

**TİTANYUM DİOKSİT VE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
IN VITRO İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2012
ANKARA**

Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ tarafından hazırlanan TİTANYUM DİOKSİT VE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

PROF.DR. FATMA ÜNAL

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma ÜNAL

.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Serkan YILMAZ

.....

Sağlık Bilimleri, Ankara Üniversitesi

Tarih: 22/10/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ

**TİTANYUM DİOKSİT VE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
IN VITRO İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ekim 2012**

ÖZET

Bu çalışmada kullanılan titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂ NP) ve çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO NP) taramalı elektron mikroskopunda küresel yapıda ve 10-300 nm arasında değişen partiküller içerdiği gözlenmiştir. Bu nanopartiküllerin, dinamik ışık saçılımı ile negatif elektrik yüklü ve ortalama hidrodinamik çaplarının TiO₂ NP'nde 804,30±15,06 nm, ZnO NP'nde ise 495,80±51,15 nm ebatlarında olduğu tespit edilmiştir. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için TiO₂ NP'nin 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml'lik, ZnO NP'nin 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. TiO₂ NP kromozom anormallikleri (KA) frekansını 24 saatlik uygulamada en düşük iki konsantrasyonda (20 ve 40 µg/ml) önemli düzeyde artırmış, 48 saatlik uygulamada ise önemli bir artış oluşturmamıştır. ZnO NP, KA frekansını 24 saatlik uygulamada en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 µg/ml), 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde artırmıştır. TiO₂ NP kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansını her iki uygulama süresinde de negatif kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. Bu artışlar çözücü kontrol ile kıyaslandığında, 24 saatlik uygulamada 20, 60 ve 100 µg/ml'lik, 48 saatlik uygulamada ise 20, 60, 80 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlıdır. ZnO NP, KKD frekansını her iki uygulama süresinde de doza bağlı olarak artırmıştır. Bu artış 24 saatlik muamelede en yüksek üç dozda, 48 saatlik

uygulamada ise en yüksek iki dozda anlamlıdır. TiO_2 NP, mikronükleus (MN) frekansında en düşük üç konsantrasyonda anlamlı olmayan bir artış oluşturmuştur. ZnO NP MN frekansını tüm konsantrasyonlarda artırmıştır, fakat bu artış en yüksek iki konsantrasyonda (20 and 30 $\mu g/ml$) anlamlıdır. TiO_2 NP 24 saatlik uygulamada mitotik indeksi kontrole göre düşürmüştür, ancak bu düşüş 60 ve 80 $\mu g/ml$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlıdır. TiO_2 NP 48 saatlik uygulamada mitotik indekste önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. ZnO NP, mitotik indeksi her iki uygulama süresinde de düşürmüştür. Bu düşüş 24 saatlik uygulamada 5, 10 ve 30 $\mu g/ml$ 'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada 30 $\mu g/ml$ 'lik konsantrasyonda anlamlıdır. TiO_2 NP, replikasyon indeksi üzerinde önemli bir etki göstermez iken, ZnO NP, her iki uygulama süresinde de en yüksek konsantrasyonda (30 $\mu g/ml$) anlamlı olmayan bir azalmaya sebep olmuştur. TiO_2 NP ve ZnO NP, nükleer bölünme indeksini etkilememiştir. TiO_2 NP kuyruk uzunluğunda en yüksek konsantrasyonda (100 $\mu g/ml$) kontrole göre anlamlı bir artışa sebep olmuştur, fakat kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. ZnO NP uygulaması ile kuyruk yoğunluğu en yüksek konsantrasyonda önemli düzeyde azalmıştır. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti benzer artış ve azalışlar gösterirken, kuyruk uzunluğu ZnO NP'nin 5 ve 20 $\mu g/ml$ 'lik konsantrasyonlarında önemli ölçüde artmıştır. Bu sonuçlar, TiO_2 NP'nin nisbeten zayıf bir genotoksik etkiye sahip olduğunu, bunun aksine ZnO NP'nin yüksek konsantrasyonlarda hem güçlü bir genotoksik etkiye ve hem de sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Bilim Kodu : 203.1.048
Sayfa Adedi : 100
Anahtar Kelimeler : Titanyum dioksit, Çinko oksit, Nanopartikül, Kromozomal anormallik (KA) testi, Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, Mikronükleus testi (MN), Komet testi
Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Fatma ÜNAL

**ASSESSMENT OF GENOTOXIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE AND
ZINC OXIDE NANOPARTICLES
IN HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO*
(M. Sc. Thesis)**

Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
October 2012**

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), used in this study, were observed to be spherical in shape and contained particles ranging from 10-300 nm by scanning electron microscopy. These nanoparticles were found to be negatively charged and the mean hydrodynamic diameters were found to be 804.30±15.06 nm for TiO₂ NPs and 495.80±51.15 nm for ZnO NPs by dynamic light scattering. 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml concentrations of TiO₂ NPs and 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/ml concentrations of ZnO NPs were used to assess genotoxic effects. TiO₂ NPs significantly increased the frequency of chromosomal aberrations (CAs) at two lowest concentrations (20 ve 40 µg/ml) at 24 h treatment, however they did not show a significant increase at 48 h treatment. ZnO NPs significantly increased the frequency of CAs at two highest concentrations (20 and 30 µg/ml) at 24 h and at all concentrations at 48 h treatment. TiO₂ NPs significantly increased the frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) at both treatment periods compared to negative control. These increases were significant at 20, 60 ve 100 µg/ml concentrations for 24 h treatment and, 20, 60, 80 ve 100 µg/ml concentrations for 48 h treatment compared to solvent control. ZnO NPs, increased the frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) at both treatment periods in a dose dependent manner. These increases were significant at the three highest concentrations for

24 h and at the two highest concentrations for 48 h treatment. TiO₂ NPs induced a non-significant increase in the the frequency of micronuclei at three lowest concentrations. ZnO NPs increased the frequency of MN at all concentrations, however these increases were significant at the two highest concentrations (20 and 30 µg/ml). TiO₂ NPs caused reduction in mitotic index at 24 h treatment compared to control. However these reductions were significant at 60 and 80 µg/ml concentrations. TiO₂ NPs did not induced a significant effect on mitotic index at 48 h treatment. ZnO NPs reduced mitotic index at both treatment periods. These decreases were significant at 5, 10 and 30 µg/ml concentrations at 24 h and 30 µg/ml concentrations at 48 h treatments. While TiO₂ NPs did not show any effect on replication index, ZnO NPs caused a non-significant decrease at the highest concentrations at both treatment periods. Neither TiO₂ NPs nor ZnO NPs effect nuclear division index. TiO₂ NPs caused a significant increase in tail lenght at the highest concentration (100 µg/ml) compared to control, however they did not show a significant effect on tail intensity and tail moment. Tail intensity reduced significantly at the highest concentrations with ZnO NPs treatment. Although tail intensity and tail moment displayed similar decreases and increases, tail lenght increased significantly at 5 and 20 µg/ml concentrations in ZnO NPs treatment. These results show that TiO₂ NPs have a relatively weak genotoxic effect, by contrast, ZnO NPs have a strong genotoxic effect as well as cytotoxic effect at high concentrations.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Titanium dioxide, Zinc oxide, Nanoparticle, Chromosomal aberration (CA) assay, Sister chromatid exchange (SCE) assay, Micronucleus (MN) assay, Comet assay

Page Number : 100

Adviser : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı Sayın hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, her türlü konuda bilgi ve görüşlerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bu tez çalışmasının bir kısmında emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel aşamaların bir bölümünde yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü Doktora öğrencisi Özlem EROL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2011-72 No'lu projesiyle kısmen desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoteknoloji ve Nanoteknolojik Gelişmelerin Tarihçesi.....	3
2.2. Nanomateryaller ve Kullanım Alanları.....	4
2.3. Nanomateryallerin Sınıflandırılması.....	5
2.3.1. Karbon bazlı nanomateryaller	5
2.3.2. Metalik nanopartiküller	6
2.3.3. Metal oksit nanopartikülleri	7
2.4. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri	8
2.5. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi	10
2.6. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri.....	11
2.6.1. Primer genotoksik mekanizma.....	12
2.6.2. Sekonder genotoksik mekanizma.....	13
2.7. Nanomateryallerin Genotoksitesini Etkileyen Faktörler	17

	Sayfa
2.7.1. Boyut, şekil ve yüzey alanı	17
2.7.2. Aglomerasyon durumu.....	18
2.7.3 Yüzey yükü ve kimyası.....	19
2.8. Genotoksisite Testleri.....	20
2.9. Nanomateryaller ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	24
2.9.1. TiO ₂ NP ile yapılan genotoksisite çalışmaları	26
2.9.2. ZnO NP ile yapılan genotoksisite çalışmaları.....	28
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Kromozom incelenmesi için materyal	30
3.1.2. Test materyalleri ve kullanılan kimyasallar	30
3.2. Metot	31
3.2.1. Test materyallerinin hazırlanması	31
3.2.2. Test materyallerinin karakterizasyonu	32
3.3. Preparatların Hazırlanması.....	33
3.3.1 Kültürdeki insan lenfositlerindeki çalışmalar	33
3.3.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	38
4.1.1. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri	38
4.1.2. Zeta potansiyeli ve hidrodinamik çapın belirlenmesi	39
4.2. Genotoksisite Çalışmaları	39
4.2.1. TiO ₂ NP uygulaması	39
4.2.2. ZnO NP uygulaması.....	49

	Sayfa
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Titanyum dioksit nanopartikül uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikleri frekansları.....	41
Çizelge 4.2. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi frekansları.....	44
Çizelge 4.3. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerdeki mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi frekansı.....	46
Çizelge 4.4. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen izole lenfositlerdeki DNA hasarı.....	47
Çizelge 4.5. Çinko oksit nanopartikül uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	50
Çizelge 4.6. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi frekansları.....	54
Çizelge 4.7. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi frekansları.....	55
Çizelge 4.8. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen izole lenfositlerdeki DNA hasarı.....	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mart 2011 envanterine göre nanomateryal içeren tüketici ürünleri.....	4
Şekil 2.2. Mart 2011 envanterine göre nanoteknoloji tüketici ürünlerinde en sık kullanılan maddelerin sayısı.....	5
Şekil 2.3. Nanomateryaller tarafından indüklenen DNA hasarının olası mekanizmaları.....	16
Şekil 2.4. 60 µm çapındaki bir mikropartikül ve aynı kütleye sahip 600 nm ve 60 nm çapındaki nanopartiküllerin sayısının şekille gösterilmesi.....	17
Şekil 4.1. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde hücre başına düşen anormallik frekansı.....	42
Şekil 4.2. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerdeki anormal hücre frekansı.....	42
Şekil 4.3. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi frekansı.....	45
Şekil 4.4. TiO ₂ NP ile muamele edilen insan lenfositlerinde mikronükleus frekansı.....	46
Şekil 4.5. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti.....	48
Şekil 4.6. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde hücre başına düşen anormallik frekansı.....	51
Şekil 4.7. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerdeki anormal hücre frekansı.....	51
Şekil 4.8. Şekil 4.8. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi frekansı.....	54
Şekil 4.9. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerdeki mikronükleus frekansı.....	56
Şekil 4.10. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti.....	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. TiO ₂ NP'nin SEM görüntüsü.....	38
Resim 4.2. ZnO NP'nin SEM görüntüsü.....	38
Resim 4.3. TiO ₂ NP uygulaması sonucunda lenfositlerde gözlenen kromozom anormallikleri.....	43
Resim 4.4. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimleri.....	45
Resim 4.5. TiO ₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde mikronükleuslu binükleat hücreler.....	47
Resim 4.6. TiO ₂ NP ile muamele edilen izole lenfositlerde oluşan DNA hasarları.....	48
Resim 4.7. ZnO NP uygulaması sonucunda lenfositlerde gözlenen kromozom anormallikleri.....	52
Resim 4.8. ZnO nanopartiküllerinin lenfositlerde oluşturduğu atipik yapılar.....	53
Resim 4.9. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimleri	55
Resim 4.10. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde mikronükleuslu binükleat hücreler.....	56
Resim 4.11. ZnO NP ile muamele edilen izole lenfositlerde oluşan DNA hasarları.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ Mililitre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper
Kısaltmalar	Açıklama
Ag NP	Gümüş Nanopartikülleri
Au NP	Altın Nanopartikülleri
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BEAS-2B	Bronşo epitelyal hücreleri
BrdU	Bromodeoksiüridin
CHO	Çin hamsteri ovaryum hücreleri
CNT	Karbon Nanotüpleri
Cyt-B	Sitokalasin-B
C60	Fullerenler
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar**Açıklama**

DNA	Deoksiribonükleikasit
DPX	Depex
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit
FPG	Formamidopirimidin glikozilaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
KA	Kromozoomal anormallik
KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatid değişimi
MDA	Malondialdehit
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NM	Nanomateriyal
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
PBS	Fosfat Tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
ROT	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SSC	Salin sitrat tamponu
TiO₂ NP	Titanyum dioksit nanopartikülleri
UV	Ultraviyole
ZnO NP	Çinko oksit nanopartikülleri

1. GİRİŞ

Bilim, insanoğlunun daha sağlıklı ve konforlu yaşaması için hizmet edip, yeni teknolojiler ve uygulamaları hızla hayata geçirmektedir. Çağımızın yeni teknolojilerinden biri olan nanoteknoloji, belki de tüm bilimlerdeki hızlı gelişmelerin en heyecan verici ve ilgi uyandıran kısmıdır.

Nanoteknoloji atomları ve molekülleri tek tek işleme ve yeniden düzenleme yoluyla kullanışlı materyal, araç ve sistem oluşturma sanatı ve bilimidir. Nanoteknoloji ürünü olan nanomateryaller, 100 nanometrenin altında (<100 nm) olacak şekilde üretilmektedir [Colvin, 2003]. Endüstriyel olarak tasarlanmış nanomateryaller, eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle günümüzde çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle tıp ve biyolojide, hedefe spesifik ilaç dağıtımı, patojenlerin tespiti, protein tespiti, doku mühendisliği, tümörü yok etme ve MR görüntülemeye kontrastın artırılması gibi pek çok alanda nanomateryallerden yararlanılmaktadır. Tekstil sektöründe kir tutmayan kumaşların üretilmesinde, elektronik sektöründe daha etkili iletişim araçlarının üretilmesinde, kozmetik sektöründe güneş kremleri, ruj, göz farı, traş losyonu, nemlendirici, deodorant vb üretiminde, diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinin yanı sıra spor malzemelerinin üretilmesinde de nanomalzemeler geniş kullanım alanı bulmaktadır. Nanomateryaller, savunma sanayii, otomotiv sektörü, endüstri ve gıda sektöründe de yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Nanopartikül üretiminde ve kullanımındaki büyük artış, insanların bu nanopartiküllere maruziyetini de benzer şekilde artırmaktadır. Aynı kompozisyondaki büyük boyutlu partiküllerine kıyasla nanopartiküller, daha büyük yüzey alanına, daha yüksek katalitik aktivite ve reaktiviteye sahip olup, hücrelere daha hızlı penetre olmakta ve canlılar için daha toksik etkiler gösterebilmektedir. Bu nedenle günümüzde birçok araştırmacı, tasarlanmış nanopartiküllerin olası toksisitesi üzerine araştırmalar yapmaya başlamıştır. Tüm canlıların yaşam şifresini oluşturan genetik materyale de zarar verebileceği düşünülerek başlatılan genotoksik çalışmalar, bu partiküllerin olası riskler taşıyabileceğini de göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı çok geniş kullanım alanı bulmaya başlayan titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin, insan periferal lenfositlerinde olası genotoksik etkilerini incelemektir. Bu etkileri incelemek için, yaygın kullanılan genotoksisite testlerinden olan kromozom anormallikleri (KA) testi, kardeş kromatit değişimi testi (KKD), mikronükleus (MN) testi ve komet testi uygulanmıştır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlarla, TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin genetik açıdan herhangi bir risk taşıyıp taşımadığı belirlenerek, bu materyallerin kullanımı ve çevreye yönelik etkileri konusunda bir katkı sağlanması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji ve Nanoteknolojik Gelişmelerin Tarihçesi

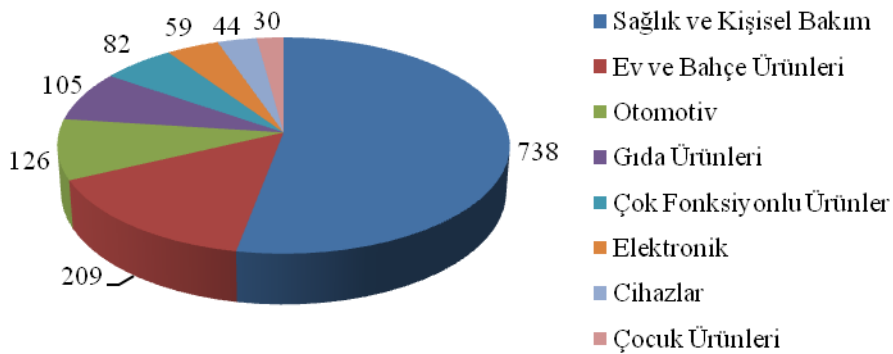
Nano kelimesi Yunanca “cüce” kelimesinden köken almıştır ve günümüzde modern bilimde adını sıkça duyduğumuz nanometre, nanomateryal, nanobilim, nanoteknoloji, nanorobot gibi kelimeleri, son derece popüler bir kavram haline getirmiştir. Nanometre (nm), metrenin milyarda birine (10^{-9}) tekabül etmektedir. Nanomateryal ise en az bir boyutu 100 nm’den küçük maddeler olarak tanımlanır ve tüp, çubuk, küre şeklinde veya daha kompleks yapılarda, bir çok farklı forma sahip olacak şekilde tasarlanabilirler.

Nanoboyutta materyallerin üretilmesi, tasarlanması ve manipülasyonunu sağlayan nanoteknoloji kavramını ilk defa ünlü bir fizikçi olan Richard Feynman, 1959 yılında Amerikan Fizik Cemiyetinin düzenlediği bir konferanstaki konuşmasında ortaya atmıştır. Feynman bu konuşmasında, atomlar ve moleküller tek tek kontrol altında tutularak yeni özellikler kazanılacak şekilde düzenlenirse, daha gelişmiş araç ve materyaller üretilebileceğinden bahsetmiştir [Toumey, 2009]. Bu dikkat çekici konuşmadan sonra nanopartikül ve nanoölçekli materyalleri içeren araştırmalar, neredeyse tüm disiplinlerden bilim adamları ve mühendislerin büyük bir ilgi odağı olmuştur. Bu ilgi, nanomateryallerdeki optik ve manyetik özellikler, özgül ısı, erime noktası ve yüzey reaktiviteleri gibi çok sayıda fiziksel özelliklerin boyuta bağlı olarak değişmesinden kaynaklanmaktadır [Richards ve Bönnemann, 2005].

Nanoteknoloji ve nanobilim, yüzeylerin atomik seviyede görüntülenmesini sağlayan taramalı tünelleme mikroskopunun (STM) icadı ve fizikteki multiatom partikülleri bilimindeki hızlı ilerlemeler sonucu 1980’lerde ivme kazanmıştır. Bu gelişme 1985’de fullerenlerin, birkaç yıl sonra da karbon nanotüplerinin keşfine yol açmıştır. Yarı iletken nanokristallerin sentezindeki araştırmalar, metal ve metal oksit nanopartiküllerinin ve quantum noktacıklarının sayısında hızlı bir artışa yol açmıştır [Mutluer, 2011].

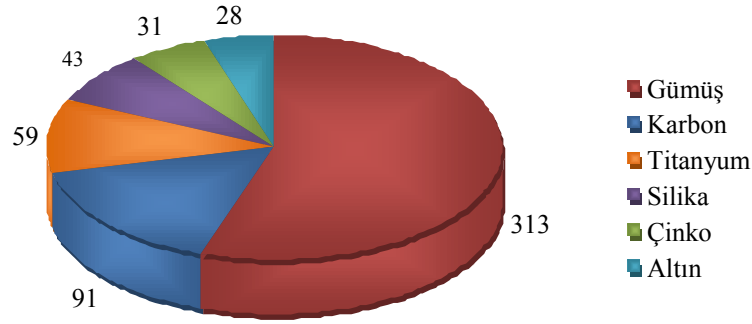
2.2. Nanomateryaller ve Kullanım Alanları

Günümüzde nanoteknoloji tabanlı tüketici ürünlerinin en büyük bölümünü, toplam 738 ürünle sağlık ve kişisel bakım ürünleri oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Bu kategori giyim, spor malzemeleri ve çeşitli kozmetik ürünlerini de içermektedir. Modern kozmetik, nanoboyutlu (50-5000 nm arasında) mikroskobik veziküller olan nanokapsül, nanozom ve nanoemülsiyon gibi bileşenler içermektedir [Nohynek ve ark., 2008]. Ev ve bahçe ürünleri kategorisine giren boya sanayisi de nanoteknolojik malzemelerden yararlanmış, binaların çoğunlukla dış cephelerinde ve gerektiğinde iç cephelerinde kullanılmak üzere, kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku giderme ve antimikrobiyal özelliklere sahip boyalar geliştirilmiştir. Çok fonksiyonlu ürünler kategorisinde, özellikle yüzey kaplama gibi uygulamalarda nanomateryaller geniş yer almaktadır. Otomotiv endüstrisi de hafif motor ve çerçeve parçalarının yapımı, sürtünmeye karşı dirençli boyaların üretimi, aşınmaya karşı koruyucu tabakalar geliştirilmesi gibi alanlarda nanoteknolojiden faydalanmıştır. Gıda sektöründe gıdaların ambalajlanması, raf ömrünün uzatılması ve kalitesinin korunması için doğada çözünebilir, antimikrobiyal özellikte nanokompozit gıda malzemeleri üretilmesine yönelik çalışmalar da yapılmaktadır [Sozer ve Kokini, 2009].



Şekil 2.1. Mart 2011 envanterine göre nanomateryal içeren tüketici ürünleri [Nanotechproject, 2011].

Nanomateriyallerin üretimi için çok sayıda organik ve organik olmayan materyaller kullanılmaktadır. Günümüzde nanoteknolojik ürünlerde en yaygın kullanılan materyal, toplam 313 ürünle gümüştür. Fullerenleri de içeren karbon, 91 ürünle ikinci sırada yer alırken, titanyum dioksiti de içeren titanyum, 59 ürünle üçüncü sırada, çinko ise 31 ürünle beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Mart 2011 envanterine göre nanoteknoloji tüketici ürünlerinde en sık kullanılan maddelerin sayısı [Nanotechproject, 2011].

2.3. Nanomateriyallerin Sınıflandırılması

Nanomateriyaller genel olarak üç gruba ayrılabilir:

- Karbon bazlı nanomateriyaller
- Metalik nanopartiküller
- Metal oksit nanopartikülleri

2.3.1. Karbon bazlı nanomateriyaller

Fullerenler, karbon nanotüpleri (CNT), grafen gibi çok sayıda türevleri bulunan karbon bazlı nanomateriyaller, nanoteknoloji endüstrisinin önemli bir odak noktasıdır.

Özellikle 60 ve daha fazla karbon atomundan oluşan fullerenler (C₆₀), eşsiz yapısal, fiziksel, kimyasal ve elektrik özelliklerinden dolayı pek çok nanomateryalin geliştirilmesinde bir kilometre taşı olmuştur. Fullerenler kozmetik, gıda katkıları, kayganlaştırıcılar, yakıt pilleri, mikroreaktörler, ilaç dağıtım araçları ve yapı malzemelerini de içeren çok sayıda teknolojik ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [Kato ve ark., 2010; Liang ve ark., 2010].

Oldukça güçlü ve sağlam fiberler olarak da bilinen karbon nanotüpleri, eşsiz özelliklere sahip grafitik karbonun moleküler ölçekli tüp şeklindeki yapılarıdır. Karbon nanotüpleri, özellikle materyal bilimi alanında endüstriyel ve akademik olarak oldukça ilgi çekici çalışmalarda kullanılmaktadır [Doak ve ark., 2012a]. Nanotüplerin avantajlarından yararlanan elektronik, enerji, sensörler, alan emisyonu ve biyoloji gibi daha pek çok alan bulunmaktadır [Endo ve ark., 2008].

2.3.2. Metalik nanopartiküller

Eşsiz optik özellikleriyle kuantum noktacıkları (Qdots), biyogörüntüleme amacıyla etkili araçlar oluşturmak için tasarlanmış yarı iletken nanokristallerdir. Kuantum noktacıkları ile canlı hücre içerisindeki aktivitelerin mikroskop aracılığıyla gözlenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca neoplazik hücrelerin tespitinde de kuantum noktacıkları kullanılmaktadır [Gao ve ark., 2004; Leary ve ark., 2006]. Bu nanopartiküllerin dezavantajı selenyum, kadmiyum, tellürit ve kurşun gibi toksik elementler içermesidir.

Altın nanopartikülleri (Au-NP), görüntüleme, biyosensörler, hedefe spesifik gen ve ilaç taşınması, kanser teşhisi ve terapisi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Küçük boyutları hücreler içerisine kolayca girebilme ve hücreler arası boşluklar boyunca yerleşebilme özelliğindedir [Wang ve ark., 2010]. 3-8 nm boyutlarındaki Au NP'nin sitotoksik ve immünojenik olmadığı, makrofaj hücrelerinde reaktif oksijen ve nitrojen türlerini azalttığı tespit edilmiştir [Shukla ve ark., 2005].

Gümüş nanopartikülleri (Ag NP), güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları için kozmetik, tekstil ve kişisel bakım ürünlerini de içeren çok sayıda tüketici ürünlerinde kullanılmaktadır. Yaygın kullanılmasına rağmen pek çok çalışma, Ag NP'lerinin çeşitli hücre tiplerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [Shin ve ark., 2007; Ahamed ve ark., 2008]. Ancak yine de genotoksik etkilerine yönelik çalışmaların sayısı oldukça azdır [Ahamed ve ark., 2008; Kumari ve ark., 2009].

2.3.3. Metal oksit nanopartikülleri

Metal oksit tabanlı nanopartiküller günümüzde dolgu materyalleri, matlaştırıcı ve katalizör olarak kullanılmakta olup, kozmetik ve mikroelektronik gibi uygulamalarda da kullanımı gittikçe artmaktadır [Oskam, 2006]. Nanoteknolojinin en çok kullandığı partiküllerden olan metal oksit nanopartikülleri, TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 ve SiO_2 'dir.

Demir oksit nanopartikülleri (Fe_2O_3 NP) özellikle tıbbi ve biyolojik teşhiste çok önemli yere sahiptir. Manyetik rezonans (MR) görüntülemeye kontrastın artırılmasında kullanılmaktadır. Ultra küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (USPIO), malign beyin tümürlü hastalarda görüntüleme ajanı olarak kullanılmaktadır [Leary ve ark., 2006].

Nanoteknolojinin gelişmesiyle nanoboyutlu silika (SiO_2 NP) uygulamaları özellikle biyomedikal ve biyoteknolojik alanlarda, hastalıkların teşhisi, tıbbi görüntüleme ve ilaç dağıtım çalışmaları hızla artmıştır [Wang ve ark., 2009; Ye ve ark., 2010].

Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO_2 NP)

TiO_2 anataz, rutil ve brookit olmak üzere üç ana kristal yapısına sahiptir. Bu üç kristal formundan anataz, daha yüksek fotokatalitik aktiviteye sahip olduğu için fotokatalizde yaygın olarak kullanılmaktadır [Li ve ark., 2004].

TiO_2 NP'leri kozmetik, gıda ürünleri, boya ve ilaçlarda en yaygın kullanılan metal oksit nanopartiküllerindendir. Cilt üzerinde beyaz lekeler bırakan mikron ölçekli

partikülleriyle kıyaslandığında, açık ve şeffaf bir görünüme sahip olduğu için TiO_2 NP'leri cilt bakım ürünlerinde topikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir [Shukla ve ark., 2011]. Aşırı derecedeki beyazlığı nedeniyle, beyazlık ve opaklık vermek amacıyla bir çok materyalde, örneğin kağıt, boya, mürekkep, kozmetik ve diş macunu gibi bazı tüketim maddelerinde beyazlatıcı olarak da kullanılmaktadır. Güneş kremlerinde UV koruma kabiliyetini de artırmaktadır [Kiss ve ark., 2008].

TiO_2 'in kristalize formları (anataz ve rutil) 3.26 ve 3.06 eV enerji kuşağı açıklığında yarı iletken özelliktedir. TiO_2 UV-A ışığını absorblar, süperoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizler [Hirakawa ve ark., 2004]. Bu fotokatalitik özelliklerinden dolayı, TiO_2 atık suların arıtılmasında ve çevre uygulamalarında kullanılmaktadır [Cho ve ark., 2004]. Son zamanlarda TiO_2 , ışın tedavisi esnasında endobronşiyal ve özofageal kanserlerin ışığa duyarlı hale getirilmesinde kullanılmaktadır [Zhang ve ark., 2004].

Çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP)

Çinko oksit nanopartikülleri günümüzde kozmetik, tekstil ve cilt losyonları gibi çeşitli tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ZnO NP'nin kozmetikteki kullanımını nano boyuttaki TiO_2 gibi diğer nanopartiküllerin kullanımını geçebilir, çünkü ZnO nanopartikülleri hem UV-A, hem de UV-B radyasyonunu absorblamaktadır [Tran ve Salmon, 2011]. Kumaşlarda, antimikrobiyal ve UV emici özelliklerinden dolayı ZnO NP koku direnci olarak da kullanılmaktadır [Becheri ve ark., 2008; Clausen ve ark., 2010]. ZnO NP ayrıca seramiklerde, kauçuk üretiminde ve atık su arıtımında da kullanılmaktadır [Kumari ve ark., 2011].

2.4. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri

İnsanlar doğal olarak oluşan veya suni olarak üretilen nanometre boyuttaki yabancı partiküllere değişik şekillerde maruz kalmaktadırlar. Doğada, fotokimyasal reaksiyonlar, volkanik patlamalar, toz fırtınaları, orman yangınları gibi değişik doğal

süreçlerle nanopartikül salınımı olabileceği gibi, egzoz dumanı, sigara dumanı, sanayi ve kömür kullanımı gibi antropojenik kaynaklarla da nanopartiküller oluşabilir [Buzea ve ark., 2007]. Son yıllarda bilim insanları, nanoteknolojik uygulamalar için tasarlanmış nanopartiküllere maruziyetin, doğal süreçlerle oluşan nanopartikül maruziyetini geçeceğini düşünmektedirler.

İnsan cildi, akciğerler ve gastro-intestinal sistem çevreyle sürekli temas halindedir. Cildimiz genel olarak yabancı maddelere karşı etkili bir bariyer olmasına rağmen, akciğerler ve gastrointestinal sistemimiz daha savunmasızdır. Bu üç yol, doğal ya da antropojenik nanopartikül maruziyeti için giriş noktalarıdır. Enjeksiyon ve aşılama, tasarlanmış materyallere olası maruziyetin bir başka yoludur.

Küçük boyutlarından dolayı, nanopartiküller dolaşım ve lenfatik sistem içerisinde dolaşarak, doku ve organların içerisine yerleşebilir. Bazı nanopartiküller kompozisyonuna ve boyutuna bağlı olarak, oksidatif stres ya da organel hasarı meydana getirebilir, hücrelerde geri dönüşümsüz hasarlar oluşturabilir. Astım, bronşit, amfizem, akciğer kanseri gibi hastalıklar ve Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların, solunum yoluyla alınan nanopartiküllerle ilişkili olabileceği belirtilmektedir [Li ve ark., 2010].

Gastrointestinal sisteme giren nanopartiküllerin, Crohn hastalığı ve kolon kanseriyle ilişkili olduğu yayınlanmıştır [Powell ve ark., 2010]. Dolaşım sistemine katılan nanopartiküller, ateroskleroz ve kan pıhtılaşması, aritmi, kalp hastalıkları ve son olarak kardiyak ölüm gibi durumların ortaya çıkmasına yol açabilir [Meng ve ark., 2012]. Nanopartiküllerin karaciğer ve dalak gibi organlara taşınması, bu organlarda çeşitli lezyonlar oluşturabilir [Sardari ve ark., 2012]. Yine bu nanopartiküllere maruziyet, skleroderma ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkları da sebep olabilir [Chen ve von Mikecz, 2005; Noonan ve ark., 2006].

Erkek Wistar ratlarına nanoboyuttaki TiO_2 'in çeşitli süspansiyonlarının intravenöz enjeksiyonu yapılmış ve maruziyetten 1, 14 ve 28 gün sonra alınan doku örneklerine bakıldığında herhangi bir toksik etki, immün cevap ve organ fonksiyonu bozukluğu

gözlenmemiştir [Fabian ve ark., 2008]. Başka bir çalışmada ise TiO₂ nanopartiküllerinin farelerde *in vivo* akut toksisitesi araştırılmış, histopatolojik gözlemler neticesinde TiO₂ partiküllerinin dalak içerisine yerleşerek dalak lezyonlarına yol açtığı, akciğer damar sisteminde trombozise, karaciğer hücrelerinde nekroz, apoptoz ve fibrozise neden olduğu tespit edilmiştir [Chen ve ark., 2009].

Liu ve ark.'ları (2008), ICR (imprinting control region) farelerde nano boyutlu çinko oksitin akut toksisitesi üzerine çalışmış, ZnO NP ile muamele edilen farelerdeki histopatolojik gözlemlerinde, önemli oranda akciğer inflamasyonu, proliferasyon ve alveolar duvarda incelmeler tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada 120 nm boyutlarındaki ZnO ile oral olarak muamele edilen farelerde mide, karaciğer ve dalakta patolojik hasarlar tespit edilirken, 20 nm boyutundaki ZnO ile karaciğer, dalak ve pankreasta negatif doz etkisi gözlenmiştir [Wang ve ark., 2008]. TiO₂, ZnO, Fe₃O₄, Al₂O₃, ve CrO₃ nanopartiküllerinden oluşan ve boyutları 30-45 nm olan metal oksit nanopartiküllerinin toksisitesi fare nöroblastoma hücrelerinde araştırılmış, >100 µg/mL dozlarda özellikle ZnO nanopartiküllerinde, hücre morfolojisinde anormallikler ve mitokondriyal fonksiyonda azalmalar tespit edilirken, test edilen diğer nanopartiküllerin hücreler üzerinde ölçülebilir bir etki göstermediği saptanmıştır [Jeng ve Swanson, 2006].

2.5. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi

Nanopartiküller dermal, solunum veya oral yolla vücut içerisine alındığında dolaşım sistemine katılarak, çeşitli organ ve dokuların içine yerleşebilir. Bir nano organizma olan virüs gibi, nanopartiküller de hücre içine girerek, hücresel yapılarla etkileşime girme kabiliyetindedirler. Hücresel alım, hücre içi lokalizasyon ve oksidatif ürünleri katalizleme kabiliyeti, nanopartikülün kimyasal yapısına, boyutuna ve şekline bağlı olarak değişmektedir [Xia ve ark., 2006; Hamilton ve ark., 2009].

Dış yüzeylerinde belli reseptörler olmayan nanopartiküllerin hücrelere penetre olma mekanizmasının pasif alım veya adheziv interaksiyon yoluyla olduğu düşünülmektedir. Burada vezikül formasyonu olmaksızın, Van der Waals kuvvetleri,

elektrostatik yükler veya arayüzey gerilimi gibi etkilerin rol aldığı düşünülmektedir [Geiser ve ark., 2005, Peters ve ark., 2006]. Bu tip hücresel alım, nanopartikülleri sitoplazma proteinleri ve organelleriyle direkt etkileşime soktuğu için büyük önem taşımaktadır. Örneğin C_{60} moleküllerinin hücre içerisine girdiği, çekirdek membranı etrafında ve çekirdek içerisinde bulunabileceği gösterilmiştir [Porter ve ark., 2006].

Nanopartiküllerin hücre içine alım mekanizmalarından bir diğer yolu da reseptör aracılı veya klatrin aracılı endositozudur. Hem endositik ve hem de endositik olmayan yollarla hücre içine giren nanomateryaller, sitoplazmadaki organeller ve diğer bileşenlerle interaksiyona girerek, organellerde veya DNA'da hasarlar oluşturabilir [Singh ve ark., 2009; Deng ve ark., 2009; Vandebriel ve De Jong, 2012; Zhang ve ark, 2012].

2.6. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

Nanomateryaller 100 nm'den küçük oldukları için membrandaki por kompleksini geçerek nükleusa ulaşabilirler. Eğer NM'ler nükleus içerisine yerleşirlerse DNA molekülüyle ya da DNA ile ilişkili proteinlerle direkt etkileşime girerek, genetik materyale hasar verebilir. TiO_2 ve Silica NP'lerinin nükleus içerisine girdiği [Geiser ve ark., 2005; Liu ve ark., 2007], intranükleer protein agregatları oluşturarak, replikasyonu, transkripsiyonu ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir [Chen ve von Mikecz, 2005]. DNA hasarı indirekt mekanizmalarla da meydana gelebilir. Burada nanomateryaller direkt olarak DNA ile değil de, hücre bölünmesinde rol oynayan proteinlerle etkileşime girebilir [Gonzalez ve ark., 2008]. Sonuçta DNA'ya direkt ya da dolaylı olarak etki eden NM'ler genotoksisiteye yol açabilir.

Nanomateryaller tarafından indüklenen genotoksisiteden sorumlu mekanizmalar primer ve sekonder mekanizmalar olarak iki ana kategoriye ayrılabilir.

2.6.1. Primer genotoksik mekanizma

Primer genotoksik mekanizma, nanomateryallerin hücre alımı ve biyomoleküllerle interaksyonu sonucu oluşan mekanizmadır. Primer genotoksik mekanizma DNA'ya direkt ve indirekt etki eden mekanizmalar olarak ikiye ayrılır.

Direkt etki eden ajanlar, DNA ile direkt kontağı sağlayarak, genetik materyalde fiziksel ve kimyasal hasarlara yol açarlar. Böyle bir durumda DNA molekülü içinde belli bölgelerde nükleotidlerin kaybıyla, abazik DNA lezyonları oluşabilir. Eğer hasarlı baz replikasyon sırasında polimeraz enzimleri tarafından fark edilmez ise, nokta mutasyonları ya da zincir kırıkları oluşabilir [Doak ve ark., 2007]. Direkt etki eden ajanlar ayrıca DNA çift heliksi arasına girerek, DNA replikasyonunu durduran bir etki de oluşturabilirler. Bu da yine ya zincir kırıklarına ya da nükleotidlerin insersiyonuna yol açar [Ferguson ve ark., 2007]. Bütün bunlara ilave olarak, bu ajanlar DNA'da tek ve çift zincir kırıkları oluşturarak genetik materyalde fiziksel hasarlar oluşturabilir [Gonzalez ve ark., 2008].

Nanomateryaller ya direkt hücre çekirdeği içerisine girerek veya sitoplazmada serbest halde bulduklarında, çekirdek zarının parçalandığı mitoz bölünme sırasında DNA ile direkt temas oluşturabilirler. Titanyum dioksit, çinko, kuantum noktacıkları ve silikayı da içeren pek çok çalışmada nanomateryallerin çekirdek bölgesine girdiği gösterilmiştir [Chen ve von Mikecz, 2005; Nabiev ve ark., 2007; Shukla ve ark., 2011; Hackenberg ve ark., 2011b]. Yine de nanomateryaller tarafından indüklenen DNA hasarının, DNA ile direkt interaksyon yoluyla olduğu henüz yeterince açıklanamamıştır.

DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi, indirekt olarak hareket eden genotoksinler için potansiyel hedefler olan çok sayıda proteinin işe karıştığı, kompleks ve çok faktörlü bir süreçtir. İndirekt olarak hareket eden ajanlar, çoğunlukla hücre bölünmesinin bileşenleri olan aracı biyomoleküller vasıtasıyla genetik hasarı indükler. Hasar, kromozomların mekanik ayrılması için gerekli sentriyol, mikrotübül, kinetokor gibi proteinlerde, DNA tamir enzimlerinde ya da kromozom replikasyonu

ve ayrılma süreçlerini yöneten hücre döngüsü kontrol noktalarındaki sinyal aktarımı proteinlerinde meydana gelebilir [Gonzalez ve ark., 2008]. Bu bileşenlerde hasar genellikle yapısal ve sayısal kromozom anormallikleriyle sonuçlanır. DNA replikasyonu süreçlerinin müdahalesinden başka, indirekt DNA hasarı oksidatif stresin indüklenmesinin bir sonucu olarak da oluşabilir. Aerobik metabolizmanın normal bir ürünü olan reaktif oksijen türleri (ROT), protein, lipit ve DNA gibi biyomolekülleri kolaylıkla okside eder. Oksidatif hasarı önlemek için hücrel antioksidanlar ROT'lerini nötürleştirir fakat, ROT oluşumu ve hücrelerdeki antioksidan düzeyi arasında bir dengesizlik olursa hücrede oksidatif stres oluşur [Doak ve ark., 2012a]. Bu olay DNA lezyonları ve mutasyonlara sebep olur.

Nanomateriyallerle indüklenen indirekt DNA hasarını destekleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin, tek çepirli karbon nanotüplerinin (SWCNT), iç ipliklerine mekanik olarak müdahale ettiği, sentromozomun parçalanması ve çok kutuplu mitotik ipliklere yol açtığı belirlenmiştir. Nanosilikanın, DNA replikasyonu süreçlerinde rol oynayan enzimleri (özellikle topoizomerazları) etkileyen nükleer protein agregasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [Chen ve von Mikecz, 2005]. Pek çok çalışmada, indirekt DNA hasarının ana sebebinin oksidatif stresten kaynaklandığı belirtilmiştir [Gurr ve ark., 2005; Karlsson ve ark., 2008, Singh ve ark., 2009]. Nanopartiküllerin oral alımını takiben rodentlerin akciğer ve karaciğerlerinde, oksidatif DNA lezyonları (8-hidroksi-deoksiguanozin; 8-OHdG) tespit edilmiştir [Folkmann ve ark., 2009; Trouiller ve ark., 2009].

2.6.2. Sekonder genotoksik mekanizma

Genotoksik etkinin sekonder mekanizması genellikle bir maddenin *in vivo* kronik inflamatuvar yanıtı indüklemesiyle oluşur. Bu da maruziyet bölgesine gelen nötrofil ve makrofajlar tarafından oluşturulan aşırı reaktif oksijen türleriyle (ROT) sonuçlanabilir. Normalde vücudun savunma sistemi patojenlere karşı vücudu korumak için bu hücreleri hasar bölgesine gönderir, ancak eğer biyogeçirgenlik sebebiyle bu mekanizma başarısız olursa, kronik iflamasyonun sonucu olarak oksidatif stres oluşabilir. Bu durum dokular içindeki hücrelerin, hatta genetik

materyalin hasar görmesine yol açabilir. Çünkü oksidatif stres, DNA'yı da içeren biyomoleküllere zarar veren serbest radikaller oluşturabilir, buna bağlı olarak gelişen kronik inflamasyon da kanserogeneze yol açabilir [Federico ve ark., 2007; Kryston ve ark., 2011]. Bu modelde nanomateryaller *in vitro* test sistemlerinde genotoksik potansiyel göstermeyebilir, fakat onların fizikokimyasal karakteristikleri *in vivo* kronik bağışıklık yanıtını artırabilir.

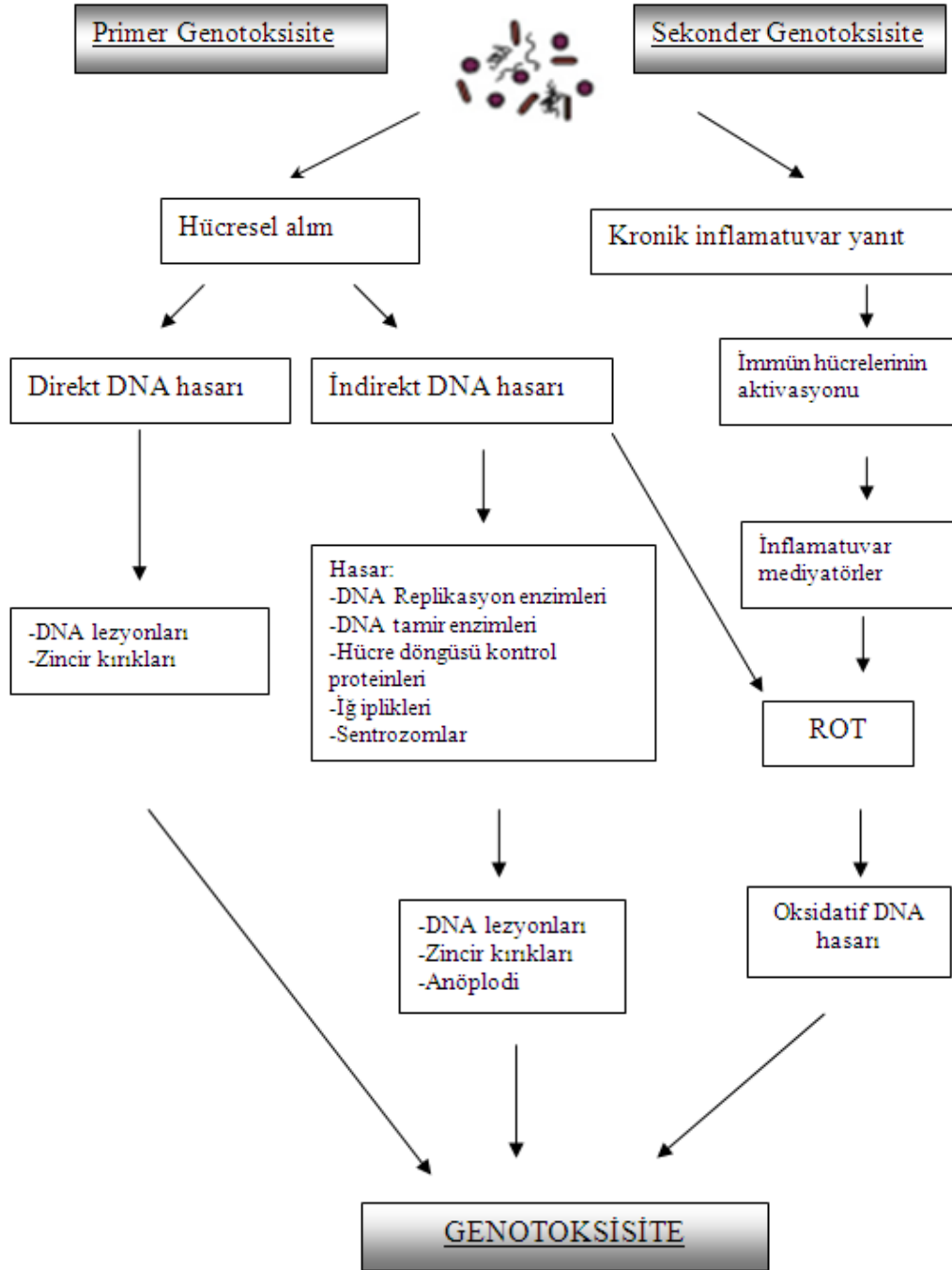
Çok çeperli karbon nanotüplerinin (MWCNT) asbest benzeri inflamatuvar yanıtı ve *in vivo* intraperitoneal maruziyeti takiben granulomaları indüklediği bildirilmiştir [Poland ve ark., 2008]. Ultrince TiO₂ (40 mg/kg) partiküllerinin intraperitoneal olarak muamele edilmesi sonucunda, farelerde akut akciğer inflamasyonu gözlenmiştir. Ayrıca bronşoalveolar lavaj hücrelerinde, tümör nekroz faktör (TNF)- α , interlökin1 β ve makrofaj inflamatuvar (MIP)-2 proteini gibi proinflamatuvar mediyatörlerin seviyesinin arttığı tespit edilmiştir [Moon ve ark., 2010].

Silika nanopartikülleri ile yapılan bir çalışmada *in vitro* mikronükleus testinde negatif bir sonuç tespit edilirken, *in vivo* çalışmada bu nanopartiküllerin inflamatuvar hücre türevli oksidanların salınımı yoluyla sekonder genotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir [Downs ve ark., 2012]. Farelere dört hafta süre ile intraperitoneal olarak verilen 50 nm boyutundaki magnetik nanopartiküllerin, çeşitli organlarda biriktiği ve belirgin toksik etkiler oluşturduğu, buna karşın *in vitro* koşullarda belli bir toksik etki oluşturmadığı tespit edilmiştir [Kim ve ark., 2006]. Bu tip sekonder genotoksik etki gösteren ajanlar, *in vitro* test sistemlerinde mutajenik çıkmayan sonuçların, neden *in vivo* çalışmalarda karsinogenezi indükleyebileceğini açıklamaktadır.

Nanomateryaller (NM) tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarının muhtemel mekanizmaları kısaca şu şekilde özetlenebilir:

1. NM'ler doğal olarak redoks-aktif olabilirler ya da oksidatif strese ve aşırı reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açan, redoks aktivitesini katalizleyen yüzey özelliklerine sahip olabilirler.

2. NM'ler biyogeçirgen olabilir yani biyolojik sisteme girebilir, sistemde bozulmadan parçalanmadan kalabilir, bu da bölgeye spesifik ve sistemik inflamasyona yol açabilir. İnflamasyon, inflamatuvar lökositlerin (örneğin, monosit, nötrofil gibi) toplanmasını başlatır ve böylece aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir.
3. NM'ler hücre içine girebilir ve mitokondri gibi hücre içi organellerle fiziksel olarak etkileşime girerek, bu organellere yapısal zararlar verebilir. Bu gibi durumlarda hasar görmüş mitokondri, yine ROT oluşumuna sebep olan, elektron transport zincirinin ve adenzin trifosfat (ATP) üretiminin bozulmasına yol açabilir [Petersen ve Nelson, 2010] (Şekil 2.3).



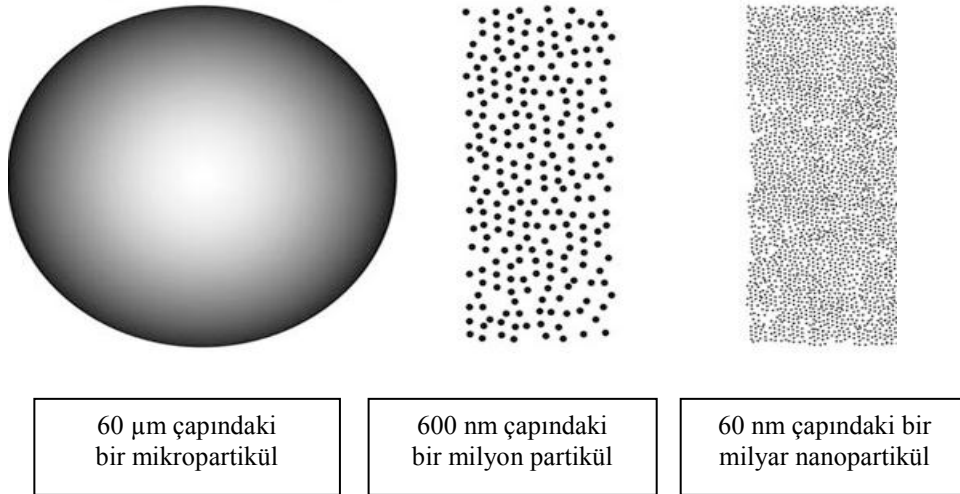
Şekil 2.3. Nanomateryaller tarafından indüklenen DNA hasarının olası mekanizmaları [Doak ve ark., 2012a].

2.7. Nanomateriyallerin Genotoksitesini Etkileyen Faktörler

Yapılan çalışmalar nanopartiküllerin çeşitli fizikokimyasal özellikleri ile genetik etkileri arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Nanopartiküllerin kütle, boyut, yüzey kimyası gibi özellikleri ile agregasyon durumu genotoksitesini etkileyebilmektedir [Mroz ve ark., 2008; Singh ve ark., 2009; Yin ve ark., 2010].

2.7.1. Boyut, şekil ve yüzey alanı

Küçük boyutlarıyla yeni fizikokimyasal özellikler kazanan nanomateriyaller, mikron ebatlı materyallere kıyasla daha fazla biyolojik etkiler oluşturabilir. Partikül boyutu azaldıkça, birim kütle başına düşen partikül sayısı ve buna bağlı olarak yüzey alanı artmaktadır. Örneğin, 60 μm çapındaki bir karbon mikropartikülü, 0.3 μg 'lık kütleyle ve 0.01 mm^2 yüzey alanına sahip iken, aynı kütlerde fakat 60 nm çapındaki karbon nanopartiküllerinin yüzey alanı 11,3 mm^2 olup, 1 milyar nanopartikül içermektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. 60 μm çapındaki bir mikropartikül ve aynı kütleye sahip 600 nm ve 60 nm çapındaki nanopartiküllerin sayısının şekille gösterilmesi [Buzea ve ark., 2007].

60 nm çapındaki bir partikülün yüzey alanının hacmine veya kütesine oranı, 60 µm çapındaki bir partiküle göre 1000 kat daha büyüktür. Daha büyük yüzey alanı, materyallerin katalitik aktivitesini artırır. Yüzey atomları, doymamış yüksek enerji bağlarına sahip olma eğiliminde olduğu için nanomateryallerin reaktivitesi artar. Kararlı duruma geçmek için de yüzeydeki bağlar diğer moleküllerle reaksiyona girecektir. Yani, daha büyük yüzey alanı, daha çok reaksiyona girme potansiyelidir. Bu sebeple nanomateryaller hücreye ulaşırlarsa, mikron ebatlı emsal partiküllerle kıyaslandığında, daha büyük yüzey alanına sahip oldukları için, daha çok biyomolekülle interaksiyona girerler. Bu da direkt hücresel hasara ve oksidatif strese yol açar [Singh ve ark., 2009].

Nanomateryallerin boyutu kadar şekilleri de önemlidir. Çünkü NM'in şekli, yüzey alanının büyüklüğünü etkilemektedir. Örneğin, oktagonal biçimli bir nanomateryal, aynı boyuttaki küre şeklindeki bir nanomateryale göre daha büyük yüzey alanına sahip olacak, bu da nanomateryalin reaktivitesini ve hücresel hasarını arttıracaktır.

2.7.2. Aglomerasyon durumu

Nanomateryallerin büyük bir kısmı doğası gereği hidrofobik özelliğe sahip olduğundan, fizyolojik koşullar altında aglomerat (topak) oluşturma eğilimindedirler. Agregasyon durumu, nanomateryallerin gerçek boyutu ve yüzey alanı gibi özelliklerini değiştirebilir.

Birçok nanomateryal, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda agregat formu oluşturmaktadır. Bu nedenle, genotoksisite testlerinde çeşitli ortamlarda hazırlanan nanomateryal dozlarıyla maruziyetin hücresel yanıtları, büyük bir olasılıkla aglomeratlı nanomateryal formunun bir sonucu olacaktır. Nanopartiküller daha büyük agregat formu oluşturma eğiliminde iken, fibröz nanomateryaller agregasyona ek olarak bükülüp, katlanarak daha kompleks bir durum oluşturabilmektedir.

Nanomateriyallerin hidrofilitliği, sürfaktan kullanarak ya da yüzeylerinde kimyasal modifikasyon (fonksiyonelleştirme) yapılarak arttırılabilmektedir. Bu da nanomateriyallerin genotoksik yanıtlarını değiştirebilir. Örneğin, CNT'lerinin yüzey modifikasyonu ile fonksiyonelleştirilmesi sonucu toksik etkisinin azaldığı gösterilmiştir [Sayes ve ark., 2006]. Buna karşın, başka bir çalışmada sürfaktanla stabil hale getirilmiş CNT'lerinin daha sitotoksik olduğu, altın ve gümüşle kaplanan nanoçubukların fonksiyonelleştirilmesi sonucu sitotoksik etkisinin arttığı gösterilmiştir [Kuo ve ark., 2007].

2.7.3 Yüzey yükü ve kimyası

Farklı deneysel şartlar altındaki davranışlarına yorum getirebilmek açısından nanomateriyallerin yüzey karakteristiklerinin bilinmesi de oldukça önemlidir. Yüzey yükü ve kimyası, nanomateriyallerin sulu ortamlardaki pH ve iyonik şiddet gibi faktörlere göre aglomerasyon durumunu etkilemektedir [Jiang ve ark., 2009]. Yüzey yükü ayrıca nanomateriyallerin hücrenel alımında da önemli bir rol oynamaktadır. Plazma membranı, dış yüzeyi üzerinde bulunan fosfolipitlerden dolayı negatif yüklüdür, bu nedenle anyonik (negatif yüklü) nanomateriyallerin katyonik (pozitif yüklü) nanomateriyallere göre endositozla daha düşük oranda alındığı düşünülmektedir. Farklı yüklere sahip nanopartiküllerle yapılan çalışmalar bunu desteklemekle beraber, bu durum her zaman için geçerli değildir; negatif yüklü olan nanomateriyaller de hücre içerisine endositozla alınabilmektedir [Lockman ve ark., 2004; Harush-Frenkel ve ark., 2007; Gratton ve ark., 2008]. DNA da negatif yüklü olduğundan, katyonik nanomateriyallerin anyonik nanomateriyallere kıyasla daha genotoksik olabileceği düşünülmektedir [Singh ve ark., 2009].

Nanomateriyallerin yüzey kimyası, hücre hedefleme ya da ilaç dağıtımı uygulamaları için peptit gibi biyomoleküller eklenmek suretiyle modifiye edilebilir. Bu modifikasyonlar da nanomateriyallerin toksik potansiyeline katkıda bulunabilir [Hoshino ve ark., 2004; Clift ve ark., 2008].

Nanomateriyallerin hücre içine alımı ve biyomoleküllerle etkileşimi, bu materiyallerin şekline, boyutuna, aglomerasyon durumuna, yüzey yükü ve kimyasına göre değişebilmektedir. Bu nedenle nanomateriyallerin genotoksik riskleri, bunların karakterlerindeki farklılıklarla da ilişkili olabilmektedir. Bu ilişki dikkate alındığında nanomateriyallerin karakterizasyonunun büyük önem taşıdığı görülmektedir. Bu nedenle nanomateriyaller çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmektedir. Örneğin, taramalı ve/veya geçirmeli elektron mikroskobu (SEM veya TEM) kullanılarak, partikül boyutu, agregat boyutu ve şekli hakkında bilgi alınabilirken, nanopartiküllerin hidrodinamik çap ve yüzey yükünü karakterize etmek için dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılmaktadır. Bunların dışında nanopartiküllerin spesifik yüzel alanlarının tespiti için Brunauer-Emmett-Teller (BET), kristal boyut ve yapısı analizi için X ışını kırınımı analizleri (XRD) kullanılmaktadır [Isfort ve Rochnia, 2009].

