzerine kurulmuştur. Çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla *in vitro* ve *in vivo* geliştirilen genotoksitesite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar da mutajenik, genotoksik ve karsinojenik potansiyellerin ölçülebilmesi için birçok genotoksitesite testi geliştirilmiştir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ökaryotik bir organizma olan *Drosophila melanogaster*'in model organizma olarak kullanıldığı *in vivo* bir sistemdir. Rekombinajenik aktivitenin, genel olarak DNA hasarının dolaylı bir ölçütü olduğu düşünülmüştür. Ancak daha sonra, rekombinasyonun, eşey hücreleri ve somatik hücrelerdeki heterozigotluk kaybindan da sorumlu olabileceği anlaşılmıştır. Maruz kalınan kimyasal maddelerin risk potansiyellerinin araştırılmasında rekombinajenik etkinin önemi fark edilince mitotik rekombinasyonu ölçebilen test sistemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen test sistemleri bakteride, mayada, *Drosophila*'da, memeli hücre kültürlerinde ve *in vivo* olarak memelilerde (fare) mevcuttur (Spano vd 2001). Kimyasalların mutajenik ve rekombinojenik aktivitesinin saptanması için de yeni bir test sistemi olarak *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) geliştirilmiştir (Graf vd 1984). *Drosophila* kanat SMART'ın avantajı, sadece mitotik rekombinasyonu değil aynı zamanda çeşitli mutasyon tiplerinin oluşumunu da tespit edilmesine olanak sağlamasındandır.

Bu test, çaprazlama sonucu elde edilen transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde heterozigotluğun kaybolarak, genetik değişimlerin fenotipte gözlenmesi esasına dayanmaktadır (Graf vd 1984, 1989). Heterozigotluğun kaybolması larval imajinal disk hücrelerinde resesif marker (belirteç) genin ekspresyonuna neden

olmaktadır. Mutant hücre klonları, kanatta mozaik klon olarak ortaya çıkmasıyla belirlenmektedir (Spano vd 2001).

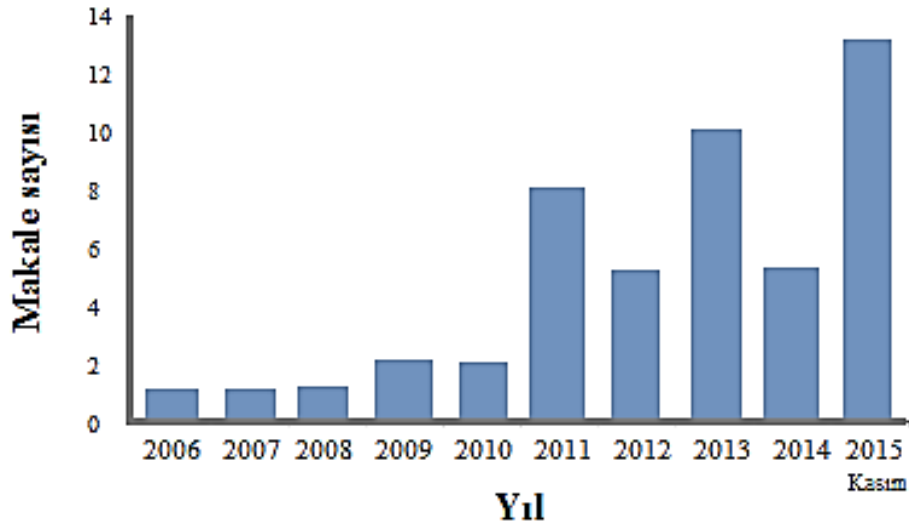
Drosophila kanat SMART'ın avantajlarından biri de kimyasala maruz bırakılmış sineklerin % 70'lik alkol içerisinde saklanabilme imkanının olması ve daimî kanat preparatlarının hazırlanabilmesiyle sonuçları doğrulama ve yeniden değerlendirilmeyi her zaman mümkün kılmasıdır (Graf vd 1984). Bununla birlikte *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, hızlı ve kolay olmasının yanında ucuz bir şekilde genetik hasar tespiti için dizayn edilmiştir (Guzman-Rincon vd 2001). Birçok araştırmacı tarafından tercih edilen SMART birçok çalışmada genotoksiste test sistemi olarak kullanılmıştır (Graf ve van Schaik 1992, Kaya vd 2002, Avalos vd 2015, Rodrigues vd 2017).

2.6. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, 1900'lerin başında laboratuvarındaki ilk kullanımından günümüze kadar genetik alanında önemli atılımların başında gelmektedir. *D. melanogaster* ilk olarak J.W Meigen tarafından 1833 yılında tanımlanmıştır. Ardından 20. yüzyılın başlarında entomolog olan Charles W. Woodworth tarafında ilk defa laboratuvar da kültüre edilerek üretilmiştir ve genetik çalışmalarda kullanılabileceğini öngörmüştür. Sonraki dönemlerde kısa hayat döngüsü ve kolay kültüre edilebilmesi bakımından laboratuvar çalışmalarında yerini almaya başlamıştır. Bir model organizma olarak *Drosophila*'nın genetik çalışmalarda kullanılması ilk defa T.H. Morgan tarafından 1909 yılında önerilmiştir (Robert 2006, Markow 2015).

20. yüzyıl boyunca ve 21. yüzyılda *Drosophila* önemli bir model organizma olmuştur. Bu kadar önemli olmasının ve kullanımının tercih edilmesinin sebebi birçok avantaja sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Pek çok deney için, haploid kromozom setinin tüm genetik materyalinin sadece dört kromozomda mevcut olması büyük avantaj sağlamaktadır. Küçük kromozom sayısı, bir mutantın bağlantı grubunu belirlemeyi kolaylaştırmaktadır (Graf vd 1992). Ayrıca *D. melanogaster*, insan hastalığının (özellikle kalp rahatsızlığı, zihinsel ve nörolojik hastalıklar, uykusuzluk hastalığı, kanser ve obezite gibi) hayvan modellerinin oluşturulmasında giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. İnsan hastalık genlerinin yaklaşık % 65'inin *D. melanogaster*'de karşılık geldiği tahmin edilmektedir (Markow 2015). Buna ek olarak, *Drosophila*'nın ksenobiyotik metabolizması için çok yönlü bir sisteme sahip olduğu iyi bilinmektedir. Üçüncü kromozom üzerindeki *mwh* ve *flr³* markerları için trans heterozigot larvaları kullanılarak yapılan *Drosophila* kanat SMART'ın genotoksistesinin araştırılması için kolay ve ucuz bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Graf ve van Schaik 1992).

Genetiği ve genomu hakkında kapsamlı bilgiye sahip olunması, *Drosophila* genleri ile insan genleri arasındaki yüksek homoloji ve kısa hayat döngüsü *Drosophila*'yı *in vivo* olarak NP'lerin toksisitesini ve genotoksistesini incelemek için ideal bir model yapmaktadır (Avalos vd 2015). Şekil 2.4'de 2006 ile 2015 Kasım ayları arasındaki NP'lerin değerlendirilmesinde *D. melanogaster*'in kullanıldığı yayınlanmış makale sayısı gösterilmektedir (Alaraby vd 2016).



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin değerlendirilmesinde *in vivo* model olarak *Drosophila melanogaster* kullanılan yayımlanmış makalelerin 2006-2015 Kasım ayı arasında yıllık sayısı. (Alaraby vd 2016'dan uyarlanmıştır).

3. MATERYAL VE METOT

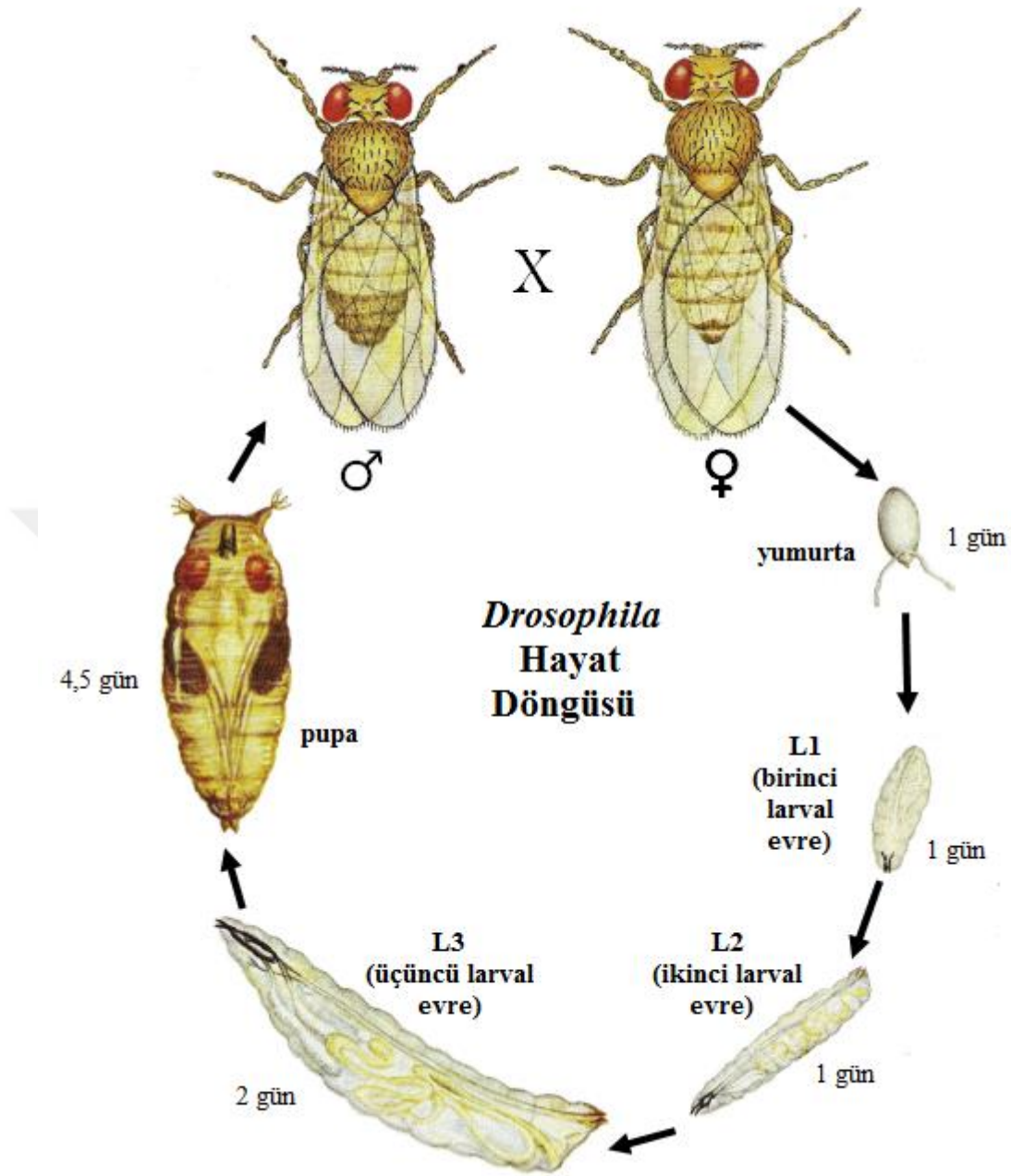
Bu çalışmada CeO₂ NP (<25) ve MgO NP (<50)'lerinin ve bunların iyonik formlarının *D. melanogaster* hatlarında genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. MgO ile CeO₂ NP'leri ve iyonik formlarına ait dört farklı konsantrasyon (1, 2, 5 ve 10 mM) geniş spektrumda incelenmesi amacıyla uygulanmıştır.

Bu çalışmada genetik değişimlerin gözlenebilmesi için *Drosophila*'da flare (*flr*³, 3-38.8) ve multiple wing hair (*mwh*, 3-0.3) belirleyici genlere sahip bireyler kullanılmıştır.

3.1. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Mevye sineği veya sirke sineği olarak adlandırılan *D. melanogaster* genetik çalışmalarda kullanımı açısından ideal bir model organizmadır. Sadece 9-11 günlük bir süreçte yumurta aşamasından ergin birey haline gelmesi, basit bir şekilde kültüre edilebilmesi, yüksek üreme potansiyeli ve kolayca tanınan genetik belirteçlerinin olması sebepleriyle birçok genetik araştırmalarda tercih sebebidir (Graf vd 1992, Alaraby vd 2016).

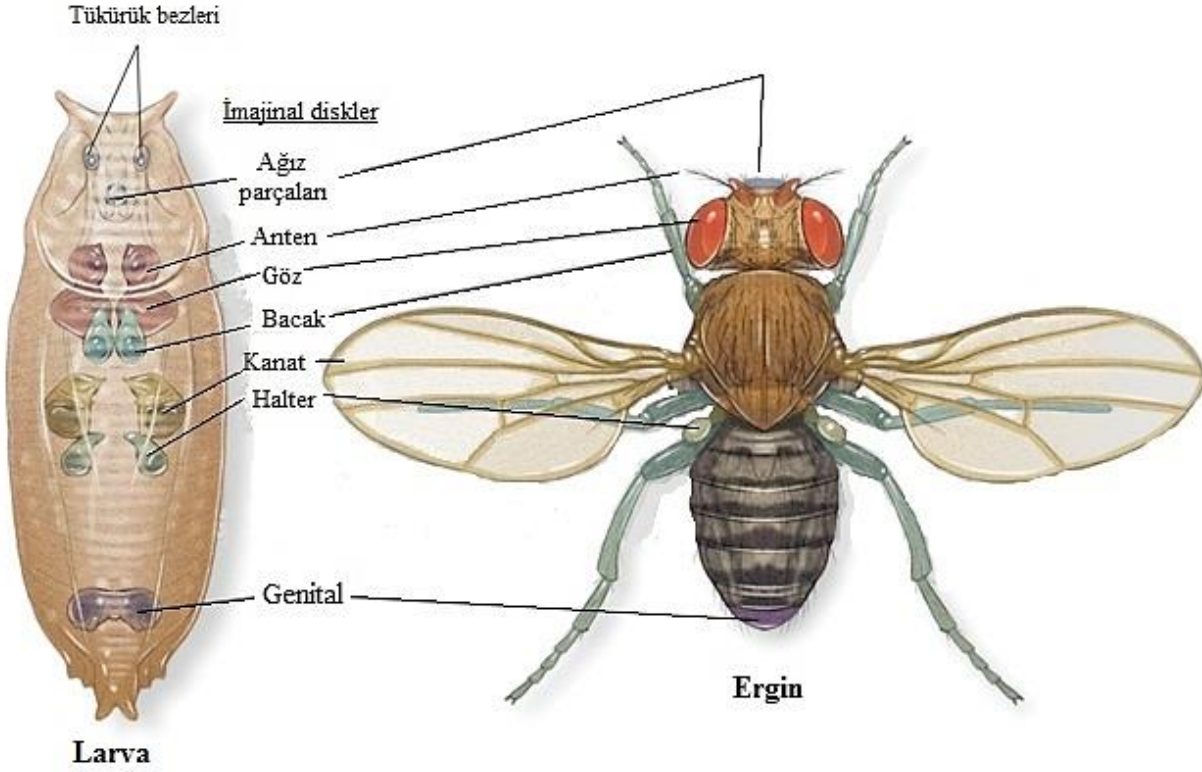
Holometabol böcekler grubuna ait olan *D. melanogaster* tam başkalaşım geçirmektedir. Optimum büyüme sıcaklığı 25 °C'dir ve yaşam döngüsünü embriyonik gelişim, birinci larval evre, ikinci larval evre, üçüncü larval evre, pupa ve yetişkin evre olmak üzere farklı evreler geçirerek tamamlamaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster* hayat döngüsü (Flagg 1988'den uyarlanmıştır).

Yumurtalar beyaz, oval ve lateral taraftan biraz basık şekildedir, yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda ve 0,2 mm çapındadır. Dorsal yanın ön ucunda iki filament bulmaktadır. Filamentler, yumurtaların hem ıslak bir ortama batmasını engellemekte hem de oksijen ihtiyacını sağlamaktadır. Bir dişi ortalama 400 yumurta bırakır ve yumurtalar 24 saat içerisinde birinci larval evreye geçmektedir ardından larvalar beslenerek büyümekte ve iki kere deri değiştirmektedir ve her aşama bir larval evre olarak adlandırılmaktadır. Her larval evre 24 saat sürmektedir. Besin üzerinde beslenen üçüncü larval evredeki larvalar kuru ve temiz bir alana yerleşerek pupa evresine geçmekte ve sarımsı beyaz renkte olan pupalar koyulaşarak imago'ya (gelişimini tamamlamış böcek) dönüşmektedir. 4,5 gün

pupa evresinin ardından başkalaşım geçirerek erişkin haline gelmektedir. Pupa evresi boyunca, indüklenen hormonlar sayesinde *Drosophila*'da bacak ve kanatlar oluşmaya başlamaktadır. Bu yapılar imajinal disk hücreleri olarak zaten larvalarda bulunmaktadır. İmajinal disk hücrelerinin larva ve erişkindeki yerleri Şekil 3.2'de gösterilmektedir (Graf vd 1992, Vijayalakshmi 2013).



Şekil 3.2. İmajinal disk hücrelerinin *Drosophila* larva ve erişkinlerindeki yeri (Grewal 2013'den uyarlanmıştır).

