

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİKEL DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN
GENOTOKSİSİTESİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ (SMART)
İLE ARAŞTIRILMASI

Burhan NAS

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2019
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK danışmanlığında, Burhan NAS tarafından hazırlanan bu çalışma 08.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Sevgi SEVSAY

İmza:

Üye : Doç. Dr. Arif AYAR

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 08 / 08 / 2019 tarih ve 31 / 2 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mustafa Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Nikel Demir Oksit Nanopartikülünün Genotoksisitesinin *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Araştırılması” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 08/07/2019



(İmza)

Burhan NAS

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NİKEL DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN GENOTOKSİSİTESİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ (SMART) İLE ARAŞTIRILMASI

Burhan NAS

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

Nikel demir oksit nanokompozitinin ($\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$) modern sanayi, biyomedikal uygulamalar, manyetik rezonans görüntüleme, sensörlerin yapımı, hedeflenmiş ilaç tedavisi, fotoelektrik cihazlarına kadar hayatımızın pek çok önemli alanında kullanıldığını bilinmektedir. Bu çalışmada, metaloksit nanopartiküller arasında yer alan NiFe_2O_4 (30nm) nanopartikülünün *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde olası toksik ve genotoksik etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, resesif *flare* (*flr*³) ve *multiple wing hair* (*mwh*) belirleyici genlerini üçüncü kromozomlarında taşıyan 72±4 saatlik larvalar kullanılmıştır. Larvalar, farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL) $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$ içeren besin ortamına alınarak kronik olarak beslenmiştir. $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$ 'nün genotoksik etkileri, uygulama sonunda larvalardan çıkan sineklerin kanat imajinal disk hücrelerindeki genetik değişimler (mitotik rekombinasyon, delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirilmiştir. Mutant klon değerlendirmeleri, küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon sınıflandırmaları esas alınarak yapılmıştır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon test yöntemiyle NiFe_2O_4 nanopartikülünün en yüksek konsantrasyonda genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

2019, 75 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, genotoksik etki, nanoteknoloji, nanopartikül, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXICITY EFFECT OF NICKEL IRON OXIDE NANOPARTICLE BY SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART) IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Burhan NAS

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

It is known that nickel iron oxide nanocomposite (NiFe₂O₄NP) is used in many important areas of our life, from modern industry, biomedical applications, magnetic resonance imaging, construction of sensors, targeted drug treatment, photoelectric devices. The aim of this study was to investigate the possible toxic and genotoxic effects of NiFe₂O₄ (30nm) nanoparticle between metal oxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* transheterozygote larvae. For this purpose, 72±4h larvae carrying the recessive genes (*flr*³) and *multiple wing hair* (*mwh*) in their third chromosomes were used. The larvae were fed chronically at different concentrations (25, 50, 75, 100 and 200µg/mL) by taking into the nutrient medium containing NiFe₂O₄NP. The genotoxic effects of NiFe₂O₄NP were evaluated according to mutant trichomes resulting from genetic changes (mitotic recombination, deletion, point mutation, non-disjunction) development of the wing imaginal discs. Mutant clone evaluations were performed on the basis of small single spots, large single spots and twin spots classifications. The somatic mutation and recombination test showed that the NiFe₂O₄ nanoparticle had the highest concentration of genotoxic effect.

2019,75 Pages

Keywords: *Drosophila melanogaster*, genotoxic effect, nanotechnology, nanoparticle, somatic mutation and recombination test

TEŞEKKÜR

Canım Ailem;

Hayatımın tek gayesi olan biricik ailem; çalıőmalarım süresince benim moral ve motivasyonumu artırarak azmimin oluşmasında çok büyük katkıları olan eşim Rabiye, büyük oğlum Mehmet Said, kızım Elifsu ve ikiz oğullarım Yusuf ve Eymen NAS'a atfen hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitim danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve birikimlerinden faydalandığım fakültemizin değerli akademisyen ve öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Burhan NAS
Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	17
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	17
3.1.3. Kullanılan organizma.....	18
3.1.3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematığı.....	18
3.1.3.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in gelişim biyolojisi	19
3.1.3.3. Ergin sineklerde eşeysel farklılıklar	22
3.1.3.4. <i>Drosophila</i> stoklarının genetiksel özellikleri.....	23
3.2. Yöntem	25
3.2.1. NiFe ₂ O ₄ NP'nin morfolojik karakterizasyonu	25
3.2.1.1. Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) analizi.....	25
3.2.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji dağılım X-ışını spektrometre (EDX) analizi.....	26
3.2.1.3. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi.....	26
3.2.1.4. X-ışını kırınımı (XDR) analizi	27
3.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	27
3.2.2.1. <i>Drosophila</i> hatlarının kültürü	30
3.2.2.2. Çaprazlama için birey seçimi.....	30
3.2.2.3. NiFe ₂ O ₄ NP konsantrasyonlarının belirlenmesi	33
3.2.2.4. Deney gruplarına NiFe ₂ O ₄ NP'nin uygulanması	33
3.2.2.5. Ergin birey toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	33
3.2.2.6. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesi	34

3.2.2.7. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması	36
3.2.2.8. İstatistiksel analiz.....	36
4. BULGULAR	38
4.1. NiFe ₂ O ₄ Nanopartikülünün Karakterizasyonu	38
4.1.1. UV-Vis spektroskopisi.....	38
4.1.2. SEM ve EDX analizleri	39
4.1.3. FT-IR analizleri.....	40
4.1.4. XRD analizi sonuçları.....	41
4.2. NiFe ₂ O ₄ NP'nin LD ₅₀ ve Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Oranları.....	42
4.3. Distile Su, EMS ve NiFe ₂ O ₄ NP Uygulaması Sonucu Elde Edilen SMART Bulguları.....	43
4.3.1. Distile su ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması	43
4.3.2. NiFe ₂ O ₄ NP'nin genotoksik etkisinin araştırılması	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	75
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	75
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Nanometrik boyut ile biyolojik yapılarla mukayese edildiği ölçek.....	1
Şekil 1.2. NP'lerin sentezlenme yöntemleri.....	2
Şekil 1.3. Nano malzemelerin kullanım alanları.....	3
Şekil 1.4. NP aracılı ROS üretim mekanizmaları.....	7
Şekil 1.5. NP aracılı NP'lerin hücre içine alınma ve toksisite oluşum süreci.....	8
Şekil 1.6. NP'lerin genotoksik etki mekanizması.....	8
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam evreleri.....	20
Şekil 3.2. <i>Drosophila melanogaster</i> dişi ve erkek birey morfolojisi.....	22
Şekil 3.3. Üçüncü kromozom üzerindeki belirleyici genlerin diziliş gösterimi.....	23
Şekil 3.4. <i>flr³/TM3</i> , <i>Bd^S</i> bireylerindeki saf genotiplerin letal etkileri.....	24
Şekil 3.5. <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait kanat şekilleri.....	25
Şekil 3.6. <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait farklı klon türleri.....	29
Şekil 3.7. <i>D. melanogaster</i> 'de SMART uygulanmasının şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.8. Kanat trikomlarının görünümü.....	35
Şekil 4.1. NiFe ₂ O ₄ NP'lerinin UV-Vis spektrumu.....	39
Şekil 4.2. NiFe ₂ O ₄ NP'lerinin SEM görüntüleri.....	40
Şekil 4.3. NiFe ₂ O ₄ NP'lerinin FT-IR analizleri.....	41
Şekil 4.4. NiFe ₂ O ₄ NP'lerinin XRD görüntüleri.....	42
Şekil 4.5. Normal ve serrat kanat sektörleri.....	44
Şekil 4.6. Normal bireydeki kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	44
Şekil 4.7. <i>mwh/mwh</i> hattına ait kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.8. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.9. Büyük tek tip <i>mwh</i> klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	46
Şekil 4.10. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	46
Şekil 4.11. İkiz klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	47
Şekil 4.12. Kontrol grubu (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanat trikomlarında gözlenen klon tiplerine ait frekanslar.....	48
Şekil 4.13. Kontrol grubu (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	49
Şekil 4.14. NiFe ₂ O ₄ NP uygulanan (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	53
Şekil 4.15. NiFe ₂ O ₄ NP uygulanan (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	54

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. SMART uygulanmış bazı NP'ler.....	11
Tablo 3.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi	17
Tablo 3.2. Deneyleerde kullanılan alet ve cihazların listesi	17
Tablo 3.3. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerdendirilmesi.....	37
Tablo 4.1. NiFe ₂ O ₄ NP'nin <i>D. melanogaster</i> 'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisi.....	43
Tablo 4.2. Distile su ve EMS'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (<i>mwh/flr³</i>) ve serrat kanat (<i>mwh/TM3</i>) hatları üzerine etkileri	50
Tablo 4.3. NiFe ₂ O ₄ NP'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (<i>mwh/flr³</i>) ve serrat kanat (<i>mwh/TM3</i>) hatları üzerine etkileri	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
(i)	Önemsiz fark
°	Derece
♀	Dişi
♂	Erkek
C	Santigrat
cc	Santimetreküp (= mililitre)
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
Ha	Alternatif hipotez
Ho	Orijinal hipotez
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
X	Çaprazlama
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

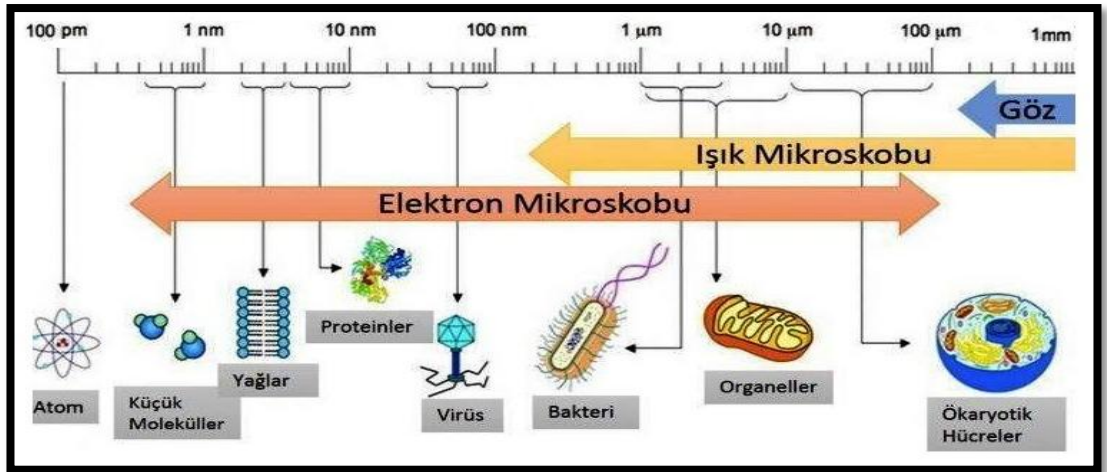
Kısaltmalar

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ANOVA	Varyans analizi
<i>Bd^s</i>	Beaded serrat
EDX	Enerji dağılım X-ışını spektrometre
EMS	Etil metansülfonat
Fe ₂ O ₃	Demir oksit (Hematit)
Fe ₂ O ₄	Demir oksit (Manyetit)
<i>flr³</i>	<i>Flare³</i> geni
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
ION	Iron oksit nanopartikül
LD ₅₀	Canlıların %50'sini öldüren letal doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
MNP	Manyetik (metal) nanopartikül
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı geni
NiFe ₂ O ₄	Nikel demir oksit
NM	Nanomalzeme
NP	Nanopartikül
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
SPSS	Statistical package for social sciences
<i>TM3</i>	Dengeleyici kromozom
UV-Vis	UV- görünür bölge spektroskopisi
XRD	X- ışını kırınımı

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji teriminin doğuşu, Richard Feynman'ın 1959 yılında yapmış olduğu bir konuşmadaki “küçük boyutlarda yapılabilecek çok şey var” ifadelerine istinat edilmiştir. 1981 yılında atomların görüntülerini doğrudan veren taramalı tünelleme mikroskobunun (STM) ve 1986 yılında atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) icadıyla biyolojik yapıların nano boyutlarda görüntülenip, incelenmesi mümkün olmuştur. Bu gelişimsel süreçlerle beraber, bilim adamlarının nanometre boyutlarında bilime ilgisini artmış, bilimsel çalışmalarla bilimsel bilgilerin daha detaylı incelenmesine, bilimin hızlı gelişmesine ve güncellenmesine katkı sağlamıştır. 21. yüzyılın başında ise şimdiye kadar üretilmemiş yeni nano yapıların atomsal ve moleküler düzeyde tasarlanarak üretilmesi dönemi başlamıştır (Lehn, 2002; Schmidt vd., 2003; Gupta, 2011).

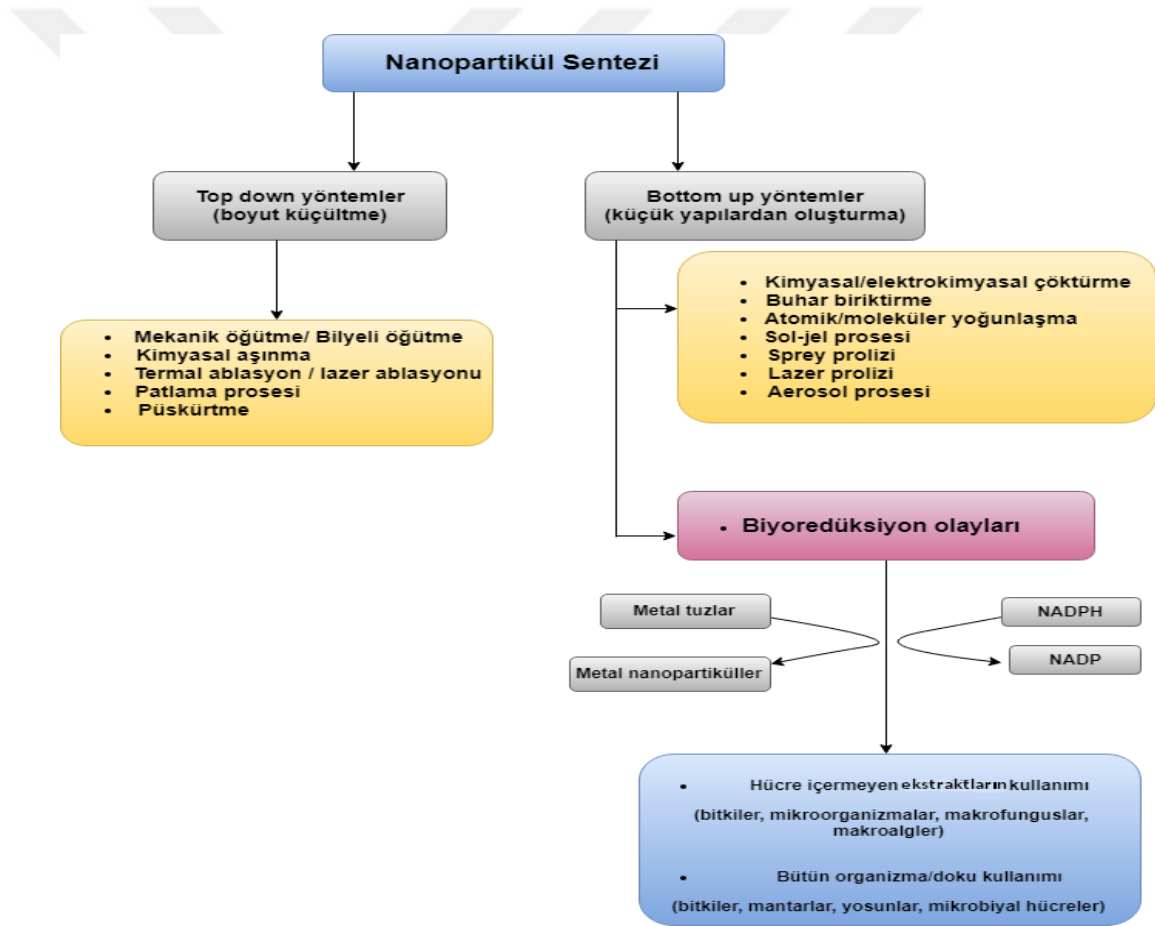
Nanoteknoloji, yapı taşları olarak molekül veya atomların kullanıldığı insan yapımı 1-100nm boyutundaki nano yapıların işlevsel olarak tasarlanıp üretilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Thrall, 2004; Kuzma ve Priest, 2010; Gupta, 2011; Syed vd., 2013). Nanometrik boyut atom ve molekül yapısını temsil etmektedir. Nanometrik boyut ile bazı biyolojik yapıların karşılaştırılması (Özdoğan, 2019) Şekil 1.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Nanometrik boyut ile biyolojik yapılarla mukayese edildiği ölçek

Yunanca “nannos” kelimesinden gelen nano kelimesi “küçük yaşlı adam veya cüce” demektir (Demir vd., 2011). Matematiksel bir ölçü birimi olarak kullanılan nanometre,

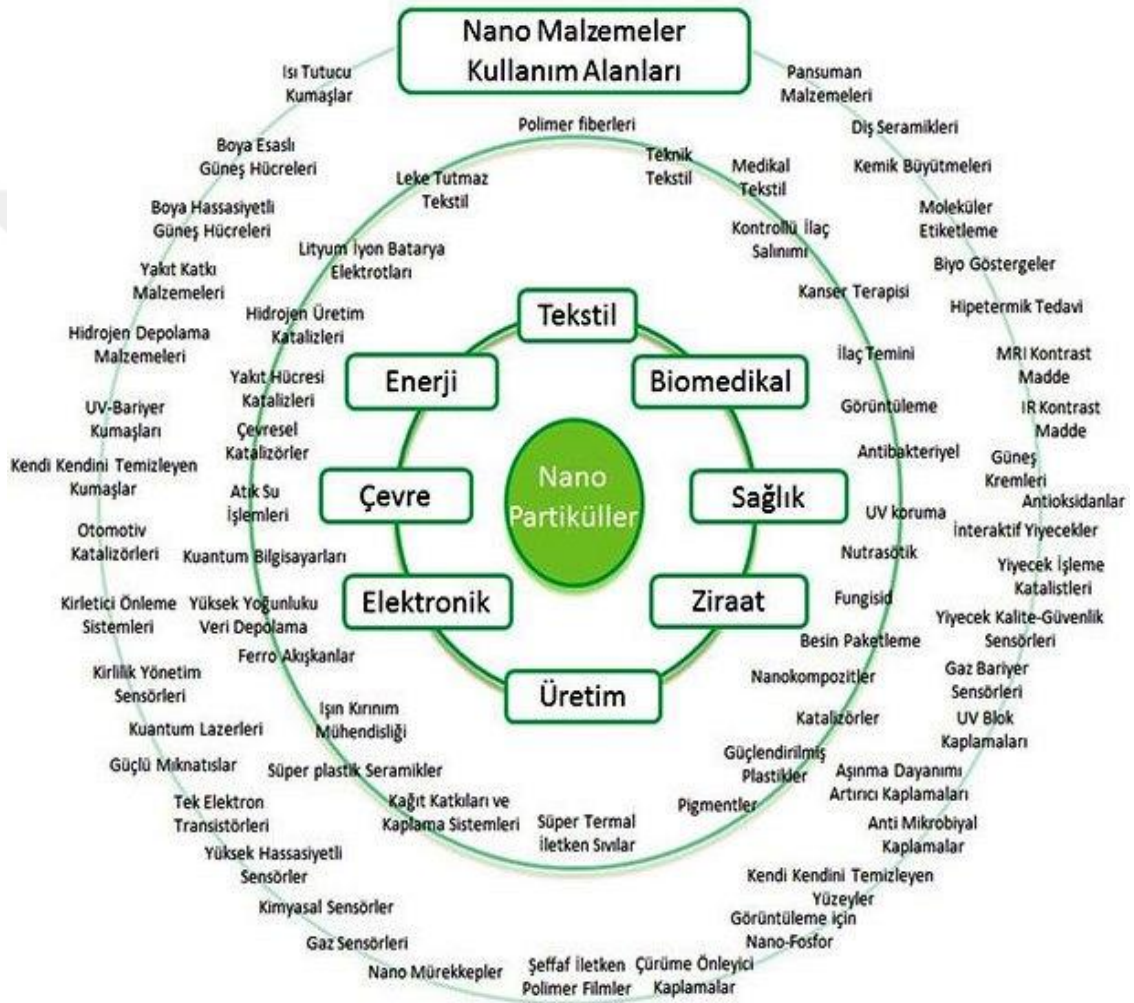
metrenin milyarda birine denk gelir. Nanoteknoloji ile 1-100nm boyutlarda elde edilen küçük yapılara nanopartikül (NP) denir. NP'leri partikül yapılarına, karakterizasyon özelliklerine ve üretim şekline göre bir birçok açıdan sınıflandırmak mümkündür. NP'ler, parçacık yapılarına göre inorganik NP, polimerik NP, lipozom, katı lipit NP, nanokristal, nanotüp ve dendrimer olmak üzere yedi gruba ayrılmaktadır (Kavaz, 2011). Karakterizasyon özelliklerine göre ise aglomerasyon derecesi, yoğunluk, şekil, boyut, tane boyut dağılımı, bileşim, porozite yüzey alanı, yüzey özellikleri, yüzey yükü, yüzey pürüzlülüğü ve kristal yapıya bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Entekno, 2019). NP'ler sentezlenme yöntemlerine göre sınıflandırılması (Erci ve Khodakovskaya, 2013) Şekil 1.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. NP'lerin sentezlenme yöntemleri

İnsanoğlunun dikkatini çekmeyi başaran nanoteknoloji yaklaşık 100 yıllık bir serüvene sahiptir. Günümüzde milyonlarca çeşit NP'ler ve nano yapılar elde edilmektedir. NP'ler, insanın yaşamını sürdürdüğü her alana girmeye devam etmekte ve NP'lerin

insan yaşamını olumlu veya olumsuz yönden etkilemesi de kaçınılmaz olmaktadır (Chen vd., 2006). Nanomalzemeler (NM) mikro yapılara göre asgari hata seviyeleri sunmakta ve eşsiz dayanıklılık güçleri ile hâlihazırdaki birçok endüstriyel süreç için devrimsel yenilikler getirmektedir. Bu sebeple nano malzemelerin tıp, biyoloji, mühendislik gibi pek çok alanda kullanımı yaygınlaşmıştır. Şekil 1.3'te gösterildiği gibi ve birçok alanda da kullanımının artacağı ön görülmektedir (Entekno, 2019).



Şekil 1.3. Nano malzemelerin kullanım alanları

Nanoteknoloji ile atomsal ve moleküler yapılarda yeni tasarımlarla beraber nanometaryallerin, cihazların ve sistemlerin değişime uğraması kaçınılmaz olmuştur. Son 20 yıl göz önüne alındığında nanoteknoloji ve nanoteknolojik ürünlerin üretilmesi ivmeli bir artış göstermektedir. Nanoteknolojik ürünlerin yaşamın her alanında kullanılır olması nanoteknolojinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Entekno, 2019).

Nanoteknolojinin gelişmesine paralel olarak önem kazanan NP'lerin doğa ve canlılar üzerindeki olumlu veya olumsuz etkileri olacaktır (Gök, 2007). İnsanoğlunun nanoteknolojik ürünlerin daha sık kullanılmasıyla beraber doğaya salınımının artması kaçınılmaz olacaktır. NP'lerin ve salınım artışının olası etkileri ise yapılan çalışmaların çelişkili sonuçlar vermesiyle insanoğlunu ve doğayı büyük bir risk beklemektedir. Ayrıca NP'lerin olası etkilerinin araştırılmasında kullanılan günümüzdeki teknik ve yöntemlerin de yetersiz kalışına birçok çalışmada değinilmiş ve NP'lerin doğa ve canlılar üzerindeki etki mekanizması tam olarak gösterilememiştir (Warheit ve Donner, 2010).

Ünlü düşünür Paracelsus "*Her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur; zehir ile ilacı ayıran dozdur.*" demiştir. Zehir bilimi anlamına gelen toksikoloji, canlılar üzerinde istenmeyen sonuçlar ortaya çıkaran, onların biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerini, canlı organizmada uğradığı değişimi ve etki mekanizmalarını olası risk faktörleri ile birlikte deneysel olarak inceleyen bir bilim dalıdır (Doğan, 2008). Toksikolojik çalışmalar, canlıların bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerini de incelemektedir. Bu bağlamda, multidisipliner bir bilim dalı olan toksikoloji, birçok bilim dalı ile yakından ilişkilidir (Vural, 2005).

Toksikolojinin alt dalı olan, NP'lerin DNA üzerindeki etkilerini inceleyen genotoksikoloji bilim dalının yanında yeni bilim olarak NP'lerin olası toksik etkisini araştıran Nanotoksikoloji doğmuştur (Handy vd., 2008).

NP'lerin etkileri henüz çok yeni olarak araştırılmaya başlanmış olmasına rağmen NP'lerin toksik etkili olduğunu gösteren pekçok literatür bilgisine rastlanmıştır (Ahamed vd., 2010; Demir vd., 2011-2013-2015; Vales vd., 2013; Reis vd., 2015).

NP'lerin toksik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, çeşitli canlılarda denenmiş ve değişik NP için de benzer sonuçların oluştuğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, gümüş NP'lerin çok düşük dozlarda bile toksik etkili olduğu ve gümüş NP'lerinin çevre için potansiyel tehlike teşkil edebileceği ortaya koyulmuştur (Gubbins vd., 2011).

Bir çalışmada ZnO ve TiO₂NP'lerinin ekotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucu *Pseudokirchneriella subcapitata* türü üzerinde, ZnONP'nin membran kararsızlığına

sebepe olduğu ve alg büyümesinin NP doz miktarındaki artış ile inhibe edildiği tespit edilmiştir. Toksikiteye serbest Zn^{2+} iyonunun neden olduğu ifade edilmiştir (Lee ve An, 2013). Pinheiro ve arkadaşları (2013), titanyum dioksit NP'lerinin (TiO_2NP) su piresi *Daphnia magna* ve su mercimeği *Lemna minor* üzerine olan olası toksik etkilerini incelemişlerdir. TiO_2NP 'ne maruz kalan *D. magna*'da önemli miktarda TiO_2NP birikimi ve yüksek TiO_2NP dozlarında ($>10mg/L$) yüksek oranda letalite gözlenmiştir. $25mg/L$ üzerindeki TiO_2NP 'ne maruz kalan *L. minor*'de ise morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Sonuç olarak TiO_2NP 'ne maruz kalan bireylerde, bu organizmaların fizyoloji ve popülasyon düzeylerini değiştirerek sucül ekosistemlerde risk oluşturabileceği ifade edilmiştir (Pinheiro vd., 2013).