2.8. Genotoksisite Testleri

Genetik toksikoloji, fiziksel ya da kimyasal ajanlar tarafından genlerde ve/veya kromozomlarda oluşturulan hasarları belirlemektedir. Genotoksisite testleri genomu etkileyebilecek UV ve radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateriyaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizleme testleri olarak kullanılmaktadır [Kumari ve ark., 2009; Mamur ve ark., 2010; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Zengin ve ark., 2011; Timoroğlu ve ark., 2012].

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur [Kihlman, 1966; Galloway ve ark., 1987; Garcia-Sagredo, 2008; Mahadevan ve ark., 2011]. Bu durum mutajenik kimyasalların tespitini ve onların insanlar üzerindeki

etkilerini karakterize etmek için genetik toksisite testlerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Genotoksik karsinojenlerin belirlenmesine ilişkin çeşitli düzenleyici kuruluşlar tarafından önerilen *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri bulunmaktadır [Thybaud ve ark., 2007]. Günümüzde büyük ölçüde kullanılan *in vitro* testler;

-Bakteriyal geri mutasyon testi (Ames testi)

-Memeli hücresi gen mutasyonu testi (örn; HPRT ileri mutasyon testi, fare lenfoma TK testi)

-Memeli hücresi kromozom anormalliği, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve komet testleridir.

Bunların yanı sıra *in vivo* genotoksisite çalışmaları için tipik olarak fare ya da ratların kemik iliği hücreleri kullanılarak kromozom hasarı değerlendirilir.

Ames testi eksojen maddelerin mutajenitesini belirlemede kullanılan bakteriyel geri mutasyon testidir. Test prosedüründe histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları kullanılmaktadır [Ames ve ark., 1975]. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini mutasyon ile kaybetmiş suşların, test maddesi ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleme özelliğini geri kazanmasına ve histidinsiz ortamda üreyebilmesi esasına dayanır. Histidinsiz ortamda üreyebilen koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir. Test sisteminin kolay ve ucuz olması nedeni ile, kimyasal maddelerin güvenliği analizlerinde sıklıkla tercih edilmektedir [Zeiger, 2007; Doak ve ark., 2012b].

Mutajenitenin değerlendirilmesinde Ames testine ilave olarak bir memeli hücresinin de kullanılması önerilmektedir [Doak ve ark., 2012b]. En çok kullanılan memeli hücresi mutajenite testleri, otozomal Timidin kinaz (TK) genini, fare lenfoma hücre hattında mutasyon belirteci olarak kullanan fare lenfoma testi (MLA) ve X kromozomuna bağlı olan Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HPRT) geni

ileri mutasyon testidir. Fare lenfoma hücresi ileri mutasyon testinde, Timidin kinaz (TK) aktivitesine sahip, L5178Y (TK+/+ or TK+/-) hücreler test ajanları ile muamele edilirler. Hücrelerin kendini ifade ettiği seçici kültür ortamında, sadece mutant hücreler (TK-/-) seçici ortam koşullarında hayatta kalırlar ve test bileşeninin mutajenitesi, mutantların sayısındaki artış ile tespit edilir [Oberly, 1997]. HPRT geni ileri mutasyon testi pürin biyosentezi için gerekli bir enzim olan HPRT enzimi bakımından mutant hücrelerin seçilmesi prensibine dayanır. Toksik bir nükleozit analogu olan 6-tioguanin (6-TG) bulunan ortamda mutant hücreler seçilip, koloni frekansına bakılarak test gerçekleştirilir [Albertini, 2001]. Ames testine göre her iki test sisteminin de avantajı TK veya HPRT lokuslarındaki mutant sekanslardaki olası mutasyonların çeşitli oranlarını karakterize ederek mutasyonel orjinin anlaşılmasını sağlamaktır [Doak ve ark., 2012b].

Kromozomal anormallik testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır [Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011]. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansının, karsinogenez ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir [Hagmar ve ark., 1998; Bolognesi, 2003; Garcia-Sagredo, 2008]. Mutajenik ajanların KA testi ile tespiti için, insan periferik lenfositleri en sık kullanılan test materyalidir. KA testinde kültüre alınmış memeli hücreleri test maddelerine maruz bırakılır ve hücre döngüsünün metafaz safhasında yakalanan kromozomlar boyandıktan sonra kromozom anormallikleri açısından mikroskop ile analiz edilir. Test çok zahmetli olmasına ve iyi bir sitogenetik deneyim gerektirmesine rağmen rutin genotoksisite testi olarak tercih edilmektedir.

Kimyasal mutajenlerin ve karsinojenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılan diğer bir test kardeş kromatit değişimi testidir. KKD, metafaz kromozomlarının kardeş kromatidleri arasındaki DNA segmentlerinin simetrik

değişimleridir [Garcia-Sagredo, 2008]. Değişimler simetrik olduğu için ilk başlarda kardeş kromatid değişimleri mutasyon olarak düşünülmemiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde KKD frekansının arttığı, bu nedenle KKD'nin DNA hasarının bir indikatörü olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [Latt ve ark., 1980; Perry ve Thompson, 1984; Albertini ve ark., 2000; Wilson III ve Thompson, 2007]. Moleküler mekanizması hakkında az bilgi olmasına rağmen, KKD'nin muhtemelen replikasyon çatalındaki DNA replikasyon hatalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir [Tucker ve ark., 1993; Beg ve ark., 2009; Montoro ve ark., 2012]. KKD testi ile özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptanmaktadır. KKD testinde, DNA kırıklarının görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) eklenmektedir. Bu kimyasal, replikasyon sırasında yeni oluşan DNA zincirlerine dahil olarak, kardeş kromatidlerdeki DNA parçalarının karşılıklı değişimini gözlenebilir hale getirmektedir.

Mikronükleus testi, basit oluşu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi gibi avantajlarından dolayı farmasötik ve kimyasal ajanların genotoksitesini karakterize etmek için yaygın kullanılan testlerdendir. MN'ler çekirdek bölünmesi sırasında anafazda geri kalan tüm bir kromozomdan ya da kromozom fragmanlarından köken alan ve esas çekirdeğe dahil olmayan oluşumlardır [Fenech, 2007]. İnsan periferik lenfositlerinde artmış MN frekansı ile kanser insidansı arasında önemli bir korelasyon olduğu gözlenmiştir [Parry ve Kirsch-Volders, 2010; Preston ve ark., 2010; Bonassi ve ark., 2011]. Mikronükleus yönteminde sitokinezi durdurmak amacı ile bir aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalasin B (Cyt B) kullanılmakta ve böylece bir hücre bölünmesi geçirmiş binükleat (iki çekirdekli) hücreler değerlendirilmektedir.

Komet tekniği, düşük seviyedeki hasarın tespitinde hassas olması, çok çeşitli doku ve hücre tiplerinde uygulanabiliyor olması, az sayıda hücrenin yeterli olması ve test performansının hızlı ve kolay gerçekleştirilmesi gibi avantajlarından dolayı DNA hasarı ve tamirinin değerlendirilmesinde standart bir teknik olarak popülerite

kazanmıştır [Speit ve ark., 2009; Kryston ve ark., 2011]. Komet yöntemi, negatif yüklü DNA fragmanlarının bir agaroz jel üzerinde elektriksel alanda göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu testte bir hücre süspansiyonu düşük erime ısıyla agar ile karıştırılır ve bu süspansiyon bir mikroskop lamı üzerine yayılır. Yüksek tuz konsantrasyonu içeren bir deterjan kullanılarak hücreler lize edildikten sonra spesifik bir pH'da DNA sarmalının çözünmesi ve elektroforez işlemleri gerçekleştirilir [Singh ve ark., 1988]. DNA'nın çözünmesi ve elektroforez aşamaları nötral pH (7-8)'da gerçekleştirilirse çift zincir kırıkları ve çapraz bağlanmalar saptanırken, pH 12,1-12,4'de gerçekleştirilirse, tek ve çift zincir kırıkları, tamamlanmamış eksizyon tamir bölgeleri ve çapraz bağlanmalar saptanır. pH 12,6'dan daha büyük olduğunda ise alkali labil bölgeler ve diğer tüm lezyon tipleri saptanır [Miyamae ve ark., 1997]. Elektroforez işlemini takiben, hazırlanan preparatlara nötralizasyon uygulanır ve DNA spesifik boyalarla (örneğin, etidyum bromür) boyandıktan sonra bir floresan mikroskop kullanılarak incelenir. Eğer DNA kırık içeriyorsa, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız (komet) görünümü oluşacaktır. DNA göçünün miktarı hücrelerde varolan DNA hasarına bağlıdır [Tice ve ark., 2000]. Komet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır. Kuyruk uzunluğu düşük düzeydeki hasarın değerlendirilmesi için iyi bir alternatif olmasına karşın, kuyruktaki DNA yüzdesi daha geniş oranda hasarı göstermektedir. Kuyruk momenti ise hem kuyruktaki DNA miktarını hem de kuyruktaki DNA dağılımını ölçmektedir [Karlsson, 2010].

2.9. Nanomateryaller ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

NM'lerin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, farklı organizmalarda ve farklı hücre kültürlerinde çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır.

Materyal biliminde çokça kullanılan karbon nanotüpleri ile yapılan çalışmalardan bazıları, bu materyalin az veya önemsiz hücresel yanıtlar oluşturduğunu göstermiştir [Kisin ve ark., 2007; Jacopsen ve ark., 2008; Davoren ve ark., 2009]. Diğer bazı çalışmalar ise CNT'lerinin fibröz yapıda olmaları nedeni ile belli hücre tiplerinde

sitotoksik ve inflamatuvar yanıtlar oluşturduğunu göstermiştir [Monteiro-Riviere ve ark., 2005; Zeni ve ark., 2008; Poland ve ark., 2008]. C60 ve türevlerinin DNA ile kompleksler oluşturabileceği, DNA zincir kırıklarını ve kromozomal hasarını indükleyebileceği saptanmıştır [Yasuharu ve ark., 2006]. Xu ve arkadaşları, gpt delta transgenik fare primer embriyo fibroblastlarında C60'ın mutajenik olduğunu tespit etmişlerdir [Xu ve ark., 2009]. Dhawan ve arkadaşları, etanol ve sudaki kolloidal C60 süspansiyonlarının, insan lenfositlerinde genotoksik olduğunu komet testiyle belirlemişlerdir [Dhawan ve ark., 2006]. Kisin ve arkadaşlarının tek çeperli karbon nanotüpleri ile yapmış olduğu bir genotoksisite çalışmasında, komet testinde bu nanotüplerin DNA hasarına yol açtığı tespit edilirken, MN ve Ames testinde negatif bir sonuç elde edilmiştir [Kisin ve ark., 2007].

Kuantum noktacıları kurşun, selenyum, kadmiyum gibi toksik elementler içerdiği için çevresel ve insan maruziyeti en çok çalışılan nanopartiküllerdendir. Kuantum noktacılarının poli etilen glikol (PEG) gibi biyolojik olarak uyumlu moleküllerle kaplanmasının, toksik etkisini azaltabileceği düşünülmeyle beraber, bu tür fonksiyonel grupların ya da kaplanmış kuantum noktacılarının da genotoksik olabileceği tespit edilmiştir [Hoshino ve ark., 2004; Anas ve ark., 2008].

Boyutu, şekli ve yüzey özellikleri, altın nanopartiküllerinin biyolojik etkilerini, özellikle sitotoksisitesini etkilemektedir [Qiu ve ark., 2010; Wang ve ark., 2010]. Embriyonik akciğer fibroblastlarında altın nanopartiküllerinin oksidatif DNA hasarını (8-OHdG adductları) indüklediği ve DNA tamir genleri ile hücre döngüsü kontrol noktası genlerinin ifadesini azalttığı tespit edilmiştir [Li ve ark., 2008].

Gümüş nanopartiküllerinin (Ag NP) insan glioblastoma hücrelerinde DNA hasarını indüklediği, ayrıca insan fibroblast hücrelerinde kromozom anormalliklerini artırdığı belirlenmiştir [Asharani ve ark., 2009]. Ag NP'leriyle muamele edilmiş insan bronşoepitelyal hücrelerinde, komet ve mikronükleus testiyle yapılan bir çalışmada, DNA kırıkları ve mikronükleus formasyonu bakımından doza bağlı artış saptanmıştır [Kim ve ark., 2011].

Silika NP'lerinin 37 ve 83 nm boyutlarındaki formlarının çeşitli konsantrasyonlarının farelere inhalasyon yoluyla verilmesi sonucunda, herhangi bir inflamatuvar, genotoksik ya da akciğerlerde histopatolojik etki görülmemiştir [Sayes ve ark., 2010]. Amorf silika nanopartiküllerinin fare fibroblast hücre hattında mikronükleus oluşumunu ve fare embriyonik fibroblastlarında gen mutasyonlarını indüklediği tespit edilmiştir [Park ve ark., 2011].

Kobalt krom (CoCr) partiküllerinin iki farklı boyutu (29.5 nm ve 2.9 µm) ile yapılan bir genotoksisite çalışmasında, bu partiküllerin komet testinde ve 8-OH-dG tespiti analizlerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu belirlenirken, her iki partikül boyutunun da MN oluşumunu indüklediği fakat 29.5 nm boyutundaki partikülün MN frekansını daha fazla artırdığı tespit edilmiştir [Papageorgiou ve ark., 2007]. Colognato ve arkadaşları, insan periferel lökositlerinde kobalt nanopartiküllerinin genotoksik etkilerini araştırmış, DNA hasarında ve mikronükleus frekansında doza bağlı artış tespit etmişlerdir [Colognato ve ark., 2008].

2.9.1. TiO₂ NP ile yapılan genotoksisite çalışmaları

TiO₂ NP'nin farklı insan ve hayvan hücre hatlarında inflamatuvar yanıtlar ve genotoksik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir [Wang ve ark., 2006; Reeves ve ark., 2007; Xu ve ark., 2009]. Rahman ve arkadaşları, Suriye Hamsteri Embriyo (SHE) fibroblastlarında TiO₂'in hem ultra ince, hem de mikron ebattaki partikülleriyle yaptıkları çalışmada, ultra ince partiküllerin test edilen konsantrasyonlarda (0.5-5µg/cm²) MN frekansını artırdığını ve kinetokor boyama tekniği kullanarak, bu etkinin klastojenik olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer yandan mikron ebattaki TiO₂ partiküllerinin MN frekansında bir artışa yol açmadığını belirlemişlerdir [Rahman ve ark., 2002].

Park ve arkadaşları, kültürdeki bronşoepitelyal hücrelerinde, TiO₂ nanopartiküllerinin perinükleer bölgede biriktiğini ve bunun sonucunda aynı bölgede ROT'lerinin arttığını göstermişlerdir [Park ve ark., 2008]. TiO₂ NP'lerine uzun dönemli maruziyetin, hücre bölünmesini yavaşlattığı ve anormal kromatin yapısı ve

ayrılmasına yol açtığı, kısa süreli maruziyetin ise hücre canlılığını ve büyümesini artırdığı saptanmıştır [Huang ve ark., 2009]. Periferik kan lenfositlerinde komet analizi ve mikronükleus testi kullanarak gerçekleştirilen bir çalışmada, TiO₂ NP'nin (25 nm) DNA hasarına yol açtığı ve bu hasarın reaktif oksijen türlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir [Kang ve ark., 2008]. Bunun tersine, *in vitro* insan periferik lenfositlerinde komet testi kullanılarak yapılan çalışmada TiO₂ NP'nin DNA hasarına yol açmadığı gösterilmiştir [Hackenberg ve ark., 2011a].

Falck ve arkadaşları, BEAS-2B hücrelerinde TiO₂'in rutil (<5 µm ve 10 × 40 nm) ve anataz (<25 nm) formlarıyla yaptıkları komet testinde, nanoboyuttaki anataz ve mikron boyuttaki rutil TiO₂'in farklı konsantrasyonlarının, tüm muamele sürelerinde DNA hasarını artırdığını tespit etmişlerdir. Mikronükleus testinde ise sadece nanoboyuttaki anataz formunun MN frekansını biraz artırdığını saptamışlardır [Falck ve ark., 2009]. Bhattacharya ve arkadaşları, insan bronşoepitelial hücrelerinde (BEAS-2B) ve fibroblastlarında 100 nm'nin altındaki TiO₂ ve Fe₂O₃ nanopartikülleriyle yaptıkları çalışmada, TiO₂ NP'lerinin komet testinde DNA kırıkları oluşturmadığını, Fe₂O₃ NP'lerinin ise her iki hücre hattında da önemli düzeyde DNA hasarına yol açtığını tespit etmişlerdir [Bhattacharya ve ark., 2009].

TiO₂ NP (100 nm) ile hem bitkilerde (*Allium cepa* ve *Nicotiana tabacum*) hem de insan lenfositlerinde gerçekleştirilen bir genotoksisite çalışmasında, bu nanopartikülün oksidatif stres belirteçlerinden biri olan malondialdehit (MDA) seviyesinde artışa sebep olduğu için genotoksik etkili olduğu, bu etkinin de lipid peroksidasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir [Ghosh ve ark., 2010]. Shukla ve arkadaşları, insan epidermal hücrelerinde, formamidopirimidin glikozilaz (FPG) enzimiyle modifiye edilmiş komet testinde TiO₂ NP'lerinin oksidatif DNA hasarı oluşturduğunu ve ayrıca mikronükleus oluşumuna yol açtığını göstermişlerdir [Shukla ve ark., 2011].

İnsan hepatoma hücrelerinde TiO₂ NP'lerinin iki farklı formu (25 nm anataz: TiO₂-An, ve <100 nm rutil: TiO₂-Ru) Fpg-Komet ve mRNA ekspresyonu analizleri yapılarak çalışılmıştır. Anataz formunun rutil formuna kıyasla daha fazla DNA hasarı

ve hücre içi ROT'leri oluşturduğu tespit edilmiştir. Buna dayanarak TiO₂ NP'lerinin toksik potansiyelinin, kristal yapısına bağlı olarak da değişebileceği gösterilmiştir [Petković ve ark., 2011]. Woodruff ve arkadaşları, kaplanmamış, küre şeklindeki 10 nm ebatlı TiO₂ NP'lerinin genotoksik etkilerini komet testi ve Ames testi kullanarak araştırmış ve TiO₂ NP'lerinin Ames testinde geri mutasyonu indüklemediğini ve komet testinde DNA hasarına yol açmadığını göstermişlerdir [Woodruff ve ark., 2012]. Anataz TiO₂ NP'lerinin *in vivo* genotoksik etkileri, Sprague–Dawley ratlara intratrakeal olarak verildikten sonra komet testi kullanılarak araştırılmıştır. TiO₂ NP'lerinin 1,0 ve 5,0 mg/kg (tek uygulama) ile 0,2 or 1,0 mg/kg (5 hafta boyunca uygulama) dozlarının DNA kuyruk yüzdesinde artışa yol açmadığı, bu nedenle genotoksik olmadığı belirtilmiştir [Naya ve ark., 2012].

2.9.2. ZnO NP ile yapılan genotoksisite çalışmaları

Çinko oksit nanopartiküllerinin toksik olmadığı ve biyolojik olarak uyumlu olduğu düşünülse de, literatürlerde bu nanopartiküllerin olumsuz hücresel yanıtları olduğu belirtilmiştir [Singh ve ark., 2009, Kim ve ark., 2010].

Karbon black, tek çeperli karbon nanotüpleri, silikon dioksit ve çinko oksit nanopartiküllerinin sitotoksik, genotoksik ve oksidatif etkilerinin belirlenmesi için fare embriyosu fibroblast hücrelerinde karşılaştırmalı bir çalışma yapılmış, analizler neticesinde ZnO NP'nin, test edilen diğer nanopartiküllere göre daha sitotoksik olduğu, yine ZnO NP ile kıyaslandığında karbon nanotüplerinin daha fazla DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır [Yang ve ark., 2009]. Landsiedel ve arkadaşları, güneş kremlerindeki UV koruma ajanları olan TiO₂ ve ZnO nanomateryallerinin potansiyel genotoksisitesini *in vivo* ve *in vitro* test sistemlerinde araştırmışlardır. Araştırmanın sonuçlarına göre *in vitro* (Ames testi ve V79 hücrelerinde mikronükleus testi) ve *in vivo* (fare kemik iliği MN testi ve inhalasyon yoluyla maruz bırakılan ratlarda akciğer hücrelerinde DNA hasarı) test sistemlerinde herhangi bir genotoksik etki gözlenmemiştir [Landsiedel ve ark., 2010].

İnsan epidermal hücre hattında ZnO nanokürelerinin, hücre canlılığında azalmaya neden olduğu, glutatyon, katalaz ve süperoksit dismutaz düzeyinde azalmaya yol açarak oksidatif stresi indüklediği, ayrıca komet testi ile gerçekleştirilen genotoksisite analizinde DNA hasarını artırdığı saptanmıştır [Sharma ve ark., 2009]. ZnO NP'nin nazal mukoza hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkiler ile birlikte, proinflamatuvar yanıtlar oluşturduğu tespit edilmiştir [Hackenberg ve ark., 2011b]. 30 nm boyutundaki ZnO NP'nin farelerde 14 gün oral alımını takiben Fpg-Komet testi yapılmış, farelerin karaciğer hücrelerinde DNA kuyruk yüzdesinde ve olive kuyruk momentinde artış saptanmıştır [Sharma ve ark., 2012].

Çok sayıdaki tıbbi ve kozmetik ürünlerde artan uygulamalarından dolayı TiO₂ NP'nin genotoksisitesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, ZnO NP ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Diğer yandan, literatürde verilen sonuçlar arasında da çelişkilerin bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, TiO₂ ve ZnO NP'nin genotoksik etkileri kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve komet testi ile incelenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelenmesi için materyal

Bu araştırmada, insan periferel kan lenfositlerinde, titanyum dioksit (TiO₂) ve çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin genotoksik etkileri incelenmiştir. Periferel kan, sigara ve alkol kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan, deney aşamaları sırasında genotoksik ajanlara ve radyasyona maruz kalma öyküsü olmayan, 25-27 yaşında üç bayan donörden temin edilmiştir. Araştırma, G.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup ve periferik kanlar, gönüllü olur formu imzalayan donörlerden alınmıştır.

3.1.2. Test materyalleri ve kullanılan kimyasallar

TiO₂ Nanopartikülleri

Test materyali olarak kullanılan titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂ nanopowder) Sigma-Aldrich'den (CAS-No: 13463-67-7) temin edilmiştir. Partikül boyutu <100 nm (BET), yüzey alanı 14 m²/g, %1 Mn katkılı, Erime noktası >350°C (lit.).

ZnO Nanopartikülleri

inko oksit nanopartikülleri (ZnO nanotoz) Sigma-Aldrich'den (CAS-No: 1314-13-2) ticari olarak temin edilmiştir. Partikül boyutu <100 nm, yüzey alanı 15-25 m²/g.

alışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerden Bromodeoksiüridin (CAS-No: 59-14-3), Mitomisin-C (CAS-No: 200-008-6), Kolkisin (CAS-No: 64-86-8), Sitokalsin-B (CAS-No: 14930-96-2) ve NaCl (CAS-No: 7647-14-5) Sigma'dan, EDTA (CAS-No: 6381-92-6), Tris (CAS-No: 77-86-1), NaOH (CAS-No: 1310-73-2), Triton X-100 (CAS-No: 9002-93-1), DMSO (CAS-No: 67-68-5), Düşük erime

ısılı agar (LMA) (CAS-No: 9012-36-6), Yüksek erime ısılı agar (NMA) (CAS-No: 9012-36-6), EtBr (CAS-No: 1239-45-8) ve KCl (CAS-No:7447-40-7) Appllichem'den, Kromozom Medium B (Katalog No: F 5023), PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Biochrom'dan temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Test materyallerinin hazırlanması

TiO₂ NP'lerinin hazırlanması

TiO₂ NP'lerinin PBS (phosphate buffered solution)'de hazırlanan 100 µg/ml'lik stok çözeltisi, ultrasonik banyoda (J.P. Selecta, v: 50-60 Hz) 30 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Bu stok solusyondan PBS ile 20, 40, 60, 80 µg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. TiO₂ NP'lerinin hazırlanan tüm konsantrasyonları kültürdeki hücrelere uygulanmadan önce 15 dakika daha sonike edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan TiO₂ NP'lerinin konsantrasyonunun belirlenmesinde literatürlerden yararlanılmıştır.

ZnO NP'lerinin hazırlanması

ZnO nanopartiküllerinin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için, TiO₂ NP için kullanılan konsantrasyonlar denenmiş, ancak bu konsantrasyonlar kültürdeki lenfositlerde yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Bu nedenle ZnO NP'lerinin 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir. ZnO NP'nin distile suda hazırlanan 30 µg/ml'lik stok süspansiyonu, ultrasonik banyoda 30 dakika sonikasyona tabi tutulduktan sonra, seri bir şekilde seyreltemeler yapılarak daha düşük olan diğer konsantrasyonları hazırlanmıştır. Kültürdeki hücrelere uygulanmadan önce, hazırlanan tüm süspansiyonlara 15 dakika sonikasyon daha uygulanmıştır.

3.2.2. Test materyallerinin karakterizasyonu

Genotoksik etkileri incelenecek olan TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Zeta Potansiyeli kullanılarak yapılmıştır.

SEM Analizleri

TiO₂ NP'nin PBS'deki ve ZnO NP'lerinin sudaki süspansiyonu, lamel üzerine damlatılıp kaplama cihazında (Polaron SC 502) altınla kaplandıktan sonra SEM (JEOL JSM 6060) ile 5-15 kV'de incelenmiştir.

Zeta Potansiyeli ve Boyut Dağılımı

TiO₂ ve ZnO NP'lerinin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli (ζ), dinamik ışık saçılımı ve faz analizi, ışık saçılımı kullanılarak Lazer Doppler Elektroforez tekniği ile çalışan Malvern Nano-ZS zeta-sizer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

ζ -potansiyeli ve boyut dağılımı ölçümleri için, PBS içinde hazırlanan TiO₂ NP (20-100 μ g/ml) ve distile suda hazırlanan ZnO NP (1-30 μ g/ml)'nin çeşitli derişimlerdeki koloidal dispersiyonları, ultrasonik banyoda 30 dakika sonike edilmiştir. İyonik denge sağlanması için, bütün dispersiyonlar ölçümlerden önce en az 2 saat bekletilmiştir. Her bir konsantrasyondaki her bir ölçüm için, cihaz tarafından 100 veri elde edilmiş ve ölçüm en az üç kez tekrarlanarak, ortalama ζ -potansiyeli elde edilmiştir.

3.3. Preparatların Hazırlanması

3.3.1. Kültürdeki insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için preparatların hazırlanması

Bu çalışmada, TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan testlerden ikisi kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testidir. Kromozomal anormallik (KA) testi, Evans ve arkadaşlarının (1984) metoduna göre bazı değişikliklerle [Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006], kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemine göre bazı modifikasyonlarla [Speit ve Haupter, 1985] uygulanmıştır. Bu testi uygulamak amacıyla, yukarıda belirtilen özelliklere sahip sağlıklı bayan donörlerden alınan periferik kanın 0,2 ml'si steril şartlarda 2,5 ml'lik kromozom ortamı (Chromosome Medium B) içeren tüplere ilave edilmiştir. Her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde BrdU ilave edilmiş ve tüpler 37°C'de toplam 72 saat inkübe edilmiştir. Kültür başlangıcından 24 ve 48 saat sonra, TiO₂ NP'lerinin 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları, ZnO NP'lerinin 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/mL'lik konsantrasyonları kültür ortamına ilave edilmiştir. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce, hücreler kolkisin ile muamele edilmiştir. Deneylerde bir negatif (distile su), bir çözücü (PBS) ve bir pozitif kontrol (MMC; 0,20 µg/ml) grubu da kullanılmıştır.

Kültür süresi bitiminde tüplere 37°C'deki 0,075M KCl çözeltisinden ilave edilip, 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra kültür tüpleri santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Fiksasyon için tüplere 3:1 metanol:asetik asit ilave edilmiştir. Fiksasyondan sonra tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik süspansiyon pastör pipeti ile çekilerek, önceden temizlenmiş lamlar üzerine damlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması

TiO₂ ve ZnO NP'lerinin insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla aşağıdaki metot uygulanmıştır.

Donörlerden alınan periferik kanın 0,2 ml'si, içerisinde 2,5 ml'lik kromozom ortamı bulunan tüplere ilave edilerek 37°C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresi toplam 72 saat olarak uygulanmıştır. Kültürdeki hücreler 24. saatte, TiO₂ NP'lerinin 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL'lik, ZnO NP'lerinin ise 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/mL'lik konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Ayrıca bir negatif, bir çözücü (PBS) ve bir pozitif (MMC; 0,20 µg/mL) kontrol grubu da kullanılmıştır. Tüm kültürlerle inkübasyonun 44. saatinde 7 µl sitokalsin B (Cytochalasin-B) ilave edilmiştir. Kültür süresi bitiminde tüpler santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve 0,075 M KCl ilave edilerek etüvde 5 dakika bekletilmiştir. Kültürler tekrar santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra, 3:1 metanol:asetik asitte, üç kez fiksasyon uygulanmıştır. Üçüncü fiksatife %1'lik formaldehit ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak önceden temizlenmiş lamalar üzerine damlatılmıştır. Hazırlanan preparatlar, oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur.