Yetişkin olarak yaklaşık 3 mm uzunluğunda olan erişkin sinekler pupadan ilk çıktıklarında kanatları kıvrık haldedir birkaç saat içerisinde açılarak normal erişkin görünümünü almaktadır. 25 °C'de erişkinler için ortalama yaşam süresi 40 ila 50 gün arasında değişmekte ve bireyler 80 gün boyunca yaşayabilmektedir. Ancak fertilité yaşla birlikte azaldığından çaprazlamalarda 10 günlükten genç sinekler kullanılmaktadır. Standart şartlar altında (25 °C ve % 60 bağıl nem) yumurtadan erişkine gelişme yaklaşık 10 gün sürmektedir. Düşük sıcaklıklarda yaşam döngüsü uzamakta, sıcaklık arttıkça yaşam döngüsü kısalmaktadır ancak 30 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda pupal evrede ölüm artmakta ayrıca dişilerde sterilite görülmektedir (Graf vd 1992, Vijayalakshmi 2013).

3.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Çalışmada kullanılan hatların genetik yapısı şöyledir (Lindsley ve Zimm 1992):

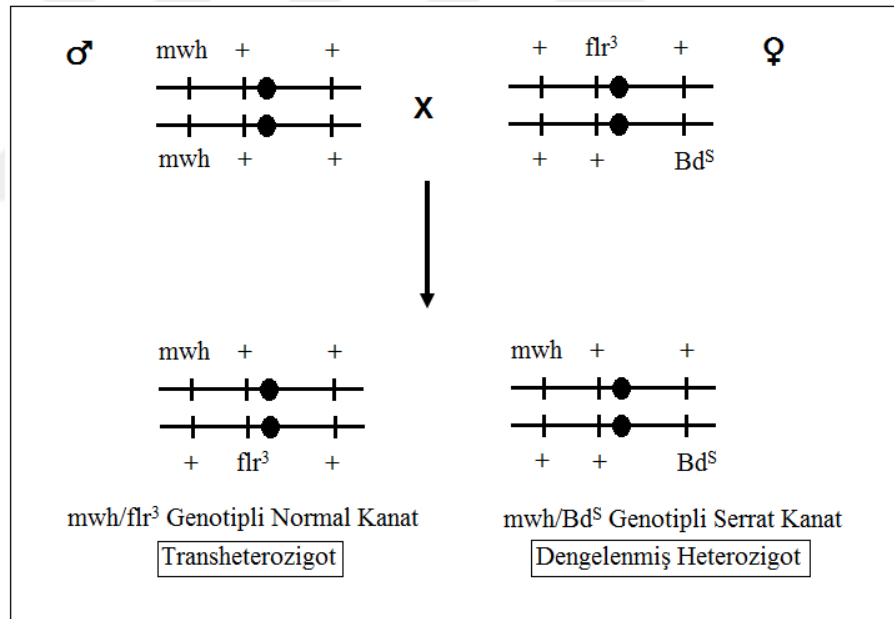
- Erkek bireyler: *mwh/mwh*
- Dişi bireyler: *flr³ / ln (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^S Bd^S*

– Kısaca; $flr^3 / TM3, Bd^S$

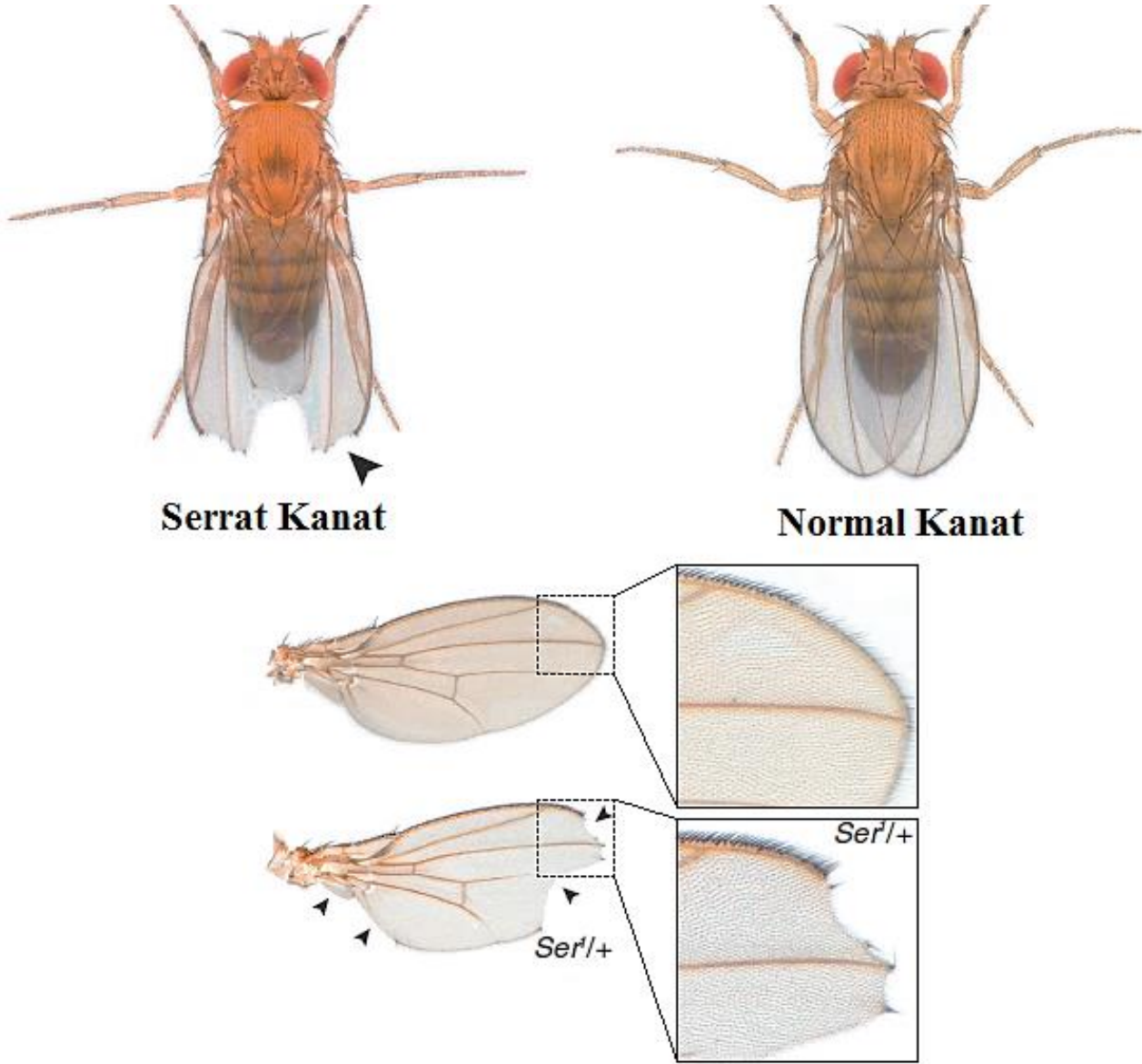
flr^3 dişileri mwh dişilerine göre daha fazla yumurta verimine sahip olduğundan dolayı dişiler $flr^3 / TM3, Bd^S$ hattından seçilmiştir ki bu da çalışma için yeterli sayıda birey elde edilmesini kolaylaştırmaktadır (Marcos ve Carmona 2013).

flr^3 homozigot olduğu durumlarda embriyonik evrede letaldir. Bu nedenle heterozigotluğu sağlayabilmek için dengeleyici kromozom kullanılmaktadır. $TM3$ balancer (dengeleyici) kromozomu Ser (Bd^S – Beaded Serrate) geni taşımaktadır. Bu sayede sadece $flr^3 / TM3, Bd^S$ bireyler hayatta kalabilmektedir (Graf vd 1984, Graf vd 1992).

mwh/mwh (erkek) ve $flr^3 / TM3, Bd^S$ (dişi) çaprazlamasından iki tür kuşak üretilmektedir (Şekil 3.3). Birincisi transheterozigot sinekler (normal kanatlı) bunlarda kanat klonları çeşitli tipte mutasyonel olaylarla ve mitotik rekombinasyona bağlı olabilmektedir. İkincisi ise balancer-heterozigot sinekler (serrat kanatlı), bunlarda kanat klonlarına sadece mutasyonel olaylar sebep olmaktadır çünkü tüm rekombinasyon olayları $TM3$ dengeleyici kromozomunda bulunan çoklu inversiyon nedeniyle elimine edilmektedir (Spano vd 2001). Serrat kanat ve normal kanat görünümü Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



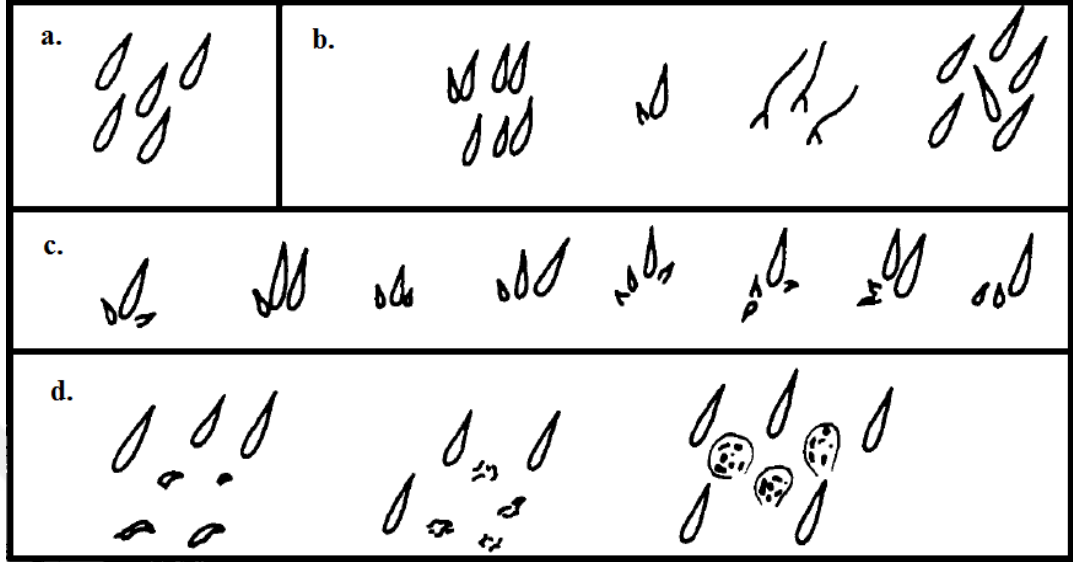
Şekil 3.3. mwh/mwh ve $flr^3/TM3, Bd^S$ bireyleri arasındaki çaprazlamaya sonucu dengelenmiş heterozigot mwh/Bd^S ve transheterozigot mwh/flr^3 bireylerin elde edilmesi (Graf vd 1984'den uyarlanmıştır).



Şekil 3.4. *Drosophila melanogaster* serrat ve normal kanat görünümü (Chyb ve Gompel 2013'den uyarlanmıştır).

Kanat hücre belirteçleri (Şekil 3.5):

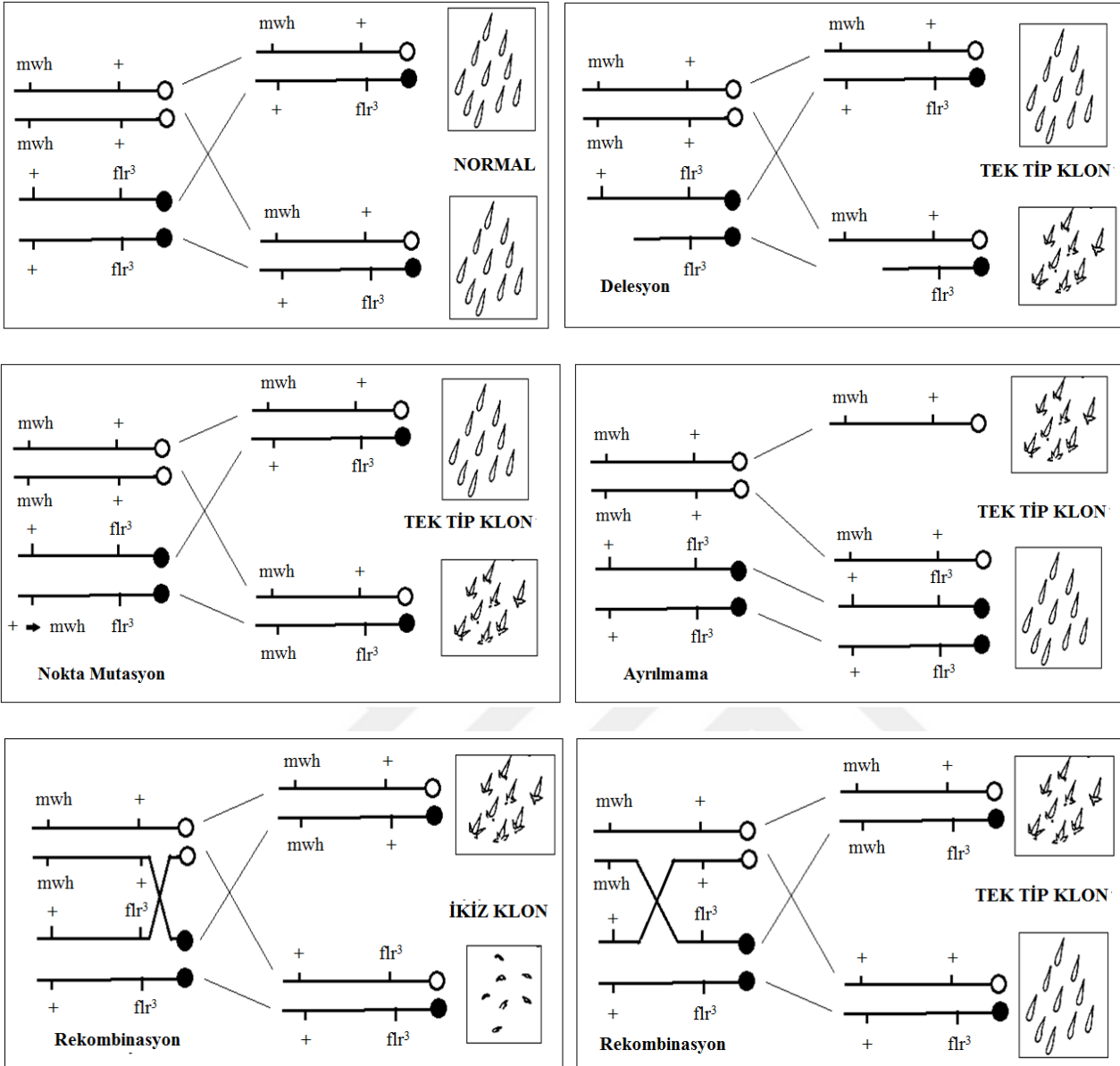
- *mwh/mwh* : Tek bir trikom yerine her bir hücrede birden fazla kanat kılı
- *flr³/flr³* : Uzun ince trikom yerine kısa ve hatalı kanat kılları



Şekil 3.5. Kanat trikomlarının görünümü a. normal, b. farklılaşmış fakat ne *flr³* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar, c. *mwh* trikomlar, d. *flr³* genotipe ait trikomlar (Graf vd 1984, Graf vd 1992).

SMART için kullanılan *flr³*, *mwh* ve *Bd^S* genleri *Drosophila*'nın 3. kromozom üzerinde bulunmaktadır. 3. kromozom *Drosophila*'nın en büyük kromozomudur ve bu belirleyici genler arasındaki mesafe oldukça uzaktır. Bu nedenle hem rekombinasyonun hem de mutasyonların büyük aralıkta incelenmesine olanak sağlamaktadır (Graf vd 1984, Graf vd 1992).

mwh klonları delesyon, nokta mutasyon, rekombinasyon ve ayrılmama sonucu oluşmaktadır (Şekil 3.6). Buna karşın gerek *flr³* klonlar gerekse ikiz klonlar *flr³* geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Tek tip ve ikiz klonların oluşumuna yol açan farklı genotoksik olayları gösteren genetik anomaliler (Graf vd 1984'den uyarlanmıştır).

3.3. *Drosophila melanogaster* Hatlarının Kültürü

Farklı çalışma laboratuvarlarında farklı besin ortamları kullanılmaktadır. Ancak genel itibariyle standart olarak kullanılan *Drosophila* besini mısır unu, şeker, maya, agar, su ve bakterisidal asit karışımından oluşmaktadır (Graf vd 1992).

– Mısır unu	104 gr	
– Şeker	94 gr	
– Maya	19 gr	
– Agar	5 gr	
– Distile su	1020 ml	
– Asit Karışımı	6 ml	
		– Orto-fosforik asit (Merck) 83 ml
		– Pirepiyonik asit (Aldrich) 836 ml
		– Distile su 108 ml

Drosophila besininin hazırlanmasında öncelikle bir pişirme kabına asit karışımı haricinde tüm malzemeler hazırlandı ve iyice kaynayanaya kadar kısık ateşte sürekli karıştırılarak pişirildi. Kaynadıktan sonra yüksek ateşte 1-2 dk daha karıştırılarak pişirildikten sonra ateş üzerinden alındı. İçerisine besinin kontamine olmasını engellemek amacıyla daha önceden hazırlanmış asit karışımı eklendi ve bir yandan da karıştırılarak asitin homojen bir şekilde besin içerisinde dağılması sağlandı. Ardından besin katılaşmadan hala sıcakken kültür şişelerine (200 ml) 1 cm kalınlığında döküldü. Şişelerin üzeri kurutma kâğıdı ile kapatılarak şişelerin içerisindeki buharın çıkması sağlandı. Sonrasında şişelerin ağzı süngerle kapatıldı. Hazırlanan besinler kuruduktan sonra döllememiş (virjin) yeterince dişi seçilebilmesi için kültür zenginleştirildi. Kültür iklimlendirilmiş kültür ortamında 25 ± 1 °C’de % 60 bağıl nem ortamına yerleştirildi.

Hazırlanan besinler uzun süre kullanılmadan beklendiğinde besin fazla kuruyup çekilerek şişeden ayrılıp düşebilmektedir bu sebeple en geç bir hafta içerisinde kullanılmasına dikkat edilmelidir.