Başka bir çalışmada AgNP'lerin *Lemna gibba*'da hücre canlılığı ve büyüme üzerindeki etkileri araştırılarak sucül sistemlerdeki AgNP birikiminin, büyüme inhibisyonuna ve yaprak sayısındaki azalma olarak potansiyel bir toksik kaynak olduğu ve su mercimeğinin canlılığı için tehlike oluşturduğu tespit edilmiştir (Oukarroum vd., 2013). Sucül başka bir bitki olan *Landoltia punctata* üzerinde bakır oksit CuONP'nün olası etkisini, bakır ile karşılaştırmış. $1mgL^{-1}$ CuONP varlığında bitkilerde klorofil sayısında önemli miktarlarda azalma olduğu görülmüştür. CuONP'ne maruz bırakılan bitki yaprağındaki Cu içeriğinin, aynı konsantrasyonlardaki bakıra maruz bırakılan bitki yapraklarındakine göre dört kat fazla olduğu, nano boyuttaki moleküllerin daha toksik olabileceği gözlemlenmiştir (Shi vd., 2011). Çinko oksit NP'lerin (ZnONP), bir midye türü olan *Mytilus galloprovincialis* üzerindeki fizyolojik etkileri araştırılmış. Midye boyutunun Zn konsantrasyonu ve birikimi ile değişiklik gösterdiği, 12 haftalık uygulamalardan sonra midyelerdeki solunum oranının ZnO konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Hayatta kalma oranının $2mgL^{-1}$ ZnO konsantrasyonunda önemli ölçüde azaldığı, ayrıca bu dozda ZnO'ya maruz kalan midyelerin kontrol grubundaki midyelere oranla %40 daha az büyüyüp geliştiği belirtilmiştir (Hanna vd., 2013).

Cyprinus carpio türü yavru sazanlarda, ZnONP'nün subakut toksisitesi ve birikiminin incelendiği başka bir çalışmada, 30 günlük yavru sazanlara $50mg/L$ ZnONP ve ZnO muamelesinden sonra dokularda önemli oranlarda birikim olabileceği, bu birikimin farklı dokularda dağılım gösterebileceği ve ZnONP'nün ZnO'dan daha fazla birikim

yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca 50mg/L ZnONP uygulamasında hücre içi oksidatif stresin daha yüksek olduğu, aynı konsantrasyondaki ZnO'dan daha ciddi histolojik değişikliğe neden olduğu tespit edilmiştir. ZnONP'nün toksik mekanizmasının artan hücre stresi ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Hao vd., 2013).

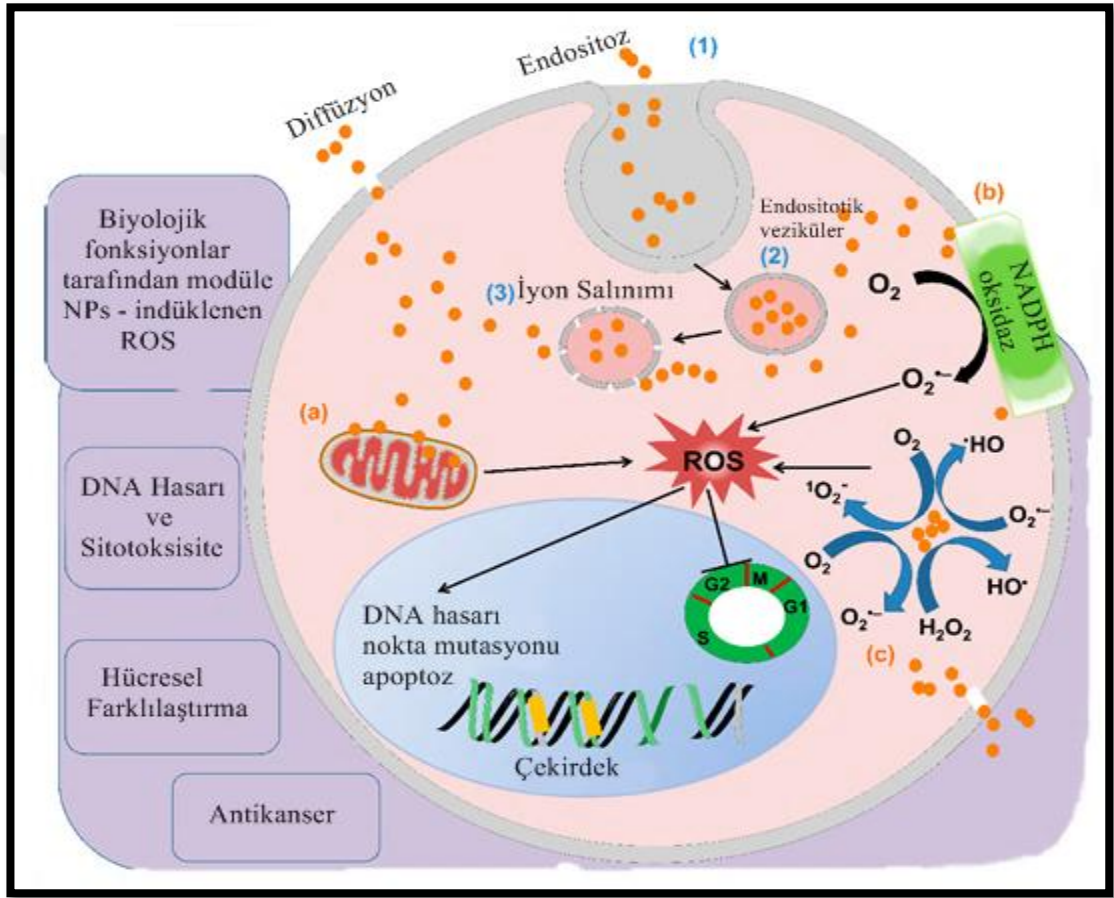
Farelere oral yolla verilen Cu elementinin nano boyutunun (23.5nm) mikropartiküler (17µm) boyutuna göre karaciğer, dalak ve böbrek gibi organlarda daha fazla hasara neden olduğu saptanmıştır (Chen vd., 2006).

Song vd., (2009) tarafından, yaşları 18-47 arasında değişen, öncesinde sağlık sorunu belirtisi olmayan, sigara kullanmamış, çeşitli hastanelerde takip edilen ve birbirine benzeyen klinik bulguları olan, benzer iş-mesleki maruziyeti anlatan kadın hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, hastalarda benzer klinik bulgularının çarpıntı, nefes darlığı ve nedeni bilinmeyen göğüs ağrıları olduğu saptanmıştır. Tanısal amaçla, kadın hastaların çalıştıkları fabrikadan malzemeler, kullandıkları boya hamurları, ortam ölçümleri ve havalandırmalarda bulunan toz numuneleri alınmış, numunelerde gaz kromatografik-spektrometrik analizleri sonucu poliakrilik esterler olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hastaların akciğer epitel hücreleri sitoplazmalarında da ortalama 30nm olan bu NP'lere rastlanmıştır. Çalışma sonucunda insanların uzun süreyle NP'lere maruz kalması akciğerde önemli tahribata neden olabileceği belirtilmiştir.

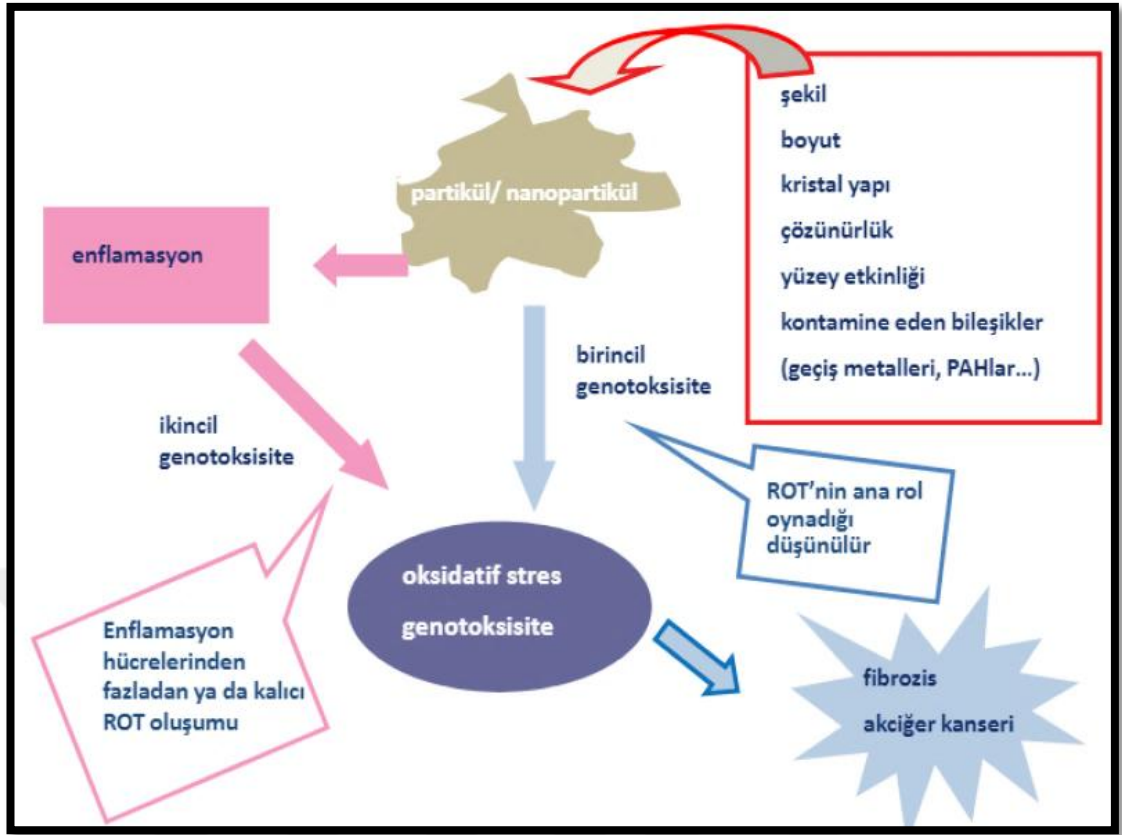
NP'lerin ciltteki etkilerinin incelendiği bir çalışmada da tek duvarlı karbon nanotübün *in vitro* olarak keratinosit hücrelerinde oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (Shvedova vd.,2003). Metal NP'lerden olan nano boyutundaki manganezin (Mn), santral sinir sisteminde birikerek Parkinson hastalığına yol açtığı, santral sinir sisteminde ROT ürünlerini ve dopamin tüketimini artırdığı bildirilmiştir (Olanow, 2004). Başka bir çalışmada ise NP'lerin insan umbilikal ve epitel hücrelerinde doğrudan sitotoksik etkiyle fizyolojik değişikliklere neden olduğu, hücre büyümesi fizyolojik olarak inhibe edebileceği saptanmıştır (Yamawaki ve Iwai, 2006).

NP'lerin neden olduğu toksisitenin tamamen anlaşılammış olmasına rağmen, temel ve olası mekanizma olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna bağlı toksik etkinin olduğu düşünülmektedir. NP'ler (1) endositozla hücreye alınır; (2) endositotik veziküller oluşur ve (3) parçacık iyonlarının hücreye salınması. NP'lerin ROS

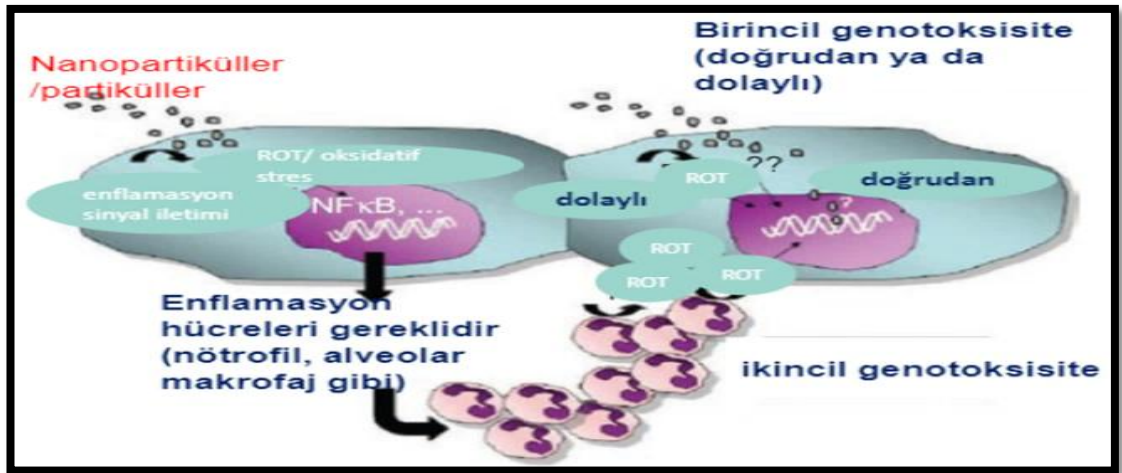
üretiminden sorumlu ana faktörler şunları içerir: (a) mitokondri ile etkileşim; (b) NADPH oksidaz ile etkileşim ve (c) fizikokimyasal özelliklerle (boyut, şekil, foto-reaktif özellikler ve yüzey kimyası) ilgili faktörler NP'lerin ROS üretiminden sorumlu olan ana faktörlerdir (Şekil 1.4). Bu faktörler ROS oluşumu, hücre zarı hasarı, DNA hasarı, hücre döngüsü durması, apoptoz gibi sonuçlarına yol açar (Ahmed vd., 2017). NP'lerin toksik etki mekanizmaları (Schins vd., 2002) Şekil 1.5- Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.4. NP aracılı ROS üretim mekanizmaları



Şekil 1.5. NP aracılı NP'lerin hücre içine alınma ve toksisite oluşum süreci



Şekil 1.6. NP'lerin genotoksik etki mekanizması

Birincil genotoksisite; Np'lerin doğrudan genomik DNA etkileşimi ya da ROT oluşturması. İkincil genotoksisite; fagositler yoluyla ROT oluşumu ve DNA hasarı (Stone vd., 2010).

Fiziksel, biyolojik ve kimyasal etkenler hücreleri farklı oranlarda etkileyerek toksisiteye yol açabilirler. Bir etkenin biyolojik davranışının bilinebilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir.

Sitotoksosite canlı bir hücredeki toksik etki oranı anlamına gelmektedir. Hücreye verilecek maddenin hücre içi toksik etkisini araştırmayı amaçlayan testlerdir. Sitotoksik etkisi olan maddelere maruz kalan hücreler otofaji, nekroz ve apoptoz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilir (Galluzzi vd., 2009). Yapılan sitotoksosite çalışmasının şekli ve yöntemi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki ölü hücre miktarının canlı hücre sayısına oranıdır (Riss vd., 2006). Bu testler üç ana grupta toplanmıştır.

Tetrazolyum tuzları ile yapılan testler; fazla sayıda maddeyi kısa zamanda kolayca inceleyebilmek için, mikropleytler ve bunlara uygun hale getirilen testlerin geliştirilmesiyle mümkün olmaktadır. Ekle- karıştır ve ölç kuramıyla, hem zamandan tasarruf edilmiş hem de uygulama kolaylığı sağlanmıştır (Weyermann vd., 2005).

Laktat dehidrogenaz (LDH) testi; hücre hayatta kalış oranlarının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem olan bu teknikte amaç hasarlı/ölmüş hücrelerden vasata salınan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin ortaya çıkarılması prensibine dayanmaktadır.

Lüminesans metodlar; canlı hücre sayısının Alamar mavisi ve diğer floresans, ATP biyölüminesans ve gerçek zamanlı (real time) biyölüminesans gibi farklı tekniklerle ölçüldüğü yöntemlerdir.

1970 yılından beri genotoksosite testleri kullanılmaktadır. Zaman içinde yeni teknikler eklenerek, günümüzde 200'den fazla test tekniği oluşturulmuştur. Prokaryotik ve ökaryotik sistemlere göre yaygın olarak kullanılan testler mevcuttur. (Cunny ve Hodgson, 2004; Çakır, 2004; Parlak vd., 2011).

Bakteriyel testlerden Ames, *E.coli*, Umu, SOS ve Mutotox testleri sık kullanılan prokaryotik testlerdendir.

Drosophila Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), Comet testi, Mikronükleus testi (MN), DNA tamir sentezi (UDS assay), Maya testleri

(*Saccharomyces*, *Neurospora* ve *Aspergillus*), Kök ucu testi, Kromozom aberasyon testi, Sperm aberasyon yöntemi, DNA alkalin unwinding assay, Kardeş kromatid değişimi (SCE assay) ve Alkali DNA elitiuon assay ise ökaryotik testler arasında yer almaktadır.

Genetik sistemler ile genotoksisitesi araştırılmak istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki, farklı canlı türlerini içeren çok çeşitli test yöntemleri ile araştırılmaktadır (Yüzbaşıoğlu vd., 2014). DNA ve kromozomal düzeyde olabilen genotoksisite testleri, *in vivo* veya *in vitro* olarak çalışılabilmektedir (Jena vd., 2001). Eşey veya somatik hücrelerde oluşan mutasyonları temel alan genotoksisite testleri ile yeni nesillerdeki kalıtsal hastalıklara neden olan, üreme yeteneğini olumsuz yönde etkileyen ya da somatik mutasyonlar ile karsinojenik etkili olan mutasyonlar bu test yöntemleriyle belirlenebilmektedir. Bu çalışmalarla belirlenen mutasyonlar, DNA iplikçisindeki kırılmalar ve çeşitli kromozom hataları, genotoksisitenin varlığını göstermektedir (Doğan, 2008). Moleküler düzeyde oluşan mutasyonların genotoksisite çalışmalarında, DNA’da oluşan hasarın direkt olarak belirlenebilmesi amacıyla yapılan Ames Testi, *Drosophila* (SMART) testi ve Comet testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromozomal düzeyde olan genotoksisite araştırmalarında ise mikronukleus (MN), kromozom aberasyonları (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) analiz yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurtoğlu, 2010).

DNA’da oluşan hasarın direkt olarak belirlenmesi amacıyla kullanılan testlerden biri olan Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), kanat benek testi ve göz benek testi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her iki test çeşidi de delesyonlar, nokta mutasyonları, mitotik rekombinasyon ve kromozom anomalilerinin belirlemede kullanılmaktadır. Kanatta mutasyona uğramış hücre hatlarının analizi, göz benek testlerindeki mutasyona uğramış hücre hatlarının belirlenmesine göre daha kolaydır (Graf vd., 1984). Birçok NP’nin genotoksisitesinin araştırılmasında SMART yöntemi kullanılmıştır. Bunlardan bazıları Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. SMART uygulanmış bazı NP'ler

NP	Boyut	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
Ag	10nm	50-100µg/mL	Pozitif	Ahamed vd., (2010)
Ag	<60nm	0,1-1-5-10mM	Pozitif	Demir vd.,(2011)
Al ₂ O ₃	16,7nm	0,1-1-5-10mM	Negatif	Demir vd.,(2013)
Co	<50nm	0,1-1-5-10mM	Pozitif	Vales vd., (2013)
CuO	<50nm	0,24-0,48-0,95mg/mL	Pozitif	Carmona vd. (2015a)
MWCNTs	10-40nm	50-250µg/mL	Negatif	Machado vd., (2013)
TiO ₂	<25nm	0,08-0,4-0,8-1,6mg/mL	Negatif	Carmona vd.(2015b)
ZnO	20nm	1,6-3,12-6,25-12,5mM	Pozitif	Reis vd., (2015)
ZrO ₂	6nm	0,1-1-5-10mM	Negatif	Demir vd.,(2013)

Amerika Çevre Koruma Kurumu (U.S. EPA), nanomateryalleri (NM) genel olarak metal bazlı NM'ler (geçiş metalleri ve metal oksitler), karbon bazlı NM'ler (grafen, tek ve çok duvarlı karbon nanotüpleri ve fulleren), nanokristaller, dendrimer (nano-ölçekli polimerler) ve kadmiyum kuantum zerrecikleri şeklinde sınıflandırmaktadır (Dreher, 2004). Bu bağlamda, tez çalışmasında, bir metal oksit olan NiFe₂O₄NP'nin (30nm) olası genotoksik etkileri SMART yöntemi ile araştırılmıştır. Genotoksisite çalışmalarında model bir organizma olan *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde NiFe₂O₄NP'nin (30nm) sebep olduğu nokta kromozom anormaliği, delesyon, mutasyon ve mitotik rekombinasyon oranlarının tespit ve analizi ile DNA üzerindeki mutajenik etkisinin olup olmadığını belirlemiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Demir bazlı metal oksit NP'lerin ve kompozitlerinin toksisite, sitotoksisite ve genotoksisitesi ile ilgili literatür çalışmaları kronolojik sıraya göre verilmiştir.

İnsan dermal fibroblastlarında DMSA kaplı Fe₂O₃NP'lerinin (6nm) genotoksisitesinin Comet testiyle araştırıldığı çalışmada herhangi bir genotoksisite gözlemlenmemiştir (Auffan vd., 2006). Demir bazlı NP'lerin redoks durumu ile *Escherichia coli*'de oluşturduğu sitotoksik etki arasındaki ilişkinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise oluşan sitotoksitenin indirgenmiş demir türevleriyle (Fe^{II} ve/veya Fe⁰) oksijen etkileşimi ile reaktif oksijen türevleri oluşumuna veya iyon taşıma zincirinin bozulmasına neden olabileceği tespit edilmiştir (Auffan vd., 2008).

İnsan akciğer A549 epitel hattında Comet ve bakteriyel enzim testleri ile CuZnFe₂O₄NP (10-100nm) toksisitesinin araştırıldığı çalışmada her iki deneyde de genotoksisiteye rastlandığı (Karlsson vd., 2008), aynı hücre hattında aynı testlerle birçok metal oksitin toksisitesi incelendiğinde 20-80µg/mL konsantrasyonlar arasında Fe₂O₃ ve Fe₃O₄NP'lerinin (20-60nm) sitotoksisite oluşturduğu fakat genotoksisite göstermediği tespit edilmiştir (Karlsson vd., 2009).

Koloni oluşturma ve hücre canlılığı üzerine HeLa hücreleriyle yapılan çalışmada, Fe₂O₄NP'lerinin (20-30nm) biyoyumlu olduğu, ZnFe₂O₄NP (15-20nm) ve NiFe₂O₄NP'lerin (20-30nm), düşük konsantrasyonlarda toksik olmamasına rağmen, 100mg/mL'lik konsantrasyonda bu NP'lere maruz kalan HeLa hücrelerinde, sitotoksik etkilerin oluştuğu tespit edilmiştir (Tomitaka vd., 2009).

Bu çalışmaların yanı sıra, insan beyin, kalp ve böbrek hücreleriyle yapılan çalışmalarla Fe₂O₃NP'lerinin (20-100nm) biyoyumlu olup çok düşük toksisitesine sahip olması sebebiyle metal NP kaplamalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir (Mahmoudi vd., 2009).

Hematolojik malignitelerin tedavisinde daunorubisin ile birlikte uygulanan manyetik Fe₃O₄NP'lerin (545nm) Kunming fare kemiği iliği hücrelerinde hemoliz, mikronükleus ve akut toksisite testleri yapılarak Fe₃O₄NP'lerin sitotoksik ve genotoksik olmadığı ve iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmalara istinaden

Fe₃O₄NP'lerin hedeflenmiş tümör tedavisi için kemoterapötikler yerine kullanılabilmesine de değinilmiştir (Wu vd., 2010).

Potansiyel çok yönlü bir ilaç dağıtım sistemi olarak tasarlanan manyetik albümin nanosferinin (γ -Fe₂O₃) (73±3nm) ön biyouyumluluğu, dişi *Swiss mouse* kemik iliği hücrelerindeki eritrositlerde MN testi ile araştırılması sonucu hiçbir durumda MN indüksiyonu gözlemlenmemiştir (Estevanato vd., 2011).

Fe, γ -Fe₂O₃NP'lerinin *Escherichia coli* genomu üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışma sonucu transmisyon elektronik mikroskopi (TEM) ve akış sitometrisi (FCM) analizi, metal nanopartiküllerin (MNP) hücrelerin dışında ve içlerinde absorpsiyon ve membran içselleşmesinin meydana geldiğini sürekli olarak göstermiştir. Hem artan Fe³⁺ iyonu hem de MNP'lerin alımı Fe'lerin protein yapılarına ve DNA iplikleri ile bağlanmasını kolaylaştırmış ve bu da *E.coli*'de mutasyon sıklığını artırmıştır (He vd., 2011).

Syrian hamster embriyo hücrelerinde nano ve mikro boyutlardaki titanyum dioksit ve demir oksit (Fe₂O₄, 27±8nm-156±82µm - Fe₂O₃, 35±14nm- 147±48µm) parçacıklarının genotoksisitesinin araştırılmıştır. Çalışmada, nano ve mikro boyutlu demir oksit NP'lerinin Comet testinde DNA hasarında önemli bir artış saptanmadığı, MN ile test edilen numunelerin hiçbiri, 24 saat muameleden sonra önemli miktarda MN oluşumu göstermediği anlaşılmıştır (Guichard vd., 2012).

İnsan lenfoblastoid MCL5 hücrelerinde, dekstran kaplanmamış g-Fe₂O₃NP ve dekstran kaplı g-Fe₂O₃NP'lerinin MN test yöntemleriyle genotoksisitesinin araştırıldığı çalışmada, sadece dekstran kaplı g-Fe₂O₃NP'nin MN frekansında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Singh vd., 2012). Fe₂O₃ (29.75±1.87nm - 2.13±4.15µm) akut oral tedaviden sonra sıçanlarda nano ve mikro boyutlu demir oksidin genotoksisite ve doku dağılımının karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmada, *Wistar rat* lökositlerinde Comet testi, *Wistar rat*'ın PBL ve kemik iliği hücrelerinde mikronükleus ve kromozomal aberasyon testleri yapılmıştır. Tüm yapılan çalışmalarda konsantrasyonların biyouyumlu olduğu, genotoksisiteye rastlanmadığı belirtilmiştir (Singh vd., 2013).