Preparatların boyanması

Kromozom anormallikleri ve mikronükleus testi için hazırlanan preparatlar, Sorensen tamponunda hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) boyanmıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin gözlenmesi için, preparatlar floresan+giemsa metoduna göre boyanmıştır [Speit ve Haupter, 1985]. Bu metotda preparatlar, 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışlandıktan sonra 1xSSC'de 1 saat inkübe edilmiş ve % 5'lik Giemsa ile (pH= 6,8) boyanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulmuş preparatlar, depex (DPX) ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Mitotik İndeks ve Kromozom Anormalliklerinin Belirlenmesi

Mitotik indeksin (Mİ) belirlenmesinde her bir uygulama için her bir donörden 1000'er hücre (toplam 3000) değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, mitoz bölünme geçiren hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden değeri şeklinde belirlenmiştir. Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, her bir uygulama için her bir donörden kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz (toplam 300) değerlendirilerek, anormal hücrelerin yüzdesi (KA%) ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) belirlenmiştir.

Replikasyon İndeksinin ve Kardeş Kromatid Değişiminin Belirlenmesi

Replikasyon indeksinin belirlenmesi amacı ile, her bir uygulama için her bir donörden 100 hücre (toplam 300) incelenmiştir. Bunlar arasında birinci (M₁), ikinci (M₂) ve üçüncü (M₃) metafaz evresindeki hücrelerin sayısı belirlenmiş ve replikasyon indeksi (Rİ) = $1x(M_1) + 2x(M_2) + 3x(M_3)/N$ (N= incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır.

Kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısının belirlenmesinde, her bir uygulama için her bir donörden, kromozomları iyi dağılmış, ikinci mitozdaki 25 hücre (toplam 75) incelenmiştir.

Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Frekansının Belirlenmesi

Mikronükleus frekansının belirlenmesi için çekirdek bölünmesi geçirmiş fakat sitoplazmik bölünme geçirmemiş iki çekirdekli (binükleat) hücreler değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, her bir uygulama için her bir donörden 1000 binükleat hücre (toplam 3000), mikronükleus taşıyıp taşımadığına ve mikronükleus sayısına göre değerlendirilmiştir [Fenech ve ark., 2003].

Hücre bölünme kinetiği olarak da bilinen nükleer bölünme indeksi, her bir uygulama için her bir donörden 500 hücre (toplam 1500) incelenerek,

$1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times (N3 + N4) / n$ formülünden belirlenmiştir. Burada N1 bir çekirdekli hücre, N2 iki çekirdekli hücre, N3 üç çekirdekli hücre, N4 dört ve daha fazla çekirdeğe sahip hücrelerin sayısını, n ise incelenen toplam hücre sayısını ifade etmektedir.

3.3.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Komet Testi

TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin, primer DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacı ile izole edilmiş insan lenfositlerinde komet testi uygulanmıştır. Bu çalışmada, Singh ve arkadaşlarının (1988) uyguladığı metot, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır.

Donörlerden alınan periferik kanın 100'er µl'si, PBS ile süspansiyon edilmiş ve Biocoll ile lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositler, sonikasyon uygulanmış TiO₂ NP'nin 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml'lik ve ZnO NP'nin 1, 5, 10, 20 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Muamelede bir negatif (distile su), bir pozitif (100 µM H₂O₂) ve bir de çözücü kontrol (PBS) grubu bulundurulmuştur.

İnkübasyon süresini takiben lenfositler agar kaplı lamalar üzerine yayılmıştır. Preparatlar lizingde 1 saat ve takiben elektroforez tamponunda (pH>13) 20 dak. bekletilmiştir. Daha sonra 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez uygulanmıştır. Preparatlar, nötralizasyon işleminden sonra EtBr ile boyanmış ve her bir uygulama için her bir donörden 100 hücre (toplam 300) incelenmiştir. Hücreler, floresan mikroskopunda (Olympus, 546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli), 10x40'ta, Comet Assay IV programı kullanılarak, % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momenti bakımından değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analizler

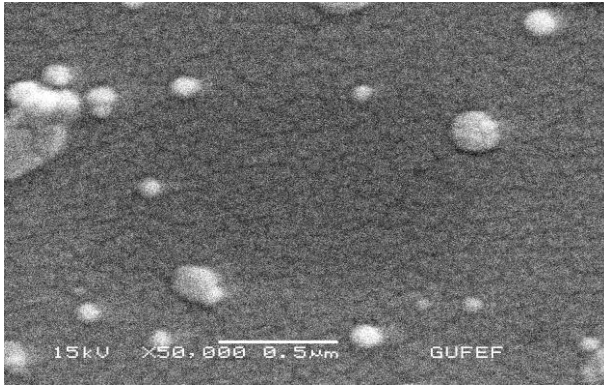
Bu araştırmada, mikronükleus frekansı, nükleer bölünme indeksi, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi sayısı, mitotik indeks, replikasyon indeksi, % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu (μm) ve kuyruk momenti için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi uygulanmıştır. Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında, mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ), nükleer bölünme indeksi (NBİ), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus frekansı için z-testi, kardeş kromatid değişimi ve komet testi için t-testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

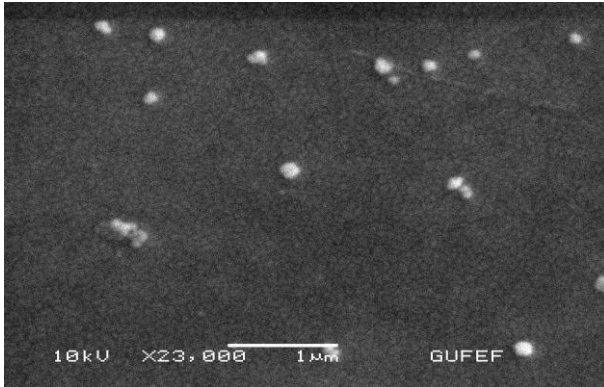
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin boyut dağılımı ve aglomerasyon durumu SEM kullanılarak değerlendirilmiştir (Resim 4.1 ve Resim 4.2). SEM ile TiO₂ ve ZnO NP'nin küresel formda ve 10-300 nm boyutlarında partiküller içerdiği, ayrıca bu nanopartiküllerin çeşitli ebatlarda aglomeratlar oluşturduğu gözlenmiştir.



Resim 4.1. TiO₂ NP'nin SEM görüntüsü



Resim 4.2. ZnO NP'nin SEM görüntüsü

4.1.2. Zeta potansiyeli ve hidrodinamik çapın belirlenmesi

TiO₂ NP'nin PBS'deki ve ZnO NP'lerinin distile sudaki çeşitli derişimlerinin zeta potansiyeli ölçülmüş ve hidrodinamik çapları belirlenmiştir. Ölçümler TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin negatif elektrik yüküne sahip olduğunu göstermiştir. Zeta potansiyeli TiO₂ NP için ortalama $-24,22 \pm 0,52$ mV, ZnO NP için $-27,68 \pm 1,54$ 'dir. TiO₂ nanopartiküllerinin ortalama hidrodinamik çapının $804,30 \pm 15,06$ nm, ZnO nanopartiküllerinin ise $495,80 \pm 51,15$ nm olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Genotoksisite Çalışmaları

4.2.1. TiO₂ NP uygulaması

Kromozomal anormallik ve mitotik indeks üzerine etkisi

TiO₂ NP'nin beş farklı konsantrasyonun uygulandığı insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

TiO₂ NP'lerinin insan lenfositlerine muamelesi sonucunda, kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme ve disentrik olmak üzere beş farklı yapısal kromozom anormalliği ve poliploidi şeklinde bir tip sayısal kromozom anormalliği gözlenmiştir. Kromatid kırığı, en çok görülen anormallik tipidir (Resim 4.3).

TiO₂ NP'lerinin kültürdeki hücrelere 24 saatlik muamelesinde, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin (KA/hücre) tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, anormal hücre yüzdesi ve KA/hücre frekansında sadece 20 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir.

TiO₂ NP'nin 48 saatlik muamelesinde, hem anormal hücre yüzdesi, hem de hücre başına düşen anormallik frekansı, tüm konsantrasyonlarda kontrole göre bir artış göstermiştir. Ancak bu artış KA/hücre frekansında 20, 80 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ve anormal hücre yüzdesinde ise sadece 20 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlıdır. TiO₂ NP, çözücü kontrole göre KA/hücre frekansında anlamlı bir artış göstermezken, anormal hücre yüzdesinde sadece 20 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlı artış göstermiştir. Regresyon analizlerinde bu artışların konsantrasyona bağlı bir ilişkisi olmadığı belirlenmiştir (anormal hücre yüzdesinde 24 saatlik uygulamada $r=0,328$, 48 saatlik uygulamada $r=0,314$; hücre başına düşen anormallik sayısında 24 saatlik uygulamada $r=0,298$, 48 saatlik uygulamada $r=0,403$).

Yapılan analizlerde, TiO₂ NP'leri ile 24 saatlik uygulamada mitotik indeks frekansı, hem kontrole ve hem de çözücü kontrole göre tüm konsantrasyonlarda (40 µg/ml hariç) azalmıştır. Bu azalma yalnızca 60 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlıdır. 48 saatlik muamelede ise mitotik indeks frekansında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Regresyon analizlerine göre konsantrasyon artışı ile mitotik indeksteki düşüşler arasında zayıf bir korelasyon vardır (24 saatlik uygulamada $r=-0,608$, 48 saatlik uygulamada $r=-0,743$).

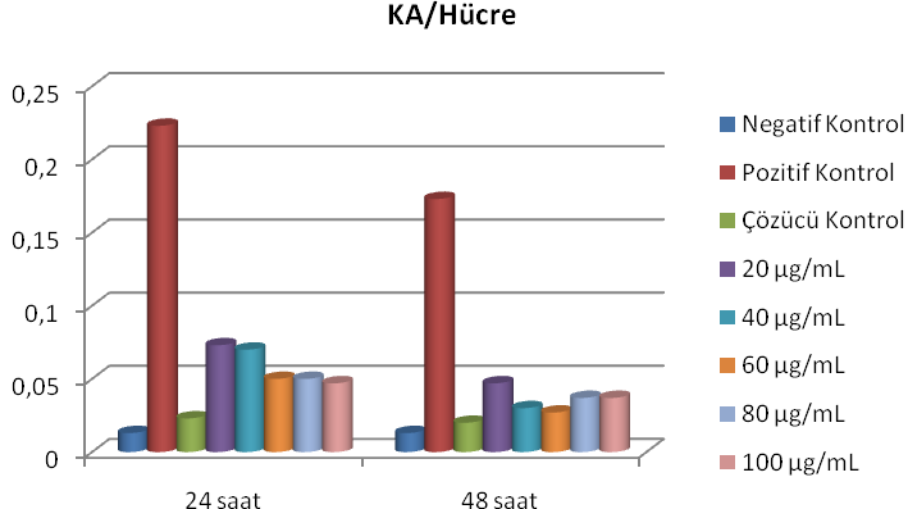
Çizelge 4.1. Titanyum dioksit nanopartikül uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (Saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Yapısal					Sayısal				
			ktk	kzk	ktd	f	kkb	dis	p			
Negatif Kontrol	24	0	2	-	-	-	2	-	-	1,33±0,66	0,013±0,006	5,57±0,42
Pozitif Kontrol	24	0,2	32	20	5	7	3	-	-	20,33±2,32	0,223±0,024	4,50±0,38
Çözücü Kontrol	24	0	6	-	-	-	1	-	-	2,33±0,87	0,023±0,009	4,70±0,39
TiO ₂ NP	24	20	17	3	-	2	-	-	-	6,00±1,37**+	0,073±0,015****+	4,57±0,38
		40	14	3	-	-	4	-	1	6,67±1,44***+	0,070±0,015****+	5,20±0,40
		60	11	3	-	-	1	-	-	4,33±1,17*	0,050±0,012**	4,43±0,38*
		80	8	6	-	-	-	1	-	5,00±1,26*	0,050±0,012**	4,43±0,38*
		100	11	1	-	-	2	-	-	4,67±1,22*	0,047±0,012*	4,60±0,38
Negatif Kontrol	48	0,	3	1	-	-	-	-	-	1,33±0,66	0,013±0,006	4,93±0,39
Pozitif Kontrol	48	0,2	16	26	4	-	5	1	1	14,00±2,00	0,173±0,022	3,27±0,32
Çözücü Kontrol	48	0	6	-	-	-	-	-	-	2,00±0,81	0,020±0,008	5,07±0,40
TiO ₂ NP	48	20	10	1	-	2	2	-	1	5,33±1,30**+	0,047±0,012*	4,37±0,37
		40	7	-	-	-	1	1	-	3,00±0,98	0,030±0,010	4,97±0,40
		60	5	1	-	-	2	1	1	3,33±1,03	0,027±0,010	4,97±0,40
		80	5	1	-	-	5	-	1	3,33±1,03	0,037±0,011*	4,87±0,39
		100	6	-	-	-	5	-	1	4,00±1,13*	0,037±0,011*	5,33±0,41

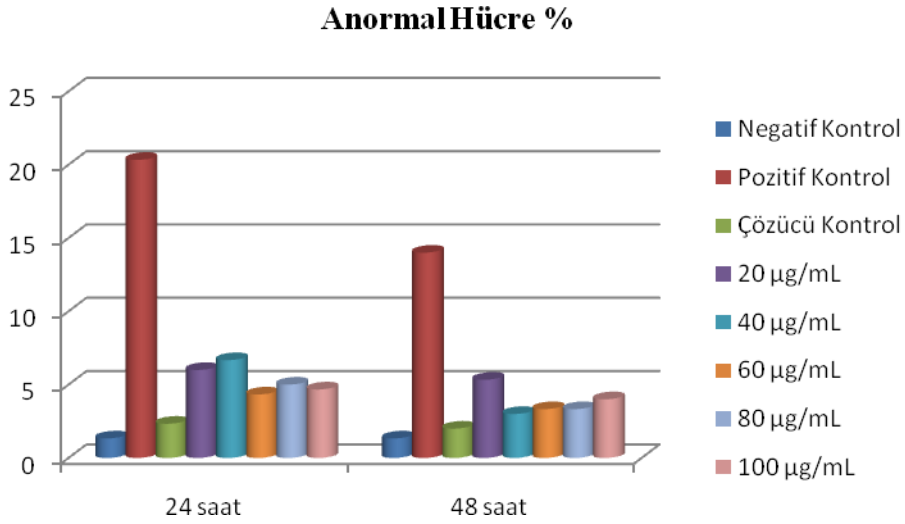
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, ktd: kromatid değişimi, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik kromozom, p: poliploidi, SH: standart hata

*Kontrolle göre p<0,05 düzeyinde anlamlı; ** Kontrolle göre p<0,01 düzeyinde anlamlı; *** Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi).

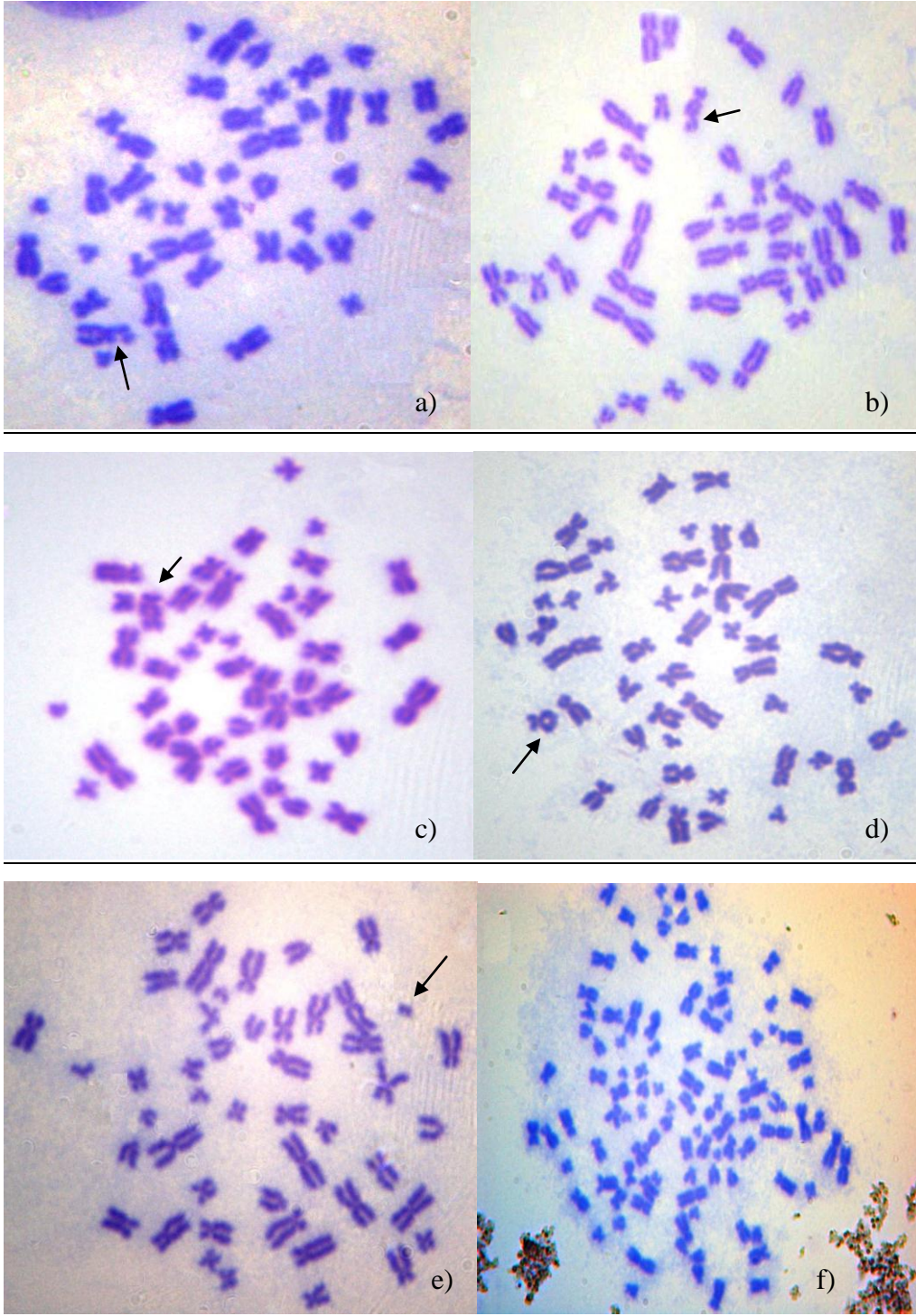
+ Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde ++ Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-testi).



Şekil 4.1. TiO₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde hücre başına düşen anormallik frekansı



Şekil 4.2. TiO₂ NP ile muamele edilen lenfositlerdeki anormal hücre frekansı



Resim 4.3. TiO_2 NP uygulaması sonucunda lenfositlerde gözlenen kromozom anormallikleri. a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı, c) disentrik, d) kardeş kromatidlerde birleşme, e) fragment, f) poliploidi

Kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi üzerine etkisi

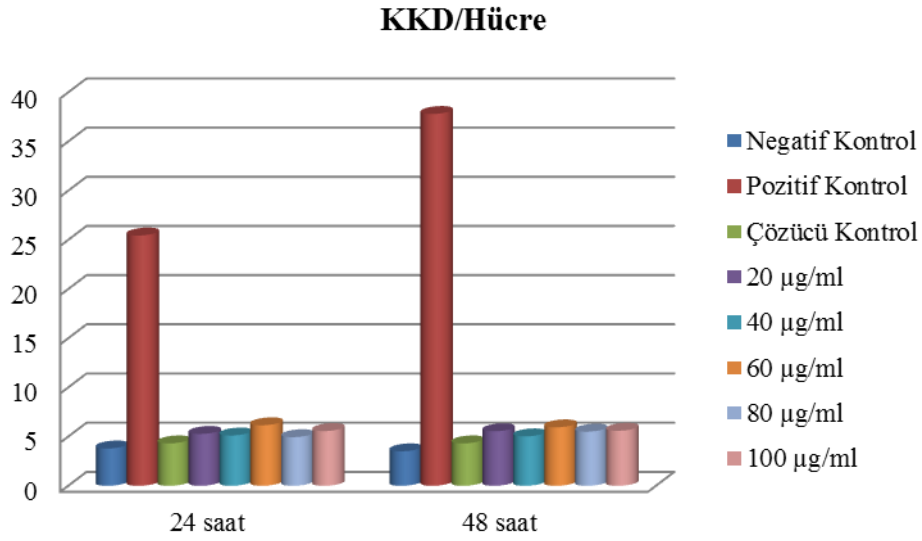
TiO₂ NP'lerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi üzerine etkileri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. TiO₂ NP'nin 24 saatlik uygulaması, kardeş kromatid değişimi frekansını tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml) kontrole göre anlamlı düzeyde artırmıştır. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, TiO₂ NP'nin 40 ve 80 µg/ml'lik konsantrasyonları hariç, KKD frekansı diğer dozlarda anlamlı bir artış göstermiştir. TiO₂ NP ile 48 saat muamele sonucunda, KKD frekansı tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında ise 40 µg/ml'lik konsantrasyon hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir artış gözlenmiştir. TiO₂ NP'nin hem 24 saatlik ve hem de 48 saatlik uygulaması, replikasyon indeksi üzerinde anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. Her iki muamele süresinde de gözlenen artışlarda konsantrasyona bağlı zayıf bir korelasyon vardır (24 saatlik uygulamada r=0,662; 48 saatlik uygulamada r=0,676).

Çizelge 4.2. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi frekansları

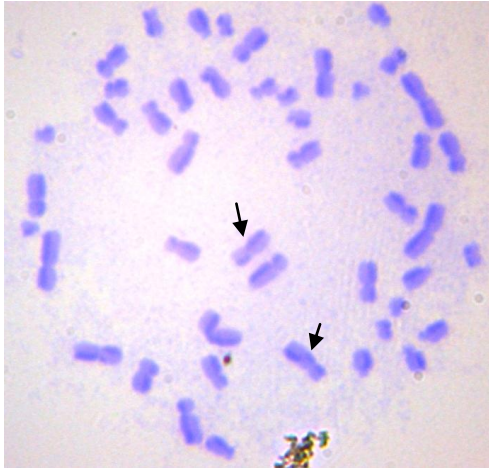
Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)						
Kontrol	24	0	0-12	3,80±0,26	46	85	169	2,41±0,04
MMC	24	0,2	10-55	25,45±1,06	51	124	125	2,25±0,04
PBS	24	0	0-12	4,32±0,30	41	94	165	2,41±0,04
TiO ₂ NP	24	20	2-12	5,28±0,29 ^{ab}	45	83	172	2,42±0,04
		40	0-11	5,12±0,29 ^a	61	84	155	2,31±0,04
		60	1-19	6,16±0,35 ^{ab}	55	91	154	2,33±0,03
		80	0-13	4,95±0,27 ^a	83	104	113	2,10±0,05
		100	1-14	5,57±0,32 ^{ab}	71	88	141	2,23±0,05
Kontrol	48	0	0-9	3,51±0,29	81	107	112	2,10±0,05
MMC	48	0,2	12-48	37,81±1,62	131	148	21	1,60±0,04
PBS	48	0	0-8	4,32±0,25 ^a	47	99	154	2,36±0,04
TiO ₂ NP	48	20	2-14	5,55±0,27 ^{ab}	66	110	124	2,19±0,04
		40	0-12	5,03±0,29 ^a	65	90	145	2,27±0,05
		60	1-13	5,95±0,28 ^{ab}	52	79	169	2,39±0,04
		80	1-11	5,51±0,27 ^{ab}	59	92	149	2,30±0,05
		100	0-12	5,60±0,28 ^{ab}	39	81	180	2,47±0,04

^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

^b Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)



Şekil 4.3. TiO_2 NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi frekansı



Resim 4.4. TiO_2 NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimleri

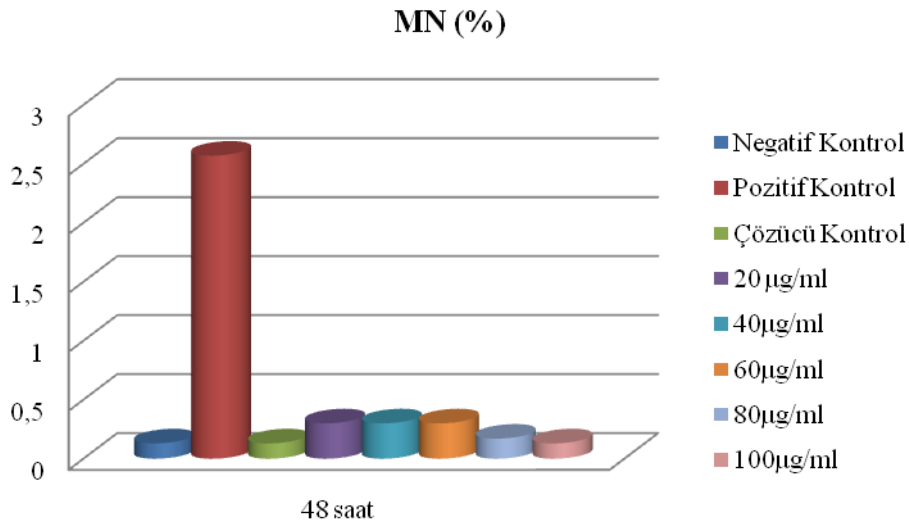
Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

TiO_2 NP'nin insan lenfositlerinde MN frekansını tüm konsantrasyonlarda (en yüksek konsantrasyon, 100 $\mu\text{g/ml}$ hariç) kontrole göre artırdığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.4). MN frekansındaki

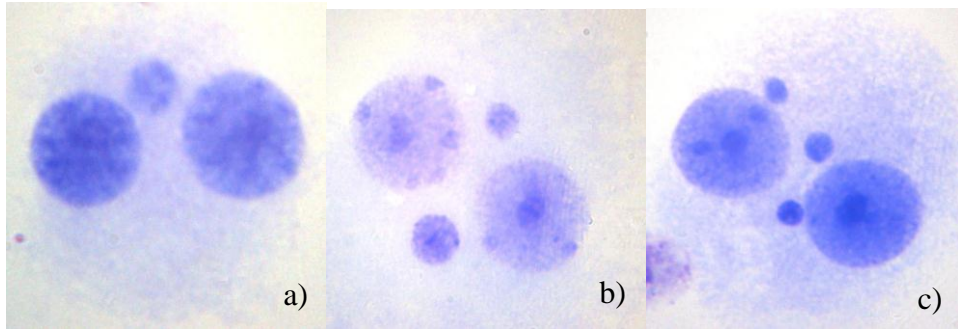
artışlar konsantrasyona bağlı değildir ($r=0,113$). TiO_2 NP'nin, nükleer bölünme indeksini önemli bir şekilde etkilemediği belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde daha ziyade bir mikronükleuslu binükleat hücreler gözlenmesine rağmen, iki ve üç mikronükleuslu binükleat hücrelere de rastlanmıştır (Resim 4.5).

Çizelge 4.3. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerdeki mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi frekansları

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	MN \pm SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi \pm SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)			
Kontrol	48	0	3000	0,13 \pm 0,066	1,57 \pm 0,32
MMC	48	0,2	3000	2,57 \pm 0,289	1,52 \pm 0,31
PBS	48	0	3000	0,13 \pm 0,066	1,94 \pm 0,36
TiO_2 NP	48	20	3000	0,30 \pm 0,099	1,66 \pm 0,33
		40	3000	0,30 \pm 0,099	1,60 \pm 0,32
		60	3000	0,30 \pm 0,099	1,62 \pm 0,33
		80	3000	0,17 \pm 0,075	1,61 \pm 0,33
		100	3000	0,13 \pm 0,066	1,60 \pm 0,32



Şekil 4.4. TiO_2 NP ile muamele edilen insan lenfositlerinde mikronükleus frekans



Resim 4.5. TiO_2 NP ile muamele edilen lenfositlerde mikronükleuslu binükleat hücreler. a) bir mikronükleuslu binükleat, b) iki mikronükleuslu binükleat, c) üç mikronükleuslu binükleat

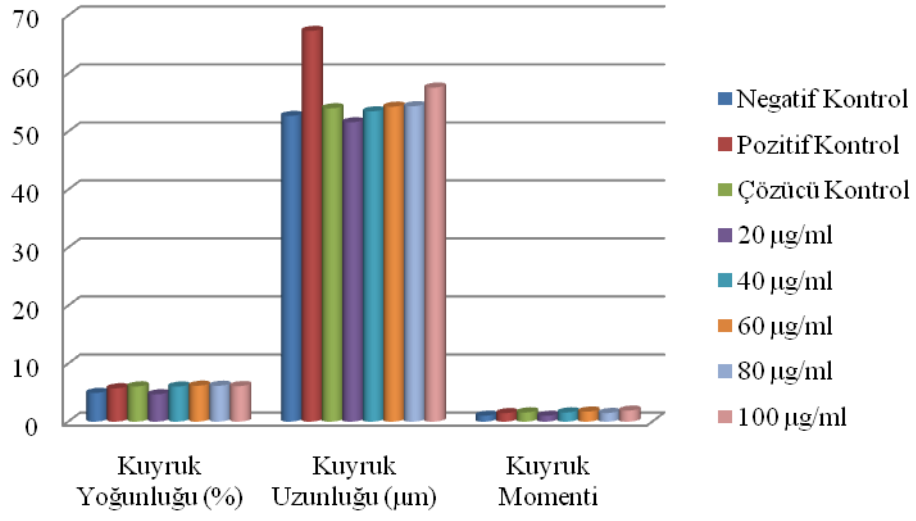
Primer DNA hasarı üzerine etkisi

TiO_2 nanopartiküllerinin izole edilen insan lenfositlerinde DNA hasarı üzerine etkileri Çizelge 4.4' de gösterilmiştir. TiO_2 NP'nin insan lenfositlerinde, kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinde meydana getirdiği artışların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı (kuyruk uzunluğunda, en yüksek konsantrasyon, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hariç) belirlenmiştir. Bunların yanı sıra, kuyruk yoğunluğu ($r=0,77$), kuyruk uzunluğu ($r=0,71$) ve kuyruk momentindeki ($r=0,86$) artışların konsantrasyona bağlı olduğu görülmüştür.