Kültüre alınan bireyler kuru besin üzerine yumurta bırakıp yaşam evrelerini takip ederek pupadan ergin hale gelmeye başlamaktadır. Pupadan çıktıktan kısa süre sonra erkek bireyler eşeysel olgunluğa ulaşmakta ve dişileri dölleyebilir hale gelmektedir. Dişi bireyler ise daha yavaş olgunlaştıklarından pupadan çıktıktan yaklaşık 6-12 saat sonra verimli hale gelmektedir. Dişiler eşeysel olgunluğa ulaştıktan sonra tekrar tekrar farklı erkeklerle çiftleşebilmekte ve spermeleri ventral haznesinde saklayarak sonraki zamanlarda da yumurtaları dölemek için kullanılmaktadır. Bu sebeple yapılacak olan çalışmalarda genetik çaprazlama yapmadan önce kullanılacak olan dişi bireyin istenilen özellikteki erkek bireyle çiftleşmesini sağlayabilmek için virjin dişi seçiminin yapılması önem taşımaktadır (Graf vd 1992).

Virjin seçmi için öncelikle kültürdeki tüm ergin bireylerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Kültürde tek bir erkek ya da dişi kalmadığından emin olunmalıdır. 4-6 saat sonrasında kültürde pupadan çıkan sineklerden dişi bireyler henüz erginliğe ulaşmamış virjin dişiler olmaktadır. İstenilen özellikteki erkekler istenilen herhangi bir zamanda toplanabilmektedir. Pupadan çıkan bireylerden virjin seçimi ya da dişi erkek ayrımı anestezi altında gerçekleştirilmektedir. Anestezi için CO₂ ya da eter kullanılmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda eter, kullanımının daha basit ve kullanışlı bir yol olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Kültürdeki tüm ergin bireylerin uzaklaştırılmasından sonraki 4 saat sonunda kültürde pupadan çıkan sinekler besin ortamından boş bir şişeye aktarıldı. Plastik bir tüp içerisine pamuk konularak bu pamuk bir miktar eterle ıslatıldı ve bu tüp içerisindeki hava sineklerin bulunduğu besinsiz şişe içerisine sinekler bayılana kadar pompalandı. Bayılan sinekler bir cam plaka üzerine dökülerek yumuşak bir fırça yardımıyla dişi erkek ayrımı yapılarak virjin dişiler seçildi. Seçilen dişiler yeni taze besin bulunan şişeye konuldu.

3.4. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi

Taze besine seçilerek konulan virjin *flr*³ dişilerinin yanına genç *mwh* erkekleri seçilerek konuldu. Ayrıca her bir uygulama tüpüne konulmak üzere yeteri kadar larva elde edilebilmesi için 40 dişi ve 40 erkek olacak şekilde bireyler çaprazlama şişelerine alınarak çiftleşmeleri sağlandı. Bu çalışmada *flr*³/*TM3*, *Bd*^S ve *mwh/mwh* genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanıldı.

Çaprazlanan bireyler en az 1 gün aynı ortamda bırakılarak döllenmenin gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra bireyler yeni besin ortamı bulunan şişelere aktararak 8 saat boyunca bu besinlere yumurtlamaları beklendi. 8 saat sonunda bireyler tekrar eski şişelerine geri alındı. Böylece aynı larval evrede transheterozigot (*mwh/flr*³) larvalar elde edilmiş oldu.

3.5. Deney Grupları

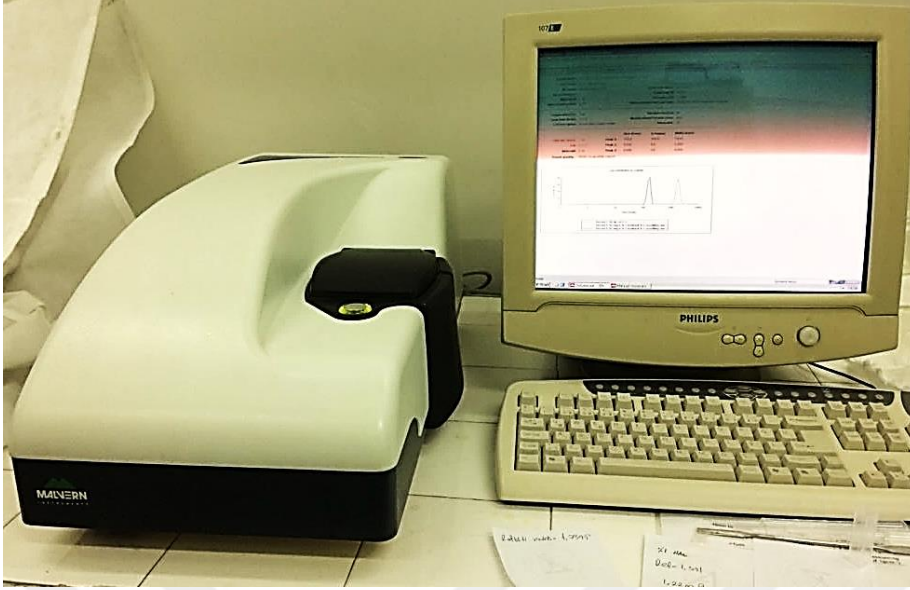
Yapılan çalışmada MgO NP, MgO ve CeO₂ iyonik formu % 1 asetik asit, CeO₂ NP distile suda çözülerek derişimleri hazırlandı. Bu sebeple % 1 asetik asit ve distile su negatif kontrol grubu olarak değerlendirildi. Ayrıca, deney sisteminin çalıştığını göstermek amacıyla, daha önceki çalışmalarımızda mutajenik etkisi teyit edilmiş olan Etil Metan Sülfonat (EMS)'nin 1 mM'lık derişimi pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Bu çalışma kapsamında CeO₂ ve MgO NP'lerinin ve iyonik formlarının özellikleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı CAS numarası Boyut	Linear Formül
Seryum oksit = Cerium oxide = Ceria 1306-38-3 <25 nm Suda ağırlıkça % 10 dispersiyon	$\text{O}=\text{Ce}=\text{O}$
Seryum oksit = Cerium oxide = Ceria 1306-38-3 İyonik form ≥% 99	
Magnezyum oksit = Magnesium oxide 1309-48-4 <50 nm (BET)	$\text{Mg}=\text{O}$
Magnezyum oksit = Magnesium oxide 1309-48-4 İyonik form ≥% 98	

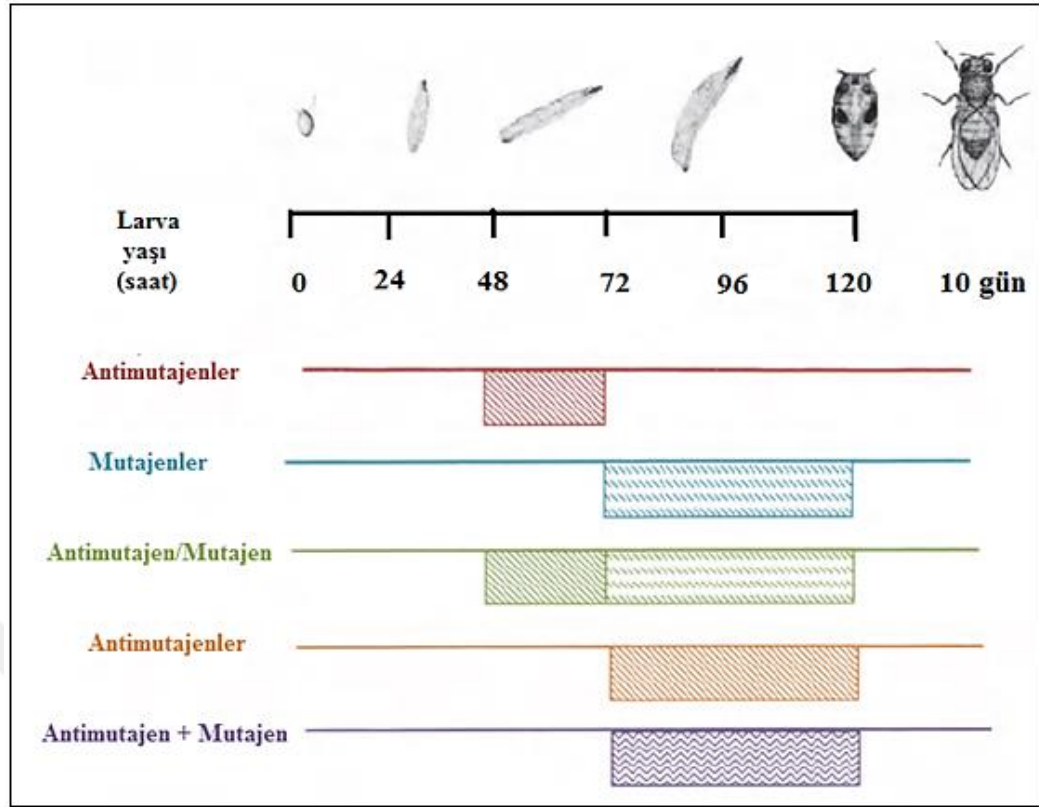
Çalışmada kullanılan CeO₂ NP (<25) ve MgO NP (<50)'leri ticari tedarikçisi Sigma-Aldrich'ten satın alındıktan sonra, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyellerinin ölçümü ile karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Kullanılan nanopartikül boyutları FETEM/JEOL JEM2100F model cihaz Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında görüntülenmiştir. Bu NP'lerin partikül büyüklük dağılımları ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz (Şekil 3.7) ile Akdeniz Üniversitesi Kimya Bölümü bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Bu NP'lerin iyonik formları da üniversitemizin kimya bölümünden temin edilmiştir.



Şekil 3.7. Nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümünün yapıldığı Malvern Zetasizer Nano-ZS model cihaz (Orijinal).

3.6. Kimyasal Uygulamaları

SMART için uygulama süresi ve zamanı açısından farklı uygulama şekilleri bulunmaktadır. Çeşitli olası uygulama zamanlamaları Şekil 3.8'de verilmiştir. (Graf vd 1984 ve Guzman-Rincon vd 2001). Graf (1995) çalışmasında *D. melanogaster*'in kanat hücrelerindeki mutant klonların indüksiyonu ve mutajen uygulama süresi arasındaki ilişkinin araştırılması sonucunda indüksiyon zamanı ile klon frekansları arasında net bir korelasyon olduğu sonucuna varmış ve buradan yola çıkarak SMAR Testinde larvaya mutajen uygulaması için en uygun zamanın 3. larval evrenin başlangıcı olan 72. saat olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda da kimyasal uygulamaları 72 ± 4 saatlik larvalarla yapılmıştır.



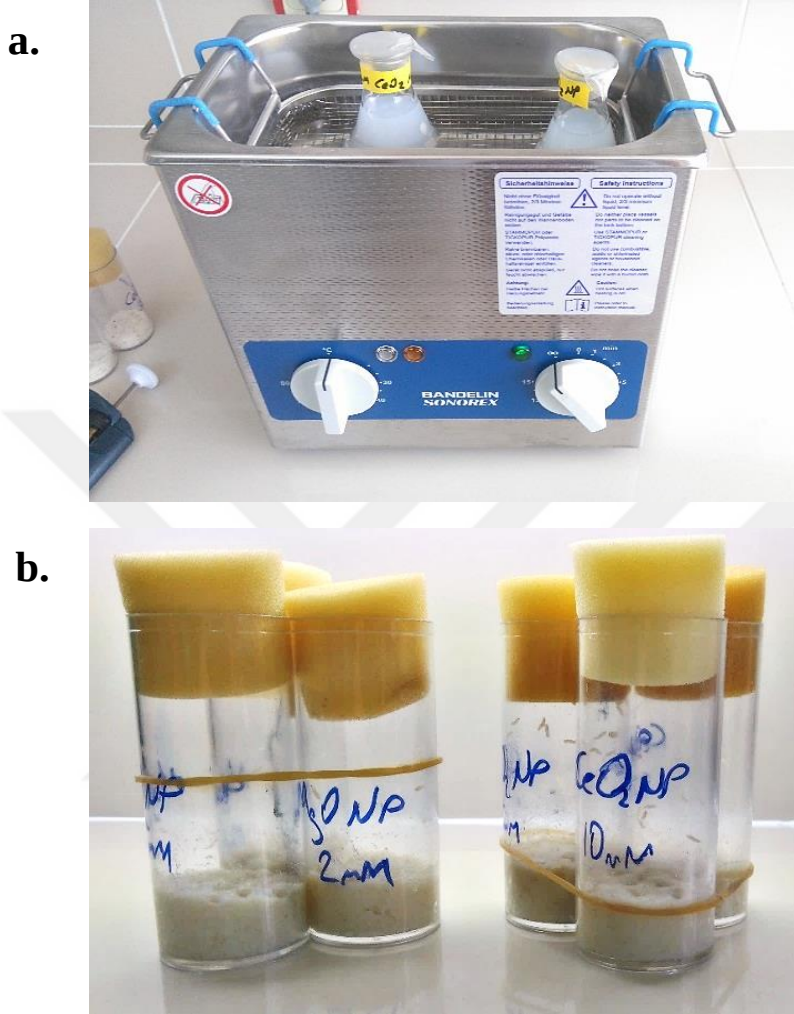
Şekil 3.8. SMART için çeşitli olası uygulama zamanlamaları (Guzman-Rincon vd 2001'den uyarlanmıştır).

Kullanılan NP'lerin hazırlanması aşamasında ise CeO_2 NP'leri distile su, MgO NP'leri ve MgO ile CeO_2 iyonik formları % 1'lik asetik asit içerisinde çözüldükten sonra 1 saat süreyle sonikatör (Bandelin-Sonorex) (Şekil 3.9 a.) içerisinde bekletilerek partikül dağılımının homojen olması sağlandı ve uygulamalar yapıldı. Elde edilen transheterozigot larvalar 72 ± 4 saatlik olduklarında içinde bulundukları şişeler çeşme suyu altında yıkandı. İnce gözenekli elekten süzülerek elde edilen larvalar kullanılan kimyasal derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatılmış olan hazır *Drosophila* hazır besini (*Drosophila* Instand Medium, yaklaşık 4.5 gr) bulunan uygulama tüplerine 1-2 spatül konularak maruz bırakıldı (Şekil 3.9 b.).

Analizlerde aşağıdaki şekilde bir yol izlendi:

1. Birinci grupta, 72 ± 4 saatlik larvalar sadece MgO NP 4 farklı dozuna (1, 2, 5 ve 10 mM) maruz bırakıldı.
2. İkinci grupta, 72 ± 4 saatlik larvalar sadece MgO 'in iyonik formunun 4 farklı dozuna (1, 2, 5 ve 10 mM) maruz bırakıldı.
3. Üçüncü grupta, 72 ± 4 saatlik larvalar sadece CeO_2 NP 4 farklı dozuna (1, 2, 5 ve 10 mM) maruz bırakıldı.
4. Dördüncü grupta, 72 ± 4 saatlik larvalar sadece iyonik formdaki CeO_2 'in 4 farklı dozuna (1, 2, 5 ve 10 mM) maruz bırakıldı.
5. Pozitif kontrol olarak 1 mM EMS ve negatif kontrol olarak nano ve iyonik formların derişimlerinin hazırlanmasında kullanılan distile su ve % 1'lik asetik asit 72 ± 4 saatlik larvalara uygulandı.

Tüm uygulamalardan sonra uygulama tüplerinin ağzı süngerle kapatılarak ergin bireyler oluşuncaya kadar sıcaklık ayarlı iklim odasında (25 ± 1 °C) tutuldu.



Şekil 3.9. a. Sonikatör uygulaması, b. Kimyasal uygulanmış uygulama tüpleri. (Orijinal)

3.7. Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Uygulamadan sonra 25 °C ve % 60 bağıl nem ortamına sahip iklim odasına kaldırılmış olan uygulama tüplerinden pupadan erişkin hale gelen bireyler eterle bayılarak toplandı ve % 70'lik alkol içerisinde kanat preparatları hazırlanana kadar +4 °C sıcaklıkta buzdolabında muhafaza edildi. Alkol içerisinde bulunan sineklerden normal kanatlı bireyler tesadüfi olarak seçilerek stereo mikroskop (Nikon SMZ645) altında distile su içerisine seçildi. Seçilen sinekler birer birer olmak üzere çukur camın ortasına damlatılan bir damla faure solüsyonu içerisine alındı ve faure solüsyonu içerisindeki bir sineğin kanatları ince uçlu (Dumont # 5) pens ve diseksiyon iğnesi yardımıyla dikkatli bir şekilde sineğin vücudundan, kanat üzerindeki trikomlara zarar vermeden kopartıldı.

Faure solüsyonu:

– Distile su	50 ml
– Gum arabic (Aldrich)	30 gr
– Kloral hidrat (Merck)	50 gr
– Gliserol	20 ml

Koparılan bir sineğin kanat çifti kanada zarar vermeden kanadın vücuda tutunduğu bölgeden pensle tutularak yan yana olacak şekilde lam üzerine yapıştırıldı. Bu işleme sırayla sayılacak bütün kanatlar tamamlanana kadar devam edildi. Bir lama 8'erli 3 sıra halinde 24 bireyin kanadı (48 kanat) yapıştırıldı ve her uygulama dozu için 80 kanat sayılacağından 2'şer preparat hazırlandı (Şekil 3.10).