L-glutamik asit kaplı demir oksit (Fe_2O_3 -15nm) NP'lerinin sitotoksosite ve genotoksitesinin değerlendirildiği çalışmada, *Chinese hamster* akciğer hücrelerinde Comet ve MN testleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda anlamlı bir genotoksik cevap gözlemlenmemiştir (Zhang vd., 2012).

İnsan vücudu epitel (A431) ve akciğer epitel (A549) hücre hatlarında demir oksit (Fe_2O_4 - 24,83nm ve 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nano parçacık kaynaklı oksidatif stres ve genotoksitenin Comet testiyle yapılan araştırma sonucu A431 ve A549 hücre hatlarında artan ROS ile pozitif orantılı olarak DNA hasarı gözlemlenmiştir (Ahamed vd., 2013). Benzer çalışmada, insan akciğer alveoller epitel (A549) hücrelerinde demir oksit NP'lerinin (Fe_3O_4 , 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sentezi, karakterizasyonu ve toksikolojik değerlendirilmesi yapılmış ve çalışma sonucu; Fe_3O_4 -NP'lerin sitotoksiteyi indüklediği, LPO ve ROS üretimindeki artış GSH seviyesindeki düşüş ile doğrulanmıştır (Dwivedi vd., 2014).

31 çeşit NP'nin, erken yaşam evrelerinde ve yetişkin zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki teratojenik etkisi karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Çalışmada kullanılan maddelerden bakır ve gümüş NP'lerinin teratojenik etki gösterdiği, diğer NiFe_2O_3 , Fe_2O_3 ve NiONP'lerin (>50nm) içice bulunduğu 29 çeşit NP'de ise herhangi toksisiteye rastlanmadığı belirtilmiştir (Kovrižnych vd., 2013).

İnsan akciğer A549 epitel hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığında tetrazolyum (MTT), nötral kırmızı alım ve LDH testleri sonucunda sitotoksosite ve oksidatif strese neden olduğunu belirtilmiştir (Ahamed vd., 2011). NiFe_2O_4 NP'nin (21nm) 5- 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığında artan doza bağlı olarak HepG2 ve MCF-7 hücre hatlarında tümör baskılayıcı p53 ve apoptotik genler bax, CASP3 ve CASP9 için mRNA'nın, apoptotik enzimlerin seviyesinin artması ile sitotoksiteye neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucu MCF-7 hücre hatlarının HepG2 hücre hatlarına göre NP'lere daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Ahamed vd., 2015).

Dekstran kaplı demir oksit NP'lerinin sıçanlarda ki *in vivo* gözlemleri sırasında tolere edilebilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada, sıçan karaciğer ve böbrek hücrelerinde

1kg/mL FeONp'nin (7,5nm) herhangi toksisitesine rastlanmadığı vurgulanmıştır (Popa vd., 2016).

İnsan lenfositleri üzerinde Co_3O_4 , Fe_2O_3 , SiO_2 ve $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$ 'lerin (20nm, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) karşılaştırmalı sitotoksik ve genotoksik etkisinin *in vitro* araştırıldığı çalışma sonucunda oksidatif stresin oluşumu, reaktif oksijen türlerinin indüklenmesi, lipid peroksidasyonu ve katalaz tükenmesi, düşük glutation ve süperoksit dismutaz ile kanıtlanmıştır. Antioksidan seviyesindeki değişim, insan lenfositlerinde DNA hasarına ve kromozomal bozulma ile sitotoksitenin genotoksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (Rajiv vd., 2016).

$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ 'nin (<50nm, <100nm ve iyonik; 1-10mM) muhtemel genotoksik etkisi *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve Allium test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ 'nin <50nm boyutunun <100nm boyutu ve iyonik formuna göre genotoksisiteyi indüklediği gözlenerek NP ve iyonik formu kıyaslandığında küçük boyutlu ve geniş yüzeye sahip olan maddelerin daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır (Kaygısız, 2016).

Kanser teşhis, hedefleme ve tedavi için çift hedefe özgü ilaç iletimi ve MRG için folik asit (FA) ile konjuge süperparamanyetik demir oksit NP'leri (FA-SPION) ve kanser kemoterapisinde kullanılan Doksorubisin (DOX) ilacı ile yüklenilerek oluşturulan DOX@FA-SPION'leri, çıplak farelerde kuyruk intravenöz enjeksiyonuna rağmen ksenograft MCF-7 meme tümörü ile test edilmiş ve tümör büyümesini daha iyi inhibe ettiği vurgulanmıştır. Ayrıca DOX@FA-SPION'lerin, farelerin karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularındaki 35 günlük tedaviden sonra önemli bir toksisite göstermemesinden dolayı kanser tedavisi için yüksek ilaç dağıtım nanoplatformu olduğu belirtilmiştir (Huang vd.,2017).

Fonksiyonel manyetik rutenyum (II) polipiridin kompleks çekirdek-kabuk ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2, [\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$) nanokompozitinin sentezi, karakterizasyonu, hücresel alım ve sitotoksitesi ile ilgili yapılan çalışmada erken teşhis ve lokal teslim yoluyla teşhis ile tedavilerde umut vadeden kompozitin B16-F10 hücre hatlarında biyouyumlu olduğu ve sitotoksiteyi minimize ederek potansiyel biyomedikal olduğu belirtilmiştir (Kandibanda vd., 2018).

Amiri vd., (2018)'nin NiFe₂O₄NP ile yaptıkları bir araştırmada NP'lerin hücrenel ve moleküler düzeyde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, insan primer glioblastomu (U87) ve insan nöroblastomu (SH-SY5Y) hücreleri kullanılmıştır. Bu alışma sonucunda NiFe₂O₄NP'lerin doza bağlı sitotoksite gösterdiği ancak bu toksisiteye bağlı olarak SH- SY5Y hücreleri letalitesinin U87 hücre hattına oranla daha fazla olduğunu gösterilmiştir. Her üç prostat kanseri hücre hattında doza bağımlı antiproliferatif etkiler gösterdiği belirtilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal madde	Firma
Nikel demir oksit nanopartikülü	Ege Nanotek Kimya Sanayi Ltd. Şti.
Etil metansülfonat	Sigma M0880
Dietyl eter	Sigma 60-29-7
Entellan	Merck 3822 00 00
Etil alkol	Sigma 52-50-0
Propiyonik asit	Sigma 79-09-4
<i>Drosophila</i> Instant Medium	Carolina Biological Supply Company, Formula 4-24

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalarda Tablo 3.2.'de verilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Tablo 3.2. Deneyleerde kullanılan alet ve cihazların listesi

Cihaz adı	Marka-model
Hassas terazi	Axis AGN 220
Manyetik karıştırıcı	Wisestir MSH-20A
Buzdolabı (derin dondurucu)	Arçelik 8820 SBS NF
Etüv	Wisecube
Binoküler mikroskop	Leica DM 500
Stereo mikroskop	Leica EZ4
Sterilizasyon cihazı	Thermomac SDO30
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex
Taramalı elektron mikroskopu	FEI-Quanta FEG 450

Tablo 3.2'nin devamı

Cihaz adı	Marka-model
FT-IR spektrometre	Thermo Scientific, Nicolet 6700
X-ışını difraksiyon spektroskopisi	Panalytical, Empyrean

3.1.3. Kullanılan organizma

Hayvanlar âleminin Insecta sınıfına dâhil olan *Drosophila*, Diptera takımının *Drosophilidae* (sirke sinekleri) familyası içerisinde yer alır. Larvaları özellikle ekşiye meyveler üzerinde geliştiği için meyve sinekleri olarak da adlandırılan bu familya, genetiksel çalışmalarda deney hayvanı olarak kullanılan *Drosophila melanogaster*'i de içeren pek çok türü kapsamaktadır (Wheeler, 1981).

3.1.3.1. *Drosophila melanogaster*'in sistematığı

Phylum (= Şube): *Arthropoda* (= Eklem bacaklılar).

Subphylum (= Alt Şube): *Mandibulata-Antennata*.

Classis (= Sınıf): *Insecta-Hexapoda* (= Böcekler- Altı bacaklılar).

Subclassis (= Alt Sınıf): *Pterygota* (= Kanatlı böcekler).

Superordo (= Üst Takım): *Mecopteroidea-Panorpoidea* (= Uzun kanatlılar).

Ordo (= Takım): *Diptera*.

Subordo (= Alt Takım): *Brachycera* (= Sinekler- Kısa antenliler).

Familia (= Familya): *Drosophilidae* (= Sirke sinekleri- Meyve sinekleri).

Genus (= Cins): *Drosophila*.

Species (= Tür): *Drosophila melanogaster*.

Drosophila'nın ökaryotik bir organizma olması, laboratuvar koşullarında küçük bir habitatta yaşayabilecek büyüklükte olması, jenerasyon süresinin 25°C'de yaklaşık 9-11 gün gibi kısa bir sürede olması, çok sayıda yavru döl meydana getirebilmesi, bakımının kolay ve ekonomik olması, az sayıda kromozoma sahip olması (X/Y çiftinden biri ve üç

otozom), biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemlerinin memelilerin enzim sistemleriyle büyük benzerlik göstermesi ve ökaryotik bir canlıda *in vivo* çalışma imkânı vermesi genotoksisite testlerinde bu canlının çok tercih edilmesinin başlıca sebepleri arasında sıralanabilmektedir (Valencia vd., 1984; Graf vd., 1984; Falakalı, 1990). Ayrıca, *Drosophila* ile çalışmak için diğer çalışmalarda kullanılan omurgalı canlılar için alınması gerekli olan etik kurul izinlerine ihtiyaç duyulmamasıdır. Bu bir yandan bilim insanları için önemli bir kolaylık sağlarken diğer yandan da hayvan araştırma prensiplerinden olan 3R kuralının (Replacement; yerine koyma, Refinement; koşulları iyileştirme ve Reduction; azaltma) uygulanmasına yardımcı olmaktadır (Flecknell, 2002; Jennings, 2011). Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila*'nın genetik anlamda insan ile büyük benzerliği, örneğin hastalık genleri bakımından %75 olması sağlıklı bir model sistem ile çalışma olanağı sunmaktadır. Bunların arasında gelişimsel, nörolojik, kanser, kardiyovasküler, metabolizma ve depolama hastalıkları ile görsel, işitsel ve immün sistem fonksiyonlarının genetik temelleri sayılabilir (Schneider, 2000; Bernards ve Hariharan, 2001; Bier, 2005; Marsh ve Thompson, 2006; Lloyd ve Taylor, 2010).

3.1.3.2. *Drosophila melanogaster*'in gelişim biyolojisi

Drosophila melanogaster gelişimine göre, tam metamorfozlu olan holometabol böcekler grubuna girer. *Drosophila* sineklerinin döllenme ve zigot oluşumunun ardından embriyonik gelişim ve diğer hayat evreleri süre bakımından ortam sıcaklığına bağlıdır 25°C olan optimum büyüme sıcaklık ortamında ortalama 10-15 günde ergin duruma

geçerler

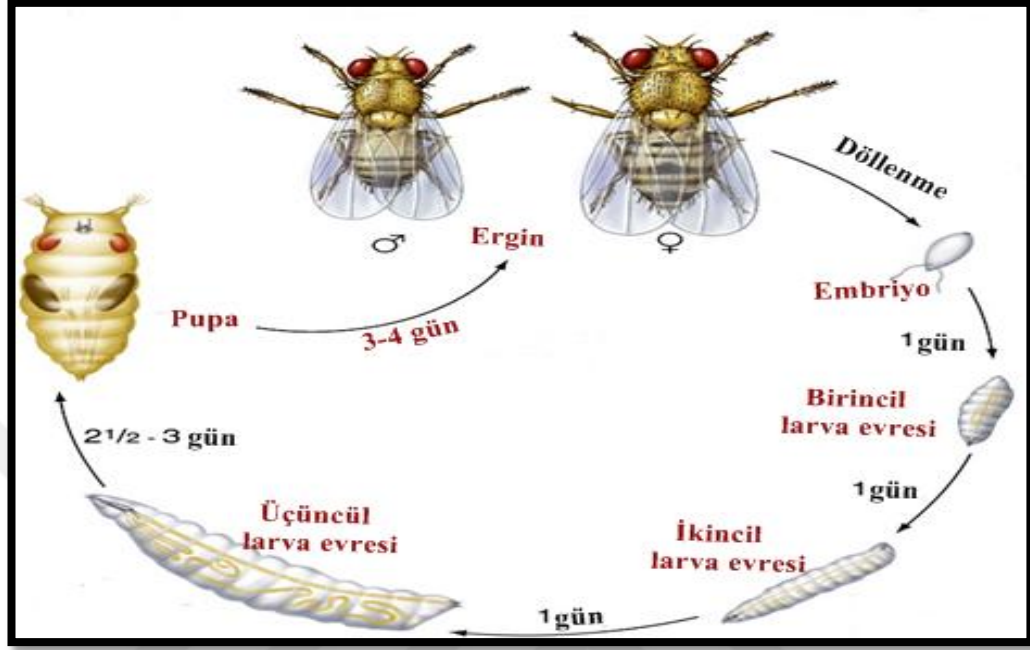
(http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Drosophila_melanogaster/)

(Şekil 3.1).

Metamorfoz süreleri;

- Embriyonik gelişim 1 gün
- Birinci larval instar (L1) 1 gün
- İkinci larval instar (L2) 1 gün
- Üçüncü larval instar (L3) 2 gün
- Prepupa 4 saat

- Pupa 4,5 gün
- Ergin 40-50 gün



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam evreleri

Erkek bireyler pupal evreden çıktıktan kısa bir süre sonra eşeyssel olarak fertil ve olgun duruma geçerler. Dişilerin olgunlaşması soylara bağlı olarak 6-12 saat arasında değişir. Dişi birey eşeyssel olgunluğa eriştiği zaman birçok erkek sinekle eşleşebilir. Sperm, dişi tarafından karın kısmında depo edilir ve kısa bir zaman sonra yumurtalar için kullanılır. Her ne kadar ergin sineklerin ömrü 25°C'de ortalama 40-50 gün arası ise de bazı bireyler 80-90 güne kadar yaşayabilirler. En fazla 10 günlük genç sinekler çaprazlama çalışmalarında kullanılır. Çünkü sineklerin yaş ile beraber fertiliteleri düşer. Standart koşullar altında (25°C, %60 kısmi nem) yumurtadan tam ergin bireyin gelişimi yaklaşık 10 günü bulur. Düşük sıcaklıklarda yaşam döngüsü süresi de uzar; 23,5°C'de 14 gün, 18°C'de 21 gün olur. Kültürlerin 18°C'den daha küçük sıcaklıklarda bulunması metabolizmayı yavaşlatır ve bu da kültürün devamlı olarak yeni besiyerlerine aktarım oranını azaltır. Sıcaklığın artmasıyla gelişim hızlanır. Fakat 29-30°C arasında çarpıcı olarak pupal oluşum artışı gözlenir ve birçok soyda 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda dişiler steril hale gelirler yani yumurta üretmez, kısırlaşırlar. Ayrıca sıcaklık artışı

çeşitli bakteri, mantar gibi parazit organizmaların gelişmesine neden olduğundan sinek kültürlerinin kullanılamaz hale gelmesine neden olur.

Drosophila yumurtaları oval şekilli, yaklaşık 0,2mm çapında ve 0,5mm uzunluğundadır. Yumurtaların dorsal tarafı ventral tarafına göre daha yassıdır. Dorsal tarafın anterior ucunda iki filament bulunmaktadır. Bu filamentler yumurtanın yumuşak besi ortamına batmasını engeller ve bu sayede oksijen alınımı sağlanır. Yumurta koryon zarı ile korunmaktadır. Yumurtaları karnında depo eden dişiler diğer dişilere göre daha şişkin görünürler. Bu durumdaki dişiler erkek içermeyen besi kültürüne aktarırlarsa döllenmemiş yumurtaları taşıyan virjin dişiler elde edilir. Erkek sineklerin testislerinde, diploid spermatogonialardan haploid spermler üretilir. Spermilerin boyu 1,7-1,8µm kadardır. Kopulasyon sırasında, spermier dişinin uterusuna aktarırlar. Aktarılan sperm burada günlerce canlı kalabilir. Yumurtalar uterusda döllenir. Döllenmede tek bir sperm mikropil tarafından yumurtaya girer (monospermi). Dişi bireyler, yumurtalarını ya döllenmenin ardından bırakır ya da embriyonik gelişmenin ilk dönemleri uterusda geçer (Şekil 3.1).

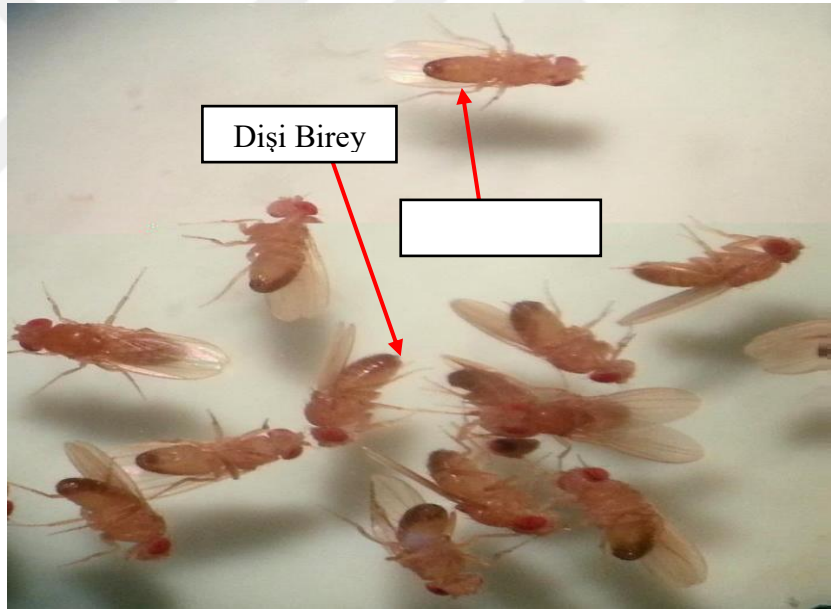
Embriyonik gelişimden yaklaşık 1 gün sonra yumurtadan çıkan larvalar, besiyerinin yüzeyine çıkarlar. Larval gelişim sırasında temel besin maddeleri bira mayası hücreleridir. 1 gün sonra ilk deri değişimi gerçekleşir. Bu değişim larvanın birinci instar (L1) döneminden ikinci instar (L2) dönemine geçiştir. L2 dönemindeki larva, 1 gün sonra ikinci deri değişimi ile üçüncü instar döneme (L3) geçer. L3 larva dönemi boyunca 2 gün boyunca beslenir ve hızla büyürler. Yaşlı larvalar besiyerinde beslenirken gezerler ve besiyeri içinde tünel açmış işçiler gibi görünürler. Larvalar kültür şişesinin etrafında ve besiyeri içinde çıplak gözle rahat görülebilirler (Şekil 3.1).

L3 döneminin sonunda, larvalar besiyerinden ayrılarak gelişimlerini tamamlamak için şişenin içinde bir yere tırmanarak pupaya girerler. Pupalarda başta beyazdır, sonra iki saat içinde koyu sarı, en sonunda da kahverengi olurlar. Beslenmenin olmadığı bu pupa evresi hareketsiz geçer. Pupal periyotta bir erginin organları ve vücut formuna sahip bir bireyin gelişmesi için gerekli tüm dönüşümler (metamorfoz) gerçekleşir. Bu gelişme 20°C'de 6 gün, 25°C'de 4 gün kadar sürer (Şekil 3.1).

Pupa içinde gelişimini tamamlayan ergin sinekler pupa kılıfının anterior ucunu (operkulum) delerek dışarı çıkarlar. Yeni çıkan ergin bireyler başta açık renkli ve uzun vücut yapısındadır. Fakat birkaç saat içinde renkleri koyulaşır. Kanatlar ve vücudun diğer kısımları başlangıçta yumuşak olup, oksijene maruz kaldıklarında birkaç saat içinde sertleşir. Böylece başlangıçtaki kırışık kanatlar açılır ve normal ergin birey görünümüne ulaşırlar (Şekil 3.1).

3.1.3.3. Ergin sineklerde eşeysel farklılıklar

Genetik çaprazlamalar için ergin dişi ve erkek sineklerin birbirlerine karıştırılmadan ayrılması çok önemlidir (Çalışkan ve Kocaman 2002). Dişi ve erkek bireyler arasında birçok morfolojik farklılıklar var ise de bunlardan yalnız birkaçı eşey farklılıklarını belirlemek için güvenilirdir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Drosophila melanogaster* dişi ve erkek birey morfolojisi

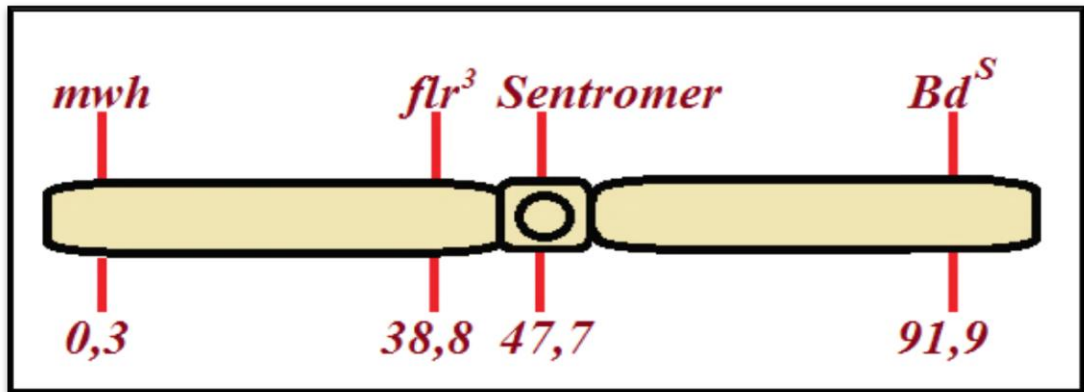
Ergin sinekler stereo mikroskop altında incelendiklerinde, erkek bireylerin birinci çift bacaklarının tarsus segmentinin iç tarafında siyah ve kalın bir seri kıldan meydana gelmiş “eşey tarağı” (sex comb) gözlenir. Dişilerde kesinlikle bu yapı bulunmaz. Bundan dolayı deneysel çaprazlamalar için erkek ve dişi bireyleri seçerken bu özelliğin kullanılması güvenilir olmaktadır.

Cinsiyete göre genital organın dış yapısı birbirinden farklıdır. Fakat bu farklılıklar mikroskopta 25 kat büyültme sonucu daha kolay gözlenir. Genel olarak erkeklerin genital organı dişilerinkine göre daha koyu yapıya sahiptir. Erkeklerin karın bölgesinde 5, dişilerde ise 7 abdomen segmenti bulunur. Erkek sineklerin son segmentlerde güçlü bir şekilde pigment birikimi ile son abdomen kısmı siyahtır, dişilerde ise abdomen segmentleri açık ve koyu bantlar halinde uç kısma kadar uzanır (Şekil 3.2). Bu özellikler, pupadan yeni çıkmış bireylerin pigmentasyonu tam gelişmediğinden, eşey ayırımı için uygun görülmemektedir.

Erkek sineklerin abdomen ucu kesik gibi küttür oysa dişilerinki uzun ve sivridir. Ayrıca dişilerin yaşlanması ve devamlı yumurta üretiminden dolayı abdomenleri geniş görülür. Genel olarak dişiler erkeklere göre daha ince ve uzundur. Vücut büyüklüğü larval dönem boyunca beslenme durumlarına göre değişebildiğinden ayırıcı özellikler değildir. Erkek bireylerin kanatları dişilere oranla daha kısadır. Bu özellik de eşey ayırımı için iyi bir morfolojik farklılık değildir.

3.1.3.4. *Drosophila* stoklarının genetiksel özellikleri

Çalışmada kullanılan normal metabolik aktiviteye sahip stoklar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde ideal yaşama koşulları olan 25°C'de % 60 bağıl nem ortamının sağlandığı insekteryumda standart besin ortamında kültüre alınarak genetik yönden homojen olarak yaşatılmaktadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için üçüncü kromozomlar üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanılmıştır (Şekil 3.3).