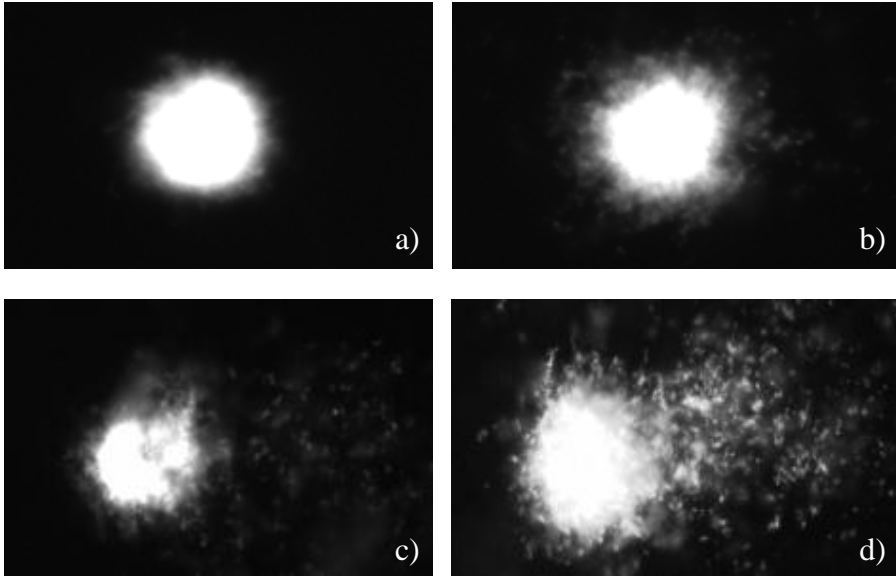
Çizelge 4.4. Titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen izole lenfositlerdeki DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (μm)	Kuyruk Momenti
	Süre (dakika)	Konsantrasyon			
Negatif Kontrol	30	0, $\mu\text{g}/\text{ml}$	4,95 \pm 0,44	52,70 \pm 0,55	1,03 \pm 0,09
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	30	100 μM	5,75 \pm 0,50	67,36 \pm 1,75	1,46 \pm 0,13
Çözücü Kontrol (PBS)	30	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,07 \pm 0,70	54,02 \pm 0,70	1,59 \pm 0,29
TiO_2 NP	30	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4,71 \pm 0,53	51,60 \pm 0,64	1,01 \pm 0,11
		40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,04 \pm 0,70	53,49 \pm 0,68	1,59 \pm 0,29
		60 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,19 \pm 0,70	54,29 \pm 0,70	1,73 \pm 0,36
		80 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,18 \pm 0,65	54,38 \pm 0,63	1,49 \pm 0,25
		100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,12 \pm 0,75	57,59 \pm 1,02*	1,90 \pm 0,41

*Kontrolle göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.5. TiO₂ NP ile muamele edilen lenfositlerde komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti



Resim 4.6. TiO₂ NP ile muamele edilen izole lenfositlerde oluşan DNA hasarları. a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

4.2.2. ZnO Nanopartikül Uygulaması

Kromozomal anormallik ve mitotik indeks üzerine etkisi

ZnO nanopartikül uygulaması ile insan lenfositlerinde dört tip yapısal anormallik saptanmıştır. Bunlar; kromatid ve kromozom kırıkları, kromatid değişimi ve fragmenttir. Ayrıca iki tip sayısal anormallik gözlenmiş olup bunlar poliploidi ve endoredublikasyondur (Resim 4.7).

ZnO NP ile 24 saatlik uygulamada, hem anormal hücre yüzdesinin ve hem de hücre başına düşen anormallik frekansının kontrole göre artış gösterdiği, ancak bu artışın sadece en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 µg/ml) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. ZnO NP'nin 48 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik frekansı tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düzeyde artış göstermiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). Bu değerlerin konsantrasyon artışı ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (anormal hücre yüzdesinde 24 saatlik uygulamada $r=0,88$, 48 saatlik uygulamada $r=0,69$; hücre başına düşen anormallik sayısında 24 saatlik uygulamada $r=0,93$, 48 saatlik uygulamada $r=0,96$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.6).

Mitotik indeks, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamada kontrole göre azalmıştır. Ancak bu azalma 24 saatlik uygulamada 5, 10 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada sadece 30 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlıdır. Regresyon analizlerine göre konsantrasyon artışı ile mitotik indeksteki düşüşler arasında zayıf bir korelasyon vardır (24 saatlik uygulamada $r=-0,443$; 48 saatlik uygulamada $r=-0,439$).

ZnO NP ile yapılan uygulamada, özellikle 20 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarda nükleer düzensizlikler gösteren halka şeklinde atipik lenfositler de tespit edilmiştir (Resim 4.8).

Çizelge 4.5. Çinko oksit nanopartikül uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

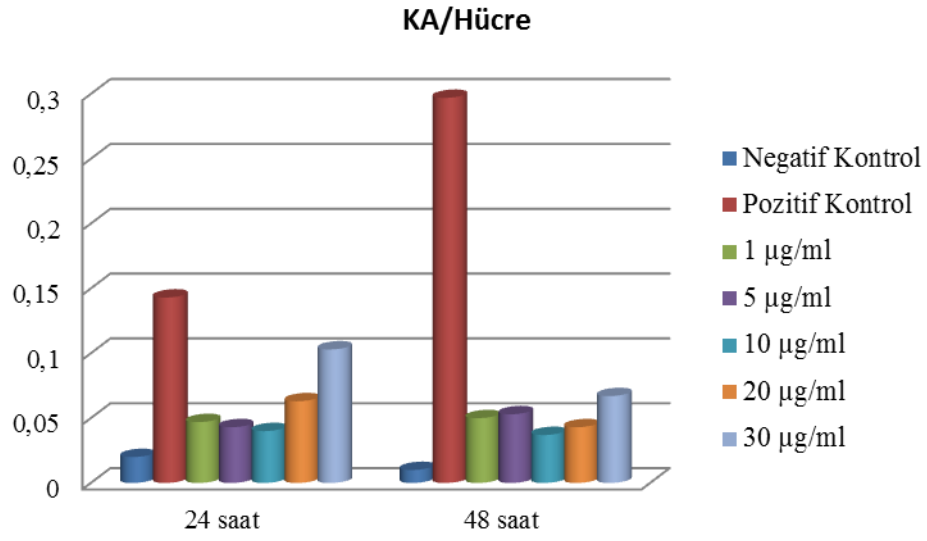
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	MI ± SH (%)
	Süre (Saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	ktd	f	p	er			
Negatif Kontrol	24	0	5	1	-	-	-	-	1,67±1,26	0,020±0,008	6,43±0,45
Pozitif Kontrol	24	0,2	19	10	9	5	-	-	13,67±1,98	0,143±0,022	4,13±0,36
ZnO NP	24	1	11	3	-	-	2	-	4,33±1,18	0,047±0,012	5,40±0,41
		5	5	3	-	5	-	-	4,00±1,13	0,043±0,012	5,06±0,40*
		10	10	-	-	2	2	1	3,67±1,08	0,040±0,011	5,06±0,40*
		20	14	3	1	1	2	3	5,33±1,30*	0,063±0,014**	5,33±0,41
		30	16	8	3	4	3	3	9,00±1,65***	0,103±0,017***	3,53±0,34***
Negatif Kontrol	48	0	3	-	-	-	-	-	1,00±0,57	0,010±0,006	6,67±0,46
Pozitif Kontrol	48	0,2	39	26	13	11	-	-	24,33±2,48	0,297±0,209	3,33±0,33
ZnO NP	48	1	11	3	-	1	3	-	5,00±1,26**	0,050±0,012**	5,73±0,42
		5	15	1	-	-	1	-	5,33±1,30**	0,053±0,013**	5,57±0,42
		10	5	2	-	4	2	-	3,67±1,08*	0,037±0,011*	6,00±0,43
		20	7	4	-	2	1	-	4,33±1,18*	0,043±0,012*	5,67±0,42
		30	14	4	-	2	1	1	6,67±1,44***	0,067±0,014***	3,77±0,35***

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, ktd: kromatid değişimi, f: fragment, p: poliploidi, er: endoredublikasyon

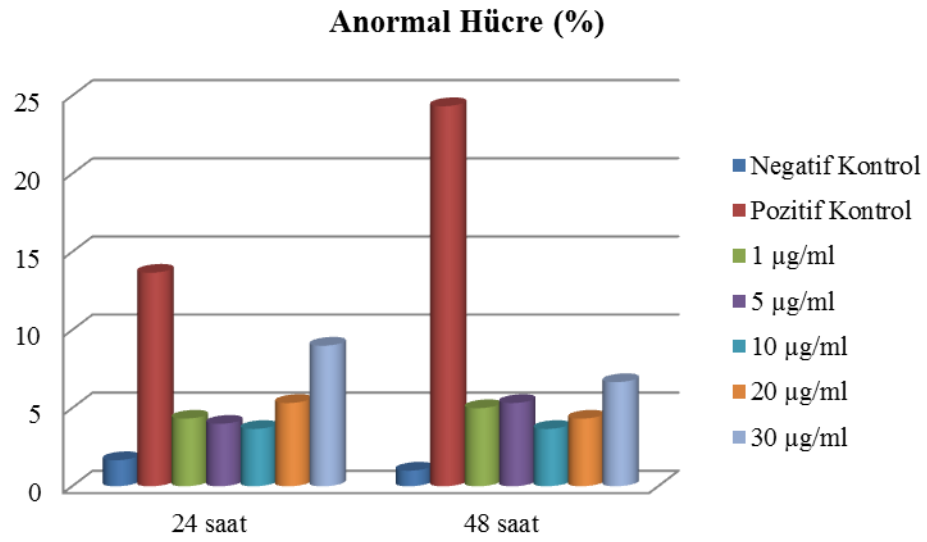
*Kontrolle göre p<0,05 düzeyinde anlamlı;

** Kontrolle göre p<0,01 düzeyinde anlamlı;

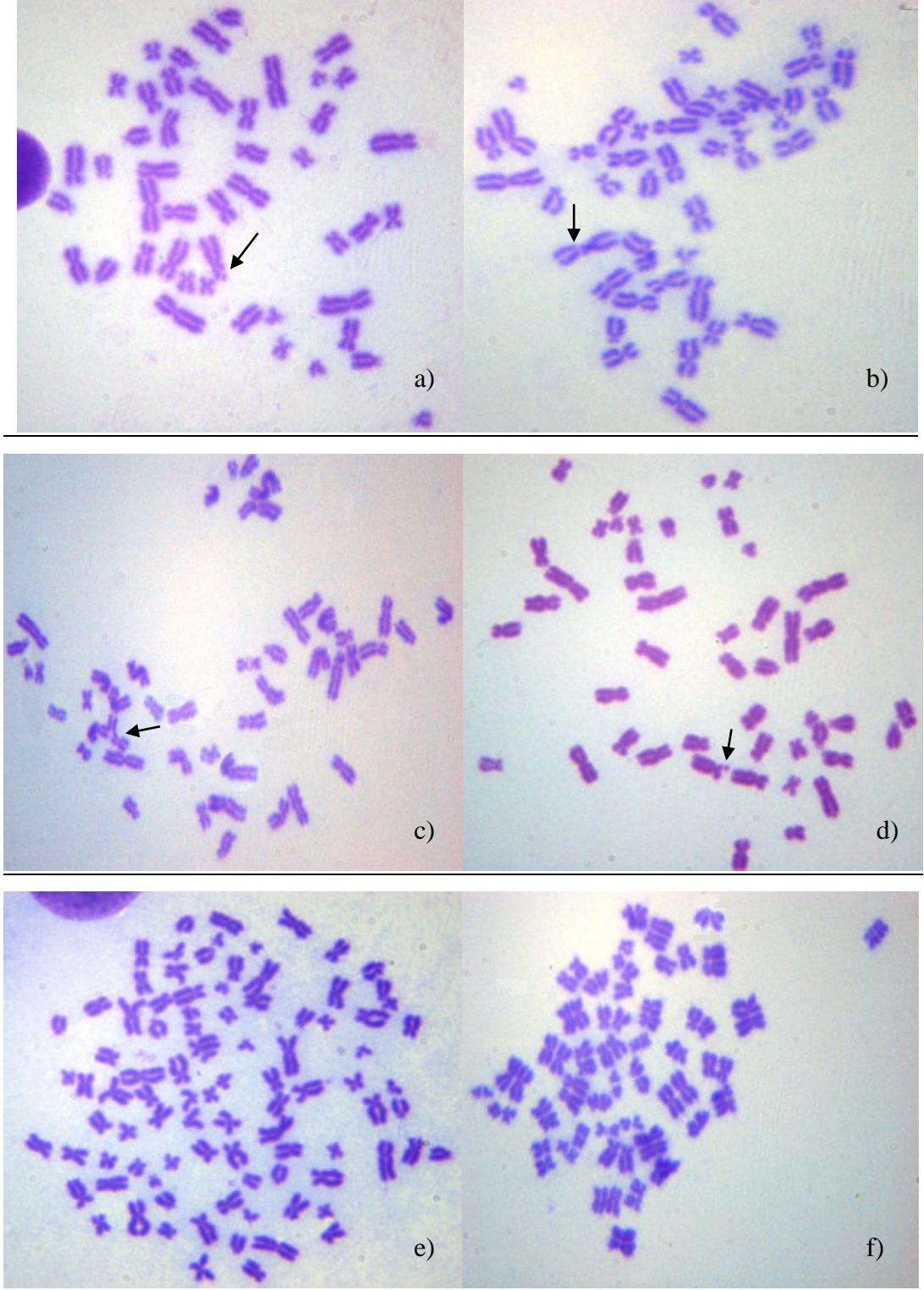
*** Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi).



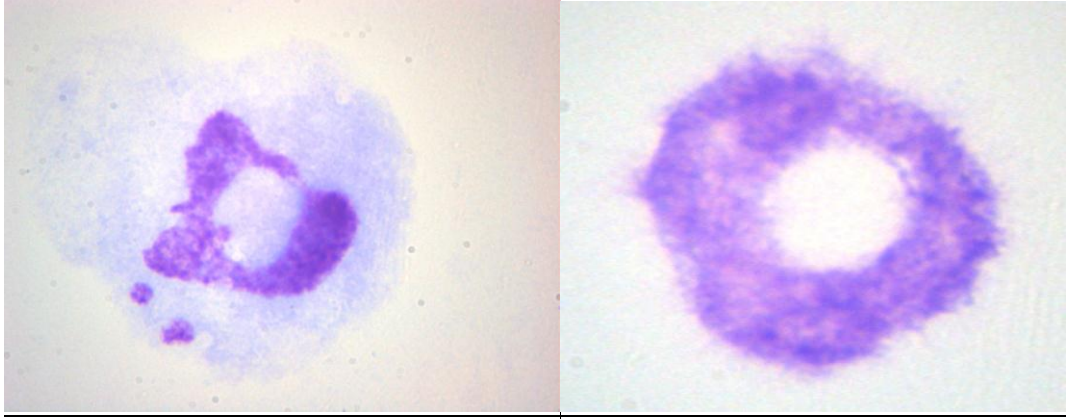
Şekil 4.6. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde hücre başına düşen anormallik frekansı



Şekil 4.7. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerdeki anormal hücre frekansı



Resim 4.7. ZnO NP uygulaması sonucunda lenfositlerde gözlenen kromozom anormallikleri. a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı, c) kromatid değişimi, d) fragment e) poliploidi, f) endoredublikasyon



Resim 4.8. ZnO nanopartiküllerinin lenfositlerde oluşturduğu atipik yapılar

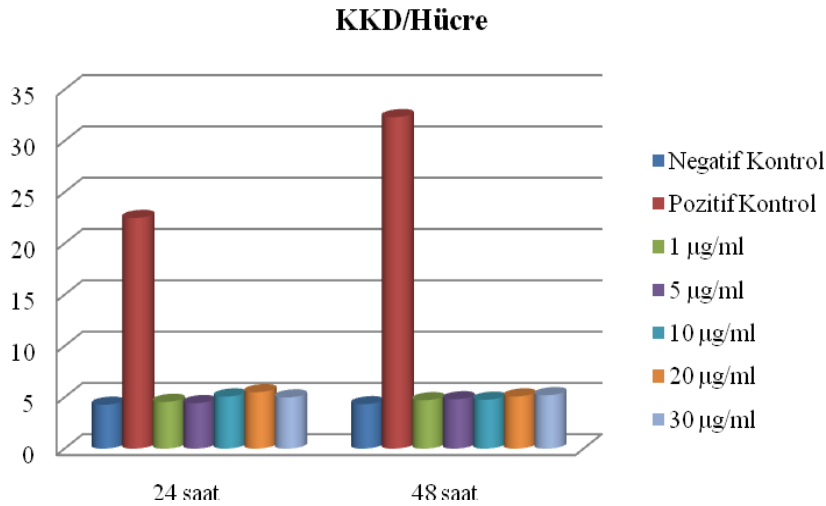
Kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi üzerine etkisi

Çinko oksit nanopartikülleri, hem 24 saatlik ve hem de 48 saatlik uygulamalarda KKD frekansını konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır (24 saatlik uygulamada $r=0,72$; 48 saatlik uygulamada $r=0,74$). Ancak bu artışın 24 saatlik uygulamada 10, 20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Çinko oksit nanopartikülleri, her iki uygulama süresinde de lenfositlerde replikasyon indeksini kontrole göre en yüksek dozda düşürmüştür, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.6, Şekil 4.8).

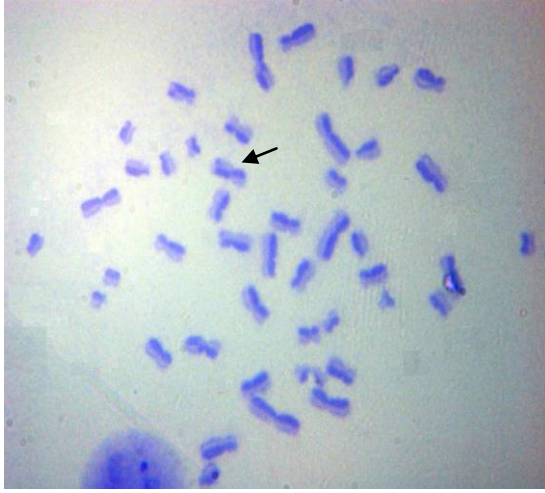
Çizelge 4.6. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi ve replikasyon indeksi frekansları

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)						
Kontrol	24	0	1-9	4,28±0,19	43	82	175	2,44±0,04
MMC	24	0,2	10-30	22,49±0,79	71	131	98	2,09±0,04
ZnO NP	24	1	1-10	4,56±0,23	61	84	155	2,31±0,04
		5	1-9	4,44±0,20	60	87	153	2,31±0,04
		10	1-10	5,08±0,24*	58	97	145	2,29±0,04
		20	2-12	5,51±0,26*	73	109	118	2,15±0,05
		30	1-9	4,99±0,21*	133	88	79	1,82±0,05
Kontrol	48	0	1-8	4,33±0,23	72	78	150	2,26±0,05
MMC	48	0,2	14-47	32,32±1,13	152	106	42	1,63±0,04
ZnO NP	48	1	2-10	4,72±0,19	60	82	158	2,33±0,05
		5	1-9	4,81±0,23	42	101	157	2,38±0,04
		10	0-9	4,77±0,24	50	100	150	2,33±0,05
		20	1-11	5,09±0,25*	87	98	115	2,09±0,05
		30	3-13	5,21±0,22*	119	82	99	1,93±0,05

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t-test)



Şekil 4.8. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimi frekansı



Resim 4.9. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde kardeş kromatid değişimleri

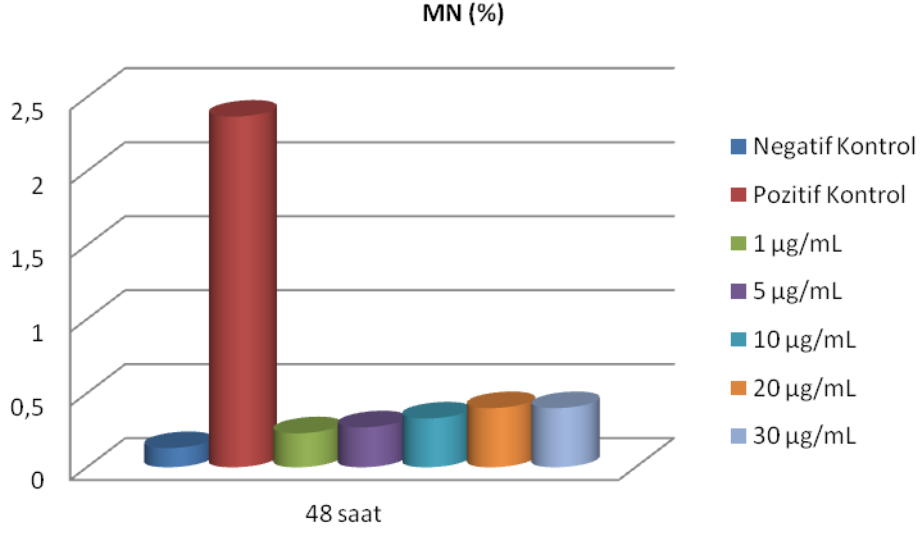
Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

ZnO nanopartikülleri insan lenfositlerinde mikronükleus frekansını konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır ($r=0,918$). Ancak bu artış sadece en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$) istatistiksel olarak anlamlıdır. ZnO NP ile muamele edilen insan lenfositlerinde daha ziyade bir mikroçekirdekli, nadiren de iki mikroçekirdekli binükleatlara rastlanmıştır (Resim 4.10). ZnO NP uygulamasının nükleer bölünme indeksinde meydana getirdiği azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı değildir (Çizelge 4.7, Şekil 4.9).

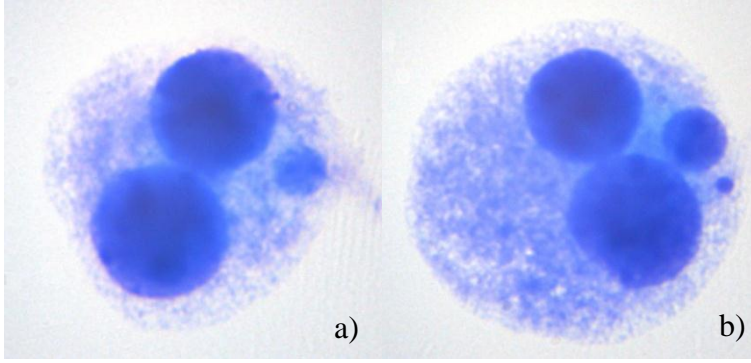
Çizelge 4.7. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerdeki mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi frekansları

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	MN \pm SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi \pm SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)			
Kontrol	48	0	3000	0,13 \pm 0,066	2,00 \pm 0,36
MMC	48	0,2	3000	2,37 \pm 0,278	1,86 \pm 0,35
ZnO NP	48	1	3000	0,23 \pm 0,087	1,94 \pm 0,36
		5	3000	0,27 \pm 0,095	1,99 \pm 0,36
		10	3000	0,33 \pm 0,105	1,98 \pm 0,36
		20	3000	0,40 \pm 0,115*	1,98 \pm 0,36
		30	3000	0,40 \pm 0,115*	1,94 \pm 0,36

*Kontrolle göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerdeki mikronükleus frekansı



Resim 4.10. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde mikronükleuslu binükleat hücreler. a) bir mikronükleuslu binükleat, b) iki mikronükleuslu binükleat

Primer DNA hasarı üzerine etkisi

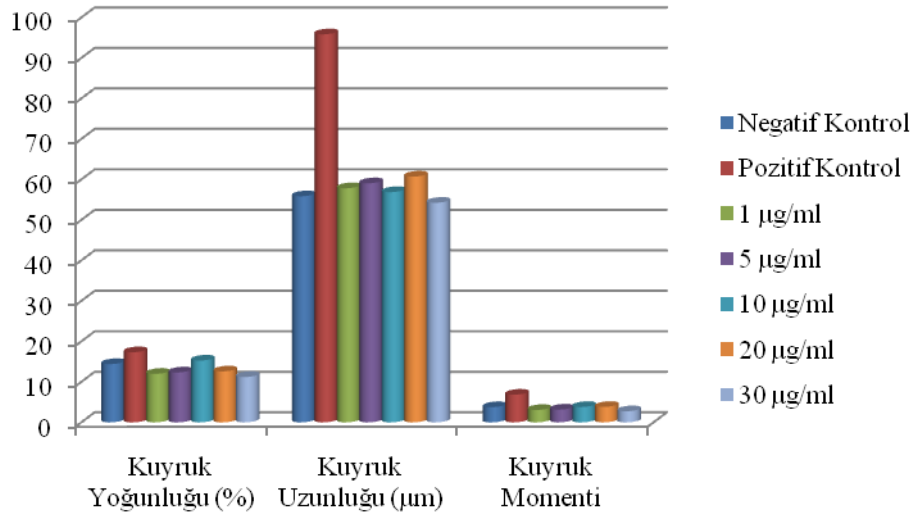
ZnO nanopartikül uygulaması ile yapılan komet testi sonuçlarına göre, kuyruk yoğunluğu en yüksek konsantrasyonda kontrole göre önemli bir azalma göstermiştir. ZnO NP muamesi, 5 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda kuyruk uzunluğunda kontrole göre önemli bir artışa sebep olmuştur. Kuyruk momentinde ise önemli bir değişiklik

gözlenmemiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.10, Resim 4.11). Regresyon analizlerine göre DNA hasarında konsantrasyona bağlı zayıf bir ilişki söz konusudur (kuyruk yoğunluğu için $r=0,61$; kuyruk uzunluğu için $r=0,63$; kuyruk momenti için $r=0,63$).

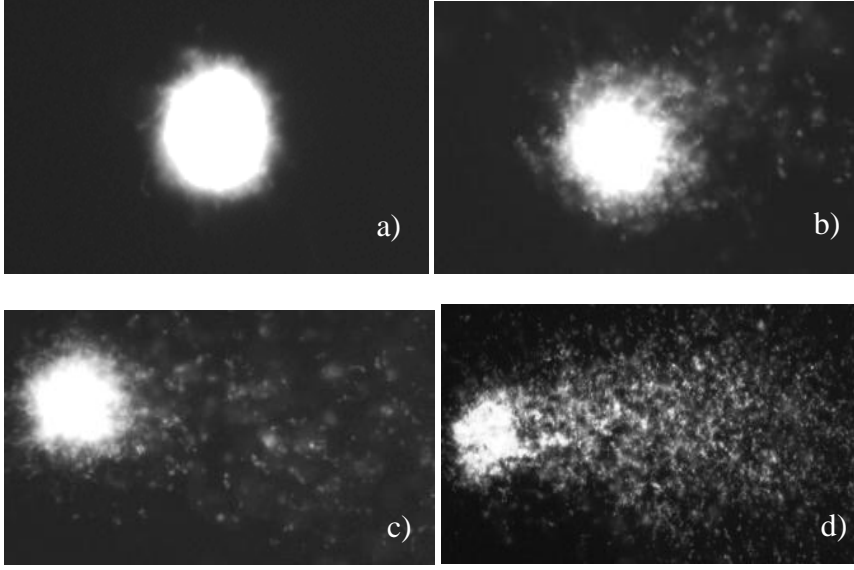
Çizelge 4.8. Çinko oksit nanopartikülleri ile muamele edilen izole lenfositlerdeki DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Süre (dakika)	Konsantrasyon			
Negatif Kontrol	30	0 µg/ml	14,39±1,02	55,84±0,64	3,75±0,38
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	30	100 µM	17,32±1,36	95,85±3,22	6,83±0,77
ZnO NP	30	1 µg/ml	11,98±0,82	57,82±0,88	3,06±0,28
		5 µg/ml	12,33±0,93	59,04±1,10*	3,15±0,34
		10 µg/ml	15,26±1,00	56,87±0,80	3,80±0,37
		20 µg/ml	12,58±1,04	60,70±0,96*	3,81±0,51
		30 µg/ml	11,20±0,81*	54,24±0,75	2,74±0,27

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.10. ZnO NP ile muamele edilen lenfositlerde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti



Resim 4.11. ZnO NP ile muamele edilen izole lenfositlerde oluşan DNA hasarları. a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son 10 yıl içerisinde nanoteknoloji endüstrisindeki genişleme, nanoboyuttaki sayısız yeni ürünün geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Bu nanomateryaller, eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahip oldukları için geleneksel materyalleri geride bırakarak günlük hayatımıza yenilik getirmeyi vaat etmektedir. Bu özellikler, yüksek elektrik ve termal iletkenlik, daha etkili katalizörler, daha hafif ağırlıkta yüksek mukavemet ve gelişmiş ilaç dağıtım sistemleri gibi yenilikleri içermektedir. Bu özellikleri nedeni ile nanomateryallerin tıbbi bakım ve tüketici ürünlerine ek olarak endüstriyel ortamda da geniş oranda uygulamaları bulunmaktadır. Günümüzde nanomateryal içerikli 1000'in üzerinde tüketici ürünü marketteki yerini almıştır [Woodrow Wilson veritabanı, Nanotechproject.org, 2011]. Bu nedenle bu yeni ürünler için bir tehlike tanımlaması yapılması ve risk yönetimi stratejisinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [Doak ve ark., 2012b].