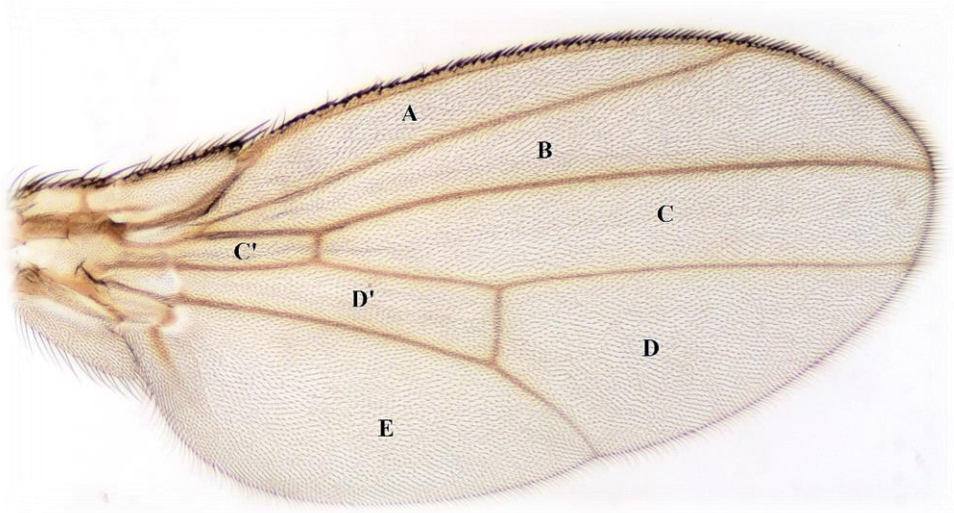


Şekil 3.10. Kanat preparatlarının hazırlanması (Orijinal)

Hazırlanan preparatlar 1 gün boyunca bir petri kutusu içerisinde toz almayacak şekilde saklanarak kuruması sağlandı. Sonrasında lamin ortasına birkaç damla faure solüsyonu damlatılarak lamel (24x60mm) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı ve havlu kâğıda sarılarak üzerine yaklaşık 30 gr ağırlığında bir metal blok konulup 1-2 gün kanatların düzleşmesi beklendi. 2 günün sonunda havlu kâğıdından çıkarılan lamin kenarından taşan fazla faure su yardımıyla temizlenerek sayıma hazır bir şekilde preparatlar elde edildi.

3.8. Kanat Preparatlarının Analizi

Hazırlanan kanatlar ışık mikroskobu (Nikon YS100) altında 40X10 büyütme altında incelendi. Kanadın her iki yüzündeki trikومları görebilmek için ince ayarla oynanılarak *flr*³ ve *mwh* klonlar tespit edildi ve bunların kayıtları tutuldu. Hem klon tespitinde hem de kayıtların tutulmasında kolaylık sağlaması açısından kanatlar üzerindeki sektörler A, B, C, C', D, D' ve E bölümlerine ayrıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kanat sektörlerinin şematik görünümü (Orjinal)

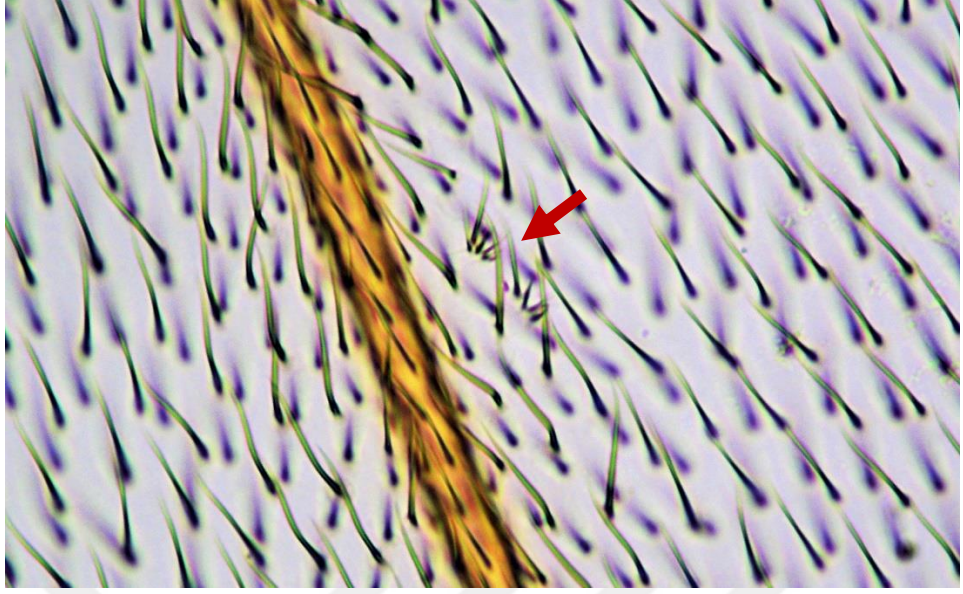
Üçüncü larval evrede (72 saatlik larva) kanatları oluşturacak imajinal disk hücreleri yaklaşık 24.400 tane bulunmaktadır. Böylece uygulama yapılan her bir larvada 24.400 hedef hücre bulunmakta ve larvaların gelişimiyle hedef hücreler daha da çoğalmaktadır. Bu hedef hücrelerden birinde oluşacak mutasyon, hücrelerin bölünmesiyle mutant klon olarak görülmektedir (Kaya 2000).

İndüklenen mutasyonlar hayatta kalan yetişkinlerin kanatlarında ya *mwh* ya da *flr*³ fenotipi gösteren tek tip klonlarına neden olmaktadır. İndüklenen rekombinasyon ise *mwh* ve *flr*³ ikiz klonları ve belli bir dereceye kadar *mwh* tek tip klonlarına neden olmaktadır. Frekansın ve klonların farklı kategorilerde kaydedilmesi mutajenik ve rekombinojenik etkilerin nicel olarak belirlenmesini sağlamaktadır (Graf vd 1984).

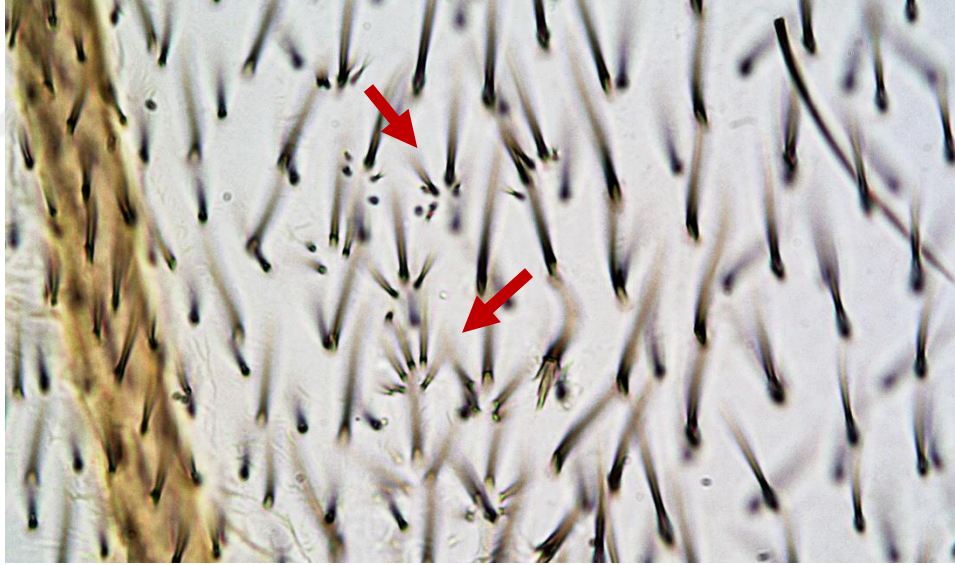
Mutant klonların sınıflandırılması şu şekildedir (Graf vd 1984, Marcos ve Carmona 2013).

- Küçük tek tip klon
- Büyük tek tip klon
- İkiz klon

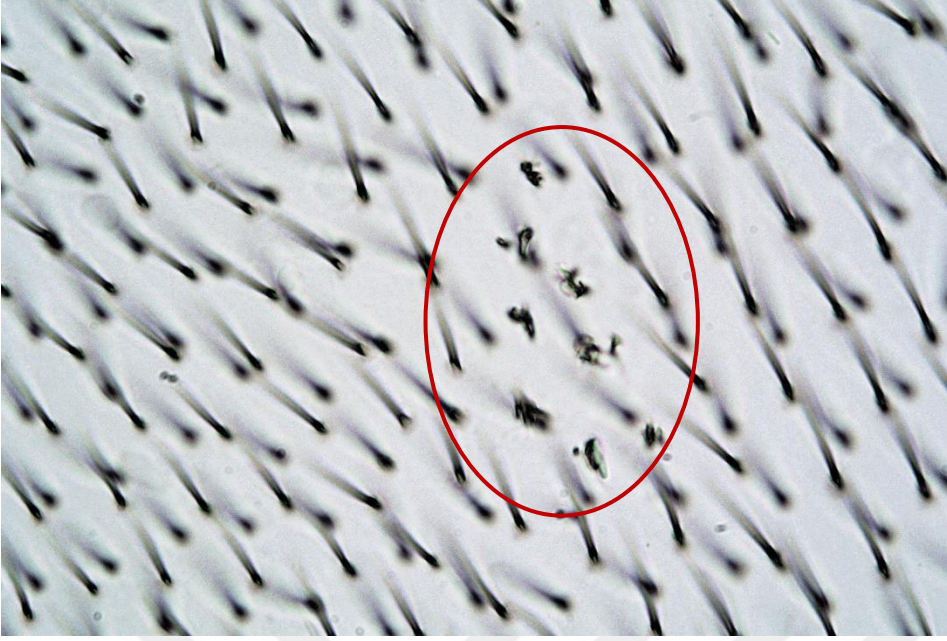
Küçük tek tip klonlar sadece 1-2 tane *mwh* klonundan oluşurken (Şekil 3.12) büyük tek tip klonlar 3 ve 3'ten fazla *mwh* klonları (Şekil 3.13) ile 4 ve 4'ten fazla *flr*³ klonlarından (Şekil 3.14) oluşmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda tek başına 4'ten az olan *flr*³ klonlarının varyasyon nedeniyle gerçekleşebildiği belirtildiğinden dolayı bu çalışma göz önünde tutularak sadece 4 ve 4'ten fazla olan *flr*³ klonları değerlendirmeye alındı (Szabad vd 1983). İkiz klonlar ise hem *mwh* hem de *flr*³ klonlarının bir arada aynı klon içerisinde bulunduğu klonlardan oluşmaktadır (Şekil 3.15). İki klon arasında üç ya da daha fazla yabancı tip trikom sırası varsa iki farklı klon olarak değerlendirildi. (Graf vd 1984, Marcos ve Carmona 2013).



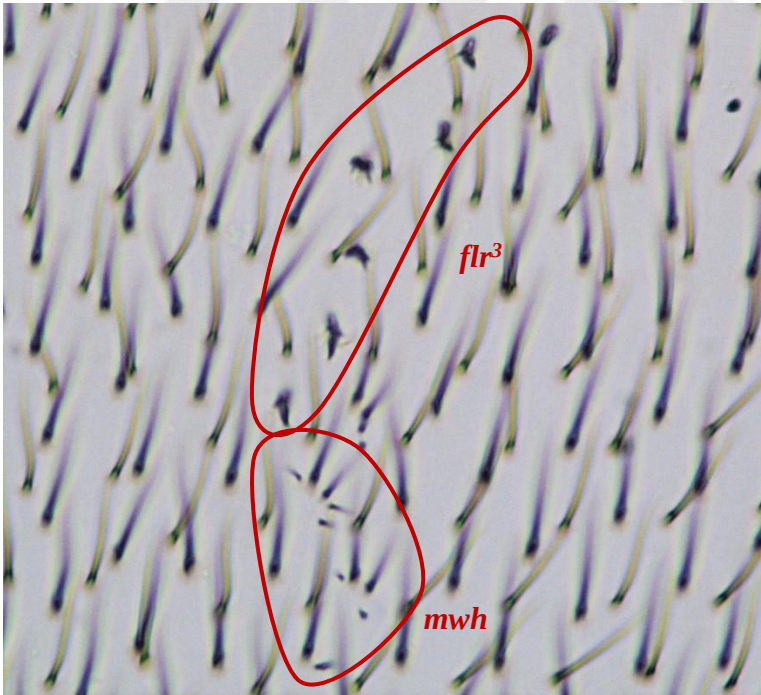
Şekil 3.12. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü (Orijinal)



Şekil 3.13. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü (Orijinal)



Şekil 3.14. Büyük tek tip flr^3 mutant klonların görünümü (Orijinal)



Şekil 3.15. İkiz mutant klonların görünümü (Orijinal)

3.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Mutajenin etkinliği, mutajene maruz kalan ve klon indüksiyonunun gerçekleştiği hücrelerin frekansı ile karakterize edilebilmektedir. Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Szabad vd 1983). Formül (3.1) bağıntısında verilmiştir.

$$f = \frac{n}{N \times C} \times 10^5 \quad (3.1)$$

Sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdeki *f* *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, *n* gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, *N* analiz edilen kanat sayısını ve *C* bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir.

3.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan bilgisayar paket programı (MICROSTA) yardımıyla değerlendirildi. Değerlendirme yapılmadan önce iki farklı hipotez kuruldu. Orijinal (null) hipotez (H_0)’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez (H_A)’de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan *m* defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezler Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplandı. Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (n_t) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (n_c) mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse H_A red edildi. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden yararlanıldı. Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 3.2’de gösterilmiştir (Selby ve Olson 1981, Frei ve Würzler 1988).

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H _A	
		KABUL (1-β)	RED (β)
H ₀	KABUL (1-α)	Önemsiz Fark $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	Negatif $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED (α)	Pozitif $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	Zayıf Pozitif $P=\alpha\beta$

Bu değerlendirmelerle sonuçlar; H₀ ve H_A'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.2 kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. *D. melanogaster* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Kullanılarak Genotoksisitenin Belirlenmesi

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile genotoksik potansiyelleri değerlendirilen CeO₂ ve MgO NP'leri ve iyonik formlarının uygulamalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir. Tüm uygulamalar 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarla gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme aşamasında her bir derişim için, 40 normal kanatlı bireyin kanat preparatları hazırlanarak incelenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında CeO₂ NP konsantrasyonları distile su ile MgO NP, CeO₂ ve MgO iyonik formlarının konsantrasyonları % 1'lik asetik ile hazırlandığı için distile su ve asetik asit negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Distile su uygulamasında, preparatı yapılan 80 kanatta 23 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon, 3 adet ikiz klon olmak üzere toplam 28 adet klon belirlenmiştir. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 1.43 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve daha önceki çalışmalarda (Graf vd 1984, Kaya 2000) genotoksik olduğu belirlenmiş olan Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucunda, distile su ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde (küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon) pozitif sonuçlar gözlenmiştir.

4.1.1. CeO₂ NP ve CeO₂ iyonik form uygulamaları

% 1'lik asetik asit uygulamasında, incelenen 80 kanatta 16 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 18 adet klon belirlenmiştir. CeO₂ iyonik formunun çözücüsü olan asetik asit kontrol grubu distile suya oranla istatistiksel olarak anlamlı pozitif sonuç gözlenmemiştir. CeO₂ iyonik formu kontrol grubu olan % 1'lik asetik asit ile karşılaştırıldığında sadece en yüksek dozunda (10 mM) küçük tek tip, toplam klon ve toplam *mwh* klon parametreleri açısından pozitif sonuç gözlenmiştir. Diğer dozlarda (1, 2 ve 5 mM) tüm parametreler açısından istatistiki olarak önemli bir sonuç gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).

CeO₂ NP (□22nm) uygulama sonuçları kontrol grubu distile suya göre küçük tek tip, ikiz kolon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından tüm uygulama dozlarında negatif sonuç gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca CeO₂ NP uygulamasında 1, 2 ve 5 mM'lık derişimler için büyük tek tip klonlar kategorisinde elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile aynı iken 10 mM'lık derişimde bir miktar artış gözlenmiştir ancak bu artış istatistiksel önemde anlamlı bir sonuç olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.1. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mwh/flr*³) CeO₂ NP'leri ve iyonik formunun genotoksik etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam <i>mwh</i> klonlar (<i>m</i> =2)			Toplam klonlar (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su	80	23	(0.29)		2	(0.02)		3	(0.04)		28	(0.35)		28	(0.35)		1.43
% 1 Asetik Asit	80	16	(0.20)	-	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	18	(0.22)	-	18	(0.22)	-	0.92
1 mM EMS	80	129	(1.61)	+	21	(0.26)	+	9	(0.11)	+	157	(1.96)	+	159	(1.99)	+	8.04
CeO ₂ (iyonik form) dozları (mM)																	
1	80	22	(0.28)	i	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	25	(0.31)	i	25	(0.31)	i	1.28
2	80	22	(0.28)	i	4	(0.05)	i	4	(0.05)	i	29	(0.36)	i	30	(0.38)	i	1.49
5	80	19	(0.24)	i	7	(0.09)	i	1	(0.01)	i	27	(0.34)	i	27	(0.34)	i	1.38
10	80	28	(0.35)	+	4	(0.05)	i	1	(0.01)	i	33	(0.41)	+	33	(0.41)	+	1.69
CeO ₂ NP (~22 nm) dozları (mM)																	
1	80	15	(0.19)	-	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	14	(0.18)	-	15	(0.19)	-	0.72
2	80	18	(0.22)	-	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02
5	80	16	(0.20)	-	2	(0.02)	i	2	(0.02)	-	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02
10	80	15	(0.19)	-	6	(0.08)	i	1	(0.01)	-	22	(0.28)	-	22	(0.28)	-	1.13

No., klon sayısı; Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würzler 1988); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

4.1.2. MgO NP ve MgO iyonik form uygulamaları

MgO iyonik formu kontrol grubu olan % 1'lik asetik asit ile karşılaştırıldığında uygulama dozlarından 5mM haricinde diğer dozlarda (1, 2 ve 10 mM) toplam klon ve toplam *mwh* klon parametreleri açısından pozitif sonuç gözlenmiştir. Diğer parametreler (küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon) açısından tüm dozlarda istatistiki olarak önemli bir sonuç gözlenmemiştir. Ayrıca MgO iyonik formu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında büyük tek tip klon kategorisinde gözlenen mutant klon sayısı 1 ve 2 mM'lık derişimlerde kontrol grubu ile aynı sayıda iken, 5 mM ve 10 mM'da biraz daha fazla oranda mutant klon gözlenmiş ancak bu artışın istatistiki olarak önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.2).