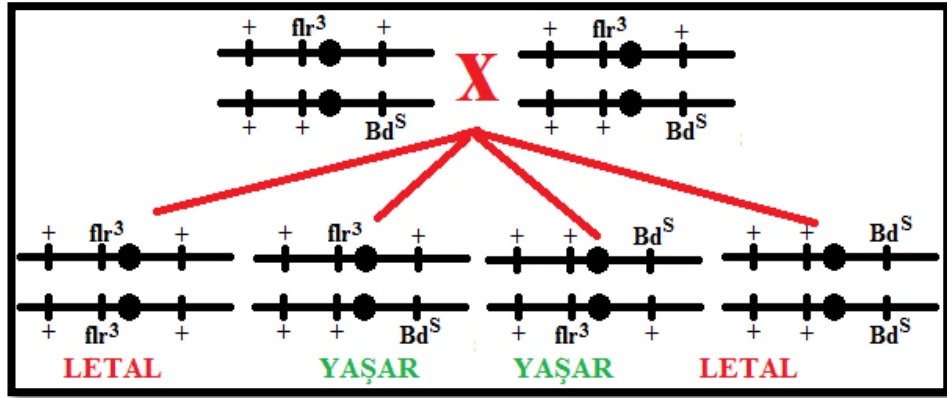


Şekil 3.3. Üçüncü kromozom üzerindeki belirleyici genlerin diziliş gösterimi

Stokların genetik yapısı şöyledir;

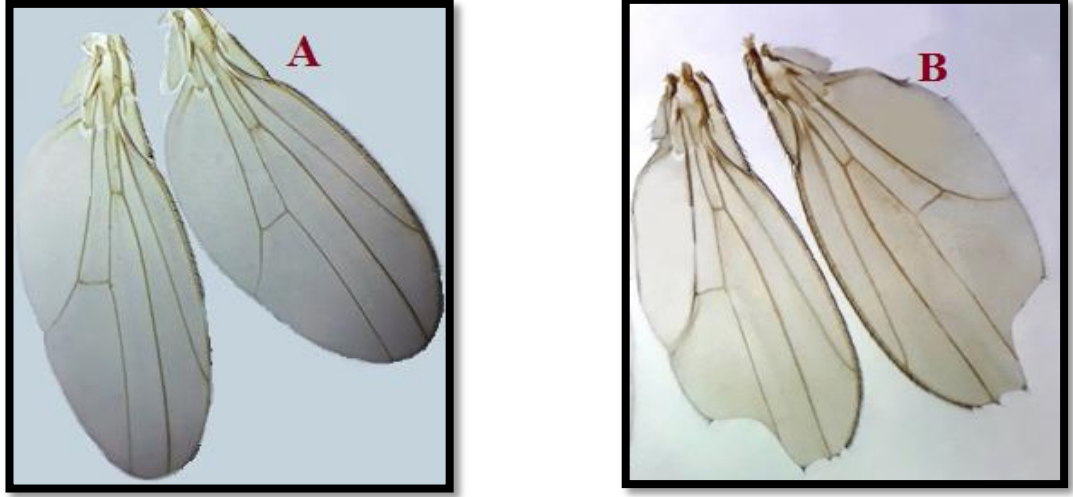
mwh/mwh: Bu mutant soy *mwh* (çoklu kanat kılı) mutasyonunu taşımakta ve üçüncü kromozomun sol kolunun uca yakın bölümünde bulunan resesif bir mutasyondur. Homozigot *mwh* soyu olarak yaşatılabilir ve kanat hücrelerinde hücre başına bir kanat kılı (trikom) olması gerekirken çoklu yani üç veya daha fazla kanat kılı oluşur (Rubin ve Lewis, 2000).

flr³/ln (3LR) TM3, ri p^P sep l (3) 89Aa bx^{34S} e^S Bd^S: Bu soyda *flare* (*flr³*) mutasyonu taşınmakta olup *flr³* kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif bir mutasyondur. *flr³*'ün üç mutant alleli olup hepsi de homozigot durumda letaldir (Şekil 3.4). Ancak kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayarak mutant kanat hücreleri oluşur. Homozigot letalite ile kanat kenarlarının testere dişi şeklinde olmasına neden olan dominant bir mutasyon olan *Bd^S* heterozigot olarak bulunur. *flr³*'ün fenotipinde kanatlardaki kıllar normal, düz ve uzun kıllar şeklinde iken, mutasyon halinde kalın ve düzgün olmayan kısalmış veya kanat yüzeyinden çıkamamış nokta, koyu renkli balon şeklinde kıl yapısı olarak kendisini gösterir (Graf vd., 1984; Graf ve Riccon, 1995).



Şekil 3.4. *flr³/TM3, Bd^S* bireylerindeki saf genotiplerin letal etkileri

Dengeleyici kromozomu taşımayan normal kanat yapılı ve dengeleyici kromozomu taşıyan serrat kanat yapılı bireylerin fenotipleri Şekil 3.5.-A ve Şekil 3.5.-B'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. *Drosophila melanogaster*'e ait kanat şekilleri

3.2. Yöntem

3.2.1. NiFe₂O₄NP'nin morfolojik karakterizasyonu

NP'ler insan sağlığı, doğa ve ekosistemler üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir. NP'lerin potansiyel toksisitesi ve davranışları, partikül sayısı, yükü, boyut ve boyut dağılımı, kimya ve reaktivitesi, yüzey alanı, şekli ve yapı ile elemental kompozisyonu ve agregasyon durumu gibi çok çeşitli özelliklerinden etkilenebilmektedir (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018). Bilimsel çalışma ve araştırmalarda doğru sonuçlara ulaşılabilmesi ve sonuçların tekrarlanabilirliği ilkesi açısından karakterizasyon çalışmaları yapılmasına özen gösterilmeli ve NP'lerin özellikleri iyi belirlenmelidir.

3.2.1.1. Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) analizi

UV-Visible Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi 200-1100nm dalga boyu arasındaki ışığın b ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının ölçümüne dayanır. Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Bunun sonucu olarak UV-Vis Spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır. Buradan hareket edilerek, absorpsiyon piklerinin dalga boyları, incelenen türlerdeki bağların tipleriyle ilişkilendirilebilir. Bu çalışmada, saf suda dispersiyonu hazırlanan 50µg/mL NiFe₂O₄NP'den 5mL alınarak 1x1cm'lik kuartz

küvete konulmuş ve Perkin Elmer, Lambda 35 UV-Vis Spektrometre kullanılarak spektrum alınmıştır.

3.2.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji dağılım X-ışını spektrometre (EDX) analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu veya SEM (Scanning Electron Microscope), çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Taramalı elektron mikroskopisi, mikro ve nano yapıları yüksek çözünürlükte analiz etmek için kullanılan yöntemlerden biridir. Görüntü, elektron demetinin odağının numune yüzeyini taramasıyla şekillenir. SEM, elektron demetini oluşturmak için bir elektron tabancası, demeti numune üzerine odaklamak için elektromanyetik lenslerden ve diyaframdan oluşur. Elektron tabancasından yayılan elektronların yörüngesi, manyetik alan üreten bobinlere uygulanan akımlarla ayarlanır ve numuneden yayınlan elektronlar dedektörde toplanıp netleştirilerek görüntü oluşturulur. EDX analizleri ise numune üzerinde belirli bir noktaya odaklanılarak bu alanın taranması ile gerçekleştirilmektedir. Sonuçlar % elementel oranı olarak grafiğe yansıtılmıştır. SEM-EDX analizleri FEI-Quanta FEG 450 marka cihazda yüksek vakum altında 20kV'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi

Deneysel çalışmalarda numune analizinde Thermo Scientific, Nicolet 6700 markalı FT-IR spektrometre Attenuated Total Reflectance (ATR) tekniği ile kullanılmıştır. Numunenin $400-4000\text{cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında yapısındaki fonksiyonel grupların absorptans değerleri belirlenmiş ve bundan yola çıkılarak yapı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Infrared (IR) spektroskopisi yönteminde infrared ışınları moleküllerin titreşim hareketleri tarafından absorplanır. Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Bu yöntemle bilinmeyen malzemelerin yapısı nitel olarak tanımlanabildiği gibi, kompleks bir karışımdaki bileşenlerin nicel ölçümleri de yapılabilir. IR spektroskopisinde, amaç herhangi bir bileşiğin yapısı hakkında bilgi sahibi olmak veya yapısındaki değişiklikleri incelemektir. Bileşiğin alınan IR spektrumu ile yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri, yapının aromatik veya alifatik olduğuna dair bir bilgi edinebilir.

3.2.1.4. X-Işını kırınımı (XDR) analizi

X- Ray Diffraction (XRD) spektroskopisi olarak bilinen X-Işını Difraksiyon spektroskopisi isminden anlaşılacağı gibi X-ışını denilen Ultraviyole ışıktan daha kuvvetli fakat Gamma ışınından daha zayıf enerjili ışın kullanılarak yapılan analizi temel alır. X ışınları kristallerdeki atomlar arası uzaklıkla kıyaslanabilecek dalga boyuna (0.01–10nm) sahip elektromanyetik dalgalardır. XRD çalışmalarında, dalga boyu sabit X-ışınları kullanılır. X-ışınları kaynağı olarak X-ışını tüpleri kullanılmaktadır. Dalga boyu sabit X-ışınları elde etmek için, ısıtılan bir tungsten filamandan ısı tahriki ile yayınlanan elektronlar elektromanyetik bir alan içinde hızlandırılır. Hızlandırılarak yüksek enerji kazandırılan bu elektron demeti bir anoda (bakır gibi) çarptığında, elektronlar anodun elektron kabuklarına girerler. Yüksek enerjili elektron demeti çekirdeğe yakın kabuktaki bir elektrona çarparak onu yerinden çıkartırsa, elektron kaybından dolayı atom kararsız hale geçer ve boş kalan elektronun yeri daha yüksek enerjili kabuktaki bir elektron tarafından doldurulur. Bu elektron geçişinden kaynaklanan enerji farkı, karakteristik X-ışını fotonu olarak yayınlanır. XRD analizi için marka ve model cihaz kullanılmıştır. NiFe₂O₄NP analizinde Panalytical, Empeyrean markalı XRD cihazı kullanılmıştır.

3.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

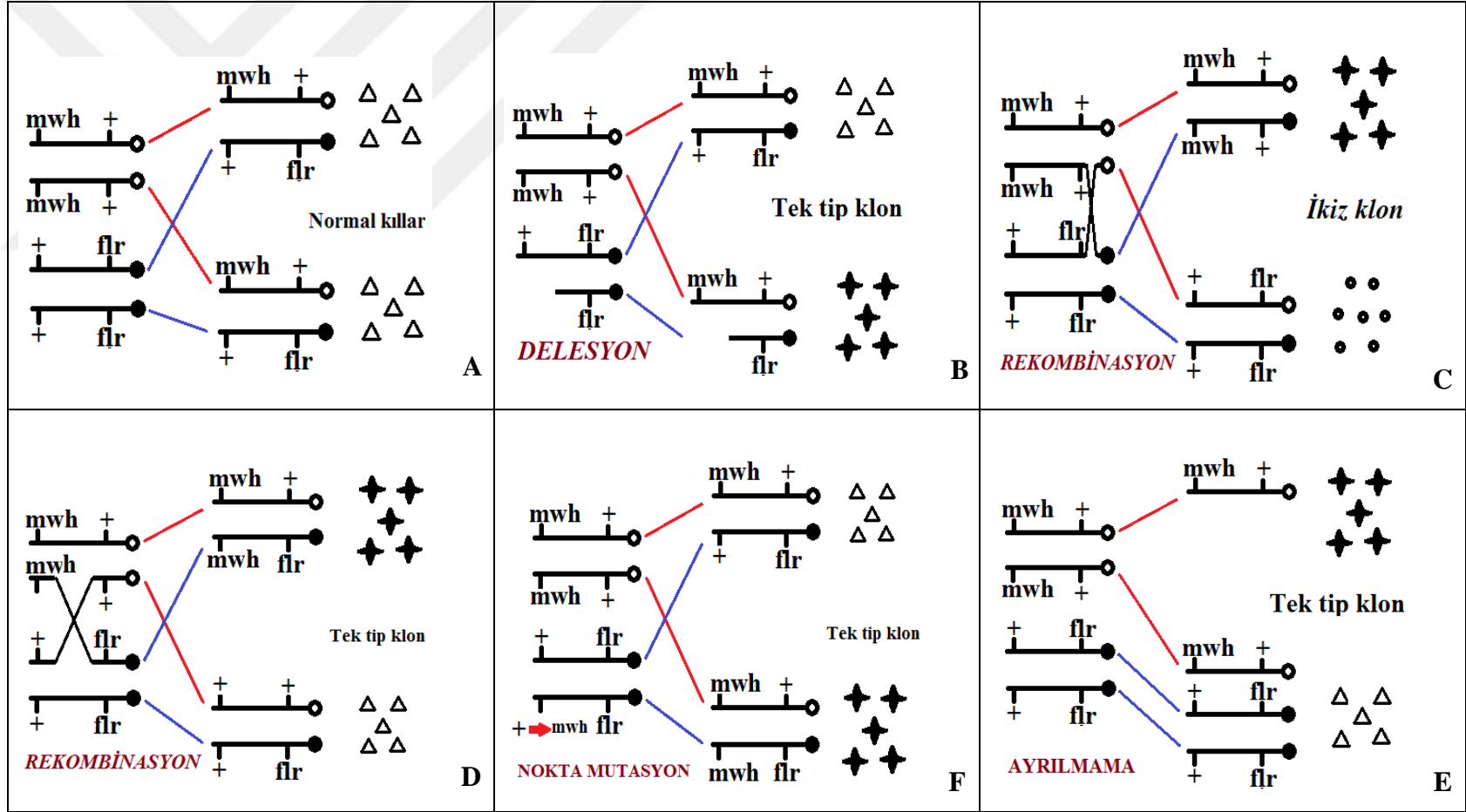
Uygulamalar Graf ve arkadaşlarının 1984 ve 1996 yıllarında yapmış oldukları çalışmalar esas alınarak gerçekleştirilmiş olup, uygulama basamaklarında çeşitli modifikasyonlar (Kaya, 2000) yapılarak çalışma tamamlanmıştır. Çalışmada 40 adet *mwh/mwh* erkek birey ile ve 40 adet *flr³/TM3*, *Bd^S* genetik yapılı dişi virgin bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 3. instar dönemindeki transheterozigot larvalar kullanılmıştır. Çaprazlamada yüksek yumurta verimine sahip olması nedeniyle *flr³/TM3*, *Bd^S* hattının dişi bireyleri tercih edilmiştir. Deneyler 25°C sıcaklık ve %60 bağıl nemde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda yapılmıştır. NiFe₂O₄ nanokompozitinin 25, 50, 75, 100, 200µg/mL konsantrasyonlarında ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 1mM Etil metansülfonat (EMS) ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan distile su *Drosophila* Instant mediumlara eklenmek suretiyle 3. instar dönemindeki 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster mwh/flr³* transheterozigot larvaların bu besiyerlerde

beslenerek ergin hale geldikten sonra kanatlarında oluşan mitotik mutasyonların tespit edilmesi sağlanmıştır.

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde, heterozigotluğun herhangi bir mutasyonla kaybedilmesi yöntemiyle yabancı fenotip yerine mutant fenotip oluşmaktadır (Graf vd., 1984; Graf ve Rincón, 1995). Mutant fenotip, mutant hücre klonlarındaki farklı benekler grup ve sayılarına göre belirlenmektedir. Tek tip klon (tekli benekler) *mwh* veya *flr³* fenotipinde iken, ikiz klon (ikili benekler) *mwh* ve *flr³* fenotiplerini aynı anda taşımaktadır. Tek tip klonda 1-2 hücreli olanlar küçük tek tip klon, 3 veya daha fazla sayıda klon taşıyanlar ise büyük tek tip klon olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (Henderson, 2004).

Tek tip ve ikiz klonların (beneklerin) oluşması farklı genetik mekanizmalara bağlıdır (Graf vd., 1984). Nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve iki işaret geni olan *mwh* ve *flr³* arasındaki mitotik rekombinasyon tek tip klonların oluşumunu tetiklerken, her iki klon çeşidinin oluşmasını ise mitotik rekombinasyon sağlamaktadır. İkiz klonlar ise 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Kaya, 2000). Serrat kanatlı (*mwh/TM3*) bireylerde *TM3* kromozomunun baskılanmasından dolayı mitotik crossing over gerçekleşmemektedir (Frei ve Würzler, 1988).

SMART çalışmasında en önemli nokta normal kanatlılar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesiyken, düzgün olmayan kenarlı serrat kanatlar (*mwh/TM3, Bd^S*) dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması sonucu sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermesidir. Bundan dolayı değerlendirme aşamasında, kanat preparatları hazırlanırken kanatlar morfolojilerine göre normal (düzgün) kanatlı ve serrat kanatlılar olmak üzere iki gruba ayrılarak inceleme yapılmaktadır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *Drosophila melanogaster*'e ait farklı klon türleri

A- Düz (normal) kıl oluşum şematığı B- Delesyon ile tek tip klon mutasyonunun genetik mekanizması C- Rekombinasyon ile ikiz klon mutasyonunun genetik mekanizması D- Rekombinasyon ile ikiz klon mutasyonunun genetik mekanizması E- Nokta mutasyon ile tek tip klon mutasyonunun genetik mekanizması F- Nokta mutasyon ile tek tip klon mutasyonunun genetik mekanizması

3.2.2.1. *Drosophila* hatlarının kültürü

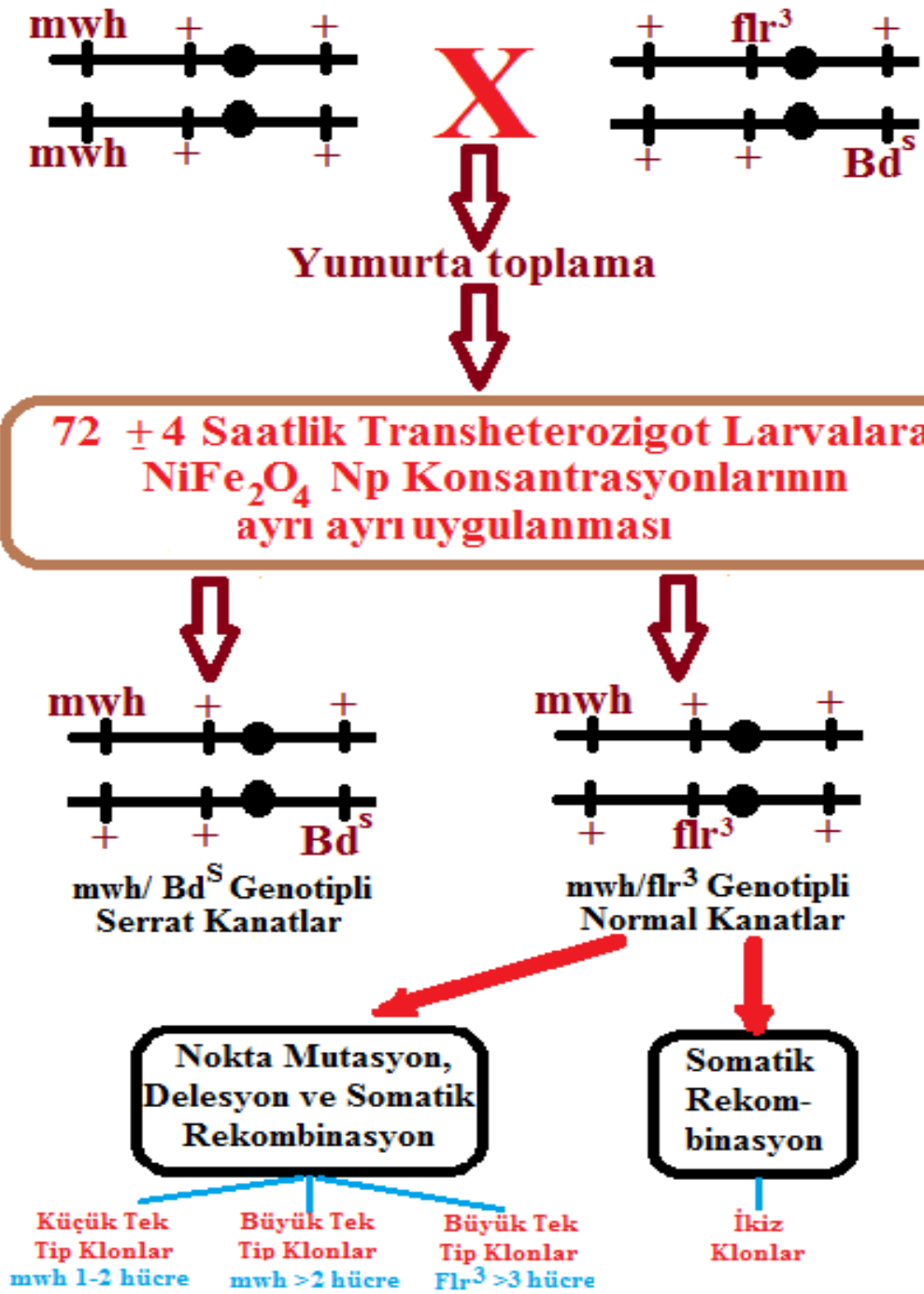
Çalışmada kullanılan tüm hatlar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan uygun sıcaklık kabinlerinde ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), 200mL hacimdeki cam şişelerde Standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) ile kültüre alınmıştır. Standart besin ortamı aşağıdaki gibi hazırlanır;

Gereken Malzemeler: 9g agar, 60g toz şeker, 19g bira mayası, 50g mısır unu, 565cc saf su ve 3- 3,5cc propionik asit. 440cc saf su temiz bir beherde kaynatılır. Kaynamaya başlayan saf suya önce 9g agar daha sonra 60g şeker ilave edilip bir cam baget yardımıyla iyice karıştırılır. Bir başka beher içinde 125cc saf suda 50g mısır unu ve 19g bira mayası ezilir. Karıştırılarak ezilen bu karışım kaynayan şeker-agar karışımına ilave edilerek karıştırmaya devam edilir. Karışım kaynamaya başladıktan sonra karıştırma işlemine 15dk daha kısık ateşte devam edilmelidir. Bu safhada karışımın kıvamına dikkat etmek gerekir. Eğer karışım çok sıvı olursa besi ortamı soğuduğu zaman çok katılaşmayacak ve sinekler besi ortamına yapışacaktır. Karışım çok katılaşursa hem şişelere doldurmak hem de sineklerin beslenmesi güçleşecektir. Bu durumlar göz önüne alınarak hazırlanan besi ortamı ateşten indirilir. Karışım biraz soğuduktan sonra 3- 3,5cc propionik asit (küf inhibitörü olarak kullanılır) ilave edilip hazırlanan besi ortamı daha fazla soğumadan temiz ve steril cam şişelere eşit miktarda (yaklaşık iki parmak yüksekliğinde) dökülür. Besin ortamının kültür şişelerinin ağzına ve kenarlarına bulaşmayacak şekilde konulmasına dikkat edilmelidir. Şişelerin ağzına bir filtre kâğıdı kapatılarak bir gün oda sıcaklığında bekletilir (kontaminasyonu engellemek için şişelerin ağızlarının açılmamasına ve şişenin kenarında birikecek su buharının tümüyle çekilmiş olmasına dikkat etmek gerekir). Ertesi gün etrafı tülbentle sarılmış olan steril pamuk tıkaçlar ile kültür şişelerinin ağızları kapatılarak buzdolabında saklanır.

3.2.2.2. Çaprazlama için birey seçimi

SMART uygulamasında 3. dönem transheterozigot larva elde edilebilmesi amacıyla *Drosophila melanogaster*'in *multiple wing hair (mwh)* ve *flare (flr³)* mutant soylarının bulunduğu kültür ortamından ergin bireylerin toplanması sağlandı.

Kültür ortamında bulunan ergin bireyler dörder saat aralıklarla toplandı. Bunun nedeni *Drosophila melanogaster* erkek ergin bireylerinin pupadan çıktıktan hemen sonra eşeyssel olgunluğa erişmeleri ve dişi ergin bireylerin ise pupadan çıktıktan 5-6 saat sonra eşeyssel olgunluğa erişmeleridir. Kültürde bulunan *flare* (flr^3) soyuna ait dişi ergin bireyler dörder saat aralıklarla kontrol edilerek her dörder saatte bir pupadan çıkan erginler başka bir besiyer şişesine aktararak toplandı. Virgin bireylerin bulunduğu besiyer şişesinin ağzı çok kısa bir süre eterli pamuk ile kapatılarak erginler bayıldı. Eterle bayıtılan flr^3 soyuna ait ergin bireyler boş bir petri kabına aktararak seçilen 40 adet dişi virgin erginin çaprazlama havuzuna aktarıldı. Aynı işlemler besiyerine toplanan *mwh* erkek bireyleri için tekrarlandı ve 40 adet erkek *mwh* birey çaprazlama havuzuna aktarıldı. Uygulamaların yapılacağı transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* erkek, 40 flr^3 dişi olacak şekilde çaprazlama yapılır. Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi bireyler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakılmıştır. Uygulama yapılacak olan transheterozigot larvaların aynı evrede olabilmesi için oogenezi gerçekleştirmiş olan bireylerin 8 saat boyunca yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları için bekletilmiştir. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanılmıştır. Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama Şekil 3.7’de gösterilmiştir (Graf vd., 1984).



Şekil 3.7. *D. melanogaster*'de SMART uygulanmasının şematik gösterimi

3.2.2.3. NiFe₂O₄NP konsantrasyonlarının belirlenmesi

Çalışmanın ilk basamağında, genotoksik etkisi test edilecek olan NiFe₂O₄NP'nin beş farklı derişiminin çalışılması amaçlanmıştır. NiFe₂O₄NP etkin derişim aralıklarının belirlenmesi aşamasında öncelikle genotoksik etkilerin geniş bir spektrumda incelenmesi için daha önceki çalışmalarda kullanılan konsantrasyon aralıklarından yararlanılmıştır. *D. melanogaster* larvaları üzerine LD₅₀ dozunu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 ve 500µg/mL) 24 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Deneyler sonucunda tüm konsantrasyon grupları için ortak LD₅₀ dozu 100µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarda uygulanan konsantrasyonlar, her bir deney grubu için LD₅₀ dozundan daha düşük ve yakın olan 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL olarak belirlenmiştir.

3.2.2.4. Deney gruplarına NiFe₂O₄NP'nin uygulanması

Bu çalışmada etkileri test edilecek olan NiFe₂O₄NP için beş farklı konsantrasyon (25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL) çalışılmıştır. Sekiz saat süresince çiftleştirilen ebeveynlerin bıraktığı döllenmiş yumurtalardan çıkan bireyler, üçüncü larva evresine eriştiğinde, musluk suyu altında yıkanmış ve elekten geçirilerek ayrılmıştır. 72±4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan cam tüpler içerisine yaklaşık 1,5g kadar hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) konulmuş ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanarak derişimlerin 5mL'si ile nemlendirilmiştir. Toplanan larvalar her bir cam tüp içerisine 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konularak uygulama ortamına alınmıştır. Larvaların uygulama ortamına konulmasından sonra tüplerin ağızları tıkaçlarla kapatılmıştır. Deney grupları sıcaklık kabinlerine konularak larvalar kronik olarak 48 saat boyunca NiFe₂O₄NP dozlarına maruz bırakılmıştır.

3.2.2.5. Ergin birey toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

NiFe₂O₄ nanokompozit dozlarına maruz bırakılan larvalardan, pupa evresini takiben çıkan ergin bireyler günlük olarak toplanmış ve kanat preparatlarını hazırlamak için bu bireyler %70'lik etil alkole konularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Toplanan bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (transheterozigot *mwh/flr³*) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3, Bd^S*) olarak iki gruba ayrılmıştır.