Boyutlarının küçük olmasına ek olarak yeni fizikokimyasal özellikleri, nanomateryallerin biyolojik sistemlerdeki farklı etkilerinden sorumlu olabilir. Partiküllerin küçülmesi, birim kütle başına yüzey alanını artırmaktadır. Yüzey alanının artması partikül yüzeyindeki atomların sayısını da artırmaktadır, bu da biyolojik reaktivitenin artmasına ve aynı malzemedan oluşan büyük partiküllere kıyasla nanomateryallerin oldukça farklı bir davranış sergilemesine yol açmaktadır. Örneğin 5 nm boyutundaki altın partikülleri ışığı 520 nm'de güçlü bir şekilde absorblarken, daha büyük boyutlu altın nanopartikülleri ışığı yansıtılmaktadır [Schatz, 2007]. Benzer şekilde, 60–120 nm boyutlarındaki titanyum dioksit partikülleri, UV ışığını mikro ebatlı partiküllere kıyasla daha etkili bir şekilde yansıtır ve dağıtır [Nohynek ve ark., 2008].

Nanopartiküllerin bu son derece farklı ve avantajlı özellikleri canlı organizmalar ile teması olduğunda zararlı etkilerinin de olabileceği endişesini beraberinde getirmiştir. Bu nedenle uluslararası bilim topluluğu ve mühendislik akademisinin 2004 yılında yayınladığı ilk raporla, nanomalzemelerin sağlık ve çevre güvenliği konusuna büyük dikkat çekilmiştir [Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004]. Daha

sonra başka hükümet raporları da ortaya çıkmıştır, ancak bu süre içerisinde nanomateryallerin güvenliği konusu, nanoteknoloji endüstrisinin materyal geliştirme hızı ile paralellik gösterememiştir [Singh ve ark., 2009]. Ancak yavaş yavaş ortaya çıkan sınırlı bilgiler nanomateryallerin sitotoksisiteyi, oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtları indüklediğini göstermektedir [Nel ve ark., 2006; Sayes ve ark., 2006; Kang ve ark., 2008; Hackenberg ve ark., 2011b, Akhtar ve ark., 2012].

Bu çalışmada özellikle kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan metal oksit nanopartiküllerinden TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin genotoksik etkileri, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Bu etkileri incelemek için, uluslararası araştırmalarda sıkça kullanılan genotoksisite testleri olan kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve komet testleri uygulanmıştır. Nanomateryallerin fizikokimyasal özellikleri, hücre tarafından alınımı ve hücre içerisindeki aktivitesini etkilediğinden dolayı, bu nanomateryallerin karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır.

Ticari olarak temin edilen TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin SEM’da küresel formda olduğu tespit edilmiştir. Üretici firmanın (Sigma-Aldrich), partikül boyutunu her iki nanopartikül için de <100 nm olarak belirtmesine rağmen, her iki nanopartikülün 10-300 nm ebatlarda partiküller içerdiği belirlenmiştir. Bu farklılıklar, boyut belirleme metodlarındaki (BET, TEM ve DLS gibi) farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bazı çalışmalarda, nanomateryallerin şekilleri, morfolojileri ve boyutlarındaki farklılıklar ile hücresel sistemler üzerindeki etkileri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Nanoboyuttaki kobalt krom partiküllerinin primer insan dermal fibroblastlarında 24 saat uygulanması neticesinde, DNA hasarında önemli bir artış saptanırken, aynı koşullarda daha büyük ebatlı CoCr partiküllerinin DNA’da daha az hasar oluşturduğu tespit edilmiştir [Papageorgiou ve ark., 2007]. Bazı nano ve mikrometre metal oksit nanopartiküllerinin (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , TiO_2 ve CuO) toksisitesi ve genotoksik potansiyeli insan hücre hattında (A549) değerlendirilmiş, CuO nanopartiküllerinin mikrometre ebatlı CuO ’e göre daha toksik olduğu, ancak diğer test edilen partiküller için benzer bir durum gözlenmediği için bir genelleme yapılamayacağı belirtilmiştir [Karlsson ve ark., 2009]. Titanyum dioksit ve silika

nanopartikülleri gibi bazı küresel nanopartiküllerin, nükleus içerisine girebileceği gösterilmiştir [Stearns ve ark., 2001; Geiser ve ark., 2005; Chen ve von Mikecz, 2005]. Silindirik C60 nanopartiküllerin nükleotidlere bağlanarak, nükleotidleri deforme ettiği gösterilmiştir [Zhao ve ark., 2005]. Yang ve arkadaşları (2009) dört farklı tip nanopartikül ile yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada küresel biçimli ya da kristal yapıya sahip nanopartiküllere göre, karbon nanotüplerinin daha fazla DNA hasarı oluşturduğunu tespit etmişlerdir [Yang ve ark., 2009]. Bu ve benzer çalışmalar birlikte değerlendirilerek, nanopartiküllerin genotoksitesinin partikül biçiminden ve büyüklüğünden etkilenebileceği düşünülmektedir. Ancak yine de daha kesin sonuçlara ulaşılabilmesi için aynı nanomateryalin farklı şekil ve ebatlarına dayalı daha detaylı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Dinamik ışık saçılımı ölçümü ile elde edilen veriler, TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin hidrodinamik çaplarının (hidrate/solvatlanmış partiküllerin çapı) SEM’de değerlendirilen kuru partikül çapından daha büyük olduğunu göstermiştir. DLS bir çözelti içerisindeki partikül topluluğunun Brownian hareketini ve ardı sıra oluşan boyut dağılımı ile bir çözücü tabakası içeren hidrodinamik çapını ölçer [Hradil ve ark., 2007]. Sulu ortamda partiküllerin agregat oluşturma eğiliminden dolayı, DLS ölçümü sırasında bireysel partiküllerden ziyade kümelenmiş partiküllerin boyutu elde edilir. DLS’den elde edilen boyut dağılımı maruziyet koşullarına daha benzer koşullar altında boyut ölçümü yaptığı için toksisite çalışmaları sırasında nanopartiküllerin boyut dağılımının belirlenmesinde SEM, TEM ve BET ile birlikte DLS’den elde edilen boyut dağılımının da belirlenmesinin gerekli olduğu kabul edilmektedir [Sharma ve ark., 2009].

Partiküllerin yüzey karakteristiğinin, nanopartiküllerin hem hücre içerisine alımını, hem de hücredeki aktivitesini etkilediği belirlenmiştir. Bu çalışmada zeta potansiyelinin TiO_2 NP için $-24,22 \pm 0,52$ mV, ZnO NP için $-27,68 \pm 1,54$ mV olduğu belirlenmiştir. Kararlı bir dağılımda yalnızca birkaç partikülün $+30$ mV/ -30 mV dan daha yüksek zeta potansiyeli değerlerine sahip olduğu görülmüştür [Malvern, 2005; Murdock ve ark., 2008]. Negatif ya da pozitif yüksek zeta potansiyeli, partiküllerin daha az aglomerasyon oluşturduğunu ve dolayısıyla daha kararlı olduğunu

göstermektedir. Bu durum yüzey alanını artıracığından, partiküllerin serum proteinleri ile daha fazla etkileşime girmesine izin verir. Ayrıca yüksek yüzey yüküne ve daha büyük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin mürin makrofajlar tarafından daha etkili bir şekilde alındığı ve yüzey yükünün 15 mV'un altında olduğu durumlarda nanopartiküllerin fagositik olmayan yollar ile hücre içerisine alındığı belirtilmiştir [He ve ark., 2010]. Bu çalışmada kullanılan nanopartiküllerin -20 mV'dan daha fazla zeta potansiyeline sahip olması, bu partiküllerin ortamda bulunan proteinlerle elektrostatik çekimlerinin olabileceği anlamına gelmektedir. Bu çalışmada zeta potansiyeli ölçümleri her iki nanopartikülün de dispersiyon ortamlarında negatif bir yüke sahip olduğunu göstermiştir. Pozitif yüklü mezorf silika partiküllerinin (108 nm) 3T3-L1 fibroblast hücreleri tarafından etkili bir şekilde alındığı tespit edilirken, negatif yüklü seryum oksit nanopartikülleri (3-5 nm) adenokarsinom akciğer hücreleri (A549) tarafından tercihen alınmıştır [Barnes ve ark., 2008]. Ayrıca katyonik yüzey yüküne sahip nanopartiküllerin anyonik nanopartiküllere göre daha sitotoksik olduğu da belirtilmiştir [Nan ve ark., 2008]. Yine de standart bir test protokolü eksikliğinden ve detaylı karakterizasyon olmadığından dolayı, nanopartiküllerin yüzey yükleri ile hücre içerisine alınması ve toksik etkileri arasındaki ilişkiyi yorumlamak zordur ve bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlerin meydana getirdiği genetik hasarın düzeyi ve insan sağlığı üzerine etkileri, bakteri, *in vivo* ve *in vitro* memeli hücreleri kullanılarak belirlenebilmektedir. İnsan lenfositlerinde, kromozomal anormallik, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus ve komet testleri en sık kullanılan mutajenite testleridir [Krishnaja ve ark., 2003; Yılmaz ve ark., 2008; Zengin ve ark., 2011].

Kromozomal anormallikler (KA) spontan ya da bir kimyasal/radyasyon maruziyetinin bir sonucu olarak normal kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişikliklerdir [Obe ve ark., 2010]. Kromozomal anormallik testi ile değerlendirilen periferik kan lenfositlerindeki yapısal kromozom anormallikleri, mesleki ve çevresel kaynaklı genotoksik karsinojenlerin erken evrede belirlenmesinde uzun süredir kullanılan bir testtir [Mateuca ve ark., 2006]. Ayrıca

insan primer lenfositlerinde ve hücre hatlarında hem *in vitro* olarak ve hem de rodent kemik iliğinde *in vivo* olarak genotoksisitenin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada titanyum dioksit nanopartiküllerinin insan periferik lenfositleri ile muamelesi neticesinde kromozomal anormallik frekansı, 24 saatlik uygulamada kontrole göre tüm konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre ise en düşük iki konsantrasyonda (20 ve 40 µg/ml) önemli düzeyde artmıştır. TiO₂ NP'nin 48 saatlik uygulamasında ise, KA frekansı 40 ve 60 µg/ml'lik konsantrasyonlar hariç diğer konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir artış gösterirken, çözücü kontrole göre önemli bir artış göstermemiştir. Çinko oksit nanopartiküllerinin kültürdeki lenfosit hücreleri ile 24 saatlik muamelesi kromozomal anormallik frekansını özellikle en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 µg/ml) anlamlı oranda artırmıştır. 48 saatlik uygulamada ise KA frekansı tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde artmıştır. Bu çalışmada KA testi ile elde edilen bulgular, TiO₂ NP'nin zayıf bir klastojenik potansiyeli olduğunu, ZnO NP'nin ise uzun süreli muamelede daha klastojenik potansiyeli olduğunu göstermektedir.

TiO₂ ve ZnO NP'nin farklı hücre kültürleri ve test sistemlerinde genotoksik etkilerinin kromozomal anormallik testi ile değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur. Warheit ve arkadaşları, TiO₂ NP'nin genotoksik etkilerini hem bakteriyel geri mutasyon testi ile hem de CHO hücrelerinde *in vitro* memeli kromozomal anormallik testi ile değerlendirmişlerdir. Bakteriyel geri mutasyonda negatif bir sonuç elde edilmiştir. Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde 750, 1250 ve 2500 µg/ml'lik konsantrasyonları, S9'suz ortamda 4 saat, 62.5, 125 ve 250 µg/ml'lik konsantrasyonları S9'lu ortamda 4 saat ve 25, 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonları S9'suz ortamda 20 saat uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda TiO₂ NP'nin yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir [Warheit ve ark., 2007]. Kumari ve arkadaşları, ZnO NP'nin çeşitli konsantrasyonlarının (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) *Allium cepa* kök uçlarında kromozomal anormalliklerin frekansını artırdığını tespit etmişlerdir [Kumari ve ark., 2011].

TiO₂ ve ZnO NP'nin özellikle fotoklastojenik bir etkiye sahip olduğu düşünüldüğü için UV varlığında/yokluğunda çeşitli çalışmalar da yapılmıştır. Nakagawa ve arkadaşları, Çin hamsteri CHL/IU hücrelerinde 21 nm'lik TiO₂ partiküllerinin UV varlığında, kromozomal anormallik frekansını artırdığı, UV yokluğunda ise herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir [Nakagawa ve ark., 1997]. Theogaraj ve arkadaşları, anataz ve rutil formlarından oluşan, farklı inorganik kaplamalar bulunan ve bulunmayan, sekiz ultraince TiO₂ partikülleri ile CHO hücrelerinde UV varlığında ve yokluğunda gerçekleştirdikleri çalışmada, kromozomal anormallik frekansında bir artış olmadığını gözlemişlerdir [Theogaraj ve ark., 2007]. Dufour ve arkadaşları, ortalama boyutu 100 nm olan çinkonun CHO hücrelerinde fotogenotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çinkonun karanlıkta, UV ile ön muamele sonrası (pre-irradasyon; PI) ve UV ile eş zamanlı muamelesi (simültan-irradasyon; SI) sonrası klastojenik etkileri incelendiğinde, karanlıkta kromozom anormalliklerinde konsantrasyona bağlı artışa yol açtığı belirlenmiştir. PI ve SI'da CHO hücrelerinde kromozom anormalliği frekansının, karanlıktaki CHO hücrelerindeki KA frekansına göre daha yüksek, fakat küçük bir fark olduğu gözlenmiştir. Test koşullarında KA frekansındaki küçük artışlar, çinkonun fotoklastojenik etkili olduğunu göstermese de, çinkonun UV ile uyarılma sonucu test sisteminin hassasiyetini artırdığı ifade edilmiştir [Dufour ve ark., 2006].

TiO₂ NP uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan yapısal anormallikler kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve fragmenttir. ZnO NP uygulaması sonucunda ise kromatid ve kromozom kırıkları ile fragmentler saptanmıştır. Kromozomlardaki bu yapısal değişiklikler, kromatit kollarında meydana gelen kırılmalardan kaynaklanmaktadır. Kırılmanın olduğu yere, kırılma tipine, sayısına ve kırılan parçaların tekrar birleşme özelliğine göre, çok çeşitli kromozom mutasyonları meydana gelebilmektedir. Kromozom tipi kırıklar iyonize radyasyon gibi S fazından bağımsız klastojenler tarafından G0-G1 evrelerinde oluşan ve eksik tamirden ya da tamir edilmemiş çift zincir kırıklarından köken almaktadır. DNA sentezi ve kromozom dublikasyonundan sonra G0-G1 evrelerinde oluşan aberasyonlar iki kromatitte de oluşur ve metafaz evresinde kromozom tipi kırıklar ve değişiklikler (disentrik, halka kromozom, dengeli

translokasyon gibi) şeklinde gözlenir. Bu çalışmada her iki nanopartikül uygulamasında da kromatid kırığı, en çok gözlenen anormallik tipidir. Kromatid tipi kırıkların çoğunlukla S fazına bağlı klastojenler (örn; kimyasallar) tarafından oluşturulduğu bilinmektedir [Natarajan, 2002; Hagmar ve ark., 2004]. Bu çalışmada TiO_2 NP'nin lenfositlerde düşük klastojenik potansiyeli olduğu, ZnO NP'nin ise yüksek konsantrasyonlarda ve uzun sürede daha klastojenik olduğu belirlenmiştir.

Hem TiO_2 , hem de ZnO NP uygulaması neticesinde sayısal anormallikler de gözlenmiştir. TiO_2 NP uygulamasında sayısal anormalliklerden sadece poliploidi gözlenirken, ZnO NP uygulamasında hem poliploidi ve hem de endoreduplikasyon saptanmıştır. Poliploidi, haploid kromozom complementinin ikiden fazla katlarda görülmesiyle ortaya çıkmaktadır [Topaktaş ve Speit, 1990]. Dört kromatit içeren diplokromozomlar olarak da isimlendirilen endoreduplikasyon, kromatid ayrılması olmaksızın ardarda iki DNA replikasyonunu takiben ortaya çıkmaktadır. Poliploidi ve endoreduplikasyonun oluşmasında iğ ipliklerinin bozulması ve DNA'da meydana gelen hasarlar önemli rol oynamakla birlikte, mitoz bölünmede anafazda kromatid ayrılmasında önemli görev alan DNA topoizomerazlarda meydana gelebilecek bozukluklar da neden olmaktadır [Cortes ve Pastor, 2003]. Mitoz bölünme sırasında kromozomların karşılıklı kutuplara çekilmesinde önemli bir rol oynayan topoizomeraz II enziminin aktivitesinin engellenmesi, kromatidlerin ayrılmamasına ve sonuçta kromozom artışına yol açabilir [Clarke ve ark., 1993; Sumner, 1998]. Bu çalışmada kromozom artışı olarak gözlenen poliploidi ve endoreduplikasyon test edilen nanopartiküllerin iğ ipliği ya da mitotik ayrılmada rol oynayan enzimler üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Kardeş kromatid değişimi, kromozomun her iki kromatidinin homolog bölgelerinde DNA'da kırıkların oluşması ve kırılan bölgelerin yer değiştirip yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır [Perry ve Thomson, 1984]. Kardeş kromatid değişimi analiz yöntemi, mutajenler ve karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede etkili yöntemlerden biridir [Wilson III ve Thompson 2007]. Bu çalışmada TiO_2 NP'nin kardeş kromatid değişimi frekansını, hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulama süresinde kontrole göre önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir.

Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, 24 saatlik uygulamada 20, 60 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlar, 48 saatlik uygulamada ise 20, 60, 80 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlar KKD frekansını önemli düzeyde artırmıştır. ZnO NP, KKD frekansını her iki uygulama süresinde de doza bağlı olarak artırmıştır. Bu artış 24 saatlik muamelede en yüksek üç dozda, 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki dozda anlamlıdır. Nanomateryallerin genotoksik etkilerinin KKD testi ile değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur. Di Virgilio ve arkadaşları, TiO₂ ve Al₂O₃ NP'nin Çin hamster ovaryum hücrelerindeki genotoksik etkilerini KKD testi ile değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar TiO₂ NP'nin 1 ve 5 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulamasında KKD frekansında kontrole göre önemli bir artış olduğunu belirlerken, Al₂O₃ NP'nin KKD frekansını etkilemediğini tespit etmişlerdir [Di Virgilio ve ark., 2010].

Katarakt tedavisinde kullanılan ve antioksidan özelliğe sahip seryum oksit (CeO₂) nanopartiküllerinin kültürdeki insan lensi epitelyal hücrelerindeki genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu nanopartiküllerin 5 ve 10 µg/ml'lik konsantrasyonlarının KKD frekansında önemli bir artışa yol açmadığı tespit edilmiştir [Pierscionek ve ark., 2010]. Biyouyumlu intravenöz nanopartikül materyalleri olarak yeni geliştirilen poli etilen glikol (PELGE) ve poli D,L-laktik-koglikolik asit (PLGA) polimerlerinin genotoksik etkileri CHO hücrelerinde metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz ortamlarda KKD testi ile değerlendirilmiştir. Test edilen PELGE nanopartiküllerinden beşinde, S9 varlığında ve yokluğunda, KKD frekansında kontrole göre artış olduğu tespit edilmiştir [He ve ark., 2009].

Kardeş kromatid değişiminin, çeşitli genotoksik ajanlara maruziyetin bir sonucu olarak artabileceği ve homolog rekombinasyon yolu ile DNA tamirini yansıttığı bilinmektedir [Garcia-Sagredo, 2008]. Hem genotoksik maruziyet ve hem de DNA tamir kapasitesi bireyler arasında değişebileceğinden, KKD frekansı ile kanser riski arasındaki ilişkiyi tahmin etmek zordur. Yüksek KKD frekansı ile kanser riski arasında bir ilişki gözlenmemiştir [Hagmar ve ark., 1994]. Yine de KKD testi, genotoksik ajanlar için bir indikatör olarak günümüzde yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. Kardeş kromatit değişiminin oluşum mekanizmasında, DNA tek

zincir kırıkları etkin bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada hem TiO_2 ve hem de ZnO NP'nin bazı konsantrasyonlarının KKD frekansını artırdığı gözlenmiş olup, bu nanopartiküllerin DNA'da kırıklara yol açarak mutajenik bir etki oluşturabileceği düşünülmektedir.

Güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği yüksek olduğu için, MN testi de insan ve memeli hücrelerinde genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde standart sitogenetik testlerden biri olarak kullanılmaktadır. Bu test nanomateryallerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde de yaygın olarak tercih edilen testlerden biridir. İnsan lenfosit kültüründe gerçekleştirilen bu çalışmada, TiO_2 NP'nin özellikle düşük konsantrasyonlarda MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı olmayan az bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu durum TiO_2 NP'nin kültürdeki yüksek konsantrasyonlardaki artan aglomerasyon durumu ile açıklanabilir. Daha büyük aglomeratlar küçük olanlara göre hücreler tarafından daha az alınacak, bu nedenle büyük aglomeratlar hücreler üzerinde daha az etkiye sahip olacaktır [Lindberg ve ark., 2009]. Literatürlerde TiO_2 NP'nin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* test sistemlerinde mikronükleusları indüklediği gösterilmiştir [Rahman ve ark., 2002; Wang ve ark., 2007; Di Virgilio ve ark., 2010; Shi ve ark., 2010; Shukla ve ark., 2011]. Bununla birlikte negatif sonuçlar da elde edilmiştir [Linnainmaa ve ark., 1997; Woodruff ve ark., 2012; Sadiq ve ark., 2012]. 10 nm ebatındaki TiO_2 NP'nin fare kemik iliğinde sitotoksositeye yol açtığı belirlenirken, *in vivo* MN testinde negatif bir sonuç elde edilmiştir [Sadiq ve ark., 2012]. Partikül boyutu <20 nm (ultrafine) ve >200 nm (fine) olan TiO_2 partiküllerinin genotoksik etkileri Suriye hamsteri embriyo hücrelerinde MN testi ile incelendiğinde, ultrafine TiO_2 partiküllerinin test edilen tüm konsantrasyonlarda (0,5-5 μ g/ml) MN frekansını artırdığı ve bu etkinin klastojenik olduğu tespit edilirken, fine TiO_2 partiküllerinin MN oluşumunu indüklemediği belirlenmiştir [Rahman ve ark., 2002].

Bu çalışmada ZnO NP'nin insan lenfositlerinde MN oluşumunu artırdığı, bu artışın özellikle en yüksek iki konsantrasyonda (20 ve 30 μ g/ml) anlamlı olduğu belirlenmiştir. UV radyasyonu ile birlikte kullanılan çinko oksitin 8,9; 13,3 ve 20 μ g/ml'lik konsantrasyonlarının insan keratinosit hücrelerinde MN oluşumunu

artırdığı, fakat bu artışın sadece 13,3 ve 20 µg/ml'lik konsantrasyonlarda önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir [Horinouchi ve Arimoto-Kobayashi, 2011]. *Allium cepa* kök uçlarında ZnO NP (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) konsantrasyona bağlı olarak MN oluşumunu artırmıştır [Kumari ve ark., 2011]. Bizim sonuçlarımız da bu çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Mikronükleus oluşumu, DNA hipometilasyonunun bir belirteci olarak da kullanılmaktadır. Örneğin DNA metilasyonu inhibitörü 5-azasitidin 1, 9 ve 16 no'lu kromozomların heterokromatin bölgelerinin daha az kondense olmasını sağlar, bu nedenle bu kromozomların kaybı artabilir ve sonuçta *in vitro* insan lenfositlerinde MN oluşumuna sebep olabilir [Guttenbach ve Schmid, 1994; Satoh ve ark., 2004]. MN oluşumu, satellit DNA'nın hipometilasyonunun sonucunda oluşabileceği gibi, hücre döngüsü kontrol noktalarında ve DNA tamirinde rol oynayan housekeeping genlerin, promotor bölgelerine bitişik ya da içindeki CpG adalarının hipermetilasyonu ile de oluşabilir. Örneğin APC, BUBR1 ve hCDC4 gibi mitotik iş kontrol noktası genlerinin CpG adalarının hipermetilasyonu, bu genlerin ifadelerini azaltabilir ve bu nedenle MN oluşumuna yol açan kromozom malsegrasyonunu artırabilir. Benzer şekilde DNA tamirinde rol oynayan genlerin susturulması ya da fonksiyon kaybı insan hücrelerinde yüksek MN frekansıyla sonuçlanabilir [Trenz ve ark., 2002; Gutierrez-Enriquez ve Hall, 2003; Fenech ve ark., 2007].

Hücrel çoğalma çeşitli metotlar kullanılarak değerlendirilmektedir. Mitotik indeks, kültürde mitoz geçiren hücrelerin sayısı dikkate alınarak belirlenen ve sitotoksitenin göstergesi olarak kabul edilen önemli bir parametredir [Thor ve ark., 1999; Alakoç ve Eroğlu, 2011]. TiO₂ NP 24 saatlik uygulamada mitotik indeks frekansında kontrole göre sadece 60 ve 80 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir düşüşe neden olurken, 48 saatlik uygulamada önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Diğer yandan ZnO nanopartikülleri mitotik indeksi her iki uygulama süresinde de kontrole göre azaltmıştır. Ancak bu azalma 24 saatlik uygulamada 5, 10 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı iken, 48 saatlik uygulamada sadece 30 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlıdır. Mitotik indeksteki azalmanın hücrelerin mitoz girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesinden dolayı ya da ATP

seviyesinde azalmadan ve enerji üretim merkezindeki bozukluktan kaynaklandığı öne sürülmektedir. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iş oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması da gösterilmektedir [Van't Hof, 1968; Jain ve Andsorbhoy, 1988; Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Bu çalışmada gözlenen mitotik indeksteki düşüşler, bu nanopartiküllerin hücre proliferasyonu için gerekli enzimleri ve proteinleri inhibe etmesi ya da mitokondriyal disfonksiyona yol açmasından kaynaklanabilir.

Replikasyon indeksi, kültürdeki hücrelerin sitokinetik indeksini göstermektedir. İnsan lenfositlerinde RI'nin belirlenmesi genotoksisite testlerinde ilave bir sitotoksisite parametresi olarak kullanılmaktadır. Çünkü DNA sentezinin engellenmesi replikasyon indeksinde düşüş ile sonuçlanmaktadır [Lazutka, 1991]. TiO₂ NP'nin hem 24 saatlik ve hem de 48 saatlik muamelesi, replikasyon indeksi üzerinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Replikasyon indeksi ZnO nanopartikül muamelesinde her iki uygulama süresinde de en yüksek dozda (30µg/ml) kontrole göre düşüş gösterdiği, ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, TiO₂ NP'nin replikasyon indeksini etkilemediği, ZnO NP'nin ise sadece en yüksek konsantrasyonda DNA sentezini etkilediği düşünülmektedir.

Nükleer bölünme indeksi, kültürdeki hücrelerin çoğalmasının bir göstergesi olan genel sitotoksisite değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerden biridir. Fazla kromozom hasarı taşıyan hücreler ya hücre bölünmesi geçirmeden önce ölecek ya da bu tür hücrelerde bölünme daha az gerçekleşecektir. En düşük nükleer bölünme indeksi değeri, sitokinezin engellenmesi sırasında bölünmede başarısız olan canlı hücrelerin çoğunun mononükleat olarak kaldığı değerdir ve bu değer 1,0'dir. Eğer tüm canlı hücreler bir bölünme gerçekleştirirse binükleat olacak ve NBİ değeri 2,0 olacaktır. Nükleer bölünme indeksi 2,0'den daha büyük olursa, kültürdeki hücrelerin birden fazla nükleer bölünme geçirdiği, bu nedenle 2'den fazla çekirdekli hücrelerin bulunduğu anlamına gelir [Fenech, 2007; Ionescu ve ark., 2011]. Bu çalışmada TiO₂

NP ve ZnO NP'nin nükleer bölünme indeksini etkilemediği ve genelde bir bölünme geçirdikleri tespit edilmiştir.