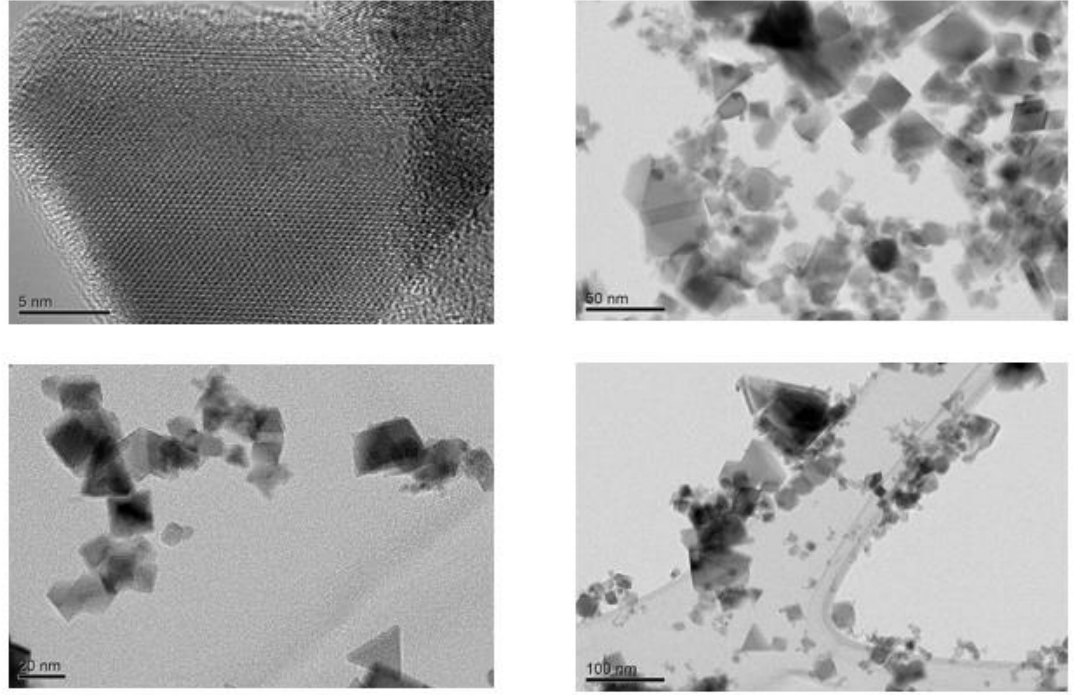
MgO NP (~11nm) uygulama sonuçları kontrol grubu % 1'lik asetik asite göre sadece en yüksek dozunda (10 mM) küçük tek tip, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından pozitif sonuç gözlenmiştir. MgO NP'leri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 2 ve 5 mM'lık derişimlerde toplam mutant klon sonuçları birbirine yakın iken derişim artınca (10 mM'lık derişimde) mutant klonların arttığı görülmektedir. 5 mM'lık derişimde sonuçların küçük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri bakımından negatif olduğu bulunmuştur ancak yine bu parametrelerin frekanslarına bakıldığında kontrol grubu ile oldukça yakın frekansta olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mwh/flr³*) MgO NP ve iyonik formunun genotoksik etkileri

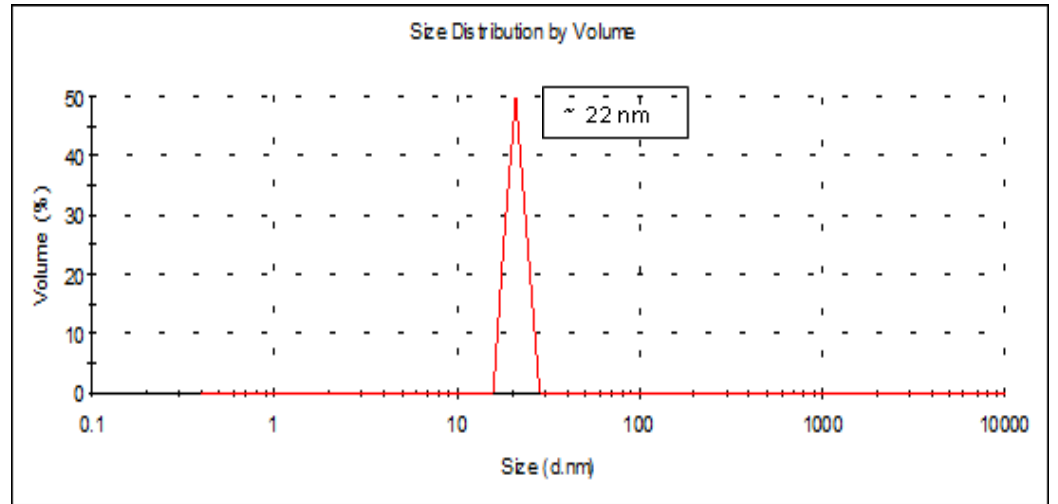
Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam <i>mwh</i> klonlar (<i>m</i> =2)			Toplam klonlar (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su	80	23	(0.29)		2	(0.02)		3	(0.04)		28	(0.35)		28	(0.35)		1.43
% 1 Asetik Asit	80	16	(0.20)	-	2	(0.02)	i	0	(0.00)	-	18	(0.22)	-	18	(0.22)	-	0.92
1 mM EMS	80	129	(1.61)	+	21	(0.26)	+	9	(0.11)	+	157	(1.96)	+	159	(1.99)	+	8.04
MgO (iyonik form) dozları (mM)																	
1	80	36	(0.45)	+	2	(0.02)	i	0	(0.00)	i	38	(0.48)	+	38	(0.48)	+	1.95
2	80	27	(0.34)	i	2	(0.02)	i	2	(0.02)	i	31	(0.39)	+	31	(0.39)	+	1.58
5	80	18	(0.22)	i	4	(0.05)	i	1	(0.01)	i	22	(0.26)	i	23	(0.29)	i	1.13
10	80	27	(0.34)	i	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	32	(0.40)	+	32	(0.40)	+	1.64
MgO NP (~11 nm) dozları (mM)																	
1	80	22	(0.27)	i	2	(0.02)	i	1	(0.01)	i	24	(0.30)	i	25	(0.31)	i	1.23
2	80	22	(0.28)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	26	(0.32)	i	26	(0.32)	i	1.33
5	80	12	(0.15)	-	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
10	80	28	(0.35)	+	6	(0.08)	i	0	(0.00)	i	34	(0.42)	+	34	(0.42)	+	1.74

No., klon sayısı; Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würzler 1988); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

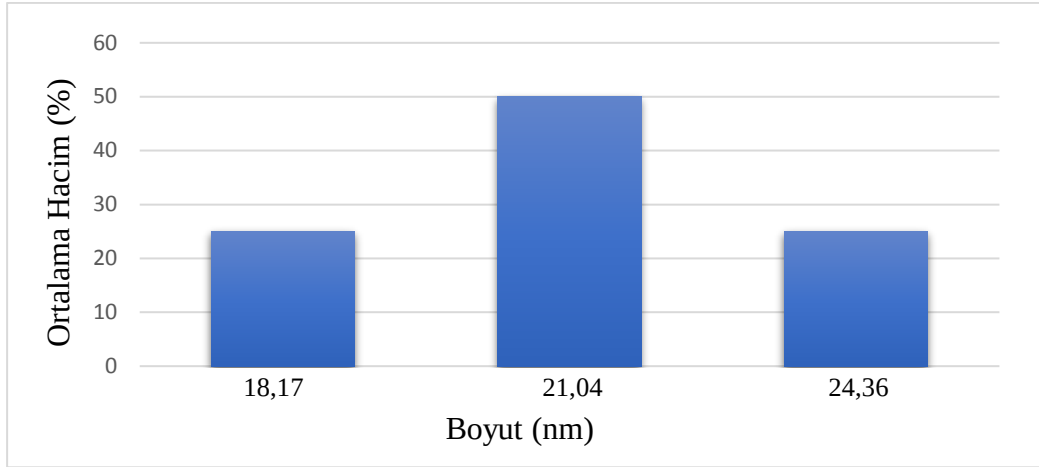
4.2. CeO₂ NP Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri



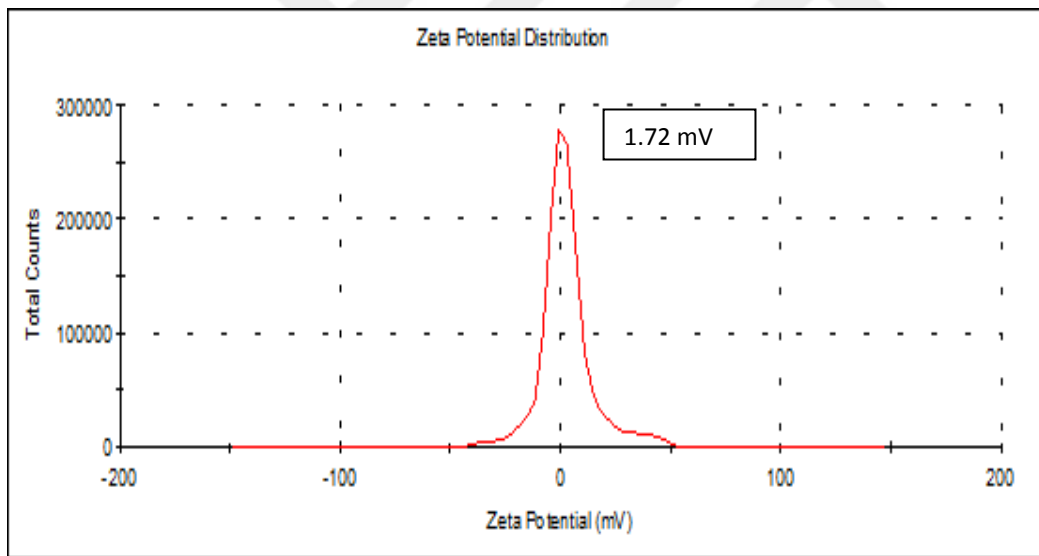
Şekil 4.1. CeO₂ NP'lerinin TEM görüntüleri



Şekil 4.2. CeO₂ NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı

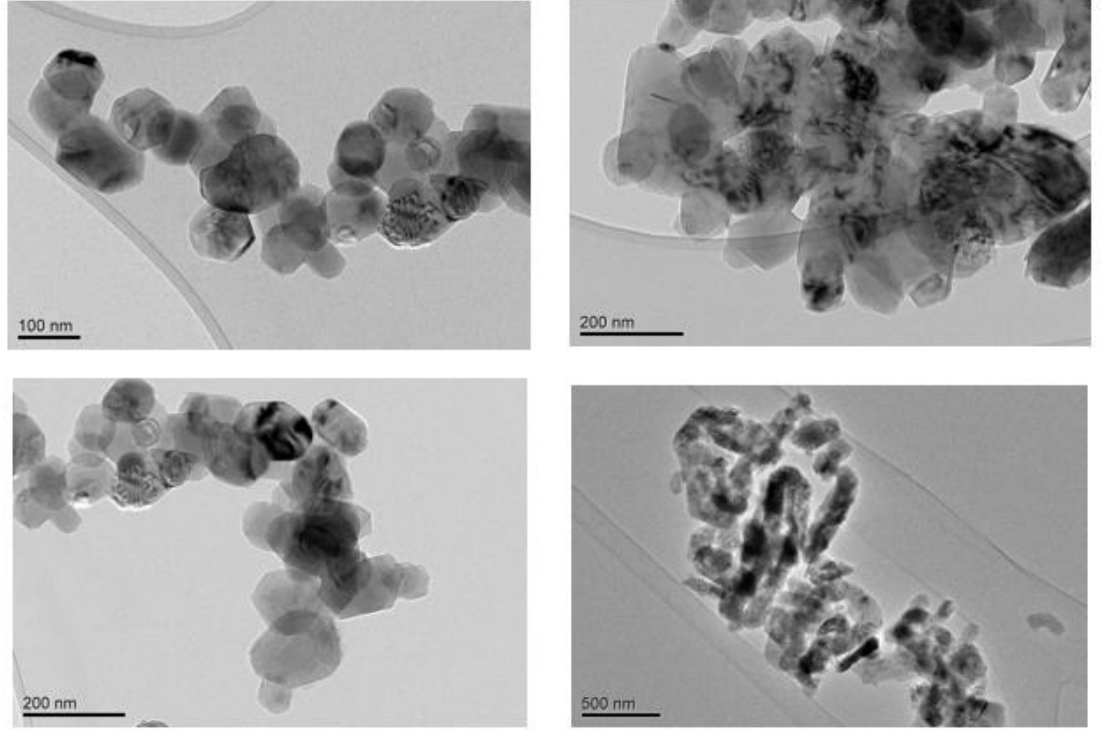


Şekil 4.3. CeO₂ NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı

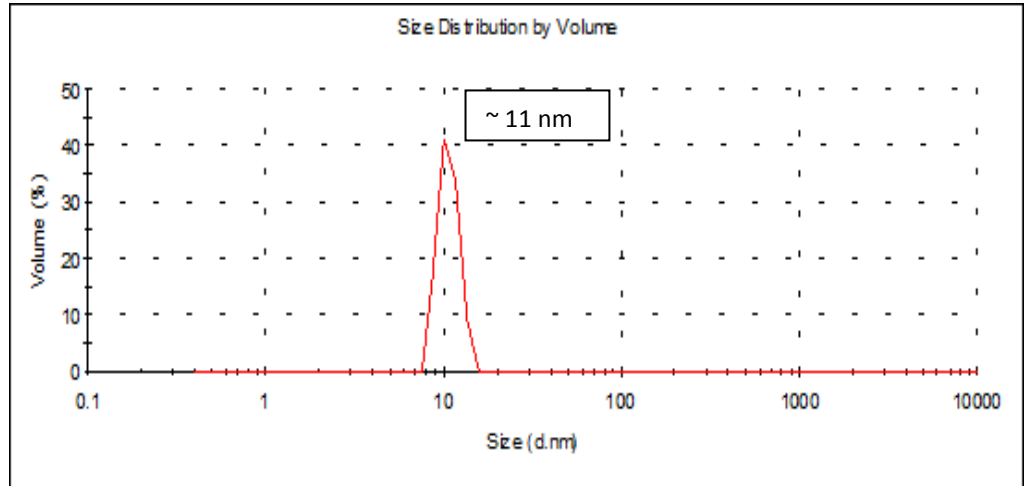


Şekil 4.4. CeO₂ NP zeta potansiyeli.

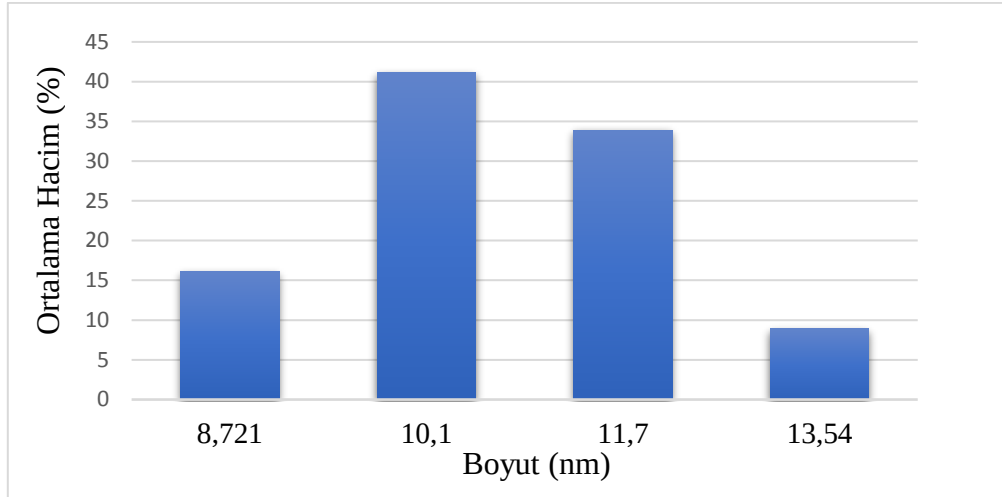
4.3. MgO NP Karakterizasyonu, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümleri



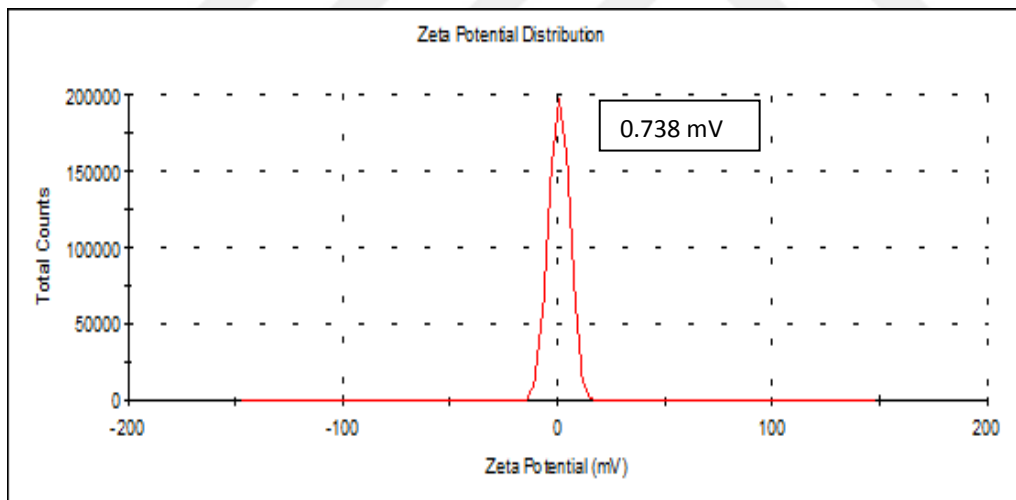
Şekil 4.5. MgO NP'lerinin TEM görüntüleri