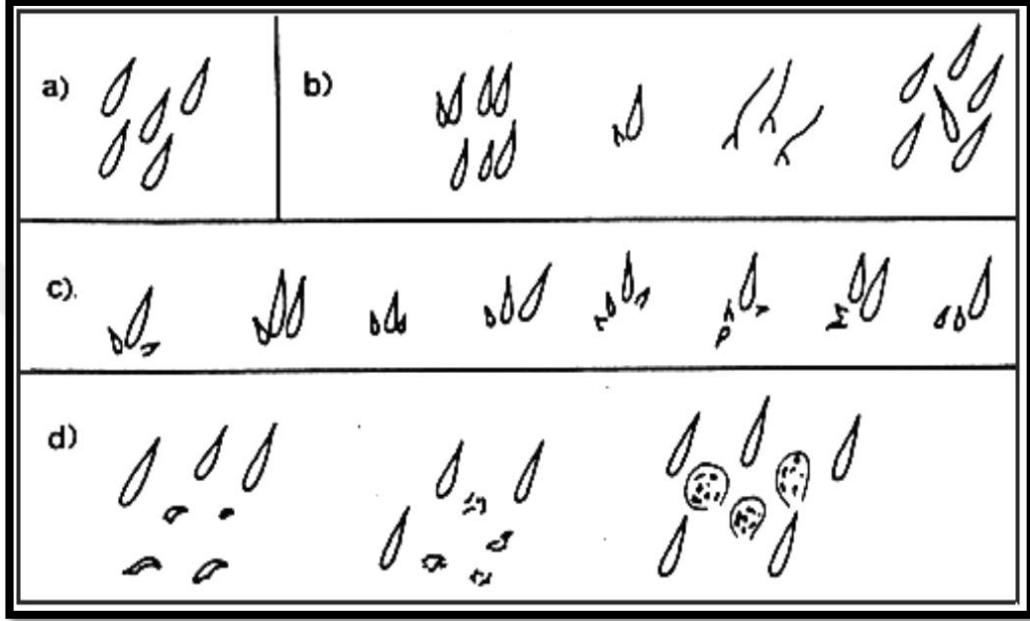
Kanat preparatlarını hazırlamak için Negishi vd., (1988) ve Graf vd., (1992)'nin çalışmalarında kullandıkları faure solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyonun içeriği 30g gum arabic, 20mL gliserol, 50g kloral hidrat ve 50mL distile su şeklindedir. Kanat preparatları hazırlanırken çukur lam üzerine faure solüsyonundan 1-2 damla konulmuştur. Distile suya alınmış olan her bir sinek, faure solüsyonu damlatılmış çukur lama alınmıştır. Kanatlar, binoküler mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatların vücuda bağlandığı yerden tutulmak suretiyle kanat üzerindeki kıllara ve kanada zarar verilmeyecek şekilde vücuttan özenle ayrılmıştır. Her bir bireyin kanadı ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (80 kanat) yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletilmiştir (Rizki vd., 2006). Preparatlar kuruduktan sonra lamlara bir iki damla entellan damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24X60mm) ile kapatılmıştır. Kanatların düzgün bir şekilde kuruması için kapatılan preparatların üzerine 3- 4g ağırlığında metal vidalar konulmuştur. Birkaç saat bu şekilde bekletilen preparatlar ışık mikroskobunda sayım ve inceleme için hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, 1 saat sonra ksilen ile ıslatılmış tülbent yardımıyla dikkatlice silinerek ışık mikroskobunda kılların görülmesini engelleyen yapılar uzaklaştırılmıştır. Preparatlar 3 gün süreyle bekletilerek kurumaları sağlanmıştır.

3.2.2.6. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesi

Hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede Olympus marka DX63 model ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kanat üzerindeki sektörler, incelemede kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C¹, D, D¹ ve E olarak bölümlere ayrılmıştır. Bu sektörlerde yapılan incelemelerde, kanatların hem dorsal hem de ventral yüzündeki hücre tabakalarında mutant klonların oluşup oluşmadığı dikkate alınmıştır. Kanatlar mikroskopta incelenirken özellikle mikro vida kullanılarak her bir sektör ayrı ayrı taranmış *mwh* ve/veya *flr³* mutant fenotipler sayılarak kaydedilmiştir. Normal ve farklılaşmış fakat ne *flr³* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar (Graf vd.,1984) Şekil 3.8.a ve Şekil 3.8.b'de gösterilmiştir.

SMART'ta tekli benekler *mwh* veya *flr³* fenotipindeki hücrelerden oluşur. Tekli benekler de küçük tek tip ve büyük tek tip diye iki grupta sınıflandırılır. Küçük tek tip

klonlar 1 veya 2 tane *mwh* hücrelerinden oluşur iken büyük tek tip klonlar ise *flr³* ve *mwh* hücre klonlarından da oluşabilir. 3 veya daha fazla sayıda *mwh* mutant hücre ile 4 veya daha fazla *flr³* mutant hücrelerden oluşan klonlara ise büyük tek tip klon denilmektedir. *mwh* trikomlar ve *flr³* genotipine ait trikomlar (Graf vd., 1984) Şekil 3.8. c ve Şekil 3.8.d'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Kanat trikomlarının görünümü

flr³ klonlarının 4'den az sayıda olduğunda sayılmamasının nedeni; önceki yıllarda yapılan çalışmalarda dörtten daha az sayıda gözlenen sadece *flr³* fenotipteki trikomların oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle ortaya çıktığı, bu nedenle *flr³* fenotipteki klonlar için dört ve daha fazla sayıdaki hücrelerin büyük tek tip klon olarak adlandırılması gerektiği olarak belirtilmiştir. *flr³* ve *mwh* hücre klonlarının ikisinin yan yana yer aldığı klonlar ise ikiz klon olarak adlandırılır (Szabad vd., 1983). Kanat preparatlarının analizi esnasında ikiz klonların yan yana bulunması hali için dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi *mwh* hücre klonları ile *flr³* hücre klonları yan yana olduğu durumda da ikiz klon olarak adlandırılır. Ancak komşu iki klon da olabilir, bu durumda farklı iki klon olarak değerlendirmeye tabi tutulur. Yan yana çok yakın olan klonların ikiz mi yoksa komşu farklı iki klon mu olup olmadıklarının ayırımı Graf vd. (1984) yapmış oldukları çalışmada göz önünde bulundurulmuştur. *mwh* ve *flr³* hücrelerinin sınıflandırılmasında, komşu iki klon arasında üç yada daha fazla sayıda

yaban tip trikoma hücre sırası varsa bunların iki farklı klon olarak değerlendirmeye tabi tutulması gerektiği belirtilmiştir.

3.2.2.7. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Kronik uygulamada her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki eşitlikle matematiksel olarak hesaplanmıştır (Szabad vd., 1983).

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

Eğer sadece *mwh* klonlar göz önüne alırsa, denklemdeki "f" *mwh* klonlarının indüksiyonunun ortalama frekansını, "n" gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını, "N" analiz edilmiş olan kanat sayısını ve "C" bir kanat üzerindeki incelenen bir hücre sayısını göstermektedir.

3.2.2.8. İstatistiksel analiz

Farklı konsantrasyonlarda NiFe₂O₄ nanokompozitinin uygulandığı kanat benek testi sonuçlarının değerlendirilmesinde *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) için hazırlanmış bir bilgisayar programı olan MICROSTA kullanılmıştır. Orijinal (null) hipotezde (H₀) uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, alternatif hipotezde (H_a) ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan *m* defa daha fazla olduğu varsayılarak orijinal ve alternatif hipotezlerin MICROSTA kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; uygulama grubundaki (nt) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya çizelge değerinden büyükse H₀, aynı şekilde, kontrol grubundaki (nc) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya çizelge değerinden büyükse bu kez H_a reddedilmiştir. H₀ ve H_a'nın kabul veya reddedilmesine göre Tablo 3.3 kullanılarak sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Selby ve Olsen, 1981; Frei ve Wügler, 1988).

Tablo 3.3. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZ	Ha (Alternatif)		
		KABUL (1- β)	RED(β)
	KABUL	ÖNEMSİZ FARK	NEGATİF
Ho (null)	(1- α)	$P = (1-\alpha)(1-\beta) = 1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	$P = (1-\alpha)\beta = \beta -\alpha\beta$
	RED	POZİTİF	ZAYIF POZİTİF
	(α)	$P = \alpha(1-\beta) = \alpha-\alpha\beta$	$P = \alpha\beta$



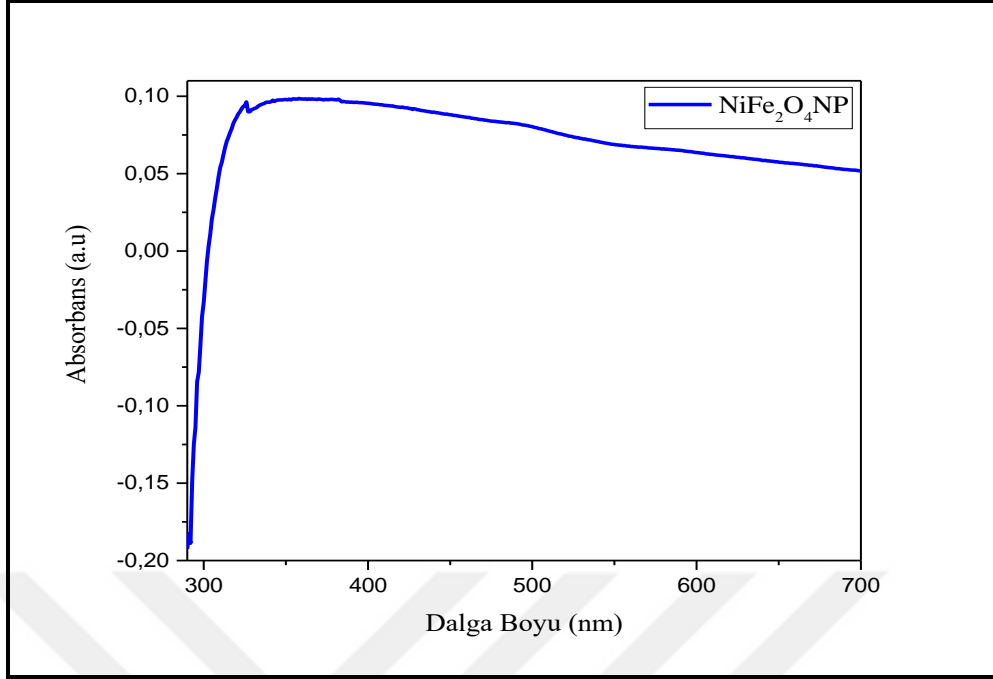
4. BULGULAR

Bu çalışma üç aşamalı olarak planlanmıştır. Öncelikle X-ışını kırınımı (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDAX) analizleri, Fourier transform infrared Spektroskopisi (FT-IR) ve Ultraviyole/görünür ışık absorpsiyon spektrofotometresi (UV-Vis) ile NiFe₂O₄NP karakterize edilmiştir. İkinci aşamada ise farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100, 200 ve 500µg/mL) NiFe₂O₄ nanokompozit (30nm) içeren besiyerlerinde *Drosophila melanogaster*'in (*mwhxflr³*) 72±4 saatlik transheterozigot larvaların yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisi araştırılmıştır. Son aşamada ise, LD₅₀ dozununun 100µg/mL olduğu belirlendikten sonra 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL konsantrasyonlarında NiFe₂O₄ nanokompoziti (30nm) içeren besiyerlerinde yaşayabilen ergin bireylere ait kanatlar kullanılarak *Drosophila* kanat benek testi ile genotoksik aktivitenin olası sonuçları incelenmiştir.

4.1. NiFe₂O₄ Nanopartikülünün Karakterizasyonu

4.1.1. UV-Vis spektroskopisi

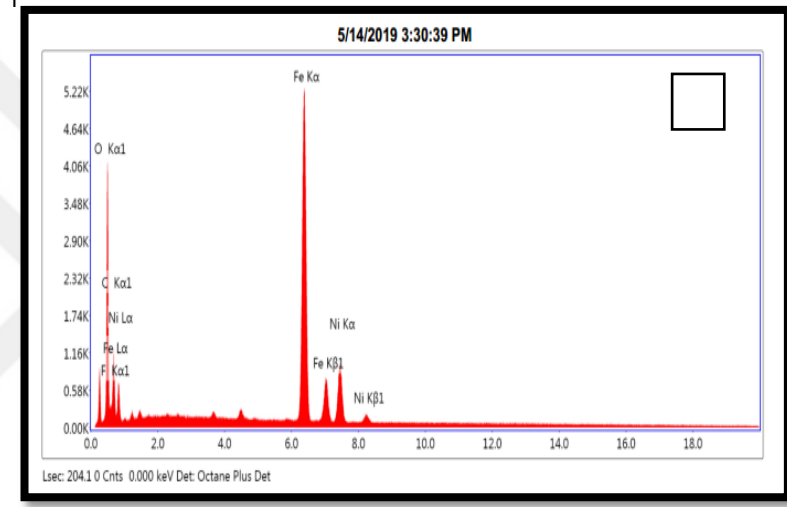
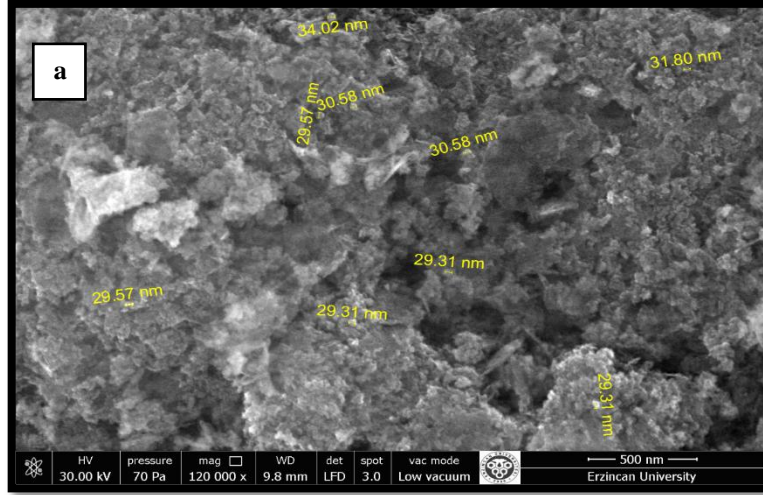
NiFe₂O₄NP'lerin optik özelliğinin belirlenmesi amacıyla UV- Görünür bölge absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Şekil 4.1'de verilen absorpsiyon spektrumu incelendiğinde, NiFe₂O₄NP'nin 343nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğu görülmektedir. NiFe₂O₄NP'nin yapısında bulunan Ni ve Fe elementlerinin sahip olduğu d orbitalinde bulunan değerlik elektronları görünür bölge ışığını absorplayabilir. Sonuçlar, NiFe₂O₄ nanoparçacıklarının, küçük enerji bandı boşluğuna bağlı olarak görünür bölgede ışığı absorbe etme kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir (Rahmayeni vd., 2016).



Şekil 4.1. NiFe₂O₄NP'lerinin UV-Vis spektrumu

4.1.2. SEM ve EDX analizleri

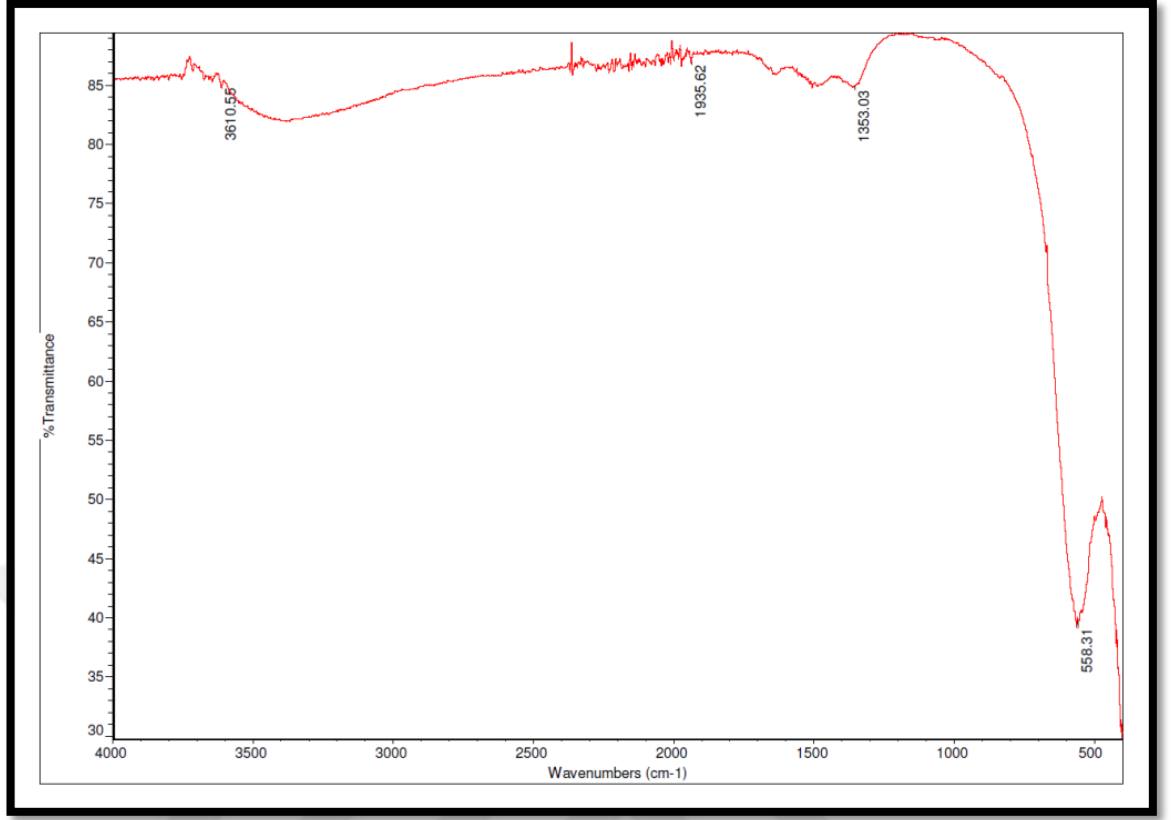
Şekil 4.2'de NiFe₂O₄NP'lerin SEM ve EDX görüntüleri yer almaktadır. SEM, tek tek kristalitlerin görüntülenmesine ve bir numunedeki partiküllerin boyutunun ve şeklinin istatistiksel olarak açıklanmasına olanak sağlar. SEM görüntülerine göre yüzey morfolojisi, tanecik şekli ve tanecik boyutu; EDX'e göre de elementel analiz hakkında bilgiler edinilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde, NiFe₂O₄NP'nin küçük küresel parçacıklarının mikrometrik agregasyon içerdiği gözlenmektedir. Yüksek yoğun aglomerasyonun varlığı, gözeneksiz kristalitlerin yüzeyde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Nanopartiküller yüksek yüzey enerjilerine sahip olduklarından, topaklanma ve daha büyük düzenekler halinde büyümeye meyillidirler (Sagadevan vd., 2017). NiFe₂O₄ nanopartikülleri yaklaşık olarak >30nm çapındaki parçacıklardan ve 25-30nm boyutunda büyük oktahedral şekilli parçacıklardan oluşmaktadır (Şekil 4.2.a). Partiküllerin EDX analizleri incelendiğinde % ağırlıkça oranı en yüksek olan oksijen (O) bulunmuş olup (%37,55); bunun kaynağı da NiFe₂O₄'tür. %28,98 oranında bulunun demir (Fe) oksijeni takip etmektedir. Sonuçlarda görülen Ni (Nikel) oranı ise %6,93'dür (Şekil 4.2.b).



Şekil 4.2. NiFe₂O₄NP'lerinin SEM görüntüleri

4.1.3. FT-IR analizleri

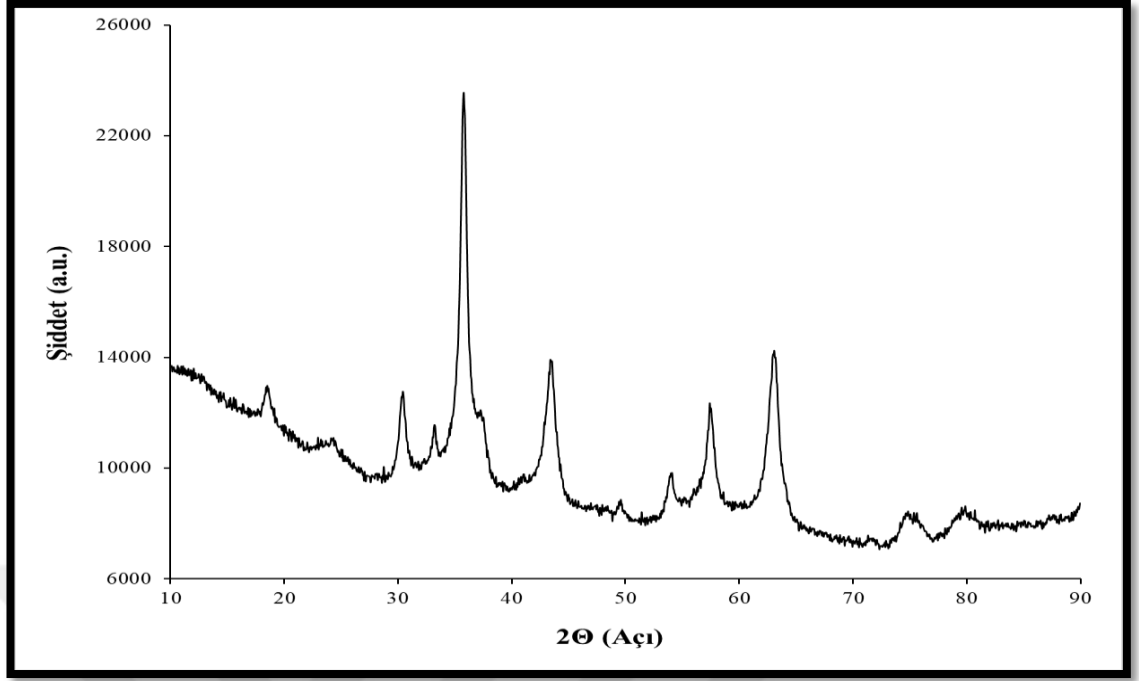
NiFe₂O₄NP'nin ATR-FT-IR spektrumları Şekil 4.3'te verilmiştir. 562 ve 421cm⁻¹'de gözlenen şiddetli IR bandları NiFe₂O₄NP'nin kristal örgüsündeki sırasıyla tetrahedral ve oktahedral alanlardaki (Fe↔O) gerilmelerinden kaynaklanmaktadır (Mujahid vd., 2019). Bu piklerin pozisyonları ve keskinlikleri nanoparçacıkların boyutuna ve safsızlığına bağlı olarak değişmektedir. Bunlara ilaveten, 3500-3300cm⁻¹ aralığındaki geniş IR bandı ve 1638cm⁻¹'deki IR bandı NiFe₂O₄ nanoparçacıklarının yüzeyine bağlı su molekül hidrosillerinin sırasıyla gerilme ve eğilme titreşimlerinden kaynaklanırken, 1486 ve 1358cm⁻¹'deki IR bandlarının ise NiFe₂O₄NP'nin sentezinde kullanılan çözücü türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.3. NiFe₂O₄NP'lerinin FT-IR analizleri

4.1.4. XRD analizi sonuçları

NiFe₂O₄ nanoparçacıklarının kristal yapısını ve saflığını karakterize etmek için numunenin toz XRD spektrumu alınmıştır ve sonuçlar Şekil 4.4'de verilmiştir. NiFe₂O₄NP'nin XRD spektrumunda 18,49, 30,37, 35,73, 37,27, 43,37, 54,01, 57,39, 62,95, 75,00 ve 79,79 (2θ) açılarında sırasıyla (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511), (440), (533) ve (444) kırınımına karşılık gelen 4,79, 2,94, 2,51, 2,41, 2,08, 1,69, 1,60, 1,48, 1,27 ve 1,20 Å'luk değerlerine sahip pikler elde edilmiştir. Bu piklerin şiddetleri ve pozisyonları kübik spinel kristal yapıya sahip NiFe₂O₄NP'nin JCPDS 86-2267 ve 74-2081 kart numaralarıyla iyi uyum içerisindedir (Salavati-Niasari vd., 2009; Feng vd., 2011; Maruthapandian vd., 2016; Zhang vd., 2019). Ayrıca bu piklerin keskin ve dar özellikte olması ise NiFe₂O₄'ün kristalizesinin hayli iyi olduğunu göstermektedir. Bunlara ilaveten 23,98, 33,19, 35,82 ve 50,00 (2θ) açılarında α -Fe₂O₃ (hematit) fazına ait XRD pikleri de tespit edilmiştir (JCPDS kart no 33-0664) (Zhou vd., 2019).



Şekil 4.4. NiFe₂O₄NP'lerinin XRD görüntüleri

4.2. NiFe₂O₄NP'nin LD₅₀ ve Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Oranları

Çalışmada ikinci aşama olarak NiFe₂O₄NP'nin embriyotoksik etkilerini (larvadadan ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranı) araştırmak için; *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları NiFe₂O₄NP'nin farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerlerine alınmıştır. Tüm uygulama gruplarında (*mwh* x *flr*³) çaprazlamasından elde edilen 72±4 saatlik larvalardan ergine gelişebilen bireyler sayılarak hayatta kalış oranları hesaplanmıştır.