Farklı hücre kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da TiO₂ NP'nin düşük bir sitotoksik etki gösterdiği, buna karşın ZnO NP'nin ise sitotoksik olduğu saptanmıştır [Hussain ve ark., 2005; Jeng ve Swanson, 2006; Karlsson ve ark., 2010; Heng ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2012]. TiO₂ NP'nin (40 nm) *in vitro* rat karaciğeri hücre hattında 10-50 µg/ml konsantrasyonları belli bir sitotoksik etki göstermez iken, 100-250 µg/ml'lik yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu tespit edilmiştir [Hussain ve ark., 2005]. Wang ve arkadaşları, insan B-hücresi lenfoblastoid hücre hatlarını (WIL2-NS) TiO₂ nanopartiküllerinin çeşitli konsantrasyonları (26, 65 ve 130 µg/ml) ile 6, 24 ve 48 saat muamele etmişlerdir. Nükleer bölünme indeksinin sadece 48 saatlik muamelede 26 ve 65 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir azalmaya yol açtığı gözlenmiştir [Wang ve ark., 2007]. Lenfositlerde normal TiO₂ (>100 nm) ile nano-TiO₂ partiküllerinin UV-A ile indüklenen fototoksik etkileri incelendiğinde, UV-A yokluğunda hücre canlılığında küçük bir azalma görülürken, UV-A varlığında önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca nano-TiO₂ partiküllerinin UV-A varlığında subG1 fazındaki hücre popülasyonu yüzdesinde artışa yol açtığı, proapoptotik proteinlerin aktivasyonunu indüklediği, ROT'ni önemli oranda artırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına yol açtığı ve böylece UV-A ile sinerjistik etki göstererek mitokondriyal yolak ile apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Buna karşın normal TiO₂ partiküllerinin UV-A varlığında böyle bir etki göstermediği tespit edilmiştir [Kang ve ark., 2011].

Yang ve arkadaşları primer fare embriyo fibroblast hücrelerine ZnO NP'nin 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarını 24 saat muamele etmişlerdir. Uygulanan MTT (metil tetrazolium test) testine göre, ZnO nanopartikülleri 20 µg/ml ve üstündeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında %73,5 oranında azalmaya yol açmıştır [Yang ve ark., 2009]. Benzer şekilde *Allium cepa* kök uçlarına uygulanan çinko oksit nanopartiküllerinin (25, 50, 75, ve 100 µg/ml), mitotik indeksi, konsantrasyon artışına ters orantılı olacak şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir [Kumari ve ark., 2011]. Çinko oksitin sitotoksik etkisinin, çözünerek ortaya çıkan

hücre içi serbest Zn^{+2} iyonu artışından kaynaklandığı düşünülmektedir. Esasen Zn^{+2} iyonu, pek çok enzimin (örneğin alkol dehidrojenaz, matriks metalloproteinaz vb) ve transkripsiyon faktörlerinin (çinko parmak proteini transkripsiyon faktörleri gibi) önemli bir bileşenidir. *In vitro* sistemlerde hücre içi çinko iyonu homeostazisinin bozulmasının, hücre canlılığının azalması, oksidatif stres ve mitokondriyal hasar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [Osmond ve ark., 2010; Kao ve ark., 2012; Vandebriel ve De Jong, 2012]. Deng ve arkadaşları, ZnO NP'nin nöral kök hücrelerine etkileri üzerine yaptıkları çalışmada, oluşan toksisitenin kültür ortamında ya da hücre içerisindeki çözülmüş Zn^{+2} iyonlarından kaynaklandığını belirtmişlerdir [Deng ve ark., 2009]. Müller ve arkadaşları, ZnO nanokürelerinin toksisitesinin, pH ile tetiklenmiş hücre içi Zn^{+2} iyonlarının salımından kaynaklandığını göstermişlerdir [Müller ve ark., 2010].

ZnO NP'nin *in vitro* sistemlerdeki muhtemel etki mekanizmaları hakkında varılan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir. i) Hücre dışındaki ortamda çözünen ZnO nanopartikülleri, hücre dışı Zn^{+2} iyon konsantrasyonunu artırır. Bu da hücre içi Zn^{+2} iyonlarının artışına yol açar. ii) Hücre içi artan Zn^{+2} , Zn^{+2} iyonlarına bağlı enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin azalması ile sonuçlanır. iii) ZnO NP hücre içerisine girerek lizozomlarda çözünebilir. Bu da lizozom içerisinde Zn^{+2} iyon konsantrasyonunu artırarak lizozomal destabilizasyona yol açar. iv) Tüm bunlarla birlikte ZnO NP, hücre içi Ca^{+2} salınımı, ROT oluşumu, membran hasarı ve mitokondriyal disfonksiyonlara yol açarak hücre içerisinde toksik etkiler oluşturabilir [Vandebriel ve De Jong, 2012].

Bu çalışmada, titanyum dioksit nanopartikülleri ile muamele edilen lenfositlerden hazırlanan preparatlardaki yoğun aglomerat kümelenmeleri, mikroskopik incelemeleri zorlaştırmıştır. ZnO NP uygulaması ile hazırlanan preparatlarda ise bu tür kümelenmelere rastlanmamıştır. Ancak, çinko oksit nanopartikülleri ile muamelede özellikle en yüksek iki konsantrasyonda (30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda daha yoğun olmak üzere) hücre morfolojisinde dramatik değişiklikler olduğu ve hücre çekirdeklerinin halka (simit) şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bu anormal yapı, malign lenfomalarda gözlenen hücre yapısına benzemektedir [Cuneo ve ark., 1999;

Pileri ve ark., 2000; Hao ve ark., 2002]. Fare nöroblastoma hücre hattında, ZnO NP'nin >100 µg/ml konsantrasyonlarının hücrelerde anormal morfoloji ve büzüşmelere sebep olduğu bildirilmiştir [Jeng and Swanson, 2006]. Benzer şekilde insan epidermal hücrelerinde, ZnO NP ile maruziyet süresi arttıkça, hücrelerin sferik şekle dönüştüğü ve kültür ortamında kümelenmeler oluşturduğu tespit edilmiştir [Sharma ve ark., 2009]. Bu çalışmada gözlenen atipik hücre yapılarının, ZnO NP'nin sitotoksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalar TiO₂ NP'nin farklı hücre kültürü ortamlarında agregat oluşturduğunu göstermiştir. Partikül konsantrasyonu, aglomerasyon durumunu ve derecesini partikül-partikül etkileşimini artırarak etkilemektedir. Partikül aglomerasyonunun sedimentasyona yol açtığı ve konsantrasyon arttıkça sedimentasyonun hızlandığı tespit edilmiştir [Allouni ve ark., 2009]. Yüksek nanopartikül konsantrasyonunun, partikül agregasyonunu artırabileceği ve sonuçta toksik etkilerinin azalabileceği gösterilmiştir [Churg ve ark., 1998; Gurr ve ark., 2005; Allouni ve ark., 2009]. Bu çalışmada, TiO₂ NP'nin yüksek konsantrasyonlarına kıyasla, düşük konsantrasyonlarında KA ve MN frekansındaki artışların, TiO₂ NP'nin yüksek konsantrasyonlarda daha fazla aglomerasyon oluşturması ve bu nedenle genotoksik etkisinin azalması ile açıklanabilir.

Komet (tek hücre jel elektroforezi) testi, DNA hasar oranı ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metottur. DNA tek ve çift zincir kırıklarının yanında, teknik alkali labil bölgeleri, oksidatif baz hasarı, DNA-DNA ya da DNA-protein çapraz bağlanmaları ve abazik bölgeleri değerlendirmek için de kullanılmaktadır [Pavanello ve ark., 2000; Collins ve ark., 2008]. Singh ve arkadaşlarının (1988) geliştirdikleri komet testinin alkalın versiyonunda, DNA hasar miktarını değerlendirmek için, DNA migrasyonunun uzunluğu (kuyruk uzunluğu) kullanılmıştır. Daha sonra çeşitli komet parametreleri daha kullanılmıştır. Örneğin kuyruktaki DNA miktarının, genotoksik ajanların konsantrasyon artışı ile iyi bir korelasyon oluşturduğu ve komet parametrelerinden en güvenilir olduğu düşünülmüştür. Kuyruk momenti, kuyruktaki DNA dağılımındaki değişimleri ifade ettiği için özellikle bir hücre popülasyonu içerisindeki heterojeniteyi tanımlamada

yararlı olan bir parametredir [Kumaravel ve ark., 2009]. Kuyruk momenti istatistiksel olarak en anlamlı parametre olarak görülmesine rağmen, bu parametrenin sonuçları ile laboratuvarlar arasında karşılaştırma yapılması zordur [Kumaravel ve Jha; 2006]. Bu nedenle laboratuvarlar arası karşılaştırma yapılmasında özellikle kuyruk yoğunluğunun dikkate alınması önerilmektedir [Burlinson ve ark., 2007; Kumaravel ve ark., 2009; Forchhammer ve ark., 2012]. Bu çalışmada kullanılan komet testinde, hem kuyruk uzunluğu, hem kuyruk yoğunluğu ve hem de kuyruk momenti değerlendirilmiştir.

Dolaşımdaki ömürlerinin uzun olması, homojenite ve kolay elde edilebilirliği gibi nedenlerden dolayı bu çalışmada komet testi izole edilen insan lenfositlerinde gerçekleştirilmiştir. TiO_2 nanopartikülleri, izole lenfositlerde sadece kuyruk uzunluğunda ve en yüksek konsantrasyonda (100 $\mu g/ml$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bu nanopartiküllerin kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti üzerinde önemli bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir. ZnO NP uygulamasında, kuyruk yoğunluğu en yüksek konsantrasyonda anlamlı bir azalma göstermiştir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti benzer artış ve azalışlar gösterirken, kuyruk uzunluğunda 5 ve 20 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarda kontrole göre önemli bir artış tespit edilmiştir. Tüm parametreler dikkate alındığında, ZnO NP'nin 30 $\mu g/ml$ 'lik konsantrasyonunun DNA hasarında kontrole göre bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Bu azalmanın ZnO NP'nin bu konsantrasyonunun DNA'da daha büyük kırıklar oluşturması ve bu kırık DNA'ların elektroforezde daha yavaş ilerlemelerinden kaynaklanıyor olabilir [Aksoy ve ark., 2008].

TiO_2 ve ZnO NP'nin genotoksik etkilerinin komet testi ile değerlendirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Kang ve arkadaşları, 25 nm ebatındaki TiO_2 NP'nin 20, 50 ve 100 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarını insan periferik lenfositleri ile 6, 12 ve 24 saat muamele etmiş ve sonuçta DNA hasarında önemli artışlar belirlemişlerdir [Kang ve ark., 2008]. Buna karşın Hackenberg ve arkadaşları, insan lenfositlerinde gerçekleştirdikleri komet çalışmasında, TiO_2 NP (<25 nm, anataz)'nin 20, 50, 100 ve 200 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması neticesinde herhangi bir sitotoksik ve genotoksik etki gözlememişlerdir [Hackenberg ve ark., 2011a]. TiO_2

NP'nin (<100 nm) 2, 5, 10 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının insan fibroblastlarında ve bronşoepitelyal hücrelerinde 24 saat uygulanması neticesinde, komet testinde negatif bir sonuç elde edilmiştir [Bhattacharya ve ark., 2009].

10 ve 20 nm ebatındaki anataz TiO₂ partiküllerinin BEAS-2B hücrelerinde oksidatif DNA hasarını artırdığı saptanırken, 200 ve >200 nm ebatlarındaki partiküllerinin DNA hasarına yol açmadığı belirtilmiştir [Gurr ve ark., 2005]. İnsan lenfoblastoit (TK6) hücrelerinin, TiO₂ NP'nin 0-200 µg/ml konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi ile DNA kırıklarında ya da oksidatif DNA hasarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir [Woodruff ve ark., 2012]. Erkek Sprague-Dawley ratlara 1 ve 5 mg/kg (tek aşılama grubu) ve 0,2 ve 1 mg/kg (beş hafta boyunca haftada bir) dozajda intratrakeal olarak verilen anataz TiO₂ NP'nin (5 nm), akciğer hücrelerinde DNA hasarına yol açmadığı tespit edilmiştir [Naya ve ark., 2012].

Bizim test koşullarımıza benzer bir çalışmada, TiO₂ NP ve ZnO NP'nin (40-70 nm ebatlarında) izole lenfosit ve sperm hücrelerinde UV varlığında ve karanlıktaki etkileri komet testi ile araştırılmıştır. ZnO NP'nin 11,5; 46,2; 69,4 ve 92,3 µg/ml'lik konsantrasyonları ve TiO₂ NP'nin 3,73; 14,92; 29,85 ve 59,7 µg/ml'lik konsantrasyonları 30 dakika kullanılmıştır. Lenfositlerde, her iki nanopartikülün, UV varlığında daha fazla DNA hasarı oluşturduğu tespit edilmiştir. TiO₂ NP'nin sperm hücrelerinde fotogenotoksik olmadığı fakat lenfositlerde özellikle UV varlığında, doza bağlı fotogenotoksik olduğu saptanmıştır [Gopalan ve ark., 2009]. Sharma ve arkadaşları, insan epidermal hücre hattında, ZnO NP'nin 0,8-5µg/ml'lik konsantrasyonları ile 24 saatlik muamelenin kuyruk momentinde bir artış olduğunu saptamışlardır [Sharma ve ark., 2009]. Yang ve arkadaşları fare embriyosu fibroblast hücrelerinde ZnO NP'nin 5 ve 10 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 24 saatlik muamelesinin, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinde önemli artışlara yol açtığını tespit etmişlerdir [Yang ve ark., 2008]. İnsan nazal mukoza hücreleri, ZnO NP (<100 nm) ve ZnO powder (<5 µm)'in 0,01; 0,1; 5; 10 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 24 saat maruz bırakılmıştır. Mikron ebatlı ZnO NP'nin kuyruk momentinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı fakat çinko oksit nanopartiküllerinin özellikle

10 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda DNA hasarında önemli bir artışa yol açtığı gözlenmiştir [Hackenberg ve ark., 2011b].

Güneş kremleri, nanoteknolojinin avantajlarından yararlanan ve dünya çapında en yaygın kullanılan tüketici ürünlerinden biridir. Güneş koruma ürünleri, organik filtreler ve güneşten gelen zararlı ultraviyole ışınlarını bloke eden inorganik partiküller içerir. Bu UV engelleyici partiküller genellikle TiO₂ ve ZnO gibi yarı iletken metal oksitlerdir. Yarı iletken partiküller aynı zamanda etkili bir fotokatalizör olduklarından, ciltte biyolojik materyallere zarar veren reaktif oksijen türlerini oluşturabileceğinden endişe edilmektedir. Bu nedenle güneş kremlerinde kullanılan TiO₂ ve ZnO partiküllerinin büyük bir kısmı, alimünyum ya da silika ile kaplanılarak, fotokatalitik özelliklerinin kaybedilmesi sağlanmaktadır [Marie-Alexandrine ve ark., 2011]. Cilt üzerinde daha beyaz görünmesi ve UV ışığını daha etkili bir şekilde engelleme özelliklerinden dolayı günümüzde güneş kremlerinde kullanılan TiO₂ ve ZnO partiküllerinin nano ebatlı formları tercih edilmektedir. Güneş kremlerinde kullanılan TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerin cilt penetrasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, bu nanopartikül içerikli güneş kremlerinin insan sağlığı üzerinde risk potansiyeli olmadığı, aksine cilt kanserine karşı cildi koruduğu saptanmıştır [Nohynek ve ark., 2008]. Bu partiküllerle yapılan çalışmalarda cildin *stratum corneum* tabakasının altında nanopartikül saptanmamıştır [Gamer ve ark., 2006]. Kaplanmış ve kaplanmamış TiO₂ nanopartiküllerinin 5, 10 ve 20 mg'lık konsantrasyonları 0,1 ml olacak şekilde 19 hafta boyunca fare cildi üzerinde topikal olarak uygulanmıştır. Yapılan histopatolojik incelemelerde herhangi bir nodül gelişimi gözlenmemiştir [Furukawa ve ark., 2011]. Buna karşın *in vitro* çalışmalarda bu nanopartiküllerin hücrelerde oksidatif strese yol açarak DNA hasarını indüklediği bildirilmiştir [Sharma ve ark., 2009; Hackenberg ve ark., 2011b].

Sonuç olarak bu çalışmada, insan lenfositlerinde titanyum dioksit nanopartiküllerinin zayıf bir genotoksik etki gösterdiği, çinko oksit nanopartiküllerinin ise özellikle yüksek konsantrasyonlarının hem sitotoksik ve hem de güçlü bir genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yaygın kullanımlarından dolayı TiO₂ NP'nin ve ZnO NP'nin genotoksitesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmış olup, özellikle TiO₂ NP

ile ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Tutarsız bulgular, değişik çalışmalarda kullanılan TiO₂ nanopartiküllerin farklı boyut ve yapısından kaynaklanabilir. Diğer yandan, bazı çalışmalarda kullanılan nanomateryalin fizikokimyasal karakterizasyonu hakkındaki bilgi eksikliği çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır.

Nanomateryaller tarafından oluşturulan genotoksisiteden sorumlu mekanizma, primer ve sekonder olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir. Primer mekanizma, nanomateryallerin tek hücre düzeyinde oluşturduğu hasardır ve nanomateryal ile DNA arasında direkt veya dolaylı yoldan etkileşim ile sonuçlanabilir. Direkt etki eden ajanlar, genetik materyal ile direkt teması sağlayarak, fiziksel ve kimyasal hasara sebep olabilir. Buna karşın dolaylı yoldan etki eden ajanlar, hücre döngüsü bileşenlerinde rol oynayan aracı biyomoleküllerde hasar oluşturmak suretiyle genetik toksisiteye sebep olurlar. Diğer taraftan indirekt DNA hasarı, nanomateryal maruziyetini takiben reaktif oksijen türlerinin oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres sonucunda lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin hasarı ile meydana gelebilir. Genotoksisitenin sekonder mekanizması, nanomateryallerin *in vivo* kronik inflamatuvar yanıtı indüklemesi ile maruziyet bölgesine savunma mekanizması olarak toplanan makrofaj ve nötrofil hücreleri tarafından aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile sonuçlanan mekanizmadır [Doak ve ark., 2012a]. Nanomateryaller tarafından indüklenen DNA hasarının ana mekanizmasının indirekt şekilde ve oksidatif stres yoluyla olduğu belirtilmektedir [Schins, 2002; Nel ve ark., 2006; Bhattacharya ve ark., 2009; Karlsson, 2010; Sharma ve ark., 2012]. Bununla birlikte nanomateryallere uzun süreli kronik maruziyetin inflamasyona yol açarak sekonder genotoksik mekanizmalar ile DNA hasarına yol açabileceği de bildirilmiştir [Poland ve ark., 2008; Trouiller ve ark., 2009; Moon ve ark., 2010].

Endüstriyel olarak tasarlanmış nanomateryallere maruz kalan kişiler sadece nanoürünleri kullanan tüketiciler değildir. Nanomateryallerin sentezi ve uygulamaları sırasında bu materyallerle direkt temas sağlayan ve nanoteknoloji alanında çalışan kişiler de bu materyallere maruz kalmaktadır. Bu nanomateryallerin taşınması ve ürün ekipmanlarının temizlenmesi sırasında, nanopartiküllere direkt maruziyet

sonucunda özellikle inhalasyon yolu ile de maruz kalınabilir. Bu nedenle sadece insan sağlığının ve çevrenin korunması için değil, aynı zamanda nanoteknoloji endüstrisinin uzun süreli zararından kaçınmak için de potansiyel toksikolojik risklerini minimize etmek gerekmektedir.

Nanomateriyallerin genotoksisitesi üzerine çalışmalar yapıldıkça, nanomateriyallerin oksidatif stres ve DNA ile ya da hücre döngüsü sistemi ile direkt mekanik etkileşim aracılığıyla DNA hasarı oluşturma kabiliyetini destekleyen kanıtlar artmaktadır. Yine de nanomateriyallerin genotoksik potansiyeli, onların fizikokimyasal karakteristiklerine bağlı olabileceğinden, bu konuda daha detaylı analizlerin de yapılması gerekmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda genellikle bu tür karakterizasyonların eksik olduğu görölmektedir. Bundan sonraki araştırmalarda, genotoksik etkileri incelenen nanomateriyallerin aynı zamanda detaylı karakteristik incelemelerinin de yapılması, bu nanomateriyallerin gerçek etkilerini belirlemede daha büyük katkı sağlayacaktır. Diğer yandan, yüksek düzeyde genotoksik etki ve kanser arasında pozitif bir korelasyon olduğu için, nanomateriyallerin genotoksik etkilerinin *in vivo* çalışmalar ile de aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J, Hong, Y., “DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233: 404-10 (2008).
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.A.M., Ahmad, J., Alrokayan, S.A., “Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species”, *International Journal of Nanomedicine*, 7: 845-857 (2012).
- Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “Moniliformin mikotoksininin *in vitro* genotoksik etkileri”, *Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Dergisi*, 2: 1-14 (2008).
- Alakoç, C., Eroğlu, H.E., “Determining mitotic index in peripheral lymphocytes of welders exposed to metal arc welding fumes”, *Turkish Journal of Biology*, 35: 325-330 (2011).
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shaker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”, *Mutation Research*, 463: 111-172 (2000).
- Albertini, R.J., “HPRT mutation in humans: biomarkers for mechanistic studies”, *Mutation Research*, 489: 1-16 (2001).
- Allouni, Z.E., Cimpan, M.R., Høl, P.J., Skodvin, T., Nils, R., Gjerdet, N.R., “Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68: 83-87 (2009).
- Ames, B.N., Mccann, J., Yamasaki, E., “Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity”, *Mutation Research*, 31: 347-364 (1975).
- Anas, A.A., Akita, H., Harashima, H., Itoh, T., Ishikawa, M., Biju, V., “Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS quantum dots”, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112: 10005-11 (2008).
- AshaRani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., “Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells”, *ACS Nano*, 3: 279-290 (2009).
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., “Genetik toksisite testleri”, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4: 221-229 (2011).

Barnes, C.A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Leśniak, A., Salvati, A., Hanrahan, J.P., Jong, W.H., Dziubałtowska, E., Stepnik, M., Rydzyński, K., McKerr, G., Lynch, I., Dawson, K.A., Howard, C.V., “Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity”, *Nano Letters*, 8: 3069-74 (2008).

Becheri, A., Durr, M., Nostro, P., Baglioni, P., “Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers”, *Journal of Nanoparticle Research*, 10: 679-689 (2008).

Beg, T., Siddique, Y. H., Ara, G., Gupta, M., Afzal, J., “Protective action of EGCG against anticancer drugs MMS and CP”, *The Internet Journal of Pharmacology*, 6(2): 1-7 (2009).

Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz J., Schins R.P., Hoffmann, E., Dopp, E., “Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells”, *Particle and Fibre Toxicology*, 6: 17 (2009).

Bolognesi, C., “Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies”, *Mutation Research*, 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M., “Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies”, *Mutagenesis*, 26(1): 93-100 (2011).

Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab S.Y., Collins, A.R., “In vivo Comet Assay workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the *in vivo* Comet Assay workgroup”, *Mutation Research*, 627: 31-5 (2007).

Buzea, C., Pacheco Blandino, I.I., Robbie, K., “Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity”, *Biointerphases*, 2(4): 17-172 (2007).

Chen, J., Dong, X., Zhao, J., Tang, G., “In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection”, *Journal of Applied Toxicology*, 29(4): 330-337 (2009).

Chen, M., von Mikecz, A., “Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles”, *Experimental Cell Research*, 305: 51-62 (2005).

Cho, M., Chung, H., Choi, W., Yoon, J., “Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection”, *Water Research*, 38: 1069-1077 (2004).

Churg, A., Stevend, B., Wright, J.L., “Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system”, *American Journal of Physiology*, 274: 81-86 (1998).

Clarke, D.J., Johnson, R.T., Downes, C.S., “Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks”, *Journal of Cell Science*, 105(2): 563-569 (1993).

Clausen, C.A., Green, F., Kartal, S.N., “Weatherability and leach resistance of wood impregnated with nano-zinc oxide”, *Nanoscale Research Letters*, 5: 1464-1467 (2010).

Clift, M.J., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D.M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., Guy, K., Stone, V., “The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232: 418-427 (2008).

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., “The comet assay: topical issues”, *Mutagenesis*, 23: 143-51 (2008).

Colognato, R., Bonelli, A., Ponti, J., Farina, M., Bergamaschi, E., Sabbioni, E., Migliore, L., “Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro”, *Mutagenesis*, 23: 377-382 (2008).

Colvin, V.L., “The potential environmental impact of engineered nanomaterials”, *Nature Biotechnology*, 21: 1166-1170 (2003).

Cortes, F., Pastor, N., “Induction of endoreduplication by topoisomerase II catalytic inhibitors”, *Mutagenesis*, 18(2): 105-112 (2003).

Cuneo, A., Bigoni, R., Rigolin, G.M., Roberti, M.G., Bardi, A., Piva, N., Milani, R., Bullrich, F., Veronese, M.L, Croce, C., Birg, F., Döhner, H., Hagemeyer, A., Castoldi, G., “Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features”, *Blood*, 93:1372-80 (1999).

Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H.J., Lyng, F.M., “In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells”, *Toxicology In Vitro*, 21: 438-448 (2009).

Deng, X., Luan, Q., Chen, W., Wang, Y., Wu, M., Zhang, H., Jiao, Z., “Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis”, *Nanotechnology*, doi:10.1088/0957-4484/20/11/115101 (2009).

Dhawan, A., Taurozzi, J.S., Pandey, A.K., Shan, W., Miller, S.M., Hashsham, S.A, Tarabara, V.V., “Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: Evidence for genotoxicity”, *Environmental Science & Technology*, 40: 7394-401 (2006).

Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Fernández Lorenzo de Mele, M., “Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells”, *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3): 711-8 (2010).

Doak, S.H., Liu, Y., Chen, C., “Genotoxicity and Cancer”, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials 1st ed., Edited by: Fadeel, B., Pietroiusti, A., Shvedova, A., *Academic Press*, USA, 243-261 (2012a).

Doak, S.H., Jenkins, G.J., Johnson, G.E., Quick, E., Parry E.M., Parry, J.M., “Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens”, *Cancer Research*, 67: 3904-11 (2007).

Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Singh, N., “In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines”, *Mutation Research*, 745: 104-111 (2012b).

Downs, T.R., Crosby, M.E., Hu, T., Kumar, S., Sullivan, A., Sarlo, K., Reeder, B., Lynch, M., Wagner, M., Mills, T., Pfuhler, S., “Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not”, *Mutation Research*, 745(1-2): 38-50 (2012).

Dufour, E.K., Kumaravel, T., Nohynek, G.J., Kirkland, D., Toutain, H., “Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photoclastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells”, *Mutation Research*, 607: 215-224 (2006).

Endo, M., Strano, M.S., Ajayan, P.M., “Potential Applications of Carbon Nanotubes”, *Topics in Applied Physics*, 111: 13-62 (2008).

Evans, D.E., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., “Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance”, *Mutation Research*, 567: 1-61 (2004).

Evans, H.J., In Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., “Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”, *Hand Book of Mutagenicity Test Procedures 2nd ed*, *Elsevier Sciences*, Amsterdam, 405–427 (1984).

Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben, W., van Ravenzwaay, B., “Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats”, *Toxicology*, 82: 151-157 (2008).

Falck, G.C.M., Lindberg, H.K., Suhonen, S., “Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂”, *Human and Experimental Toxicology*, 28: 339-352 (2009).

Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., Loguercio, C., “Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis”, *International Journal of Cancer*, 121: 2381-6 (2007).

Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Nature Protocols*, 2(5): 1084-1104 (2007).

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., “Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures”, *Mutation Research*, 534(1-2): 65-75 (2003).

Fenech, M., Morley, A.A., “Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation”, *Mutation Research*, 161: 193–198 (1986).

Ferguson, L.R., Denny, W.A., “Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators” *Mutation Research*, 623: 14-23 (2007).

Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., Moller, P., “Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes”, *Environmental Health Perspectives*, 117: 703-8 (2009).

Forchhammer, L., Ersson, C., Loft, S., Möller, L., Godschalk, R.W., van Schooten F.J., Jones, G.D., Higgins, J.A., Cooke, M., Mistry, V., Karbaschi, M., Collins, A.R., Azqueta, A., Phillips, D.H., Sozeri, O., Routledge, M.N., Nelson-Smith, K., Riso, P., Porrini, M., Matullo, G., Allione, A., Steepnik, M., Komorowska, M., Teixeira, J.P., Costa, S., Corcuera, L.A., López de Cerain, A., Laffon, B., Valdiglesias, V., Møller, P., “Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol”, *Mutagenesis*, doi:10.1093/mutage/ges032 (2012).

Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W., Nie, S., “In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots”, *Nature Biotechnology*, 22: 969-76 (2004).

Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G., Zeiger, E., “Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals”, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 10(10): 1-175 (1987).

Gamer, A., Leibold, E., van Ravenzway, B., “The *in vitro* absorption of microfine ZnO and TiO₂ through porcine skin”, *Toxicology In Vitro*, 20: 301–307 (2006).

Garcia-Sagredo, J.M., "Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779: 363-375 (2008).