Şekil 4.6. MgO NP'lerinin partikül büyüklük dağılımı



Şekil 4.7. MgO NP'lerinin partikül boyut dağılımı



Şekil 4.8. MgO NP zeta potansiyeli

5. TARTIŞMA

Nanoteknoloji, gıda, askeri, enerji, ilaç, tıbbi ve kozmetik endüstrileri dahil birçok endüstride yaygın şekilde kullanılmaktadır (Niska vd 2015). Nanopartiküllerin 100 nm ve daha küçük boyutlardaki benzersiz davranışları onları dünya ekonomisinin neredeyse her sektöründe yeni materyal ve uygulamaların geliştirilmesi için cazip kılan bir özelliktir. NP'lerin küçük boyutları nedeniyle yüzey alanları, diğer büyük boyutlu partiküllere göre çok daha fazladır bu sayede bir uygulama için daha az malzeme kullanımına olanak sağlamakta böylece doğal kaynakların, enerjinin ve paranın harcanmasında tasarrufa imkân vermektedir. Buna ek olarak, parçacıklar nano boyutta sentezlendiklerinde boyut ve/veya yapı nedeniyle bazı temel kimyasal ve fiziksel özellikleri de değişmektedir. Örneğin TiO_2 kaplama malzemeleri, boya ve diş macunu gibi tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılan beyaz bir pigment iken nano boyutta üretildiğinde şeffaf hale gelir ve güneşten koruyucu, ultraviyole ışınlarına dayanıklı kaplamaları şeffaf yapmak için kullanılmaktadır (Shatkin 2013). Metal oksit NP'leri, en çok kullanılan nanomalzeme çeşitleri arasında yer almaktadır. Metal oksit NP'leri özellikle kataliz, çevresel iyileştirme, sensörler ve kişisel bakım ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadırlar (Niska vd 2015). Fakat kullanımları ile birlikte biyolojik sistemleri (insanlar ve çevre) de etkileyecek şekilde davranış sergileyip sergilemeyeceği gibi sorunları da beraberinde getirmektedir.

Bu tez kapsamında da CeO_2 ve MgO NP'lerinin ve bu nanopartiküllerin üretiminde çıkış maddesi olarak kullanılan iyonik formlarının potansiyel genotoksik etkileri *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile değerlendirilmiştir.

Bugüne kadar partikül toksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak yapılan tahminler, partikül toksisitesinin küçük partikül boyutu ve geniş reaktif yüzey alanına sahip olmasından kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Xia vd 2008, Rosenkranz vd 2012). Partikül boyutu azaldıkça moleküllerin yüzey alanı katlanarak artmaktadır. Yüzey alanının önemi nano boyutlu partiküllerin kimyasal ve biyolojik aktivitelerinin artırılması açısından önemlidir. Artan biyolojik aktivite pozitif (antioksidan aktivite, terapötik için taşıyıcı kapasite) ve negatif (toksikite, oksidatif stresin indüklenmesi, hücresel işlev bozukluğu) veya her iki özelliği birden gösterebilmektedir (Oberdörster vd 2005). Yaşamın temel yapı taşı olan DNA sadece birkaç nanometre genişlikteki moleküllerden oluşur. Önemli olan nokta şudur ki nanopartiküller ve nanoboyutlu malzemeler DNA ile aynı boyut aralığına sahiptir ve bu sebeple bu NP'ler daha büyük parçacıkların yapamayacağı şekilde genetik materyalle etkileşime girerek farklı tepkiler verebilmektedir (Shatkin 2013). Her organizma için ortak yapı olan genetik materyalin korunması gelecek nesillerin sağlıklı olması bakımından önemlidir. Memeliler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda NP'lerin inhale edildikten veya yutulduktan sonra kan yoluyla sistemik etkilere neden olabildiği ve bazı NP'lerin doğrudan deriye nüfuz edebildiği gösterilmiştir (Johnston vd 2010, Niska vd 2015). Nanopartiküller hücrelere kolayca girebildiği ve çevrede birikebildiğinden insan sağlığına ve ekosisteme karşı potansiyel bir risk taşımaktadır (Lofrano vd 2016). NP'lere maruz kalınması sonucunda diğer çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlarda olduğu gibi maruz kalınan NP'lerin de genotoksisiteyi indükleyebilme yetenekleri vardır (Singh vd 2009). Ayrıca NP'lerin toksikolojik çalışmalarının birçoğunda da ROS üretimini arttırdığı ve oksidatif stresin uyarılmasına neden olduğu sonuçlarına ulaşılması da dikkat çekicidir.

(Nel vd 2006, Eom ve Choi 2009). İnsan vücudunda patolojik koşullar altında veya normal metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin zararlı etkileri vücuttaki farklı doğal savunma mekanizmaları (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz, peroksidaz vb.) tarafından kontrol altında tutulmaktadır ancak yetersiz kaldığı durumlarda bulunmaktadır (Koca ve Karadeniz 2005) ve bu durumda çeşitli genetik hasarlar oluşabilmektedir (Singh vd 2016b). Nanopartiküllerde boyut küçüldükçe yüzey alanı ve hacimde azalma olmakta ancak yüzey alanı/hacim oranında belirgin bir artış bulunmaktadır. Parçacıkların yüzey kimyası doğrudan ROS oluşumuna neden olabilmektedir (Singh 2016c). Bu nedenle ROS üretimi ve oksidatif stres hasarı NP toksisitesi için bir paradigma haline gelmiştir (Xia vd 2008). ROS ve RNS (reaktif azot türleri)'nin, üretimi, birikimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengesizlik, oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Singh 2016b). ROS, DNA hasarı, gen mutasyonu, MN, kromozom bozuklukları gibi olaylarla genotoksositeye neden olabilmektedir (Kumari vd 2014). Ayrıca apoptotik süreçte önemli bir faktördür ve aşırı ROS üretimi, mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırmakta ve apoptotik sürecin tetiklenmesi ile sonuçlanacak solunum zincirine zarar vermektedir (Park vd 2008).

DNA molekülünde değişikliklere yol açan ajanlar çeşitli genotoksosite testleri ile belirlenebilmektedir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyal üzerinde oluşan hasarı belirlemek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır. Geleneksel toksikolojik yaklaşım kimyasal testlerde risk değerlendirmesinin birincil aracı olarak hayvan çalışmalarını içermektedir (Xia vd 2008). Bu bağlamda çalışmamızda CeO₂ ve MgO NP'lerinin *in vivo* genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla model organizma olarak *D. melanogaster* kullanılmıştır. Günümüzde, farklı NP'lerin biyolojik etkilerinin test edilmesinde model olarak submemeli ökaryotik bir organizma olan *Drosophila* kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Posgai vd 2011, Pandey vd 2013, Siddique vd 2015).

Bu tez kapsamında *Drosophila* SMAR Testinde kanat preparatlarının değerlendirme sonuçlarına bakıldığında 22 nm boyutundaki CeO₂ NP'leri kontrol grubuna oranla küçük tek tip, ikiz kolon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından genotoksositeyi inhibe ettiği gözlenmiştir ancak iyonik formdaki CeO₂'in küçük tek tip, toplam klon ve toplam *mwh* klon parametreleri açısından istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla sadece en yüksek uygulama dozunda (10mM) genotoksositeyi indüklediği gözlenmiştir. Doz toksisiteyi belirleyen en temel faktördür. Uygun dozda kullanılmadığı takdirde her madde zararlı/olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir. İyonik formdaki CeO₂'in en yüksek dozundaki pozitif sonucun gözlenmesinin bu sebepten kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun haricinde hem CeO₂ NP'de genotoksitenin inhibe edilmesi hem de CeO₂ partiküllerinin sadece en yüksek dozu haricinde genotoksitenin gözlenmemesi literatürde daha önceden yapılan CeO₂ NP'lerinin hücreleri serbest radikallere ve ROS'a karşı koruyarak pozitif biyolojik etkilerinin de olduğunu ileri süren çalışmalarla ters düşmemektedir (Chen vd 2006, Schubert vd 2006, Park vd 2008, Xia vd 2008, Johnston vd 2010, Rossi vd 2016). Yakıt katkı maddelerinde kullanıldığından hava kalitesi, iklim değişikliği ve halk sağlığı üzerine etkileri açısından önemli olan ve etkileri henüz belirsiz olan CeO₂ NP'leri, belirli koşullarda, bir antioksidan görevi görürken belirli koşullarda ise bir oksidatif stres indükleyici gibi davranabilmektedir (Rossi vd 2016, Rundle vd 2016).

CeO₂ NP'lerinin genotoksisiteyi inhibe ettiğine dair gözlemlediğimiz sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Niu vd (2011) çalışmalarında H9c2 (rat kardiyomiyositleri) hücre hattında CeO₂ NP'lerinin ön uygulaması sonucunda, sigara dumanı ekstraktı aracılığı ile indüklenen ROS üretimini inhibe ettiği ve bununla birlikte ROS üretimi, NF-kB aktivasyonu, inflamatuvar gen ekspresyonu ve antioksidan tükenmesi ile ilişkili hücre ölümünü inhibe ettiğini saptamışlardır. Rubio vd (2016) çalışmalarında BEAS-2B hücre hattı (insan bronşiyal epitel hücreleri) üzerinde CeO₂ NP'lerinin (<25nm) KBrO₃ oksitleyici ajan ile indüklenen ROS üretimini inhibe ettiğini ve beraberinde Sod2 ve Ho1 aktivitesini taklit ettiğini, KOMET testi sonucuna göre DNA hasarını azalttığını ve hücre ölüm oranını azalttığını göstermişlerdir. Cohen vd (2008) *D. melanogaster* bireylerine larva aşamasında ve yetişkinlikte çeşitli konsantrasyonlarda CeO NP maruziyetinin etkilerini incelemiş ve sonucunda dişilerde CeO NP maruziyetinden sonra ömür uzunluğunun 18 gün (% 32) arttığını ve yaşlı dişilerde genel aktivitenin % 150 arttığını tespit etmişlerdir. Strawn vd (2006) yaptıkları çalışmada ise *D. melanogaster*'in CeO₂ NP'lerine maruziyeti sonrasında yaşam süresini % 38 arttırdığını saptamışlardır. Cohen vd ile Strawn vd'nın yaptıkları çalışmalar CeO₂ NP'lerinin *D. melanogaster* için toksik olmadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızın sonucuna göre de CeO₂ NP'leri *D. melanogaster* için genotoksisite göstermemiştir. Bunlarla birlikte literatürdeki bazı çalışmalara göre CeO₂ NP'lerinin antioksidan veya oksidan etkisi hücre tiplerine göre de farklılık gösterebilmektedir. Park vd (2008) çalışmalarında CeO₂ NP'lerinin (15, 25, 30 ve 40nm) sitotoksik etkilerini BEAS-2B, T98G (insan beyin glioblastoma hücreleri) ve H9c2 hücre hatları üzerinde araştırmışlardır. Sonuçta BEAS-2B hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak ve oksidatif stres kaynaklı hücre canlılığında azalma saptamışlardır. Farklı boyutlarda kullanılan CeO₂ NP'lerinin sonuçları arasında istatistiksel olarak bir fark saptamamışlardır. Buna karşılık T98G ve H9c2 hücrelerinde belirgin bir sitotoksisite saptamamışlar, 98 saatlik maruz kalma süresi boyunca hücre canlılığında azalma gözlememişlerdir. Tarnuzzer vd (2005) normal insan meme hücre hattı (CRL 8798) ve insan meme tümör hücre hattı (MCF-7) ile yaptıkları *in vitro* çalışmada CeO₂ NP'lere maruz bırakılan hücre hatlarının ışın tedavisi uygulandıktan sonraki hücre canlılıklarını karşılaştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda CeO₂ NP'lerinin normal insan meme hücrelerinde radyasyona karşı % 99 koruyucu etkisinin olduğunu ancak tümör hücrelerinde herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Hücredeki antioksidanlar, oksidatif stresi sınırlayan birincil savunma sistemini oluştururlar. Hücreleri oksidatif strese karşı koruyan kritik antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutazlar bulunur (Niu vd 2011). CeO₂ NP'lerin çalışmamızda gözlediğimiz bu genotoksisiteyi inhibe ederek gösterdikleri koruyucu etkisini daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkarak SOD'ı taklit ederek ve H₂O₂'i O₂'e ve H₂O'ya ayrıştırma yeteneğine sahip katalaz benzeri etkinliğe sahip olarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Karlsson vd 2015). CeO₂ NP'lerinin anti-oksidatif etkisi, ROS ile NP'lerin büyük yüzey alanları üzerindeki yüksek elektron oranı arasındaki direkt değişimi olarak ifade edilmektedir. CeO₂ NP'lerinin hem 3+ hem de 4+ oksidasyon durumlarına sahip olması, yüzeyinde oksijen boşlukları yaratarak devam eden bir otojeneneratif reaksiyon döngüsüne (Ce³⁺ → Ce⁴⁺ → Ce³⁺) neden olabilmektedir. Bu sayede Ce³⁺, hidroksil radikalleri (OH⁻) ile reaksiyona girerek serbest radikal süpürücü olarak rol oynayabilmektedir. Yani CeO₂ NP'lerinin yüksek reaktiviteleri nedeniyle ROS'u süpürme yetenekleri yüksektir (Park vd 2008, Niu vd 2011).

Bu literatür bilgilerine ve bizim tez çalışmamızın sonuçları ile farklılık gösteren CeO₂ NP'lerinin genotoksik potansiyele sahip olduğunu ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Eom ve Choi (2009) CeO₂ NP'lerinin (15, 30 ve 45 nm) toksisite mekanizmasını anlamak için BEAS-2B (insan bronşiyal epitel hücreleri) üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda CeO₂ NP'lerinin nanopartikül boyutuna bağlı olmayan bir şekilde ROS konsantrasyonunda önemli bir artışa sebep olarak oksidatif stres yoluyla toksisitesini gösterdiğini gözlemişlerdir. Ali vd (2014) A375 (insan deri melanoma hücreleri) hücre hattında CeO₂ NP'lerinin (25 nm) doza ve zamana bağlı olarak önemli ölçüde ROS üretimini indüklediği böylece sitotoksositeye neden olduğunu göstermişlerdir. Zhang vd (2011) 8.5 nm boyutundaki CeO₂ NP'lerinin toksik etkilerini *C. elegans*'da *in vivo* olarak araştırmışlardır. Sonuçlar en düşük dozda bile (1nM) NP'ün oksidatif hasar ve ROS birikimine sebep olduğunu ve nematodların ortalama ömür uzunluğunu anlamlı olarak azalttığını ortaya koymuştur. Bu CeO₂ NP genotoksitesinin altında yatan mekanizmalar daha önceki çalışmalara dayandırılarak ROS aracılı oksidatif stres kaynaklı olabileceği ileri sürülmektedir (Lin vd 2006, Zhang vd 2011, Houdy vd 2011). CeO₂ NP'lerinin ROS indüksiyonuyla ilgili mekanizmalar hakkında açık bir açıklama yapılmamıştır. Ancak CeO₂ NP'leri potansiyel redoks özellikleri sayesinde ROS oluşumunda anahtar rol oynamaktadır (Park vd 2008). ROS oluşumunun Ce⁴⁺'ün Ce³⁺'e redüksiyonu sonucunda Ce³⁺ ile O₂ molekülünün etkileşimiyle birlikte süperoksit anyonlarının (O₂⁻) üretilmesi ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Lin vd 2006). Üretilen iki süperoksit anyon molekülü etkileşime girerek hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüşmektedir. Daha sonrasında hidrojen peroksit hidroksil radikallerine (OH⁻) dönüşmektedir. OH⁻'leri de DNA zincirine saldırarak DNA hasarına sebep olmaktadır (Houdy vd 2011).

Ayrıca son bulgular göstermektedir ki pH ve diğer faktörler CeO₂ NP'lerinin antioksidan etki mi yoksa toksik etki mi göstereceğini belirleyebilmektedir. Örneğin, 7.00 pH, nanopartikül yüzey yükünü ve dolayısıyla partiküllerin bakterilere doğru adsorpsiyon afinitesini değiştirebilmektedir (Pelletier vd 2010). CeO₂ NP'lerinin fizyolojik pH değerinde (7.38 ve 7.42) antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve radyasyon hasarına, oksidatif strese ve inflamasyona karşı koruma gibi biyomedikal uygulamalarda potansiyel kullanımının olduğu bildirilmiştir (Asati vd 2009). Asati vd (2009) çalışmalarında CeO₂ NP'lerinin hidrojen peroksit gibi oksidasyon ajanı olmaksızın bir dizi organik substratı hızlıca oksitleyebileceğinden, asidik pH'da bir oksidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu sebeplerle CeO₂ NP'lerinin sulu ortamdaki bu eşsiz pH-bağımlı oksidaz aktivitesi, onları biyoteknoloji ve çevre kimyasında geniş bir yelpazede potansiyel uygulamalar için güçlü bir araç yapmaktadır.