Uygulama gruplarında larvalara ait yaşama yüzdelerinin NiFe₂O₄NP'nin konsantrasyonu arttıkça kontrol grubuna oranla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (*p*<0,05). Bu durum NiFe₂O₄NP'nin toksik etkilerinin konsantrasyon artışına paralel olarak arttığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Tablo 4.1'deki veriler incelendiğinde, 100µg/mL konsantrasyonda hayatta kalış oranı %49 olduğu görülmektedir. LD₅₀ dozu 100µg/mL olarak kabul edilerek çalışma dozları 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. NiFe₂O₄NP'nin *D. melanogaster*'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisi

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	Larva Sayısı	Hayatta Kalış Oranı (%)
Kontrol	0	100	97
	25	100	89
NiFe ₂ O ₄ NP	50	100	66
	75	100	54
	100	100	49
	200	100	38
	500	100	13

4.3. Distile Su, EMS ve NiFe₂O₄NP Uygulaması Sonucu Elde Edilen SMART Bulguları

Çalışmanın üçüncü aşamasında *Drosophila* kanat benek testi ile NiFe₂O₄ nanokompozitinin olası genotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılırken, pozitif kontrol grubu için de yine EMS kullanılmıştır. Her bir uygulama grubu için 3. larva dönemindeki transheterozigot larvalardan elde edilen ergin bireylerden seçilen 80 kanat, beneklerin varlığını araştırmak için, ışık mikroskopunda 400X büyütmeyle incelenmiştir. İncelemeler sırasında kanat benekleri istatistiki analizlerde kullanılmak üzere tekli benekler (*mwh* veya *flr³* fenotipinde) ve ikili benekler (*mwh* ve *flr³* fenotipinde) olmak üzere sınıflandırılarak kaydedilmiştir. Ayrıca tekli benekler de kendi aralarında küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek (3≤ hücreli) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

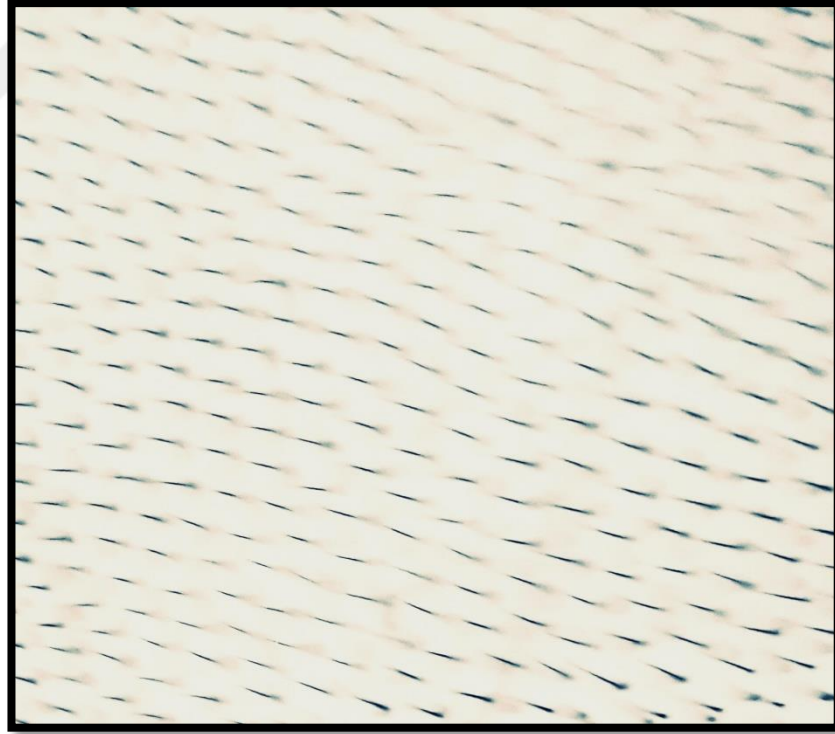
4.3.1. Distile su ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması

Çalışmalarda distile su ve DMSO negatif kontrol, mutajenik ve rekombinojenik aktiviteleri bilinen EMS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. F₁ neslinde elde edilen hem normal kanatlı hem de serrat kanatlı bireylere ait kanat preparatları hazırlanarak mikroskopik analizleri yapılmıştır. Preparatların incelenmesinde kolaylık olması açısından, kanatlar A, B, C, C¹, D, D¹, E olmak üzere sektörlere ayrılmıştır (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. Normal ve serrat kanat sektörleri

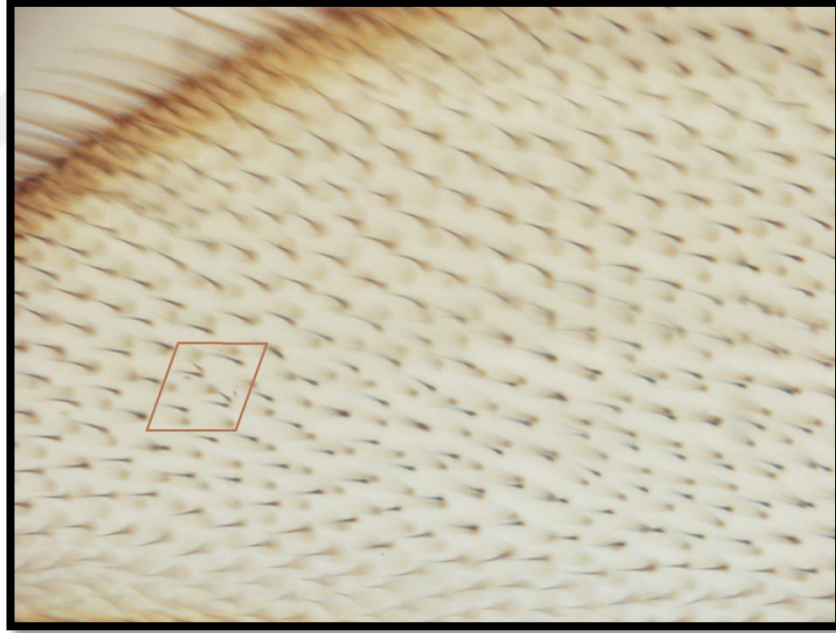
Kanat preparatları stereo mikroskop ile $10 \times 40 = 400$ kat büyütülerek incelenmiştir. Preparatlardaki kanat çiftlerinin her bir sektörü detaylı bir şekilde ayrı ayrı taranıp *mwh* ve/veya *flr³* mutant fenotipler bakımından incelenmiştir. Normal ve mutant kanatlarda gözlemlenen küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonlar sayısal veriler olarak kaydedilmiş ve Şekil 4.6 - Şekil 4.11'de bu bireylere ait kanat kıllarının yapısı 10×40 kat büyütülmüş görüntüleri gösterilmiştir.



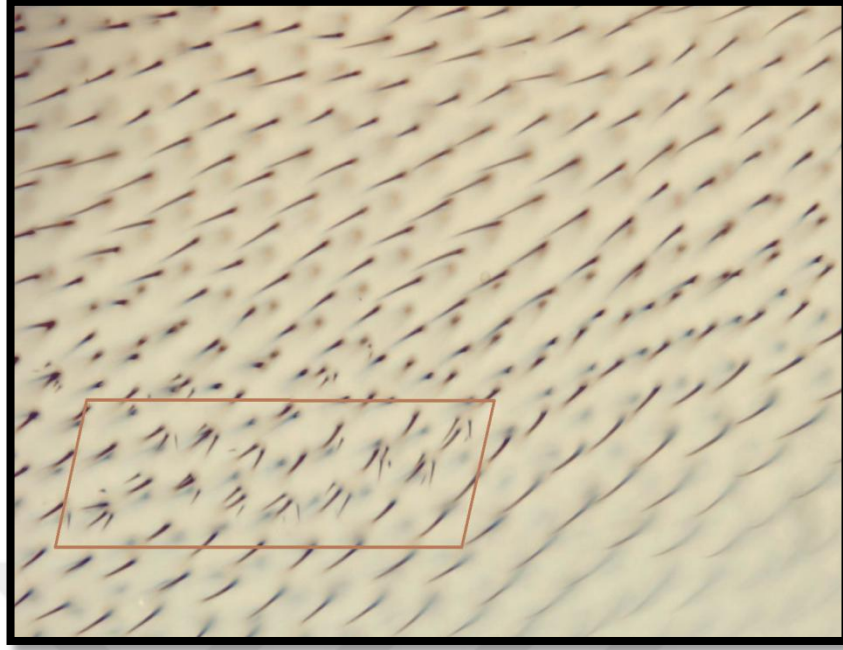
Şekil 4.6. Normal bireydeki kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü



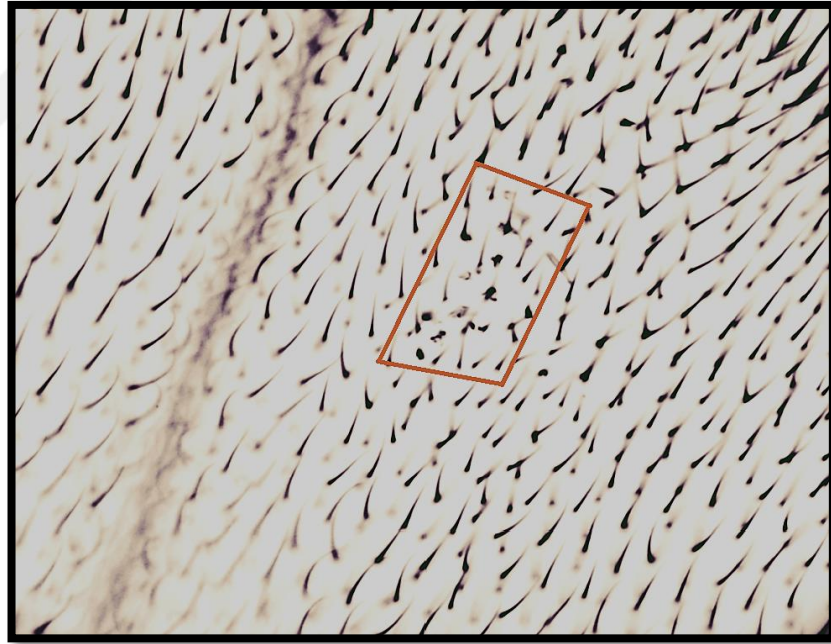
Şekil 4.7. *mwh/mwh* hattına ait kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü



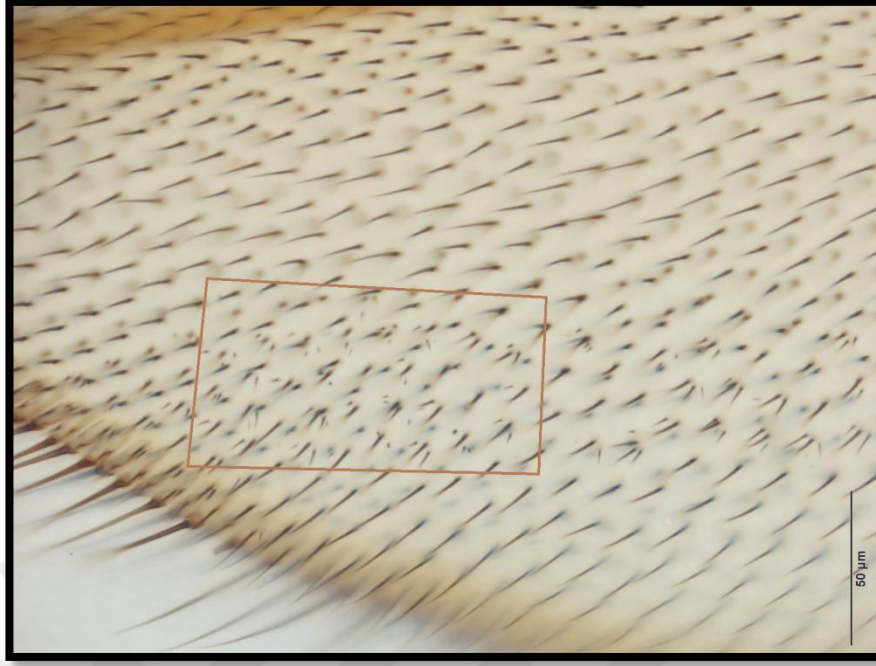
Şekil 4.8. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



Şekil 4.9. Büyük tek tip *mwh* klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



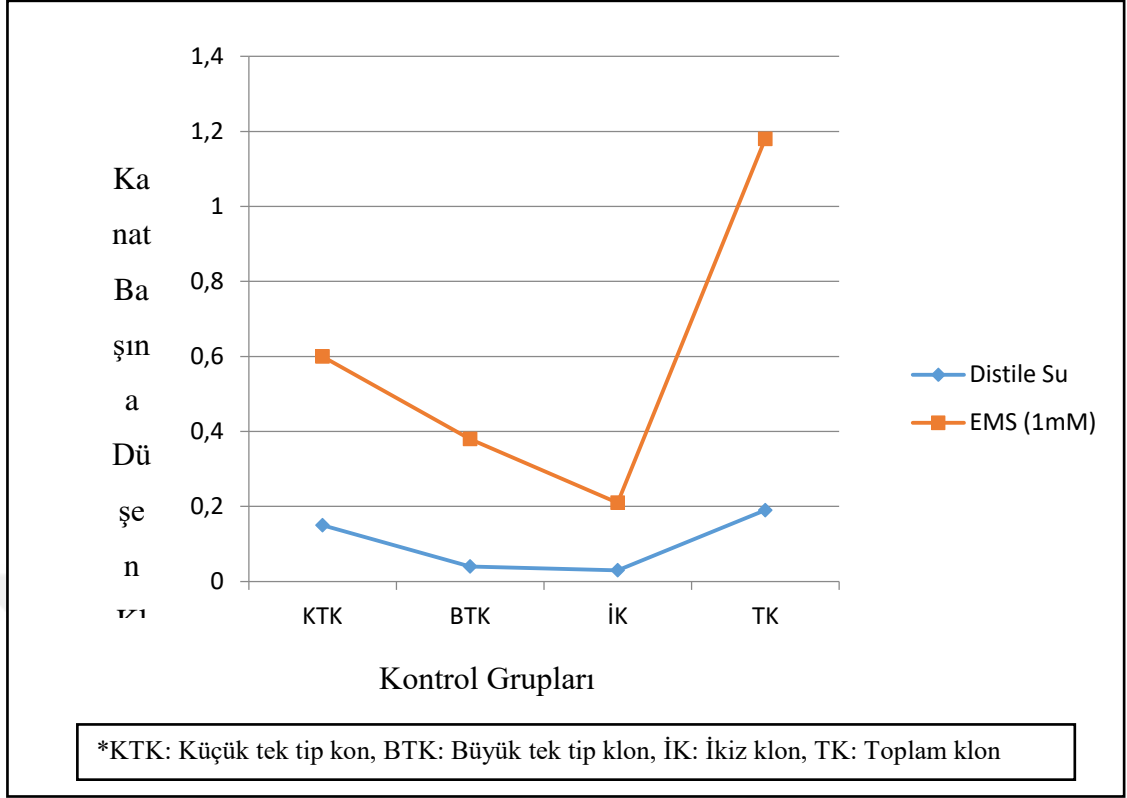
Şekil 4.10. Büyük tek tip *flr³* mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



Şekil 4.11. İkiz klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü

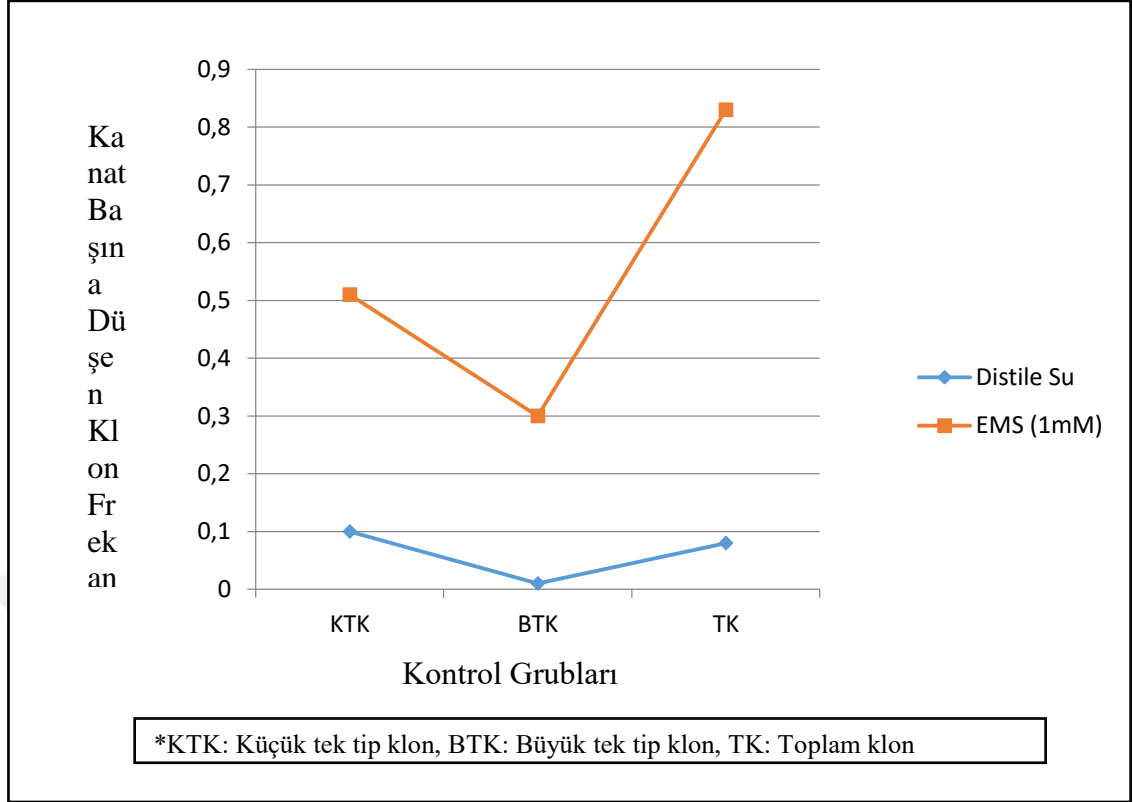
Negatif (distile su) ve pozitif (EMS) kontrol gruplarının muhtemel etkilerinin, hem *mwh/flr³* genotipli normal bireyler hem de *mwh/TM3* genotipli serrat kanatlı bireyler için belirlenmesi amacıyla elde edilen Tablo 4.2'deki verilerden yararlanarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

72±4 saatlik *D. melanogaster mwh/flr³* transheterozigot larvalarına, distile su uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta, 12 adet küçük tek tip klon, 3 adet büyük tek tip klon, 2 adet ikiz klon olmak üzere toplam *mwh* klon sayısı 17 adet olarak belirlenmiştir. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 0,87 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve daha önceki çalışmalarda Graf vd. (1984), Kaya vd. (2000) genotoksik olduğu belirlenen 1mM EMS'nin 72±4 saatlik *D. melanogaster mwh/flr³* transheterozigot larvalarına uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta 48 adet küçük tek tip klon, 30 adet büyük tek tip klon, 17 adet ikiz klon olmak üzere 95 adet toplam *mwh* klon belirlenmiştir. EMS uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 4,87 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12 ve Tablo 4.2).



Şekil 4.12. Kontrol grubu (mwh/flr^3) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanat trikomlarında gözlenen klon tiplerine ait frekanslar

Benzer şekilde, distile su uygulaması sonucu elde edilen 80 adet serrat fenotipli kanatta, toplam mwh klon sayısının 9 adet olduğu gözlenmiş ve klon indüksiyon frekansı 0,46 olarak hesaplanmıştır. EMS uygulanan gruplardan elde edilen 80 adet serrat fenotipli kanatta ise 65 adet toplam mwh klon sayılarak klon indüksiyon frekansı da 3,33 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.13 ve Tablo 4.2).



Şekil 4.13. Kontrol grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

Pozitif ve negatif kontrol gruplarındaki uygulamalardan elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda tüm klon tiplerinde istatistiksel farkın anlamlı (+) olduğu ve EMS'nin genotoksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Distile su ve EMS'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1- 2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m=5$)			İkiz klon ($m=5$)			Toplam mwh klon ($m=2$)			Toplam klon ($m=2$)			Klon indüksiyon frekansı (10^5 hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (mwh/flr^3)	Distile Su	80	12	(0,15)	3	(0,04)		2	(0,03)		13	(0,16)		17	(0,21)		0,87
	EMS (1mM)	80	48	(0,60)	+	30	(0,38)	+	17	(0,21)	+	78	(0,97)	+	95	(1,18)	+
Serrat Kanat ($mwh/TM3$)	Distile Su	80	8	(0,10)		1	(0,01)				9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
	EMS (1mM)	80	41	(0,51)	+	24	(0,30)	+		*	65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,33

No: Klon sayısı, Fr.: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei ve Würgler, 1988), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, * : *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$ etkileri

4.3.2. NiFe₂O₄NP'nin genotoksik etkisinin araştırılması

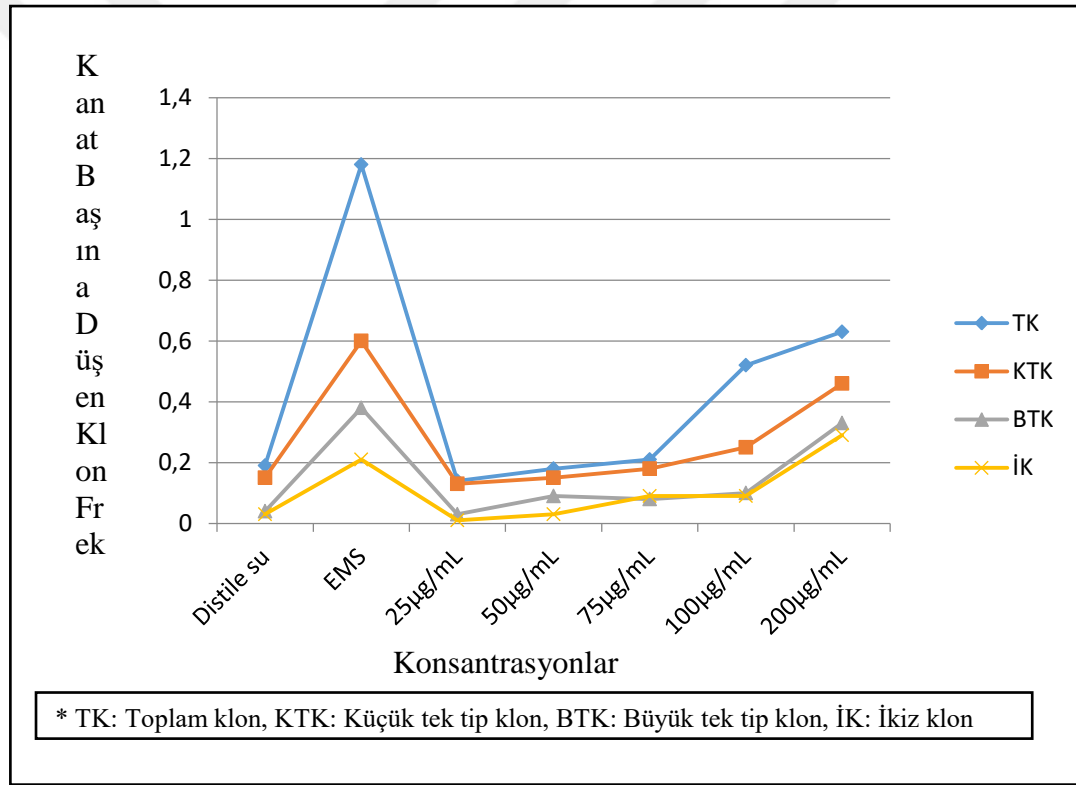
72±4 saatlik *Drosophila melanogaster mwh/flr³* transheterozigot larvalarına, NiFe₂O₄NP'nin çeşitli konsantrasyonları (25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL) ayrı ayrı eş zamanlı uygulanarak erginleşen bireylerin kanatlarında meydana gelen mutasyonlar kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile sınıflandırılarak ergin bireylerin klonların sınıflandırılarak NiFe₂O₄NP'nin genotoksik etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. NiFe₂O₄ NP'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (*mwh/flr*³) ve serrat kanat (*mwh/TM3*) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 benek) (<i>m=2</i>)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m=5</i>)			İkiz klon (<i>m=5</i>)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m=2</i>)			Toplam klon (<i>m=2</i>)			Klon indüksiyon frkansısı (10 ⁵ hücre)	
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D		
Normal Kanat (<i>mwh/flr</i> ³)	Distile Su	80	12	(0,15)	-	3	(0,04)	-	2	(0,03)	-	13	(0,16)	-	17	(0,21)	-	0,87
	EMS (1mM)	80	48	(0,60)	+	30	(0,38)	+	17	(0,21)	+	78	(0,97)	+	95	(1,18)	+	4,87
	NiF ₂ O ₄ Deneş Grupları																	
	25µg/mL	80	10	(0,13)	-	2	(0,03)	-	1	(0,01)	-	10	(0,13)	-	13	(0,16)	-	0,67
	50µg/mL	80	12	(0,15)	i	4	(0,09)	i	2	(0,03)	i	12	(0,15)	-	18	(0,23)	i	0,92
	75µg/mL	80	14	(0,18)	i	6	(0,08)	i	4	(0,09)	i	13	(0,16)	i	24	(0,30)	i	1,23
	100µg/mL	80	20	(0,25)	i	8	(0,10)	i	4	(0,09)	i	26	(0,32)	i	42	(0,53)	i	2,15
200µg/mL	80	37	(0,46)	+	27	(0,33)	+	20	(0,29)	+	66	(0,83)	+	84	(1,05)	+	4,30	
Serrat Kanat (<i>mwh/TM3</i>)	Distile Su	80	8	(0,10)	-	1	(0,01)	-	*			9	(0,11)	-	9	(0,11)	-	0,46
	EMS (1mM)	80	41	(0,51)	+	24	(0,30)	+	*			65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,33
	NiF ₂ O ₄ Deneş Grupları																	
	25µg/mL	80	11	(0,14)	i	2	(0,03)	i	*			13	(0,16)	-	13	(0,16)	i	0,67
	50µg/mL	80	15	(0,19)	i	2	(0,03)	i	*			17	(0,21)	-	17	(0,21)	i	0,87
	75µg/mL	80	16	(0,20)	i	4	(0,05)	i	*			20	(0,25)	-	20	(0,25)	i	1,02
	100µg/mL	80	18	(0,23)	i	4	(0,05)	i	*			22	(0,28)	i	22	(0,28)	i	1,13
200µg/mL	80	39	(0,43)	+	22	(0,28)	+	*			61	(0,76)	+	61	(0,76)	+	3,13	

No: Klon sayısı, Fr.: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei ve Würçler, 1988), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında *flr*³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$ etkileri