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., Gehr, P., "Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells", *Environmental Health Perspectives*, 113: 1555-1560 (2005).

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., "Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes", *Chemosphere*, 81(10): 1253-1262 (2010).

Gonzalez, L., Lison, D., Kirsch-Volders, M., "Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review", *Nanotoxicology*, 2(4): 252-273 (2008).

Gopalan, R., Osman, I., Amani, A., Matas, M., Anderson, D., "The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the Comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes", *Nanotoxicology*, 3(1): 33-39 (2009).

Gratton, S.E., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., DeSimone, J.M., "The effect of particle design on cellular internalization pathways", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 11613-8 (2008).

Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y., "Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells", *Toxicology*, 213: 66-73 (2005).

Gutierrez-Enriquez, S., Hall, J., "Use of the cytokinesis-block micronucleus assay to measure radiation-induced chromosome damage in lymphoblastoid cell lines", *Mutation Research*, 535: 1-13 (2003).

Guttenbach, M., Schmid, M., "Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures", *Experimental Cell Research*, 211: 127-132 (1994).

Hackenberg, S., Friehs, G., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Scherzed, A., Burghartz, M., Kleinsasser, N., "Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52: 264-268 (2011a).

Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N., "Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro", *Toxicology in Vitro*, 25: 657-663 (2011b).

Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Hogstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., “Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage”, *Cancer Research*, 54(11): 2919-22 (1994).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., “Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)”, *Cancer Research*, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hagmar, L., Stromberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Lindholm, C., Norppa, H., “Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts”, *Cancer Research*, 64(6): 2258-2263 (2004).

Hamilton, R.F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., Holian, A., “Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity”, *Particulate and Fibre Toxicology*, 6:35 (2009).

Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., Altschuler, Y., “Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353: 26–32 (2007).

Hao, S., Sanger, W., Onciu, M., Lai, R., Schlette, E.J, Medeiros, L.J., “Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features”, *Modern Pathology*, 5(12): 1266-72 (2002).

He, L., Yang, L., Zhang, Z.R., Gong, T., Deng, L., Gu, Z., Sun, X., “In vitro evaluation of the genotoxicity of a family of novel MeO-PEG-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-Ome triblock copolymer and PLGA nanoparticles”, *Nanotechnology*, 20(45): 455102 (2009).

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C., “Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles”, *Biomaterials*, 31: 3657-3666 (2010).

Heng, B.C., Zhao, X., Xiong, S., Ng, K.W., Boey, F.Y., Loo, J.S., “Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress”, *Food and Chemical Toxicology*, 48(6):1762-6 (2010).

Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., “Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chlorprophan”, *Cytobios*, 57: 7-14 (1989).

Hirakawa, K., Mori, M., Yoshida, M., Oikawa, S., Kawanishi, S., "Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide", *Free Radical Research*, 38: 439-447 (2004).

Horinouchi, M., Arimoto-Kobayashi, S., "Photomicronucleus assay of phototoxic and pseudophotoclastogenic chemicals in human keratinocyte NCTC2544 cells", *Mutation Research*, 723: 43-50 (2011).

Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Masato, Y., Kazuo, S., Kenji, Y., "Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification", *Nano Letters*, 4: 2163-2169 (2004).

Hradil, J., Pisarev, A., Babic, M., Horak, D., "Dextran-modified iron oxide nanoparticles", *China Particuology*, 5: 162-168 (2007).

Huang, S., Chueh, P.J., Lin, Y.W., Shih, T.S., Chuang S.M., "Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long term exposure", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241: 182-194 (2009).

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J., "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells", *Toxicology In Vitro*, 19: 975-983(2005).

Ionescu, M.E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A.G., Gologan, S.I., Arbanas, T., Diculescu, M.M, "Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions", *Journal of Clinical Medicine*, 6 (3): 173-178 (2011).

Isfort, C.S., Rochnia, M., "Production and physico-chemical characterisation of nanoparticles", *Toxicology Letters*, 186: 148-151 (2009).

Internet: Woodrow Wilson Database <http://www.nanotechproject.org> (2011).

Jacobsen, N.R., Pojana, G., White, P., Moller, P., Cohn, C.A., Korsholm, K.S., Vogel, U., Marcomini, A, Loft S, Wallin, H., "Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark-Mouse lung epithelial cells", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 476-487 (2008).

Jain, A.K., Andsorbhoy, R.K. "Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. III. Concluding Remarks", *Cytologia*, 53: 427-436 (1988).

Jeng, H.A., Swanson, J., "Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells", *Journal of Environmental Science and Health A*, 41(12): 2699-2711 (2006).

Jiang, J., Oberdorster, G., Biswas, P., "Characterisation of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies", *Journal Nanopart Research*, 11: 77-89 (2009).

Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J., Chung, H.W., "Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 399-405 (2008).

Kang, S.J., Lee, Y.J., Kim, B.M., Choi, Y.J., Chung, H.W., "Cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiated normal peripheral blood lymphocytes", *Drug and Chemical Toxicology*, 34(3): 277-284 (2011).

Kao, Y.Y., Chen, Y.C., Cheng, T.J., Chiung, Y.M., Liu, P.S., "Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity", *Toxicological Science*, 125(2):462-472 (2012).

Karlsson, H.L., "The comet assay in nanotoxicology research", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 651-666 (2010).

Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Moller, L., "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes", *Chemical Research Toxicology*, 21: 1726-32 (2008).

Kato, S., Taira, H., Aoshima, H., Saitoh, Y., Miwa, N., "Clinical evaluation of fullerene-C60 dissolved in squalane for anti-wrinkle cosmetics", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10: 6769-74 (2010).

Kihlman, B.A., "Actions of Chemicals on Dividing Cells", *Prentice Hall*, Englewood, Cliffs, NJ (1966).

Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M., Chung, K.H., "Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells", *Mutation Research*, 726(2): 129-35 (2011).

Kim, I.S., Baek, M., Choi, S.J., "Comparative Cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10: 3453-3458 (2010).

Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Kim, B.G., Park, S.J., Kim, H.W., Lee, K.H., Park, S.B., Lee, J.K., Cho, M.H., "Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice", *Toxicological Sciences*, 89(1): 338-347 (2006).

Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., Shi, X.C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W.E., Kagan, V.E., Shvedova, A.A., "Single-walled carbon nanotubes: Geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells", *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 70: 2071-9 (2007).

Kiss, B., Bíró, T., Czifra, G., Tóth, B.I., Kertész, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., Juhász, I., Zouboulis, C.C., Hunyadi, J., “Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells,” *Experimental Dermatology*, 17(8): 659-667 (2008).

Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W.C., Yamamoto, Y., Chien, K.C., Inoue, M., “Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen”, *Redox Report*, 6: 319-25 (2001).

Krishnaja, A.P., Sharma, N.K., “Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*”, *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 1: 99-122 (2003).

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., “Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis”, *Mutation Research*, 711(1–2): 193-201 (2011).

Kumaravel, T.S., Jha, A.N., “Reliable Comet Assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals”, *Mutation Research*, 605:7-16 (2006).

Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., “Comet Assay measurements: a perspective”, *Cell Biology and Toxicology*, 25:53-64 (2009).

Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, A., “Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*” *Science of the Total Environment*, 407: 5243-5246 (2009).

Kumari, M., Khan, S.S., Pakrashi, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., “Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*”, *Journal of Hazardous Materials*, 190: 613-621 (2011).

Kuo, C.W., Lai, J-J., Chen, P., “Cytotoxicity of the functionalized gold and silver nanorods”, *Material Research Society*, 951: 105-110 (2007).

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Schulz, M., Wiench, K., Champ, S., Schulte, S., Wohlleben, W., Oesch, F., “Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations” *Nanotoxicology*, 4(4): 364-381(2010).

Latt, R.R., Sehrek, K.S., Loveday, C.P., Dougherty, C.F., Schuler, “Sister chromatid exchange”, *Advanced Human Genetics*, 10: 267-331 (1980).

Lazutka, J.R., “Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17(3): 188-95 (1991).

Leary, S.P., Liu, C.Y., Apuzzo, M.L., “Toward the emergence of nanoneurosurgery: part II—nanomedicine: diagnostics and imaging at the nanoscale level”, *Neurosurgery*, 58: 805-823 (2006).

Li, J.J., Muralikrishnan, S., Ng, C.T., Yung, L.Y., Bay, B.H., “Nanoparticle-induced pulmonary toxicity”, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 235(9): 1025-1033 (2010).

Li, J.J., Zou, L., Hartono, D., Ong, C.N., Bay, B.H., Yung L.Y. “Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro”, *Advanced Materials*, 20: 138-42 (2008).

Li, W., Ni, C., Lin, H., Huang, C.P., Shah, S.I., “Size dependence of thermal stability of TiO₂ nanoparticles”, *Journal of Applied Physics*, 96(11) : 6663 (2004).

Liang, X.J., Meng, H., Wang, Y., He, H., Meng, J., Lu, J., Wang, P.C., Zhao, Y., Gao, X., Sun, B., Chen, C., Xing, G., Shen, D., Gottesman, M.M., Wu, Y., Yin, L.J., Jia, L., “Metallofullerene nanoparticles circumvent tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 7449-54 (2010).

Lindberg, H.K., Falck, G.C., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., Norppa, H., “Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*”, *Toxicology Letters*, 186(3):166-73 (2009).

Linnainmaa, K., Kivipensas, P., Vainio, H., “Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells”, *Toxicology In Vitro*, 11: 329-335 (1997).

Liu, L., Takenaka, T., Zinchenko, A.A., Chen, N., Inagaki, S., Asada, H., “Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells”, *International Symposium Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 1: 281-5 (2007).

Liu, Z., “Acute Toxicity of Nano-sized Zinc Oxide in ICR Mice via Intratracheal Instillation”, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 25: 4 (2008).

Lockman, P.R., Koziara, J.M., Mumper, R.J., Allen, D.D., “Nanoparticle surface charges alter blood–brain barrier integrity and permeability”, *Journal Drug Target*, 12: 635-641 (2004).

Mahadevan, B., Ronald, D., Snyder, R.D., Waters, M.D., Benz, R.D., Kemper, R.A., Tice, R.R., Richard, A.M., “Genetic toxicology in the 21st century: Reflections and future directions”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52:339-354 (2011).

Malvern Instruments Ltd. "Zetasizer Nano Series User Manual", MAN0317 Issue 2.2. Worcestershire, UK, (2005).

Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., "Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?", *Toxicology In Vitro*, 24: 790-794 (2010).

Marie-Alexandrine, B., Stéphanie, B., Yves, C., "Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals" *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnology*.doi: 10.1002/wnan.146 (2011).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring", *Biochimie*, 88: 1515-1531 (2006).

Meng, J., Yang, X.D., Jia, L., Liang, X.J., Wang, C., "Impacts of nanoparticles on cardiovascular diseases: modulating metabolism and function of endothelial cells", *Current Drug Metabolism*, 13(8): 1123-1129 (2012).

Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M., "Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition", *Mutation Research*, 393: 107-13 (1997).

Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., "Multiwalled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes", *Toxicology Letters*, 155: 377-384 (2005).

Moon, C., Park, H.J., Choi, Y.H., Park, E.M., Castranova, V., Kang J.L., Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO₂) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide", *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 73(5): 396-409 (2010).

Montoro, A., Soriano, J.M., Barquinero, J.F., Almonacid, M., Montoro, A., Verdu G., Sahuquillo, V., Villaescusa, J.I., Sebastia, N., "Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes", *Food and Chemical Toxicology*, 50: 216-221 (2012).

Mroz, R.M., Schins, R.P., Li, H., Jimenez, L.A., Drost, E.M., Holownia, A., MacNee, W., Donaldson, K., "Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways", *European Respiratory Journal*, 31: 241-251 (2008).

Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., "Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure

using dynamic light scattering technique”, *Toxicological Sciences*, 101(2): 239-53 (2008).

Mutluer, S., “The history of little things that changed our lives”, *Child’s Nervous System*, 27: 1513-1520 (2011).

Müller, K.H., Kulkarni, J., Motskin, M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J.N., Ryan, M.P., Porter, A.E., “pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution”, *ACS Nano*, 4(11): 6767-6779 (2010).

Nabiev, I., Mitchell, S., Davies, A., Williams, Y., Kelleher, D., Moore, R., Gun'ko, Y.K., Byrne, S., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., Sukhanova, A., Conroy, J., Cottell, D., Gaponik, N., Rogach, A., Volkov, Y., “Nonfunctionalised nanocrystals can exploit a cell’s active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments”, *Nano Letters*, 7: 3452-61 (2007).

Nakagawa, Y., Wakuri, S., Sakamoto, K., Tanaka, N., “The photogenotoxicity of titanium dioxide particles”, *Mutation Research*, 394: 125-132 (1997).

Nan, A., Bai, X., Son, S.J., Lee, S.B., Ghandehari, H., “Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes”, *Nano Letters*, 8: 2150-4 (2008).

Natarajan, A.T., “Chromosome aberrations: past, present and future”, *Mutation Research*, 504: 3-16 (2002).

Naya, M., Kobayashi, N., Ema, M., Kasamoto, S., Fukumuro, M., Takami S., Nakajima, M., Hayashi, M., Nakanishi, J., “In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62: 1-6 (2012).

Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N., “Toxic potential of materials at the nano level”, *Science*, 311: 622-7 (2006).

Nohynek, G.J., Dufour, E.K., Roberts, M.S., “Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk?”, *Skin Pharmacology Physiology*, 21: 136-149 (2008).

Nohynek, G.J., Lademann, J., Ribaud C., Roberts M.S., “Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety”, *Critical Reviews in Toxicology*, 37(3): 251-277 (2007).

Nohynek, G.J., Dufour, E.K., Roberts, M.S., “Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk?”, *Skin Pharmacology and Physiology*, 21: 136-149 (2008).

Noonan, C.W., Pfau, J.C., Larson, T.C., Spence, M.R., “Nested case-control study of autoimmune disease in an asbestos-exposed population”, *Environmental Health Perspectives*, 114: 1243-1247 (2006).

Norppa, H., Falck, G.C., “What do human micronuclei contain?”, *Mutagenesis*, 18: 221-233 (2003).

Obe, G., Johannes, C., Ritter, S., “The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more important for the formation of chromosomal aberrations: a hypothesis”, *Mutation Research*, 701: 3-11 (2010).

Oberdorster, G., Gelein, R., Johnston, C.J, Mercer, P, Corson N, Finkelstein, J.N., “Ambient ultrafine particles: inducers of acute lung injury?” Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution, Edited by: Mohr, U., Dungworth, D.L., Brain, J.D., Driscoll, K.E, Grafstrom, R.C, Harris, C.C, *ILSI Press; Washington*, 216-229 (1998).

Oberly, T.J., Yount, D.L., Garriott, M.L., “A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y TK+/- mouse lymphoma assay”, *Mutation Research*, 388: 59-66 (1997).

Oskam, G., “Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application” *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 37: 161-164 (2006).

Osmond, M.J., McCall, M.J., “Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard”, *Nanotoxicology*, 4(1): 15-41 (2010).

Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E., Case, C.P., “The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro”, *Biomaterials*, 28(19): 2946-58 (2007).

Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K., “Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells”, *Toxicology Letters*, 180: 222-229 (2008).

Park, M.V., Verharen, H.W., Zwart, E., Hernandez, L.G., van Benthem, J., Elsaesser, A., Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Salvati, A., Lynch, I., Dawson, K.A., de Jong, W.H., “Genotoxicity evaluation of amorphous silica nanoparticles of different sizes using the micronucleus and the plasmid lacZ gene mutation assay”, *Nanotoxicology*, 5(2): 168-81 (2011).

Parry, J.M., Kirsch-Volders, M., “Special issue on *in vitro* MN trial”, *Mutation Research*, 702: 132-134 (2010).

Pavanello, S., Clonfero, E., “Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms”, *Mutation Research*, 463: 285–308 (2000).

Perry, P.E., Thompson, E.J., "The methodology of sister chromatid exchanges", Edited by: Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., In: Handbook of mutagenicity test procedures, *Elsevier Science*, Amsterdam, 495-529 (1984).

Perry, P.E., Wolff, S., "New giemsa method for the differential staining of sister chromatids", *Nature*, 251 (5471): 156-158 (1974).

Peters, A., Veronesi, B., Calderon-Garciduenas, L., Gehr, P., Chen, L.C., Geiser, M., Reed, W., Rothen-Rutishauer, B., Schurch, S., Schultz, H., "Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles", *Partical and Fibre Toxicology*, 3: 13 (2006).

Petersen, E.J., Nelson, B.C., "Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2): 613-50 (2010).

Petkovic, J., Zegura, B., Stevanovic, M., Drnovsek N., Uskokovic, D., Novak, S., Filipic, M., "DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells", *Nanotoxicology*, 5(3): 341-353 (2011).

Pierscionek, B.K., Li, Y., Yasseen, A.A., Colhoun, L.M., Schachar, R.A., Chen, W., "Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells" *Nanotechnology*, 21(3): 035102 (2010).

Pileri, S.A., Ascani, S., Sabattini E., Fraternali-Orcioni, G., Poggi, S., Piccioli, M., Piccaluga, P.P., Gamberi, B., Zinzani, P.L., Leoncini L., Falini, B., "The pathologist's view point. Part I – indolent lymphomas", *Haematologica* 85:1291-1307 (2000).

Poland, C.A., Duffin, R., Kinlock, I., Maynard, A., Wallace, W.A., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., Macnee, W., Donaldson, K., "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study", *Nature Nanotechnology*, 3: 423-8 (2008).

Porter, A.E., Muller, K., Skepper, J., Midgley, P., Welland, M., "Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography", *Acta Biomaterialia*, 2: 409-419 (2006).

Powell, J.J., Faria, N., Thomas-McKay, E., Pele, L.C., "Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract", *Journal of Autoimmunity*, 34: J226-J233 (2010).

Preston, R.J., Skare, J.A., Aardema, M.J., "A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes", *Mutagenesis*, 25(1): 17-23 (2010).

Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., Chen, C., "Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods", *Biomaterials*, 31: 7606-19 (2010).

Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D.G., Schiffmann D., "Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts", *Environmental Health Perspectives*, 110(8): 797-800 (2002).

Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J., Jha, A.N., "Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells", *Mutation Research*, 640: 113-122 (2007).

Richards, R., Bönnemann, H., "Synthetic approaches to metallic nanomaterials" Nanofabrication Towards Biomedical Applications, Edited by Kumar, C.S.S.R., Hormes, J., Leuschner, C., *Wiley-VCH*, Weinheim, 3-20, (2005).

Royal Society and Royal Academy of Engineering Report, "Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties", *Royal Society*, London, 7-10, (2004).

Sadiq, R., Bhalli, J.A., Yan, J., Woodruff, R.S., Pearce, M.G., Li Y., Mustafa, T., Watanabe, F., Pack, L.M., Biris, A.S., Khan Q.M., Chen T., "Genotoxicity of TiO_2 anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays", *Mutation Research*, 745: 65-72 (2012).

Sardari, R.R.R., Zarchi, S.R., Talebi, A., Nasri, S., Imani, S., Khoradmehr, A., Sheshde, S.A.R., "Toxicological effects of silver nanoparticles in rats", *African Journal of Microbiology Research*, 6(27): 5587-5593 (2012).

Satoh, T., Yamamoto, K., Miura, K.F., Sofuni, T., "Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells", *Cytogenetic and Genome Research*, 104: 289-294 (2004).

Sayes, C.M., Liang, F., Hudson, J.L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J.M., Moore, V.C., Doyle, C.D., West, J.L., Billups, W.E., Ausman, K.D., Colvin, V.L., "Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*", *Toxicology Letters*, 161:135-42 (2006).

Sayes, C.M., Reed K.L., Glover, K.P., Swain, K.A., Ostraat, M.L., Donner, E.M., Warheit D.B., "Changing the dose metric for inhalation toxicity studies: short-term study in rats with engineered aerosolized amorphous silica nanoparticles", *Inhalation Toxicology*, 22: 348-354 (2010).

Schatz, G., "Using theory and computation to model nanoscale properties", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States Of America*, 104: 6885-92 (2007).

Schins, R.P., “Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers”, *Inhalation Toxicology*, 14(1): 57-78 (2002).

Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A., “DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells”, *Toxicology Letters*, 185: 211-218 (2009).

Sharma, V., Singh, P., Pandey, A.K., Dhawan, A., “Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles”, *Mutation Research*, 745: 84-91 (2012).

Shi, Y., Zhang, J.H., Jiang, M., Zhu, L.H., Tan, H.Q., Lu, B., “Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p,p'-DDT in human hepatocytes”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51:192-204 (2010).

Shin, S., H., Ye, M.K., Kim, H.S., Kang, H., S., “The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells”, *International Immunopharmacology*, 7: 1813-1818 (2007).

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhone, R.R., Sastry, M., “Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview”, *Langmuir*, 21: 10644-10654 (2005).

Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S., Dhawan, A., “ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells”, *Toxicology in Vitro*, 25: 231-41 (2011).

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G., Wright, C.J., Doak, S.H., “NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials”, *Biomaterials*, 30: 3891-3914 (2009).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Experimental Cell Research*, 175: 184-191 (1988).

Sozer, N., Kokini, J.L., “Nanotechnology and its applications in the food sector”, *Trends in Biotechnology*, 27: 82-89 (2009).

Speit, G., Haupter, S., “On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted Chromosome, II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns”, *Human Genetics*, 70: 126-129 (1985).

Speit, G., Vasquez, M., Hartmann A., “The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity”, *Mutation Research*, 681: 3-12 (2009).

Stearns, R.C., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J., “Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells”, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24: 108-115 (2001).

Sumner, A.T. “Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II”, *Chromosoma*, 107: 486-490 (1998).

Suzuki, T., Fujii, M., Ayusawa, D., “Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts”, *Experimental Gerontology*, 37: 1005-1014 (2002).

Theogaraj, E., Riley, S., Hughes, L., Maier, M., Kirkland, D., “An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles”, *Mutation Research*, 634(1-2): 205-19 (2007).

Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kirkland, D., MacGregor, J.T., Marzin, D., Ohyama, W., Schuler, M., Suzuki, H., Zeiger, E., “Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing”, *Mutation Research*, 627(1): 41-58 (2007).

Thor, A.D., Liu, S., Moore II, D.H., Edgerton S.M., “Comparison of mitotic index, *in vitro* bromodeoxyuridine labeling and mib-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer”, *Journal of Clinical Oncology*, 17(2): 470-477 (1999).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., “Single cell gel/Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing”, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221 (2000).

Timoroğlu, İ., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., “Assessment of the genotoxic effects of organophosphorus insecticides phorate and trichlorfon in human lymphocytes”, *Environmental Toxicology*, DOI: 10.1002/tox.21783 (2012).

Topaktaş, M., Speit, G., “İnsan lenfositlerinde prometryn herbisiti ile SCE ve CA'nın indüklenmesi”, *Turkish Journal of Biology*, 14: 69-78 (1990).

Toumey, C., “Plenty of room, plenty of history”, *Nature Nanotechnology*, 4: 783-784 (2009).

Tran, D.T., Salmon, R., “Potential photocarcinogenic effects of nanoparticle sunscreens, Australas”, *The Journal of Dermatology*, 52: 1-6 (2011).

Trenz, K., Rothfuss, A., Schutz, P., Speit, G., “Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation”, *Mutation Research*, 500: 89-96 (2002).

Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiest, R.H., "Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice", *Cancer Research*, 69: 8784-9 (2009).

Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino M.c., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R., Carrano, A.V., "Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program", *Mutation Research*, 297: 101-180 (1993).

Vandebriel, R.J., De Jong, W.H., "A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles", *Nanotechnology, Science and Applications*, 2012(5): 61-71 (2012).

Van't Hof, J., "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems", *Experimental Cell Research*, 51 (1): 167-176 (1968).

Wang J.J., Sanderson, B.J.S., Wang, H., "Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells", *Mutation Research*, 628: 99-106 (2007).

Wang, B., Feng W., Wang, M., Wang, T., Gu, Y., Zhu, M., Ouyang, H., Shi, J., Zhang, F., Zhao, Y., Chai Z., Wang, H., Wang J., "Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice", *Journal of Nanoparticle Research*, 10: 263-276 (2008).

Wang, C., Ma, Q., Dou, W., Kanwal, S., Wang, G., Yuan, P., Su, X., "Synthesis of aqueous CdTe quantum dots embedded silicananoparticles and their applications as fluorescence probes", *Talanta*, 77: 1358-1364 (2009).

Wang, J.J., Sanderson, B.J., Wang, H., "Cyto- and geno-toxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells", *Mutation Research*, 628: 99-106 (2006).

Wang, L., Li, Y.F., Zhou, L., Liu, Y., Meng, L., Zhang, K., Wu, X., Zhang, L., Li, B., Chen, C., "Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: Their uptake, retention, and chemical forms", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 1105-1114 (2010).

Wang, L., Liu, Y., Li, W., Jiang, X., Ji, Y., Wu, X., Xu, L., Qiu, Y., Zhao, K., Wei, T., Li, Y., Zhao, Y., Chen, C., "Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy", *Nano Letters*, 11: 772-780 (2011).

Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L., Sayes, C.M., "Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management", *Toxicology Letters*, 171(3): 99-110 (2007).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., “Molecular mechanism of sister chromatid exchange”, *Mutation Research*, 616(1-2): 11-23 (2007).

Woodruff, R.S., Li, Y., Yan, J., Bishop, M., Jones, M.Y., Watanabe, F., Biris, A.S., Rice, P., Zhou, T., Chen, T., “Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay”, *Journal of Applied Toxicology*, DOI 10.1002/jat.2781 (2012).

Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., Nel, A.E., “Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm”, *Nano Letters*, 6: 1794-1807 (2006).

Xu, A., Chai, Y., Nohmi, T., Hei, T.K., “Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells”, *Partical and Fibre Toxicology*, 6: 3 (2009).

Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., Xi, Z., “Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition”, *Journal of Applied Toxicology*, 29(1): 69-78 (2009).

Yasuharu, N., Naoharu, I., “Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water soluble fullerenes using micronucleus test”, *Environmental Health and Preventive Medicine*, 11: 292-297 (2006).

Ye, Y., Liu, J., Chen, M., Sun, L., Lan, M., “In vitro toxicity of silicananoparticles in myocardial cells”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(2): 131-137 (2010).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., “Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*”, *Russian Journal of Genetics*, 44(3): 273-278 (2008).

Yin, H., Casey, P.S., McCall, M.J., Fenech, M., “Effects of surface chemistry on cytotoxicity genotoxicity, and the generation of reactive oxygen species induced by ZnO nanoparticles”, *Langmiur*, 26(19): 15399-408 (2010).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research*, 604 (1-2): 53-59 (2006).

Zeiger, E., “Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing”, *Mutation Research*, 627(1): 41-58 (2007).

Zeni, O., Palumbo, R., Bernini, R., Zeni, L., Sarti, M., Scarfi, M.R., “Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes”, *Sensors*, 8: 488-499 (2008).

Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., “The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate”, *Food and Chemical Toxicology*, 49: 763-769 (2011).

Zhang, A.P., Sun, Y.P., “Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells”, *World Journal of Gastroenterology*, 10: 3191-3193 (2004).

Zhang, H., Ji, Z., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., Pokhrel, S., Lin, S., Wang, X., Liao, Y.P., Wang, M., Li, L., Rallo, R., Damoiseaux, R., Telesca, D., Mädler, L., Cohen, Y., Zink, J.I., Nel, A.E., “Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation”, *ACS Nano*, 6(5):4349-68 (2012).

Zhao, X., Striolo, A., Cummings, P.T., “C60 binds to and deforms nucleotides”, *Biophysical Journal*, 89: 3856-3862 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DEMİRTAŞ KORKMAZ, Funda
 Uyuşu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 08.04.1985, Ordu
 Medeni hali : Evli
 e-mail : fundademir@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Batıkent Mobil Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-...	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

A) Özeti Basılmış Uluslar Arası Kongre Tebliğleri

- 1) Demirtaş, F., Taner, G., Ünal, F., Suludere, Z., Erol, Ö., Ünal, H.İ., Yüzbaşıoğlu, D., "Titanium dioxide genotoxicity in human lymphocytes assessed by the alkaline comet assay" İzmir, 2010.

- 2) Demirtaş, F., Ünal, F., Erol, Ö., Ünal, H.İ., Suludere, Z., Yüzbaşıoğlu, D. “Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles in human lymphocytes assessed by comet assay”, Oslo, Norveç, 2010.
- 3) Demirtaş, F., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., “Sister chromatid exchanges induced by titanium dioxide nanoparticles in human peripheral lymphocytes” 7th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 2011.
- 4) Demirtaş, F., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. “Chromosomal Abnormalities Induced By Nanosized Titanium Dioxide Nanoparticles *In Vitro*” Nanosafety Congress, Kemer, Antalya. 2012.
- 5) Demirtaş, F., Ünal, F., Gunes, G., Yüzbaşıoğlu, D., “Effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on the frequency of micronuclei in human lymphocytes *in vitro*” Nanosafety Congress, Kemer, Antalya, 2012.
- 6) Saygılı, Y., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Demirtaş, F., "In vitro genotoxic effects of silicon dioxide nanoparticles in human lymphocytes" Nanosafety Congress, Kemer, Antalya, 2012.
- 7) Demirtaş F., Ünal F. and Yüzbaşıoğlu D. “Evaluating the genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles using micronucleus test in human lymphocytes *in vitro*” 8th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Ankara, 2012.