Bu çalışmada genotoksitesi araştırılan diğer kimyasallarda MgO NP (11nm) ve iyonik formudur. *Drosophila* kanat imajinal disk hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi sonucuna göre MgO NP'ün sadece en yüksek dozunda (10 mM) küçük tek tip, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla pozitif sonuç gözlenmiştir. Diğer dozlarında (1, 2 ve 5 mM) tüm parametreler açısından genotoksite tespit edilmemiştir. Heydary vd (2015) insan lenfositlerinde Chlorpyrifos (CP=Klorpirifos)'a bağlı toksisiteye karşı MgO NP'lerinin (~100 nm) olası düzenleyici rolünü çalışmışlar ve sonucunda MgO NP'leri ile tedavi edilen CP'ye maruz kalan lenfositlerin, mortalite hızında belirgin bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Nodeh vd (2016) ratların pankreas adacıkları üzerine MgO NP'lerinin (<10nm) etkisini araştırmışlardır. Pankreas adacıkları 24 saat MgO

NP'leri ile inkübe edildikten sonra kaspaz aktivitesini incelemişlerdir. MgO NP'lerinin 100 µg/ml konsantrasyonunda kaspaz-9 aktivitesini inhibe edere apoptotik hücre oranında önemli bir azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu konsantrasyondaki MgO NP'leri insülün seviyesinin önemli artışına neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar MgO NP kullanımını düşük konsantrasyonlarda destekler niteliktedir (Nodeh vd 2016). Bizim gözlediğimiz sonuçlara göre de bu önceki çalışmalara paralel olarak MgO NP'leri düşük dozlarda genotoksisite göstermemiştir. Bunun dışında MgO NP'lerinin yüksek dozunda meydana gelen toksisitesinin literatür çalışmalarından yola çıkarak ROS üretimini indükleyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Krishnamoorthy vd (2012) yaptıkları çalışmada, normal akciğer fibroblast hücreleri (CCD-25Lu) ve HeLa (İnsan serviks adenokarsinoma), AGS (insan gastrik adenokarsinoma) ve SNU-16 (insan gastrik karsinoma) olmak üzere üç farklı kanser hücre hattına karşı, MgO NP'lerinin (20nm) sitotoksik etkilerini araştırmışlardır ve sonucunda MgO NP'lerinin kanserli hücrelere yönelik toksisiteye neden olan olduğunu ve bunun MgO NP'lerinin ROS üretimine neden olup sitotoksisiteyi indüklemesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada MgO NP'lerinin (~26 nm) oral/gastrointestinal yolla fare (*Mus musculus*) üzerinde etkilerini araştırmışlardır. Hem akut toksisitesi bir grup fareye MgO NP'lerinin (25mg/kg) gavaj yapıp 72 saat izlenmesi ile hem de kronik toksisitesi 30 gün boyunca MgO NP'leri (12mg/kg) ile sürekli olarak beslenerek ve sonucunda davranışları, motor bozuklukları ve hayatta kalmaları gözlenerek araştırılmıştır. Sonuçta MgO NP'lerinin hem akut hem de kronik toksisitesinin araştırılma verilerine göre zayıf toksik olduğu sonucunu gözlemişlerdir. Ayrıca MgO NP'lerinin en fazla absorpsiyonu sırasıyla kas ve bağırsaklarda olduğunu göstermişlerdir (Shaikh vd 2015). Ge vd (2011) yaptıkları çalışmada, MgO NP sitotoksitesini insan kordon endotelial hücrelerinde *in vitro* olarak incelemişlerdir. Deney sonuçları MgO NP'lerinin sitotoksitesinin temas süresi ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. MgO NP yüzeyinde ROS oluşum mekanizması halen belirsizdir. Ancak süperoksit radikal (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi için sıralı oksidasyon-indirgenme reaksiyonlarının MgO NP yüzeyinde oluşabileceği düşünülmektedir (Krishnamoorthy vd 2012a).

MgO iyonik formuna baktığımızda ise 5mM haricinde diğer dozlarda (1, 2 ve 10 mM) toplam klon ve toplam *mwh* klon parametreleri açısından istatistiksel olarak kontrol grubuna oranla pozitif sonuç gözlenmiştir. NP'lerin genel olarak iyonik formlarına göre daha büyük bir yüzey alanı ve yüksek reaktiviteye sahip olmaları nedeniyle iyonik formlarına göre daha fazla toksik potansiyele sahiptirler (Casseo vd 2011). Çünkü NP'lerin büyük yüzey alanlarına sahip olması onları biyolojik olarak daha aktif hale getirmektedir (Oberdörster vd 2005). Ancak bizim çalışmamızda MgO iyonik formu MgO NP'e göre uyguladığımız düşük dozlarda da pozitif sonuç göstermiştir. Şu anda literatürde MgO'nin farklı formlarının toksisitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle sebebini şu an bilememekle birlikte ancak olası bir neden olarak NP'lerin bir araya toplanarak kümeleşmesi (agregasyonu) ve bu sebeple yüzey alanları azalacağından iyonik form ile NP arasında yüzey alanı bakımında fark oluşmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yani bu durum NP'lerin kararlılıkları ile açıklanabilir. NP'lerin kararlılıkları da toksisitelerini etkileyebilmektedir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, NP kararlılığı hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Zeta potansiyeli, taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür.

Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Zeta potansiyeli $>60\text{mV}$ üzerinde ise partiküller çok iyi seviyede kararlıdır, $>20\text{-}30\text{mV}$ arasında ise kararlıdır ancak bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve kümeleşerek çökelme eğilimindedirler (Nanobülten 2011). Akışkan bir sıvı içerisinde yüzen veya asılı kalan parçacıkların, içinde bulunduğu çözücü moleküllerin sürekli çarpışmaları sonucu yaptıkları rastgele hareket yapmaktadırlar. Brown hareketi denilen bu hareketten dolayı nanoparçacıklar birbirleriyle çarpışmakta ve belirli koşullar altında bağlar oluşturarak farklı boyutlarda agrega olarak bilinen daha büyük parçacıkların oluşumuna neden olmaktadır. Dinamik ışık saçılımı methodu (DLS) kullanılarak Brown hareketinin hızı ölçülebilmekte ve böylece parçacığın boyutu hesaplanabilmektedir (Dalgakıran 2006, Kamer 2012). Nanopartiküllerin çarpışma frekansı partikül boyutuna ters orantılı olduğu için, daha küçük parçacıklar daha büyük parçacıklara göre daha yüksek agregasyon oranına sahip olabilmektedir (Singh 2016b). Bizim çalışmamızda da kullandığımız NP'lerin zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde (CeO_2 NP 1.72 mV , MgO NP 0.738 mV) kararsız olduğu ve agrega oluşturma eğiliminde olduğu görülmektedir. Bu da çalışmamızdaki NP genotoksitesini etkileyen faktörlerden biri olabileceği düşünülmektedir.

NP'lerin hazırlama yöntemleri, partikül büyüklüğünü ve dağılımını etkileyen önemli faktörlerdendir. NP üretiminde kullanılan emülsifiyelerin tipi ve miktarı ayrıca üretimde kullanılan çözücülerin türü hazırlama yöntemlerinde çeşitlilik katan faktörlerdir (Nanobülten 2011) ve bu faktörlerin NP toksisitesini etkileyebileceği de göz önünde tutulmalıdır. Örneğin, en iyi bilinen fulleren yapısı C_{60} 'ın başlangıçta toksik olduğu düşünülüyordu ancak daha sonraki çalışmalar, C_{60} sentezinde kullanılan tetrahidrofuran (THF) kalıntılarının toksisiteden sorumlu olduğunu göstermiştir (Pelletier vd 2010). Klasik sentez yöntemleri ile nanopartiküllerin istenilen büyüklük ve morfolojide sentezlenebilmeleri mümkün olmasına rağmen bu yöntemlerin sahip oldukları dezavantajlar nedeniyle yeşil nanoteknoloji ile daha ekonomik, basit ve toksik madde içermeyen yöntemler araştırılmaktadır (Beykaya ve Çağlar 2016).

Sonuç olarak yapılan çalışmanın, *in vivo* koşullarda SMAR testi ile *Drosophila* kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelebilecek nokta mutasyon, rekombinasyon, ayrılmama ve delesyon gibi birçok genotoksik hasarın saptanabilmesi, *Drosophila* üzerinde genotoksik etkisinin araştırıldığı literatürde CeO_2 NP'leri ve özellikle MgO NP'leri hakkında çok kısıtlı araştırmaya rastlanılmış olması nedeniyle önemlidir. Bu bakımdan, sonuçların *in vivo* koşullarda elde edilmiş olması ve elde edilen sonuçların nanoteknoloji alanına katkı sağlayabilecek olması bakımından önem taşımaktadır ve tartışmalı sonuçların ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilmesi adına daha farklı test sistemleri ve farklı organizmalarla yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Metal oksit NP'leri su arıtımında, UV engelleyici olarak kozmetik alanlarında, elektronik, gıda ambalajı, yakıt katkı maddesi, sigara katkı maddesi, nano kriyoterapi ve hipertermi olarak kanser terapisi uygulamalarında ilaç ve sağlık katkı maddeleri olarak ve hatta gıda ürünleri gibi birçok amaç için kullanılmakta olup uygulama alanları genişlemeye devam etmekte ve devam ettikçe çevredeki NP'lerin çevresel akıbeti ve potansiyel sağlık riskleri hakkında endişeler de artmaktadır. Biyolojik sistemlerde NP'lerin davranışı iyi bilinmemekle birlikte, bugün piyasada NP içeren birçok ürün olduğu bilinmektedir. Giderek yaygınlaşan kullanım alanına sahip metal oksitlerden olan MgO ve CeO₂ NP'lerinin hem sitotoksik hem de antioksidan özellikte olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunduğundan dolayı canlı üzerine etkileri hakkında farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Birlikte ele alındığında, muhtemel sağlık etkileri (olumsuz veya yararlı) ile ilgili genel sonuçlar çıkarmak şu anki verilerin yetersizliğinden dolayı mümkün olmamaktadır. Ancak bu NP'lerin kullanımları için bir kontrol mekanizmasının geliştirilmesi açısından farklı düzeylerdeki muhtemel etkilerinin araştırılması önemlidir. Bu bağlamda bu çalışmada MgO ve CeO₂ NP'lerinin ve bunların iyonik formlarının genotoksitesi *in vivo Drosophila* Kanat somatik Mustasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) kullanılarak araştırıldı.

CeO₂ iyonik formunun sadece en yüksek dozunda (10mM) küçük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon frekansını indüklediği gözlenirken CeO₂ NP uygulama sonuçlarında ise tüm uygulama dozlarında, küçük ve büyük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon kategorilerinde olmak üzere mutant klon frekanslarını inhibe ettiği gözlemlendi. MgO iyonik formunun uygulama dozlarından 5 mM haricinde diğer dozlarda toplam *mwh* klon ve toplam klon parametresi açısından pozitif sonuç verdiği, MgO NP'ün uygulama sonuçlarında ise sadece en yüksek dozunda (10 mM) küçük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından pozitif sonuç vererek genotoksiteyi indüklediği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa, *Drosophila* SMART ile çalışılan CeO₂ NP'lerinin *D. melanogaster* kanat imajinal disk hücreleri üzerinde genotoksiteyi indirgeyici bir etkiye sahip olduğu, MgO iyonik formunun ise istatistiki olarak anlamlı düzeyde genetik hasara sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. CeO₂ iyonik formunun ve MgO NP'lerinin ise istatistiki olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur.

NP'ler cilt, akciğerler ve sindirim sistemi yoluyla absorbe edilebilmekte ve hedef dokularda birikebilmektedir. Ancak hücreler ve organlar üzerindeki etkileri şu an ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Elde ettiğimiz verilerdeki gibi sonuçlarda genotoksiteyi indükleyebilme ya da inhibe edebilme potansiyeli göstermelerinin altında yatan mekanizmaların araştırılması için çalışmaların yapılarak sonuçların geliştirilmesi önemlidir.

Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in genetik yapı olarak insana büyük oranda benzerlik göstermesi, ökaryotik bir organizma olması elde edilen sonuçlar bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca kimyasal maddelerin metabolizmaları ve dağılımları göz önünde bulundurulduğunda *D. melanogaster* genotoksik araştırmalarda önemli ve hassas bir model organizmadır. Bu bakımdan, sonuçların *in vivo* koşullarda elde edilmiş olması ve elde edilen sonuçların metal oksit NP toksisitesi verilerine katkı sağlayacağı düşünülmesi bakımından önemlidir ve bu tür

çalışmaların toplum sağlığını doğrudan ilgilendirmesi nedeniyle daha farklı test sistemleri (*in vivo* ve *in vitro*) ve farklı model organizmalar kullanılarak değerlendirilmesi de gerekmektedir.



7. KAYNAKLAR

- ALARABY, M., ANNANGI, B., MARCOS, R. and HERNÁNDEZ, A. 2016. *Drosophila melanogaster* as a Suitable *in vivo* Model to Determine Potential Side Effects of Nanomaterials: A Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B Crit Rev.*, 19(2):65-104.
- ALI, D., ALARIFI, S., ALKAHTANI, S., ALKAHTANE, A.A. and ALMALIK, A. 2014. Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells. *Cell Biochem Biophys*, DOI 10.1007/s12013-014-0386-6.
- ARMSTEAD, A.L. and LI, B. 2016. Nanotoxicity: emerging concerns regarding nanomaterial safety and occupational hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. *International Journal of Nanomedicine*, 11: 6421-6433.
- ASATI, A., SANTRA, S., KAITTANIS, C., NATH, S. and PEREZ, J.M. 2009. Oxidase Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 48(13): 2308–2312.
- AUFFAN, M., ROSE, J., ORSERE, T., De MEO, M., THILL, A., ZEYONS, O., PROUX, O., MASION, A., CHAURAND, P., SPALLA, O. et al. 2009. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts *in vitro*. *Nanotoxicology*, 3(2): 161-171.
- AVALOS, A., HAZA, A.I., DROSOPOULOU, E., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. and MORALES, P. 2015. *In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, 85:114-119.
- BAEK, Y-W. and AN, Y-J. 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409: 1603–1608.
- BAKER, L.F., KING, R.S., UNRINE, J.M., CASTELLON, B.T., LOWRY, G.V. and MATSON, C.W. 2016. Press or Pulse Exposures Determine The Environmental Fate of Cerium Nanoparticles in Stream Mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35 (5): 1213–1223.
- BALAMURUGAN, A., SOCKALINGUM, G., MICHEL, J., FAURÉ, J., BANCHET, V., WORTHAM, L., BOUTHORS, S., LAURENT-MAQUIN, D. and BALOSSIER, G. 2006. Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. *Materials Letters*, 60: 3752–3757.

- BEYKAYA, M. ve ÇAĞLAR, S. 2016. Bitkisel Özütlere Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 16: 631-641.
- BRUN, N., MAZEROLLES, L. and PERNOT, M. 1991. Microstructure of opaque red glass containing copper. *Journal of Materials Science Letters*, 10: 1418-1420.
- BUZEA, C., BLANDINO, I.I.P. and ROBBIE, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4): MR17- MR172.
- CASSEE, F.R., VAN BALEN, E.C., SINGH, C., GREEN, D., MUIJSER, H., WEINSTEIN, J. and DREHER, K. 2011. Exposure, Health and Ecological Effects Review of Engineered Nanoscale Cerium and Cerium Oxide Associated with its Use as a Fuel Additive. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(3): 213–229.
- CHEN, J., PATIL, S., SEAL, S. and MCGINNIS, J.F. 2006. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature Nanotechnology*, 1: 142-150.
- CHUSUEI, C.C., WU, C-H., MALLAVARAPU, S., HOU, F.Y.S., HSU, C-M., WINIARZ, J.G., ARONSTAM, R.S. and HUANG, Y-W. 2013. Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chemico-Biological Interactions*, 206:319–326.
- CHYB, S. and GOMPEL, N. 2013. *Atlas Drosophila Morphology*, Wild-type and classical mutants. Elsevier Inc., China.
- COHEN, C.A., KARFAKIS, J.A., KURNICK, M.D. and RZIGALINSK, B. 2008. Cerium Oxide Nanoparticles Reduce Free Radical-Mediated Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *The FASEB Journal*, 22(1 Supplement):624-1.
- DALGAKIRAN, E. 2006. Poliakrilik Asidin Bovine Serum Albumin ile Etkileşiminin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleri ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 70 s., İstanbul.
- ELSWAİFİ, S.F., PALMIERI, J.R., HOCKEY, K.S. and RZIGALINSKI, B.A. 2009. Antioxidant Nanoparticles for Control of Infectious Disease. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 9: 445-452.
- EOM, H-J. and CHOI, J. 2009. Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicology Letters*, 187: 77–83.
- FLAGG, R.O. 1988. *Carolina Drosophila Manual*. Carolina Biological Supply Company, North Carolina.