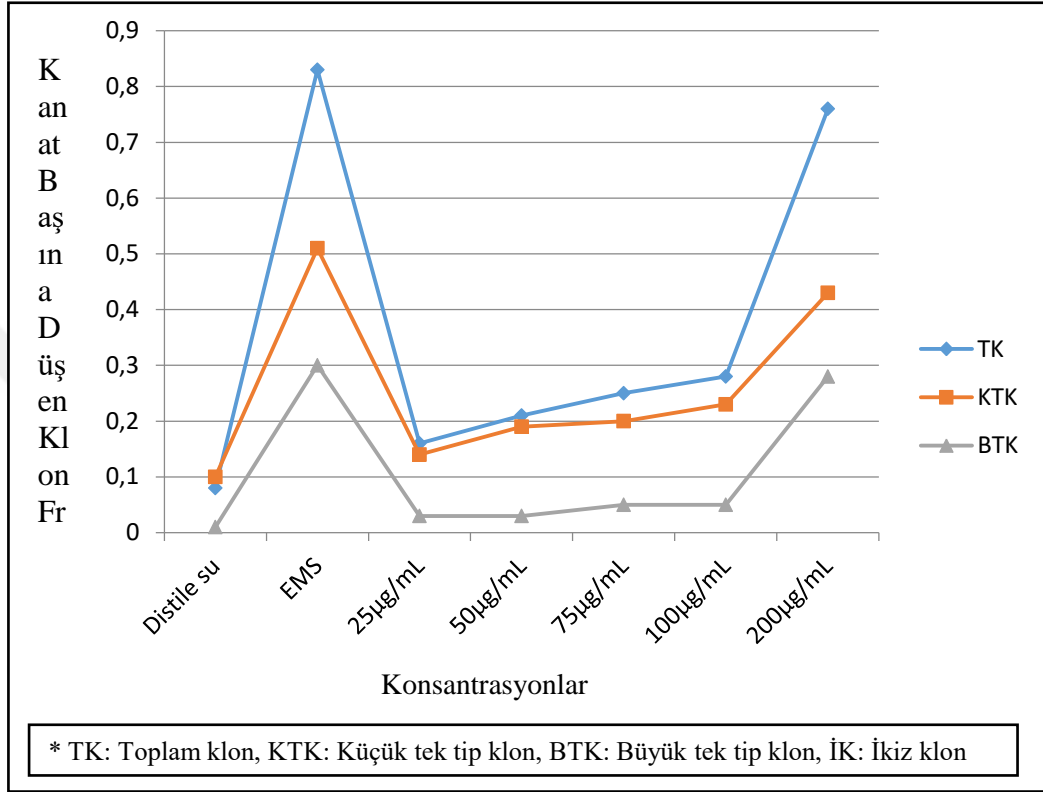
NiFe₂O₄NP'nin tüm konsantrasyonlarına ait veriler negatif kontrol grubu olan distile su değerleri ile karşılaştırılmıştır. En düşük uygulama grubu olan 25µg/mL NiFe₂O₄NP uygulama grubuna ait normal kanatlı bireylerde negatif kontrol grubuna göre toplam klon (i) hariç tüm klon tiplerinde farkın negatif (-) olduğu gözlenirken, 50, 75 ve 100µg/mL NiFe₂O₄NP uygulama gruplarında tüm klon tiplerinde önemsiz fark (i), 200µg/mL NiFe₂O₄NP grubunda ise pozitif fark (+) olduğu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda NiFe₂O₄NP (25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL) uygulamalarından elde edilen normal kanatlı bireylere ait klon indüksiyon frekanslarının distile suya ait KİF değerinin üzerinde olup sırasıyla 0,67; 0,92; 1,23; 2,15 ve 4,30 şeklinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.14 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.14. NiFe₂O₄NP uygulanan (mwh/flr^3) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

NiFe₂O₄NP'nin tüm konsantrasyonlarına ait uygulama gruplarından elde edilen serrat kanatlı bireylerde de konsantrasyon artışına paralel olarak tüm klon tiplerinde distile suya göre artışların olduğu tespit edilmiştir. 25, 50, 75 ve 100µg/mL NiFe₂O₄NP uygulama gruplarında tüm klon tiplerinde önemsiz fark (i) gözlenirken, en yüksek uygulama grubu olan 200µg/mL NiFe₂O₄NP grubunda ise pozitif fark (+) olduğu

belirlenmiştir. Negatif kontrol grubu olan distile su uygulama grubuna ait KİF değeri 0,46 iken bu değerin 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL NiFe₂O₄NP uygulama gruplarında artarak sırasıyla 0,67; 0,92; 1,23; 2,15 ve 4,30 şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.15. NiFe₂O₄NP uygulanan (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

72±4 saatlik *D. melanogaster mwh/flr³* ile *mwh/TM3* transheterozigot larvalarına 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL NiFe₂O₄NP'nin ayrı ayrı uygulanması sonucunda ergine gelişen bireylerin kanatlarında oluşan mutant klon frekansları distile su uygulamasından elde edilen ergin bireylerin kanatlarında meydana gelen mutant klon frekansları MICROSTA istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu elde edilen verilerden 200µg/mL NiFe₂O₄NP konsantrasyonda farkın anlamlı (+) olduğu gözlenmiş ve NiFe₂O₄NP'nin genotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlardan artan NiFe₂O₄NP dozunun DNA'nın yapısına etki ederek nokta mutasyon, delesyon ve somatik rekombinasyona yol açtığı ve bu duruma bağlı olarak tüm NiFe₂O₄NP uygulama gruplarında genotoksik etkinin mutant klon sayısında kontrole göre artış gösterdiği SMART ile belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, insan sağlığı ve potansiyel genotoksik riskleri hakkında sınırlı bilgi bulunan NP'ler ve yeni gelişmekte olan nanomalzemeler ile ilgili genotoksik risk üzerine yapılan çalışmalar ilgi çekmektedir (Landsiedel vd., 2009; Bakand and Hayes, 2016; Evans vd., 2017). Bu anlamda mevcut araştırma, metal oksit NP'lerin *in vivo* genotoksik etkileri hakkında yeni bilgiler eklemektedir. DNA hasarı indüksiyonu (genotoksisite) sadece kanserojenliğe yol açmayıp, aynı zamanda üreme hücrelerinde oluşan hasarlar sonraki nesillerdeki fertilitiyi de etkilemektedir. Dolayısıyla, yeni ilaç ve kimyasal maddelerin sağlık riski değerlendirmesini yöneten kilit alan genotoksikolojidir (Singh vd., 2009).

Çalışmamızda metal oksit nanaopartikülü olan $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$ 'nin olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Drosophila melanogaster* ile yapılan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) kullanılmıştır. Bununla birlikte kullanılan test tekniği benzer birçok çalışmada rastladığımız güvenilir bir test tekniği olmakla beraber genotoksik etkinliğini araştırdığımız NP SMART ile ilk defa çalışılmıştır.

Boyut ve şekil, yüzey alanı ve yüzey aktivitesi gibi özellikler NP'lerin toksikolojik profillerini belirlemektedir. Her alanda insanoğlunun hizmetine sunulan NP'lerin etkili ve güvenli kullanılabilmesi için karakterizasyon çalışmalarının yapılmasına özen gösterilmeli ve NP'lerin özellikleri iyi belirlenmelidir (Hall vd., 2007). İlk aşamada NP'nin karakterizasyon çalışmaları UV-Vis spektroskopisi, FT-IR, XRD ve SEM-EDX analizleri ile yapılmıştır. UV-Vis'i alınan $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$ 'nin küçük enerji bandı boşluğuna bağlı olarak görünür bölgede ışığı absorbe etme kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. SEM-EDX analizleri ile NiFe_2O_4 NP'lerinin küçük küresel parçacıklarının mikrometrik agregasyon içerdiği gözlenmiştir. XRD spektrumunda gözlenen piklerin şiddetleri ve pozisyonları kübik spinel kristal yapıya sahip $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{NP}$ 'nin JCPDS 86-2267 ve 74-2081 kart numaralarıyla iyi uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. SEM ve XRD ile hesaplanan gerçek parçacık boyutunun ortalama 30nm olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca ATR-FTIR spektrumları alındığında 562 ve 421cm^{-1} 'de gözlenen şiddetli IR bandlarının

NiFe₂O₄NP'nin kristal örgüsündeki sırasıyla tetrahedral ve oktahedral alanlardaki (Fe↔O) gerilmelerinden kaynaklandığı bulunmuştur.

NP karakterizasyonunun, biyolojik sistemlerde NP'lerin potansiyel toksisitesinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Powers vd., 2006). NP'lerin potansiyel toksisitesi ve davranışları, partikül sayısı, yükü, boyut ve boyut dağılımı, kimya ve reaktivitesi, yüzey alanı, yapı ve şekli ile agregasyon durumu ve elemental kompozisyonu gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018).

Hücre sinyal yollarının çoğunun ve insan hastalık genlerinin %60'ından fazlası meyve sineği genleri ile homolog olması fizyolojik sinyallere verilen sinek tepkisinin insanlarla karşılaştırılabilir olduğunu göstermektedir (Schneider, 2000; Marsh and Thompson, 2006). Ayrıca, nanomateryal maruziyeti ile ilişkili potansiyel toksisite ve genotoksisite çalışmaları için faydalı bir *in vivo* model organizma olarak uzun yıllardan bu yana kullanılan *Drosophila*'nın iyi bir model olduğu kanıtlanmıştır (Leeuw vd., 2007; Liu vd., 2009; Posgai vd., 2009).

İkinci aşama olarak NiFe₂O₄NP'nin *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde olası toksik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, *D. melanogaster*'in transheterozigot larvalarına farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100, 200 ve 500µg/mL) NiFe₂O₄NP uygulanarak yaşama yüzdesi deneyleri yapılmıştır. Bu çalışmamız sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak kontrol gruplarına göre hayatta kalış oranının azaldığı gözlenmiştir. Daha önce Nas ve Çolak (2016) tarafından *D. melanogaster*'in Oregon soyuna ait larva ve ergin bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada, 25, 50, 75, 100, 200 ve 500µg/mL NiFe₂O₄NP dozları uygulanarak meyve sineklerinin yaşama yüzdesi ve yavru birey sayıları incelenmiştir. NiFe₂O₄NP'nin tüm konsantrasyonlarında kontrol gruplarına göre yaşam yüzdesi ve yine konsantrasyon artışına bağlı olarak F₁ neslinde gözlenen yavru birey sayısının kontrol grubuna göre azaldığı ve artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak NP'nin sitotoksik etkisinin arttığı gözlenmiştir.

Son aşamada, *D. melanogaster*'in dişi *flr*³ ve erkek *mwh* soyları kullanılarak yapılan çaprazlama sonrası elde edilen 72±4 saatlik transheterozigot larvalar, larval toksisitesi gösterilen NiFe₂O₄NP'nin 25, 50, 75, 100 ve 200µg/mL dozlarına maruz bırakılmıştır.

Ökaryotik *in vivo* bir test olan ve heterozigotluğun kaybı esasına dayanan SMART yöntemiyle NiFe₂O₄NP'nin kanat imajinal disk hücrelerinde oluşturduğu genetik değişimler (nokta mutasyonları, delesyonlar, ayrılmama ve rekombinasyon), mutant trikomların oluşması ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. Artan NiFe₂O₄NP konsantrasyonuna bağlı olarak tüm uygulama gruplarında hem normal hem de serrat kanat fenotipli bireylerin kanat hücrelerinde gözlenen klon sayılarında kontrole göre anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir.

Literatür taraması yapıldığında bizim bu sonuçlarımızı destekleyecek toksisite ya da mutajenite çalışmaları olduğu kadar farklı sonuçlara da rastlanılmıştır. Farklı tipte NP'lere maruziyetten doğan toksisite, hücresel alım, ROS üretimi, pigmentasyonda zayıflık, morfolojik bozukluklar, gen ifadesinde değişiklikler ve genotoksisite çalışmaları bulunmaktadır. NP'lerin organizmalara olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için yuvarlak solucanlar olan *Caenorhabditis elegans* (Chatterjee vd., 2014), su piresi olan *Daphnia magna* (Santo vd., 2014), Zebra balığı olan *Danio rerio* (Dedeh vd., 2015) ve meyve veya sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* (Panchal ve Tiwari, 2017) gibi farklı *in vivo* model organizmalarda çalışmalar yapılmaktadır.

Karbon nanomalzemelerini test etmek için *Drosophila*'nın larvalar ve ergin bireyleri kullanılmış ve NP maruziyetinin neden olduğu etkilerin hem maruz kalma yoluna hem de materyal agregasyon durumuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2009). ZnOTiO₂NP'nin *Drosophila melanogaster*'in dişi ve erkek bireylerinde ömür uzunluğunu önemli bir oranda azalttığı tespit edilmiştir (Atıcı, 2016). Altın nanopartikülüne maruz kalan *Drosophila*'da AuNP'nin pek çok doku ve organa yayıldığı, yaşam süresini ve eşeyssel verimliliği oldukça önemli bir oranda azalttığı (Pompa vd., 2011), *Drosophila* embriyolarında ölüme yol açtığı (Vega-Alvarez vd., 2014), gen ekspresyonunda düzensizliklere (Vecchio vd., 2012b) ve fenotipik bozukluklara (Vecchio vd., 2012a) neden olduğu gözlenmiştir.

Fe₂O₃NP'nin (<50nm, <100nm ve iyonik; 1-10mM) muhtemel genotoksik etkisi *D. melanogaster*'de SMART ve Allium test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Fe₂O₃NP'nin <50nm boyutunun <100nm boyutu ve iyonik formuna göre genotoksisiteyi indüklediği gözlenerek NP ve iyonik formu kıyaslandığında küçük boyutlu ve geniş yüzeye sahip olan maddelerin daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır (Kaygısız, 2016).

Bir metal oksit olan seryum oksit nanoparçacıklarının (CeO₂NP) paraquat herbisitine karşı kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada, kültürü yapılan sıçan beyin hücrelerinin ömrünü arttırdığı, enflamatuar hücre aktivasyonunu ve korunmuş nöronal fonksiyonu azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, *in vivo* olarak *Drosophila melanogaster*'de parakuat ile birlikte serbest radikal temizleyici işlevi yaparak ömür uzunluğunda pozitif etki gösterdiği de tespit edilmiştir (Strawn vd., 2006).

Yapılan farklı çalışmalarda NiFe₂O₄NP ve türevlerinin sitotoksitesi gösterilmiştir. 0-100µg/mL konsantrasyon aralığında NiFe₂O₄ nanokompoziti (21nm) ile yapılan bir çalışmada, NiFe₂O₄NP A549 hücrelerinde sitotoksitesite ve oksidatif strese neden olduğu, 5-25µg/mL konsantrasyon aralığında ise artan NiFe₂O₄NP dozuna bağlı olarak HepG2 ve MCF-7 hücre hatlarında sitotoksitesiteye neden olduğu ortaya konmuştur (Ahamed vd., 2011; Ahamed vd., 2015). Yine Amiri vd., (2018) tarafından U87-SH-SY5Y gibi farklı kanserli hücre hatlarında NiFe₂O₄NP toksisitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada NiFe₂O₄NP'nin sitotoksitesiteye yol açarak tümörlü dokularda antiproliferatif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

HeLa hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, koloni oluşturma ve hücre canlılığı deneyleri ile 10-100µg/mL Fe₃O₄ (20-30nm), ZnFe₂O₄ (15-30nm) ve NiFe₂O₄ (20-30nm) nanopartiküllerinin toksisitesi araştırılmıştır. Fe₃O₄NP'nin HeLa hücrelerine biyoyumlu olduğu; ZnFe₂O₄ ve NiFe₂O₄NP'lerin ise 7 günlük koloni sayılarını karşılaştırılarak sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir (Tomitaka vd., 2009).

Aralarında NiFe₂O₄NP'nin (<50nm) bulunduğu 31 farklı NP'nin teratojenik etkisinin Zebra balığının (*Danio rerio*) embriyo ve larvaları üzerinde araştırıldığı bir çalışmada ise NP'lerinin malformasyonların yanı sıra kuluçka sürelerinde uzama gibi akut toksik etkilere sebep olmasna rağmen 400-1600mg/mL konsantrasyon aralığında NiFe₂O₄NP'ye maruz kalan balıklarda hiçbir malformasyona rastlanmadığı ancak 96 saat sonra konsantrasyon artışına bağlı olarak embriyonal toksisite artış gözleendiği

tespit edilmiştir (Kovrižnych vd., 2013). Benzer şekilde, Zhu vd., (2012) başka bir metal oksit olan demir oksit NP'lerinin (Fe_2O_3) sucul organizmalar üzerindeki ekolojik etkilerini incelerken, zebra balıklarının (*Danio rerio*) erken yaşam evrelerini kullanarak ≥ 10 mg/L demir oksit NP'lerin bu embriyolarda gelişimsel toksisiteye, ölüme, kuluçka süresinde gecikmeye ve malformasyona neden olduğunu göstermiştir.

He vd., (2011) tarafından metal oksit NP'ler arasında yer alan manyetik γ - Fe_2O_3 NP'lerinin *E. coli*'de mutasyon sıklığını artırıp protein ve DNA yapısında değişime sebep olduğu gösterilmiştir. Süper paramanyetik demir oksit NP'lerinin tetrazolyum testleri ile *in vitro* toksisite deneylerinde hücre canlılığı bakımından çok düşük (<%40 hücre canlılığı) bir toksisiteye sebep olduğu (Mahmoudi vd., 2009); yine sıçan karaciğer ve böbrek hücrelerinde 1mL/kg FeO (7,5nm) süper paramanyetik demir oksit NP'lerin herhangi toksisitesine rastlanmadığı bulunmuştur (Popa vd., 2016).

Benzer şekilde, insan akciğer epitel hücre hattında (A549) farklı boyutlardaki birçok metal oksitin toksisitesi hücre ölümü, mitokondriyal hasar, DNA hasarı ve oksidatif DNA lezyonlarına neden olma yönünden incelediğinde çok yüksek toksisiteye sahip olmadıkları, toksisitenin NP'nin kimyasal kompozisyonuna göre değişiklik gösterdiği ve ayrıca her NP'nin toksisitesinin boyuta göre farklılık gösterip küçük boyutlu olanların daha da toksik olabileceği belirtilmiştir (Karlsson vd., 2009). Yine, farklı metal oksit parçacıkları (CuO, TiO_2 , ZnO, $CuZnFe_2O_4$, Fe_3O_4 , Fe_2O_3) ile A549 hücre hatlarında yapılan çalışmada, CuO NP'leri sitotoksosite ve DNA hasarı bakımından en yüksek toksisiteye sahipken, demir oksit partiküllerinde (Fe_3O_4 ve Fe_2O_3) toksisitenin ya hiç görülmediği ya da çok düşük toksisiteye sebep olduğu tespit edilmiştir (Karlsson vd., 2008). Farelere bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan bir kemoterapik ajan olan daunorubicin ile birlikte Fe_3O_4 NP verilerek tedavi grupları ile aralarında vücut ağırlığında anlamlı bir fark gözlenmeyen akut toksikolojik bir çalışmada, mikronükleus testi ile değerlendirilen karaciğer ve böbrek hücrelerinde de herhangi bir toksisite saptanmayarak NP'nin iyi bir biyouyumluluğa sahip olduğu ve hedeflenen tümör tedavisi için faydalı olabileceği belirtilmiştir (Wu vd., 2010). İlaç dağılım sisteminde kullanılan 73 ± 3 nm γ - Fe_2O_3 manyetik albümin nanosferin *Swiss mouse* kemik iliği eritrositlerinde genotoksisitesinin mikronükleus testi ile araştırıldığı çalışma sonucu

toksik etkili olmayıp *in vivo* biyoyumluluk sağladığı görülmüştür (Estevanato vd., 2011). Fe₂O₄ (27±8nm-156±82µm) ve Fe₂O₃ (35±14nm- 147±48µm) NP'lerinin genotoksisitesinin *Syrian hamster* türü embriyo hücrelerinde Comet ve mikronükleus testleriyle araştırması sonucunda toksik etkili olmadığı görülmüştür (Guichard vd., 2012).

Fe₂O₃ (29,75±1,87nm – 2,13±4,15µm) genotoksisitesinin *Wistar rat* türünün lökosit, PBL, kemik iliği gibi hücre hatlarında Comet, MN ve KA testleri sonucu biyoyumlu olduğuna değinilmiştir (Singh vd., 2013). Glutamik asit kaplı (Fe₂O₃-15nm) NP'nin sitotoksisite ve genotoksisitesinin *Chinese hamster* türü akciğer hücrelerinde Comet ve MN test sonuçlarının negatif çıktığı gözlemlenmiştir (Zhang vd., 2012).

İnsan lenfositleri üzerinde dört farklı NP'nin (Co₃O₄, Fe₂O₃, SiO₂ ve Al₂O₃NP) karşılaştırmalı *in vitro* sitotoksisitesi ve genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 saatlik maruziyet sonrası doz artışına bağlı olarak SiO₂ ve Al₂O₃NP'nin hücre canlılıkta azalmaya ve hücre lenf hasarına yol açtığı; diğer tüm NP'lerle karşılaştırıldığında en az DNA hasarını Al₂O₃NP'lerin gösterdiği; 100µg/mL Co₃O₄ ve Fe₂O₃NP maruziyetinin kromozomal sapmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insan lenfositlerinde DNA hasarına ve kromozomal bozulmaya NP maruziyeti sonrası oluşan antioksidan seviyesindeki değişimin neden olduğu ifade edilmiştir (Rajiv vd., 2016).

NP'lerin toksisite ve genotoksisite çalışmalarında *Drosophila* model organizma olarak kullanılmaktadır. Somatik mutasyon ve stres ile ilişkili genlerin ekspresyonunda artış, oksidatif stres ve DNA hasar etkisi gözlenen bu çalışmalar arasında gümüş (Ag) (Demir vd., 2011), çinko (Zn) (Alaraby vd., 2015a), kobalt (Co) (Vales vd., 2013), sentetik amorf silika (SAS, SiO₂) (Demir vd., 2015), titanyum (Ti), zirkonyum (Zr) ve alüminyum (Al) (Demir vd., 2013), karbon bazlı materyaller (CNTs) (de Andrade vd., 2014), bakıroksit (CuO) (Alaraby vd., 2016), seryum (Ce) (Alaraby vd., 2015c), ve kuantum zerrecikleri (QDs) (Brunetti vd., 2013; Alaraby vd., 2015b) yer almaktadır.

Demir (2016) tarafından NP ile canlılar arasındaki etkileşimin altında yatan moleküler mekanizmanın halen tam olarak anlaşılmamış olduğu, NP'lerin toksisite ve biyoyumluluklarının canlılık, doğurganlık ve ROS gibi pek çok parametrele

bakımından değişkenlik gösterebildiği ifade edilmiştir. NP'lerle oluşacak genetik hasarın karsinogeneze yol açabileceği düşünülürse, NP'lerin olası epigenetik etkilerini ve etki mekanizmalarını anlayabilmek için, hücre döngüsü ve DNA tamiri konularını da kapsayan detaylı *in vivo* ve *in vitro* sitotoksisite ve genotoksisite araştırmalarının yapılması insan sağlığı bakımından önem arz etmektedir.

Toksisite testlerin güncel olmaması, testte kullanılan negatif ve pozitif kontrol gruplarının NP'lere uygun olmaması, NP karakterizasyon çalışmalarının iyi yapılmaması, aynı karakterizasyon yapısına sahip NP'lerle çalışılmaması, ortak kültürlerde çalışılmaması, farklı kültür veya hücre hatlarının farklı cevap oluşturması, uygun kültüre göre uygun dozlarla çalışılmaması, NP'lerin primer hasarı üzerinde durulup, sekonder ve uzun vadedeki olası hasarların araştırılmaması, NP'lerin doğaya vereceği etkilerinden çok ekonomik getiriye önem verilmesi NP'lerin toksisitesiyle ilgili yapılan çalışmaların birbiriyle zıtlık oluşturmasının nedenleri arasında gösterilmektedir (Doak vd., 2009-2012; Donaldson vd., 2009-2010; Griffiths vd., 2011; Warheit ve Donner, 2010).

20 yıldır NP'lerin toksik etkilerinin araştırılmasına rağmen sonuçların çelişkili olması test yöntemlerinin güvenilirliğini sorgular hale getirmiştir. Uygulanan testlerdeki pozitif ve negatif kontrol gruplarının NP'lere eşdeğer olmaması, kullanılan NP'ler aynı olsa bile küçük karakterizasyon farkları çok farklı sonuçlar çıkarması, her kültür ve hücrenin hassasiyetinin ve DNAtamiri yeteneğinin birbirinden farklı olması bu çelişikliğin doğmasına sebep olmuştur. Bundan dolayı NP'lerin toksik etkilerinin tam belirlenebilmesi için uluslararası çalışma ve işbirliği gerçekleştirilerek yukarıda sayılan olumsuzlukları giderilerek uygun bir yöntem belirlenmeli veya hali hazırda kullanılan yöntemler NP'lere göre güncelleştirilmelidir.

Yeni teknolojilerin üretime hız kazandırdığı bu çağda, çeşitli NP'lerin üretimi ve farklı testlerden ve standartlardan geçirilmeden piyasaya sürülmesinin kaçınılmaz sonuçları olacaktır. NP'lerin üretimi ve kullanımının yaygınlaştırılmasının belli kriterlere göre yapılmasını, ekosistemler üzerinde kalıcı ve yıkıcı etkiye sahip olan NP'lerin üretiminin önüne geçilmesini ya da sınırlandırılmasını kontrol eden ve denetleyen kurumlar ve kanunlar oluşturulmalıdır. Böylelikle insanoğlu, yapay moleküllerin doğa üzerindeki yıkıcı etkilerini azaltarak önlemiş olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A. and Alrokayan, S. A. (2015) "Comparative cytotoxic response of nickel ferrite nanoparticles in human liver HepG2 and breast MFC-7 cancer cells" ,*Chemosphere*, 135,278-88.
- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Siddiqui, M. A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., AlSalhi, M. S. and Alrokayan, S. A. (2011) "Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells", *Toxicology*, May 10,283(2-3),101-8.
- Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Alam, J., Khan, M. A., Ali, D. and Alarafi, S. (2013) "Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines", *Current Pharmaceutical Design*, 19(37), 6681–90.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hus-sain, S. M. and Rowe, J. J. (2010) "Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242, 263-269.
- Ahmed, A. D., Mohammed, K. H., Soo B. L., Kyeongseok K., Subbroto K. S., Gwang-Mo Y., Hye Y. C. and Ssang-Goo C. (2017) "The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles", *Published in International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 120.
- Alaraby, M., Annangi, B., Hernandez, A., Creus, A. and Marcos, R. (2015a) "A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model", *Journal of Hazardous Materials*, 296, 166-174.
- Alaraby, M., Demir, E., Hernandez, A. and Marcos, R. (2015b) "Assessing potential harmful effects of CdSe quantum dots by using *Drosophila melanogaster* as *in vivo* model", *Sciences of the Total Environment*, 530, 66-75.
- Alaraby, M., Hernandez, A. and Marcos, R. (2016) "New insights in the toxic/genotoxic effects of CuO nanoparticles in the *in vivo Drosophila* model", *Nanotoxicology*, 10(6), 749-60.
- Alaraby, M., Hernández, A., Annangi, B., Demir, E., Bach, J., Rubio, L., Creus, A. and Marcos, R. (2015c) "Antioxidant and antigenotoxic properties of CeO₂ NP. Studies with *Drosophila melanogaster* as a promising *in vivo* model", *Nanotoxicology*, 9(6), 749-59.
- Amiri, M., Pardakhti, A., Ahmadi, Z. M., Akbari, A. and Salavati, N. M. (2018) "Magnetic nickel ferrite nanoparticles: Green synthesis by *Urtica* and therapeutic effect of frequency magnetic field on creating cytotoxic response

in neural cell lines” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 244-253.

- Andrade, L. R., Brito A. S., Melero, A. M., Zanin, H., Ceragioli H. J., Baranauskas, V., Cunha, K. S. and Irazusta, S. P. (2014) “Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila wing-spot* test and *Allium cepa* test”, *Ecotoxicol and Environmental Safety*, 99, 92-97.
- Atıcı, T. (2016) “*Drosophila melanogaster*’de ZnOTiO₂ nanokompozitinin *in vivo* toksik potansiyeline karşı oleuropein’in kullanılması”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan, 62-63.
- Atlı, Ş. Z. (2013) “Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt- krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70 (1), 33-42.
- Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M. A., Chaneac, C., Waite, D. T., Masion, A., Woicik, J. C., Wiesner, M. R. and Bottero, J. Y. (2008) “Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*”, *Environmental Science & Technology*, 42, 6730–6735.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc J. L. and Botta, A. (2006) “*In vitro* interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study”, *Environmental Science & Technology*, 40, 4367–4373.
- Bakand, S., and Hayes, A. (2016) “Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles”, *International journal of molecular sciences*, 17(6), 929.
- Bernards, A. and Hariharan, I. K. (2001) “Of flies and men- studying human disease in *Drosophila*”, *Current Opinion in Genetics & Development*, 11, 274-278.
- Bier, E. (2005) “*Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics”, *Nature Reviews Genetics*, 6, 9-23.
- Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengo, R., Galeone, A., Malvindi, M. A., Vecchio, G., Cingolan, R., Nadeau, J. L. and Pompa, P. P. (2013) “InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/Shell quantum dots: *in vitro* and *in vivo* toxicity assessment”, *Nanoscale*, 5, 307-317.
- Carmona, E. R., Inostroza-Blancheteau, C., Rubio, L. and Marcos, R. (2015b) “Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*”, *Mutation Research*, 791, 1-11.
- Carmona, E. R., Escobar, B., Vales, G. and Marcos, R. (2015a) “Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the

Comet assay in *Drosophila*”, *Mutation Research*, 778, 12-21.

- Chatterjee, N., Eom, H. J. and Choi, J. (2014) “Effects of silver nanoparticles on oxidative DNA damage-repair as a function of p38 MAPK status: A comparative approach using human Jurkat T cells and the nematode *Caenorhabditis elegans*”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55, 122-133.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y. and Jia, G. (2006) “Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*”, *Toxicology Letters*; 163, 109-20.
- Cunney, H. and Hodgson, E. (2004) “Toxicity Testing” A Textbook of Modern Toxicology, 3. Edition, *John Wiley & Sons*, ABD, 3, 351-397.
- Çakır, Ş. (2004) “Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*’in yaşama yüzdesi üzerine etkisi”, *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3), 71-80.
- Çalışkan, M., ve Kocaman, Y. (2002) “*Drosophila* Biyolojisi”, *Drosophila Genetiği, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi*, Hatay , 5-8.
- Dağlıoğlu, Y. ve Yılmaz H. Ö. (2018) “Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksosite Deneylerindeki Önemi”, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1), 1-17.
- Dedeh, A., Ciutat, A., Treguer-Delapierre, M. and Bourdineaud, J. P. (2015) “Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment”, *Nanotoxicology*, 9, 71-80.
- Demir, E. (2016) “Nanomateriyallerin toksisite ve genotoksosite çalışmalarında bir *in vivo* model organizma olarak *Drosophila melanogaster* (meyve sineği)’in kullanılması”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9 (1), 1-11.
- Demir, E., Aksakal, S., Turna, F., Kaya, B. ve Marcos, R. (2015) “*In vivo* genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silica nanoparticles in *Drosophila melanogaster*”, *Journal of Hazardous Materials*, 283, 260-266.
- Demir, E., Turna, F., Vales, G., Kaya, B., Creus, A. ve Marcos, R. (2013) “*In vivo* genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*”, *Chemosphere*, 93 (10), 2304-2310.
- Demir, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A. ve Marcos, R. (2011) “Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*”, *Nanotoxicology*, 5(3), 417-424.
- Doak, S. H., Griffiths, S. M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P. M., Brown, A. P. and Jenkins, G. J. (2009) “Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology”, *Mutagenesis*, 24(4), 285-93.

- Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S. and Singh, N. (2012) “*In vitro* genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines”, *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 745, Issues 1–2, Pages 104-111.
- Doğan, E. (2008) “Bazı Flavanoidlerin *Drosophila melanogaster*’de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması”, Doktora tezi, *İnönü Üniversitesi*, Malatya.
- Donaldson, K., Borm, P. J. A., Castranova, V. and Gulumian, M. (2009) “The limits for testing particle-mediated oxidative stress *in vitro* in predicting diverse pathologies; relevance for testing nanoparticles”, *Particle and Fibre Toxicol*, 6, 13.
- Donaldson, K., Poland, C. A. and Schins, R. P. (2010) “Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies”, *Nanotoxicology*, 4, 414-20.
- Dreher, K. L. (2004) “Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles”, *Toxicological Sciences*, 77, 3-5.
- Dwivedi, S., Siddiqui, M. A., Farshori, N. N., Ahamed, M., Musarrat, J. and Al-Khedhairy, A. A. (2014) “Synthesis, characterization and toxicological evaluation of iron oxide nanoparticles in human lung alveolar epithelial cells” *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 209-215.
- Entekno. “Nano Malzemeler”, <http://www.enteknomaterials.com/nano-malzemeler>
Son erişim tarihi: 22.04.2019.
- Erci, F. and Khodakovskaya, M. (2013) “Analysis of intracellular localization of *Arabidopsis thaliana* calcium-dependent lipid-binding protein(AtCLB)”. *Conference: Meeting of the Southern Section of the American Society of Plant Biologists*,
- Estevanato, L., Cintra, D., Baldini, N., Portilho, F., Barbosa, L., Martins, O., Lacava, B., iranda-Vilela, A. L., Tedesco, A. C. and Bao, S. (2011) “Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system”, *International Journal Nanomedicine* 6, 1709–1717.
- Evans, S. J., Clift, M. J., Singh, N., de Oliveira, M. J., Burgum, M., Wills, J. W., Wilkinson, T. S., Jenkins, G. J. and Doak, S. H. (2017) “Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity”, *Mutagenesis*, Jan;32(1), 233-241.
- Falakalı, B. (1990) “*Drosophila* Genetiği”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova-İzmir. ss 44.

- Feng, S., Yang, W. and Wang, Z. (2011) "Synthesis of porous NiFe₂O₄ microparticles and its catalytic properties for methane combustion", *Materials Science and Engineering, B*, 176(18), 1509-1512.
- Flecknell, P. (2002) "Replacement, reduction and refinement", *Altex*, 19, 73-78.
- Frei, H. and Würgler, F. E., (1988) "Statistical methods to decide whether mutagenic testdata from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results", *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., et al. (2009) "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes", *Cell Death Differentiation*, 16, 1093-1107.
- Gök, H. (2007) "Fiziksel tıp ve rehabilitasyon uzmanlarının nanoteknolojiden beklentileri", *Türk Fizik Tıp Rehabilitasyon Dergisi*, 53(2), 13-7.
- Graf, U. and Rincon, J. G. (1995). "*Drosophila melanogaster* somatic mutation andrecombination test as a biomonitor", *Plenum Press*, New York, pp. 169-179.
- Graf, U., Van, S. N. and Würgler, F. E. (1992) "*Drosophila* Genetics", A Pratical course, *Springer-Verlag Press*, 0 387 57327 9, New York, pp. 236.
- Graf, U., Wrügler, 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.
- Griffiths, S. M., Singh, N., Jenkins. G.J., Williams, P. M., Orbaek, A. W., Barron, A. R., Wright, C. J. and Doak, S. H. (2011) "Dextran coated ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles: compatibility with common fluorometric and colorimetric dyes", *Analytical Chemistry*, 15,83(10), 3778-85.
- Gubbins, E.J., Batty, L. C. and Lead, J. R. (2011) "Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L", *Environ Pollut*, 159(6), 1551-1559.
- Guichard, Y., Schmit, J., Darne, C., Gaté, L., Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R., Witschger, O., Martin, A., Fierro, V. and Binet, S. (2012) "Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in *Syrian hamster* embryo cells", *Annals of Occupational Hygiene*, 56(5), 631-44.
- Gupta, J. (2011) "Nanotechnology applications in medicine and dentistry", *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2, 81-88.
- Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., McNeil, S. E. (2007) "Characterization of nanoparticles for therapeutics", *Nanomedicine (Lond)*, 2(6), 789-803.

- Handy, R. D., Owen, R. and Valsami-Jones E. (2008) “The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs”, *Ecotoxicology*, 17, 315-325.
- Hanna, S. K., Miller, R. J., Muller, E. B., Nisbet, R. M. and Lenihan, H. S. (2013) “Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the individual performance of *Mytilus galloprovincialis*”, *Plos One*, 8(4), e61800.
- Hao, L.H., Chen, L., Hao, J. M., Zhong, N. (2013) “Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 52-60.
- He, S., Feng, Y., Gu, N., Zhang, Y. and Lin, X. (2011) “The effect of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on *Escherichia coli* genome”, *Environmental Pollution*, 159(12), 3468- 3473.
- Henderson, D.S. (2004) “*Drosophila* Cytogenetic Protocols”, *Humana Press*, p 389.
- Huang, Y., Mao, K., Zhang, B. and Zhao, Y. (2017) “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics”, *Materials Science Engineering C Materials for Biological Applications*, 70 (Pt 1), 763-771.
- Jena, G.B., Kaul, C.L. and Ramarao, P. (2001) “Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines”, *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 86-99.
- Jennings, B. H. (2011) “*Drosophila*-a versatile model in biology & medicine”, *Mater Today*, 14, 190-195.
- Kandibanda, S. R., Gundeboina, N., Das, S. and Sunkara, V. M. (2018) “Synthesis, characterisation, cellular uptake and cytotoxicity of functionalised magnetic ruthenium (II)polypyridine complex core-shell nanocomposite”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 178, 270-276.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Moller, L. (2008) “Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes”, *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1726-1732.
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. and Moller, L. (2009) “Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano and micrometer size”, *Toxicology Letters*, 188, 112-118.
- Kavaz, D. (2011), “Nanopartiküller”, *Nanobülten*, 13, 12-13.
- Kaya, B., (2000). “Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması”, (Doktora Tezi), *Akdeniz*

Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 40-45.

- Kaygısız, Ş. Y. (2016) “Farklı boyutlardaki Fe₂O₃ nanopartiküllerinin genotoksik potansiyellerinin *Drosophila melanogaster* somatik hücreleri ve allium test yöntemi ile araştırılması”, Doktora tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.*
- Kovrižnych, J. A., Sotníková, R., Zeljenková, D., Rollerová, E., Szabová, E. and Wimmerová, S. (2013) “Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages–comparative study”, *Interdisciplinary toxicology*, 6(2), 67- 73.
- Köçkar, F., Türkoğlu Aydoğan, S., ve Aydın, M., (2009) “Oleuropein’in Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve hepatoma (HEP3B) kanser hücrelerinde anti-tümör etkisinin belirlenmesi” *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(2), 185- 190.
- Kurtoğlu, E. L. (2010) “Takrolimus’un genotoksik etkilerinin araştırılması”, Yüksek lisans tezi, *İnönü Üniversitesi, Malatya.*
- Kuzma, J. and Priest S. (2010) “Nanotechnology, risk, and oversight: learning lessons from related emerging Technologies” *Risk Analysis*, 30(11), 1688-1698.
- Landsiedel, R., Kapp, M. D., Schulz, M., Wiench, K. and Oesch, F. (2009) “Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answers”, *Mutation Research*, 681(2–3), 241- 258.
- Lee, W. M. and An, Y. J. (2013) “Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation”, *Chemosphere* 91(4), 536-544.
- Leeuw, T.K., Reith R. M, Simonette R. A, Harden, M., Cherukuri, P., Tsyboulski, D. A., Beckingham, K. M. and Weisman, R. B. (2007) ”Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: Near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila*”, *Nano Letters*,7(9), 2650–2654.
- Lehn, J. M. (2002), “Toward self-organization and complex matter”, *Science*; 295, 2400-2403.
- Lewis, E. B. and Bacher, F. (1968) “ Methods of feeding Ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males”, *Drosophila Information Service*, 43, 193.
- Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R. H. and Rand, D. M. (2009) “Differential toxicity of carbon nanomaterials in *Drosophila*: larval dietary uptake is benign, but adult exposure causes locomotor impairment and mortality”, *Environmental Science Technology*, 43, 6357-6363.
- Lloyd, T. E. and Taylor, J. P. (2010) “Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease”, *Annals of the New York Academy of Sciences*,

1184, e1-20.

- Machado, N. M., Lopes, J. C., Saturnino, R. S., Fagan, E. B. and Nepomuceno, J. C. (2013) "Lack of mutagenic effect by multi-walled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*", *Food and Chemical Toxicology*, 62, 355-360.
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S. and Stroeve, P. (2009) "Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(2), 510- 518.
- Maqsood A., Mohd, J. A., Maqsood, A., Siddiqui, J. A., Javed, M., Abdulaziz. A. K., Mohamad, S. A. and Salman A. A. (2011) "Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells", *Toxicology*, Volume 283, Issues 2-3, Pages 101-108.
- Maqsood, A., Mohd Javed Akhtar, Mohd Jamed Akhtar, Hisman A., Alhadlaq, M.A. and MajeeKhan, Salman A. A. (2015) "Comparative cytotoxic response of nickel ferrite nanoparticles in human liver HepG2 and breast MFC-7 cancer cells", *Chemosphere*, 135 , 278-288.
- Marsh J. L. and Thompson, L. M. (2006) "*Drosophila* in the study of neurodegenerative disease", *Neuron*, 52, 169-178.
- Maruthapandian, V., Muralidharan, S. and Saraswathy, V. (2016) "Spinel NiFe₂O₄ based solid state embeddable reference electrode for corrosion monitoring of reinforced concrete structures", *Construction and Building Materials*, 107, 28-37.
- Mujahid, M., Khan, R. U., Mumtaz, M., Soomro, S. A. and Ullah, S. (2019) "NiFe₂O₄ nanoparticles/MWCNTs nanohybrid as anode material for lithium-ion battery", *Ceramics International*, 45(7), 8486-8493.
- Nas, B., ve Çolak, D. A. (2016) "NiFe₂O₄ Nanokompozitinin olası toksik etkisine karşı olueropein'in koruyucu rolü" *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9. Özel Sayı I, 172-183.
- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S. (1988) "The genotoxicity of N4-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test", *Mutagenesis*, 3(1), 11-13.
- Olanow, C. W. (2004) "Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012, 209-23.
- Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L. and Dewez, D. (2013) "Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4), 902-907.
- Özdoğan, M. "Nanoteknoloji, Nanotıp Nedir- Kısaca- Kullanım Alanları ve Örnekler", <https://www.drozdogan.com/nanoteknoloji-nanotip-ve->

- Panchal, K., and Tiwari, A. K. (2017) “*Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 1331-1345.
- Parlak, H., Arslan, Ö. Ç., Boyacıoğlu, M. ve Karaaslan, M. A. (2011) “Ekotoksikoloji”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, İzmir, s.339.
- Pinheiro, T., Moita, L., Silva, L., Mendonca, E. and Picado, A. (2013) “Nuclear microscopy as a tool in TiO₂ nanoparticles bioaccumulation studies in aquatic species”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 306, 117-120.
- Pompa, P. P., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Sabella, S., Maiorano, G., Falqui, A., Bertoni, G. and Cingolani, R. (2011) “*In vivo* toxicity assessment of gold nanoparticles in *Drosophila melanogaster*”, *Nano Research*, 4, 405-413.
- Popa, C. L., Prodan, A. M., Ciobanu, C. S. and Predoi, D. (2016) “The tolerability of dextran-coated iron oxide nanoparticles during *in vivo* observation of the rats”, *General Physiology and Biophysics*, 35(3), 299- 310.
- Posgai, R., Ahamed, M., Hussain, S. M., Rowe, J. J. and Nielsen, M. G. (2009) “Inhalation method for delivery of nanoparticles to the *Drosophila* respiratory system for toxicity testing”, *Science of the Total Environment*, 408(2),439–443.
- Powers, K.W., Brown, S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M. and Roberts, S.M. (2006) “Research Strategies For Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation”, *Toxicological Sciences*, 90(2), 296-303.
- Rahmayeni, S., Zulhadjri, Z., Jamarun, N., Emriadi, E., and Arief, S. (2016) “Synthesis of ZnO-NiFe₂O₄ magnetic nanocomposites by simple solvothermal method for photocatalytic dye degradation under solar light”, *Oriental Journal of Chemistry*, 32, 1411-1419.
- Rajiv, S., Jerobin, J., Saranya, V., Nainawat, M., Sharma, A., Makwana, P., Gayathri, C., Bharath, L., Singh, M., Kumar, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2016) “Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes *in vitro*”, *Human & Experimental Toxicology*, 35(2), 170-183.
- Reis, E. M., Rezende, A. A., Santos, D. V., Oliveria, P. F., Nicolella, H. D., Tavares, D.C., Silva, A. C., Dantas, N. O. and Spano, M. A. (2015) “Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources

(amorphous and nanoparticles) using the *in vitro* micronucleus test and the *in vivo* wing somatic mutation and recombination test”, *Food and Chemical Toxicology*, 84, 55-63.

- Riss, T. L., Moravec, R. A., O’Brien, M. A., Hawkins, E. M. and Niles, A. (2006) “Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis”, Handbook Of Assay Development In Drug Discovery, Ed: Minor L. K., *CRC Press*, Florida, USA. Chapter 28, 385-406.
- Rizki, M., Kossatz, E., Velazquez, A., Creus, A., Farina, M., Fortaner, S., Sabbioni, E. and Marcos, R. (2006) “Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethyl arsenic acid in the *Drosophila* wing spot test”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 162-168.
- Rubin, G. M. and Lewis, E. B. (2000) “A brief history of *Drosophila*’s contributions to genome research”, *Science*, 287, 2216-2217.
- Sagadevan, S., Chowdhury, Z. Z., and Rafique, R. F. (2018). Preparation and characterization of nickel ferrite nanoparticles via co-precipitation method. *Materials Research*, 21(2), e20160533.
- Salavati-Niasari, M., Davar, F. and Mahmoudi, T. (2009) “A simple route to synthesize nanocrystalline nickel ferrite (NiFe₂O₄) in the presence of octanoic acid as a surfactant”, *Polyhedron*, 28(8), 1455-1458.
- Santo, N., Fascio, U., Torres, F., Guazzoni, N., Tremolada, P., Bettinetti, R., Mantecca, P. and Bacchetta, R. (2014) “Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter?”, *Water Research*, 53, 339-350.
- Schins, R. P., Duffin, R., Höhr, D., Knaapen, A. M., Shi, T., Weishaupt, C., Stone, V., Donaldson, K. and Borm, P. J. (2002) “Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells”, *Chemical Research in Toxicology*, 15(9), 1166-1173.
- Schmidt G., Decker M., Ernst H. and Fuchs H. (2003), Small dimensions and material properties. *Europäische Akademie Graue Reihe*, In A definition of nanotechnology Bad Neuenahr, Nr 35.
- Schneider, D. (2000) “Using *Drosophila* as a model insect”, *Nature Reviews Genetics*, 1, 218-226.
- Selby, P.B. and Olsen, W.H. (1981) “Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result”, *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Shi, J. Y., Abid, A. D., Kennedy, I. M., Hristova, K. R. and Silk, W. K. (2011) “To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution”, *Environmental*

Pollution 159(5), 1277-1282.

- Shvedova, A. A., Castranova, V., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Murray, A. R. and Gandelsman, V. Z. (2003) "Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells", *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*; 66, 1909-1926.
- Singh, N., Jenkins, G. J. S., Nelson, B. C., Marquis, B. J., Maffei, T. G.G., Brown, A. P., Williams, P. M., Wright, C. J. and Doak, S. H. (2012) "The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles", *Biomaterials*, 33, 163- 170.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., Wright, C. J. and Doak, S. H. (2009) "Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials", *Biomaterials*, 30, 3891-3914.
- Singh, S. P., Rahman, M. F., Murty, U. S. N., Mahboob, M. and Grover, P. (2013) "Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment", *Toxicol and Applied Pharmacology*, 266, 56- 66.
- Song, Y., Li, X. and Du, X. (2009) "Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma", *European Respiratory Journal*, 34, 559-567.
- Stone, V., Johnston, H. And Schins, R. P. (2009) "Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations", *Critical Reviews in Toxicology*, 39(7), 613-626.
- 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(6), A1356-c.
- Syed, S., Zubair, A. and Frieri, M. (2013) "Immune response to nanomaterials: implications for medicine and literature review", *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 50-57.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejja, G. (1983) "Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and sex linked recessive lethal test", *Mutation Research*, 113, 117-133.
- Thrall, J. H. (2004) "Nanotechnology and medicine", *Radiology*, 230, 315-318.
- Tomitaka, A., Hirukawa, A., Yamada, T., Morishita, S. and Takemura, Y. (2009) "Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using *HeLa cells*", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(10), 1482-1484.
- Valencia, R. L., Abrahamson, S., Lee, W. R., Von H. E. S., Woodruff, R. C.,

- Würgler, F. E. and Zimmering, S. (1984) "Chromosomal mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*", ***Mutation Research***; 134, 61-88.
- Vales, G., Demir, E., Kaya, B., Creus, A. and Marcos, R. (2013) "Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in *Drosophila*", ***Nanotoxicology***, 7(4), 462-468.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sabella, S., Cingolani, R. and Pompa, P. P.(2012a) "Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*", ***Nanomedicine***; 8, 1-7.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Sabella, S., Cingolani, R. and Pompa, P. P. (2012b) "Concentration-dependent, size-independent toxicity of citrate capped aunps in *Drosophila melanogaster*", ***PLoS ONE***, 7, e29980.
- Vega-Alvarez, S., Herrera, A., Rinaldi, C. and Carrero-Martinez, F. A. (2014) "Tissuespecific direct microtransfer of nanomaterials into *Drosophila* embryos as a versatile *in vivo* test bed for nanomaterial toxicity assessment", ***International Journal of Nanomedicine***, 9, 2031-2041.
- Vural, N. (2005) "Toksikoloji", ***Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları*** No: 73. Ankara, 659 p.
- Warheit, D. B. and Donner, E. M. (2010) "Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines", ***Nanotoxicology***, 4, 409-413.
- Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A. (2005) "A practical note on the use of cytotoxicity assays", ***International Journal of Pharmaceutics***, 288, 369-376.
- Wheeler, M.R. (1981) "The Drosophilidae: A Taxonomic Overview", *The Genetics and Biology of *Drosophila**, Ed. Ashburner, M., Carsen, H.L., Thompson, J., ***Academic Press Incorporated Limited***, London, 3a, 1-84.
- Wu, W., Chen, B., Cheng, J., Wang, J., Xu, W., Liu, L., Xia, G., Wei, H., Wang, X., Yang, M., et al. (2010). "Biocompatibility of Fe₃O₄/DNR magnetic nanoparticles in the treatment of hepatic malignancies", ***International Journal of Nanomedicine***, 5, 1079- 1084.
- Yamawaki, H. and Iwai, N. (2006) "Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells", ***Circulation Journal***, 70(1), 129- 140.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Ünal, F. (2014) "Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri", ***Gıda***, 39, 179-186.

- Zhang, S., Jiang, W., Li, Y., Yang, X., Sun, P., Liu, F., Yan, X., Gao, Y., Liang, X., Ma, J. and Lu, G. (2019) “Highly-sensitivity acetone sensors based on spinel-type oxide (NiFe_2O_4) through optimization of porous structure”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 291, 266-274.
- Zhang, T., Qian, L., Tang, M., Xue, Y., Kong, L., Zhang, S. and Pu, Y. (2012) “Evaluation on cytotoxicity and genotoxicity of the L-glutamic acid coated iron oxide nanoparticles”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12, 2866- 2873.
- Zhou, T., Zhang, R., Wang, Y. and Zhang, T. (2019) “MOF-Derived 1 D α - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{NiFe}_2\text{O}_4$ heterojunction as efficient sensing materials of acetone vapors”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 281, 885-892.
- Zhu, X, Tian, S. and Cai, Z. (2012) “Toxicity Assessment of iron oxide nanoparticles in Zebra fish (*Danio rerio*) early life stages”, *PLoS ONE*, 7(9), e46286.

EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Nas, B. ve Çolak, D. A. (2016) “NiFe₂O₄ Nanokompozitinin olası toksik etkisine karşı olueropein’in koruyucu rolü”, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9. Özel Sayı I, 172-183

Nas, B. ve Çolak, D. A. (2016) “NiFe₂O₄ Nanokompozitinin olası toksik etkisine karşı olueropein’in koruyucu rolü”, *1st International Mediterranean Science and Engineering Congrss*, Adana, pp. 1745-1745



ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Gümüşhane'nin Kelkit ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Kelkit'te tamamladı. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Öğretmenliği Bölümü'nü kazandı. 2005 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2005 yılında Milli Eğitim Bakanlığına Fen Bilimleri Öğretmeni olarak atandı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Öğretmenlik mesleğinin yanı sıra 2014 yılında kabul edildiği Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