- FOCUS ON POWDER COATINGS. 2014. Global magnesium oxide nanoparticle market to reach \$42.3 M by 2020.
- FOURCHES, D. and TROPSHA, A. 2014. Quantitative Nanostructure–Activity Relationships from Unstructured Data to Predictive Models for Designing Nanomaterials with Controlled Properties. In: N.A. Monteiro-Riviere and C.L. Tran (Editors), *Nanotoxicology Progress toward Nanomedicine*, Second Edition, CRC Press Taylor&Francis Group, pp. 115-133, New York.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- FUTURE MARKET INSIGHTS. 2017. Metal & Metal Oxide Nanoparticles Market: Gold Nanoparticles Continue to Shine in Terms of Value Owing to Significant Market Demand: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment, 2016-2026. <http://www.futuremarketinsights.com/reports/metal-and-metal-oxide-nanoparticles-market>
- GAFFET, E. 2010. Nanomaterials and Nanoproducts: World Markets and Human and Environmental Impacts. In: P. Houdy, M. Lahmani and F. Marano (Editors), *Nanoethics and Nanotoxicology*, Springer, pp. xxxiii- xlv, France.
- GE, S., WANG, G., SHEN, Y., ZHANG, Q., JIA, D., WANG, H., DONG, Q. and YIN, T. 2011. Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *IET Nanobiotechnol.*, 5(2): 36–40.
- GHOBIADIAN, M., NABIUNI, M., PARIVAR, K., FATHI, M. and PAZOOKI, J. 2015. Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebra fish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122:260–267.
- GRAF, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51: 168-173.
- GRAF, U. and VAN SCHAIK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.
- GRAF, U., FREI, H., KAGI, A., KATZ, A.J. and WURGLER, F.E. 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 222(4): 359-373.
- GRAF, U., VAN SCHAIK, N. and WTIRGLER, F.E. 1992. *Drosophila Genetics A Practical Course*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- GRAF, U., WURGLER, 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*. *Environmental Mutagenesis*, 6: 153-188.
- GRAND VIEW RESEARCH INC. 2017. Metal Oxide Nanoparticles Market Analysis, Market Size, Application Analysis, Regional Outlook, Competitive Strategies And Forecasts, 2015 To 2022. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/metal-oxide-nanoparticles-market>
- GREWAL, S.S. 2013. Instant Messaging, During development, communication between organs determines their relative final size. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34435/title/Instant-Messaging/>
- GUZMAN-RINCON, J., RAMIREZ-VICTORIA, P. and BENITEZ, L. 2001. In: F.M. Butterworth, A. Gunatilaka and M.E. Gonsebatt, *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2, A Handbook*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 221- 237, New York.
- GÜRSEL, İ. 2006. Türkiye’de Nanoteknoloji. *Bilim ve Teknik*. Tübitak, 12-14 s.
- HASBULLAH, N.I., ZAIN, M.M. and KAMARULZAMAN, N. 2013. Nanotoxicity of Magnesium Oxide on Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Lines. *Advanced Materials Research*, 667: 160-164.
- HORIE, M., FUJITA, K., KATO, H., ENDOH, S., NISHIO, K., KOMABA, L.K., NAKAMURA, A., MIYAUCHI, A., KINUGASA, S., HAGIHARA, Y. et al. 2012. Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*, 4: 350–360.
- HOUDY, P., LAHMANI, M. and MARANO, F. 2011. *Nanoethics and Nanotoxicology*. Springer, France.
- HUANG, L., LI, D., LIN, Y., EVANS, D.G. and DUAN, X. 2005. Influence of nano-MgO particle size on bactericidal action against *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Chinese Science Bulletin*, 50 (6): 514–519.
- IVASK, A., TITMA, T., VISNAPUU, M., VIJA, H., KÄKINEN, A., SIHTMÄE, M., POKHREL, S., MÄDLER, L., HEINLAAN, M., KISAND, V. et al. 2015. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types *in vitro*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15: 1-16.
- JOHNSTON, B.D., SCOWN, T.M., MORGER, J., CUMBERLAND, S.A., BAALOUSHA, M., LINGE, K., VAN AERLE, R., JARVIS, K., LEAD, J.R. and TYLER, C.R. 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 1144–1151.

- JOO, S.H. and ZHAO, D. 2017. Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 322: 29–47.
- JU-NAM, Y. and LEAD, J.R. 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, 400: 396–414.
- KAMER, G.M. 2012. Fe₃O₄/HA/Ag Nanoparçacıklarının Sentezi ve Sentetik Uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 55 s., İstanbul.
- KARLSSON, H.L., DI BUCCHIANICO, S., COLLINS, A.R. and DUSINSKA, M. 2015. Can the Comet Assay be Used Reliably to Detect Nanoparticle-Induced Genotoxicity? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56:82-96.
- KASTENBAUM, M.A. and BOWMAN, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9: 527-549.
- KAYA, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 134 s., Antalya.
- KAYA, B., CREUS, A., VELÁZQUEZ, A., YANIKOĞLU, A. and MARCOS, R. 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research*, 520: 93–101.
- KIRANMAI, G. and REDDY, A.R.N. 2012. Antioxidant status in MgO nanoparticle-exposed rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(10): 897–903.
- KLAINE, S.J., ALVAREZ, P.J.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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9) :1825–1851.
- KOCA, N. ve KARADENİZ, F. 2005. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 32-37 s.
- KRISHNAMOORTHY, K. MOON, J.Y., HYUN, H.B., CHO, S.K. and KIM, S-J. 2012. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22: 24610–24617.
- KRISHNAMOORTHY, K., MANIVANNAN, G., KIM, S.J., JEYASUBRAMANIAN, K. and PREMANATHAN, M. 2012a. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9): 1063.

- KUMAR, A., KHAN, S. and DHAWAN, A. 2014. Metal Oxide Nanoparticles Elicit Genotoxic Responses in Mammalian Cells : A Critical Review. In: Prof. A. Misra and Prof. J. Bellare, Nanoscience and Technology for Mankind, Humana Press, pp. 160-194, India.
- KUMAR, A., PANDEY, A.K., SINGH, S.S., SHANKER, R. and DHAWAN, A. 2011. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical Biology & Medicine*, 51: 1872–1881.
- KUMARI, M., KUMARI, S.I. and GROVER, P. 2014. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*, 29 (6): 467–479.
- LABILLE, J. and BOTTERO, J-Y. 2010. Fate of Nanoparticles in Aqueous Media. In: P. Houdy, M. Lahmani and F. Marano (Editors), Nanoethics and Nanotoxicology. Springer, pp. 291- 324, France.
- LAI, J.C.K., LAI, M.B., JANDHYAM, S., DUKHANDE, V.V., BHUSHAN, A., DANIELS, C.K. and LEUNG, S.W. 2008. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International Journal of Nanomedicine*, 3(4): 533-545.
- LEE, S-W., KIM, S-M. and CHOI, J. 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28: 86–91.
- LIN, W., HUANG, Y-W., ZHOU, X-D. and MA, Y. 2006. Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. *International Journal of Toxicology*, 25:451–457.
- LINDSLEY, D.L. and ZIMM, G.G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
- LOFRANO, G., CAROTENUTO, M., LIBRALATO, G., DOMINGOS, R.F., MARKUS, A., DINI, L., GAUTAM, R.K., BALDANTONI, D., ROSSI, M., SHARMA, S.K. et al. 2016. Polymer functionalized nanocomposites for metals removal from water and wastewater: An overview. *Water Research*, 92: 22-37.
- LOPEZ-MORENO, M.L., DE LA ROSA, G., HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A., CASTILLO-MICHEL, H., BOTEZ, C.E., PERALTA-VIDEA, J.R. and GARDEA-TORRESDEY, J.L. 2010. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environ. Sci. Technol.*, 44:7315–7320.

- LOPEZ-MORENO, M.L., DE LA ROSA, G., HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A., PERALTA-VIDEA, J.R. and GARDEA-TORRESDEY, J.L. 2010a. XAS Corroboration of the Uptake and Storage of CeO₂ Nanoparticles and Assessment of their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. *J Agric Food Chem.*, 58(6): 3689–3693.
- MA, H., DIAMOND, S., HINKLEY, G. and ROBERTS, S.M. 2015. Nanotoxicology. In: S.M. Roberts, R.C. James and P.L. Williams (Editors). Principles of Toxicology Enviromental and Industrial Applications, Third Edition, John Wiley & Sons, pp. 359-372, Canada.
- MAKHLUF, S., DROR, R., NITZAN, Y., ABRAMOVICH, Y., JELINEK, R. and GEDANKEN, A. 2005. Microwave-Assisted Synthesis of Nanocrystalline MgO and Its Use as a Bactericide. *Advanced Functional Materials*, 15: 1708-1715.
- MARCOS, R. and CARMONA, E.R. 2013. The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays Detecting Genotoxicity in *Drosophila*. In: A. Dhawan and M. Bajpayee (Editors), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, DOI 10.1007/978-1-62703-529-3_23, Springer Science+Business Media, pp. 417-427, New York.
- MARKOW, T.A. 2015. The secret lives of *Drosophila* flies. *Elife*. 4, doi:10.7554/eLife.06793
- MIRHOSSEINI, M. and AFZALI, M. 2016. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Food Control*, 68: 208-215.
- MOEINI-NODEH, S., RAHIMIFARD, M., BAEERI, M. and ABDOLLAHI, M. 2016. Functional Improvement in Rats' Pancreatic Islets Using Magnesium Oxide Nanoparticles Through Antiapoptotic and Antioxidant Pathways. *Biol Trace Elem Res.*, 175(1): 146-155.
- MONZAVI, A., ESHRAGHI, S., HASHEMIAN, R. and MOMEN-HERAVI, F. 2015. *In vitro* and *ex vivo* antimicrobial efficacy of nano-MgO in the elimination of endodontic pathogens. *Clin Oral Invest*, 19:349–356.
- NANOBÜLTEN 13. 2011. Aylık Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi. Mayıs 2011. www.nanott.hacettepe.edu.tr.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L. and LI, N. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311: 622-627.
- NISKA, K., SANTOS-MARTINEZ, M.J., RADOMSKI, M.W. and INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. 2015. CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the

antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicology in vitro*, 29: 663–671.

- NIU, J., WANG, K. and KOLATTUKUDY, P.E. 2011. Cerium Oxide Nanoparticles Inhibits Oxidative Stress and Nuclear Factor- κ B Activation in H9c2 Cardiomyocytes Exposed to Cigarette Smoke Extract. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1): 53- 61.
- NODEH, S.M., RAHIMIFARD, M., BAEERI, M. and ABDOLLAHI, M. 2016. Hope for better survival in rats' pancreatic islet transplantation: Using magnesium oxide nanoparticles. *Abstracts/Toxicology Letters*, 258S: S62–S324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1944>
- NOWACK, B. and BUCHELI, T.D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150: 5-22.
- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. and OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113 (7): 823-839.
- PANDEY, A., CHANDRA, S., CHAUHAN, L.K.S., NARAYAN, G. and CHOWDHURI, D.K. 2013. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 2256–2266.
- PARK, E-J., CHOI, J., PARK, Y-K. and PARK, K. 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245: 90–100.
- PELLETIER, D.A., SURESH, A.K., HOLTON, G.A., McKEOWN, C.K., WANG, W., GU, B., MORTENSEN, N.P., ALLISON, D.P., JOY, D.C., ALLISON, M.R. et al. 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (24): 7981–7989.
- POSGAI, R., CIPOLLA-MCCULLOCH, C.B., MURPHY, K.R., HUSSAIN, S.M., ROWE, J.J. and NIELSEN, M.G. 2011. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: Size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere*, 85: 34–42.
- RAHMAN, Q., LOHANI, M., DOPP, E., PEMSEL, H., JONAS, L., WEISS, D.G. and SCHIFFMANN, D. 2002. Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 110 (8): 797-800.
- ROBERTS, D.B. 2006. *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*., 121: 93–103.

- RODRIGUES, C.R.F., PLENTZ, L.C., FLORES, M.A., DIHL, R.R. and LEHMANN, M. 2017. Assessment of genotoxic and antigenotoxic activities of artemisinin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 101: 48-54.
- ROSENKRANZ, P., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., CONDE, E., RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M.B., FLORES, J.C., FERNÁNDEZ, M. and NAVAS, J.M. 2012. Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology. *Toxicology in vitro*, 26: 888–896.
- ROSSI, L., ZHANG, W., LOMBARDINI, L. and MA, X. 2016. The impact of cerium oxide nanoparticles on the salt stress responses of *Brassica napus* L. *Environmental Pollution*, 219:28-36.
- RUBIO, L., ANNANGI, B., VILA, L., HERNÁNDEZ, A. and MARCOS, R. 2016. Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Arch Toxicol*, 90:269–278.
- RUNDLE, A., ROBERTSON, A.B., BLAY, A.M., BUTLER, K.M.A., CALLAGHAN, N.I., DIENI, C.A. and MacCORMACK, T.J. 2016. Cerium oxide nanoparticles exhibit minimal cardiac and cytotoxicity in the freshwater fish *Catostomus commersonii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 181–182: 19–26.
- SCHUBERT, D., DARGUSCH, R., RAITANO, J. and CHAN, S-W. 2006. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342: 86–91.
- SELBY, P.B. and OLSON, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- SHAIKH, S.M., SHYAMA, S.K. and DESAI, P.V. 2015. Absorption, LD50 and Effects of CoO, MgO and PbO Nanoparticles on Mice “*Mus musculus*”. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 9(2): 32-38.
- 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. *Toxicology Letters*, 185: 211–218.
- SHATKIN, J.A. 2013. Nanotechnology Health and Environmental Risks, Second Edition. CRC Press Taylor&Francis Group, pp. 1-30, New York.
- SHUKLA, R.K., KUMAR, A., GURBANI, D., PANDEY, A.K., SINGH, S. and DHAWAN, A. 2013. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*, 7(1):48–60.

- SIDDIQUE, Y.H., HAIDARI, M., KHAN, W., FATIMA, A., JYOTI, S., KHANAM, S., NAZ, F., RAHUL, ALI, F., SINGH, B.R. et al. 2015. Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in *Drosophila melanogaster* (Oregon R). *Toxicol Mech Methods*, 25(6):425-32.
- SINGH, A.K. 2016. Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 1-18, USA.
- SINGH, A.K. 2016a. Principles of Nanotoxicology. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 171-228, USA.
- SINGH, A.K. 2016b. Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 295-341, USA.
- SINGH, A.K. 2016c. Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 19-76, USA.
- SINGH, N., MANSHIAN, B., JENKINS, G.J.S., GRIFFITHS, S.M., WILLIAMS, P.M., MAFFEIS, T.G.G., WRIGHT, C.J. and DOAK, S.H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30:3891–3914.
- SPANNO, M.A., FREI, H., WURGLER, F.E. and GRAF, U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standart and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16(5): 385-394.
- STRAWN, E.T., COHEN, C.A. and RZIGALINSKI, B.A. 2006. Cerium oxide nanoparticles increase lifespan and protect against free radical-mediated toxicity. *The FASEB Journal*, 20 (Meeting Abstract Supplement) A1356.
- SUN, J., WANG, S., ZHAO, D., HUN, F.H., WENG, L. and LIU, H. 2011. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells. *Cell Biol Toxicol*, 27:333–342.
- SZABAD, J., SOOS, I., POLGAR, G. and HEJJA, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Research*, 113:117-133.
- ŞEKEROĞLU, Z.A. ve ŞEKEROĞLU, V. 2011. Genetik Toksisite Testleri. *Tübvav Bilim Dergisi*, 4(3): 221-229.

- TARNUZZER, R.W., COLON, J., PATIL, S. and SEAL, S. 2005. Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage. *Nano Letters*, 5(12): 2573-2577.
- TAYLOR, N.S., MERRIFIELD, R., WILLIAMS, T.D., CHIPMAN, J.K., LEAD, J.R. and VIANI, M.R. 2015. Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* is associated with supra-environmental exposure concentrations. *Nanotoxicology*, Early Online: 1–10.
- THILL, A., ZEYONS, O., SPALLA, O., CHAUVAT, F., ROSE, J., AUFFAN, M. and FLANK, A.M. 2006. Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 6151-6156.
- THOMAS, J., VIJAYAKUMAR, S., THANIGAIVEL, S., MUKHERJEE, A. and CHANDRASEKARAN, N. 2014. Toxicity of Magnesium Oxide Nano Particles in Two Fresh Water Fishes Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Zebra Fish (*Danio rerio*). *Int J Pharm Pharm Sci*, 6 (2): 487-490.
- VAN HOECKE, K., QUIK, J.T.K., MANKIEWICZ-BOCZEK, J., DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., ELSAESSER, A., MEEREN, P.V.D., BARNES, C., MCKERR, G., HOWARD, C.V., MEENT, D.V.D. et al. 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.*, 43: 4537–4546.
- VANCE, M.E., KUIKEN, T., VEJERANO, E.P., MCGINNIS, S.P., JR., M.F.H., REJESKI, D. and HULL, M.S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769–1780.
- VIJAYALAKSHMI, M. 2013. *Drosophila melanogaster*-Life Cycle. <http://nptel.ac.in/courses/102106035/Module%202/Lecture%206/Lecture%206.pdf>
- VIRGILIO, A.L.D., REIGOSA, M. and DE MELE, M.F.L. 2011. Biocompatibility of magnesium particles evaluated by *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity assays. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 99(1):111-9.
- WANG, D., LIN, Z., WANG, T., YAO, Z., QIN, M., ZHENG, S. and LU, W. 2016. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *Journal of Hazardous Materials*, 308: 328–334.

- WANG, Y., DING, L., YAO, C., LI, C., XING, X., HUANG, Y., GU, T. and WU, M. 2017. Toxic effects of metal oxide nanoparticles and their underlying mechanisms. *Science China Materials*, 60(2): 93-108.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., LIONG, M., MÄDLER, L., GILBERT, B., SHI, H., YEH, J.I., ZINK, J.I. and NEL, A.E. 2008. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*, 2 (10): 2121-2134.
- YANG, X., PAN, H., WANG, P. and ZHAO, F-J. 2017. Particle-specific toxicity and bioavailability of cerium oxide (CeO₂) nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Hazardous Materials*, 322(Pt A):292-300.
- ZHANG, H., HE, X., ZHANG, Z., ZHANG, P., LI, Y., MA, Y., KUANG, Y., ZHAO, Y. and CHAI, Z. 2011. Nano-CeO₂ Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 45: 3725–3730.

ÖZGEÇMİŞ



Burçin YALÇIN 1992 yılında İzmir'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir'de tamamladı. 2010 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.

