

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

**ZnO NANOMATERYALİNİN İNSAN
LENFOSİTLERİNDE İN VİTRO GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu GÜMÜŞ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY

Eylül 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

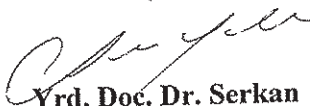
ZnO NANOMATERYALİNİN İNSAN
LENFOSİTLERİNDE İN VİTRO GENOTOKSİK
ETKİLERİ

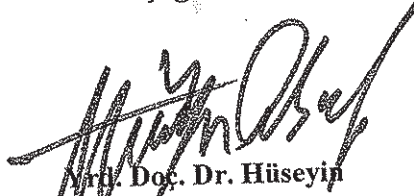
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Duygu GÜMÜŞ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 06 / 09 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Serkan
YILMAZ
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Hüseyin
AKSOY
Üye


Yrd. Doç. Dr. Nazan Deniz
KOÇ
Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kocaeli Büyükşehir Belediyesi İşçi ve Halk Sağlığı Polikliniğı Merkez Laboratuvarı çalışanlarına, özellikle Fikret DEMİRKOL ve Serkan TUNÇ başta olmak üzere hepsine teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca bana destek olan aileme, özellikle ablam Eylem GÜMÜŞ'e ve çalışmalarım boyunca emeğı geçen tüm arkadaşlarıma binlerce kez teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen SAÜ Araştırma Fonuna da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nanoteknoloji.....	4
2.2. Mutajenite Testleri.....	8
2.2.1. Kromozom anormallikleri (KA) metodu.....	9
2.2.2. Mikronukleus (MN) metodu.....	10
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Lamların temizlenmesi.....	11
3.2. Metot.....	12
3.2.1. Kromozom anormalliklerini (KA) belirlemek amacıyla insan lenfosit kültüründeki çalışmalar.....	12

3.2.2. Mikronukleus sayısını (MN) belirlemek amacıyla insan lenfosit kültüründeki çalışmalar.....	13
3.2.3. Mitotik indeks (MI) ve kromozom anormalliklerinin saptanması.....	14
3.2.4. Nükleer bölünme indeksi (NBI) ve mikronukleus frekansının saptanması.....	14
3.2.5. İstatistiksel bulgular.....	15
BÖLÜM 4.	
BULGULAR.....	16
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGELER LİSTESİ

Cyt-B	: Cytochalin-B
CaO	: Kalsiyum oksit
CdO	: Kadmiyum oksit
CeO ₂	: Seryumdioksit
Cu ₂ O	: Bakır I oksit
DNA	: Deoksiribonükleikasit
Ga ₂ O ₃	: Galyum III oksit
HNO ₃	: Nitrik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KCl	: Potasyum klorür
MgO	: Magnezyum oksit
MMC	: Mitomisin C
mL	: Mililitre
N	: Normalite
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

KISALTMALAR LİSTESİ

AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
CRN	: Nanoteknoloji'den sorumlu merkez
EPA	: Çevre koruma örgütü
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
GSH	: Gulutasyon
HIV	: İnsan bağışıklığı yetmezliği virüsü
KA	: Kromozomal aberasyon
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehit
MI	: Mitotik indeks
MN	: Mikronukleus
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STM	: Taramalı tünelleme mikroskobu
TMAOH	: Tetrametilamonyumhidroksit
UV	: Ultraviöle (morötesi)
UVA	: 320-400 nm dalga boyuna sahip UV ışınları

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	ZnO uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan..... kromozom anormallikler ve frekansları.....	17
Tablo 4.2.	ZnO uygulamasının insan periferal lenfositlerinde..... mikronukleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Nanometre boyutunu anlatan örnekler.....	5
Şekil 2.2.	Grafit tabakası ve bundan oluşmuş fulleren yapısı.....	6
Şekil 2.3.	Çok duvarlı ve tek duvarlı karbon nanotüp.....	6
Şekil 2.4.	ZnO'in kristal yapısı	7
Şekil 4.1.	İnsan periferel lenfositlerinde ZnO uygulaması sonucu oluşan... kromozom anormallikleri.....	18
Şekil 4.2.	ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerde..... anormal hücre yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	20
Şekil 4.3.	ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde... anormal hücre yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	20
Şekil 4.4.	ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde doza bağlı KA/Hücre değişimi.....	21
Şekil 4.5.	ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde.. doza bağlı KA/Hücre değişimi	21
Şekil 4.6.	ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde.. mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	22
Şekil 4.7.	ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde... mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	22
Şekil 4.8.	ZnO uygulamasıyla insan periferel lenfositlerinde oluşan..... mikronukleuslu binükleat hücreler.....	24
Şekil 4.9.	ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mikronukleus frekansı yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	25

ÖZET

Anahtar kelimeler: ZnO, Nanomateryal, Kromozomal anormallik, Mikronukleus, Lenfosit

Bu çalışmada, kromozomal anormallikleri ve mikronukleus testleri kullanılarak, *in vitro* insan periferik lenfositleri üzerine ZnO nanopartiküllerinin muhtemel genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla hücreler, ZnO'in 1, 2, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL'lik konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmişlerdir. Araştırma sonucunda, kromatid ve kromozom kırığı, fragment ve disentrik kromozomlar olarak dört tip yapısal kromozomal anormallik gözlenmiştir. 24 saatlik ZnO uygulamasında hem anormal hücre yüzdesi bakımından, hem de hücre başına düşen kromozomal anormallikler bakımından, 1, 5, 10 ve 20 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamada, anormal hücre yüzdesi bakımından sadece 10 µg/mL'lik dozda kontrole göre anlamlı artışa neden olurken, hücre başına düşen kromozomal anormallik açısından 5 ve 10 µg/mL'lik dozlarda anlamlı artışlara neden olmuştur. Diğer yandan, ZnO nanopartikülü 24 saatlik uygulamaların hepsinde mitotik indeksi, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır, ancak 48 saatlik uygulamada herhangi bir etki göstermemiştir. Mikronukleus frekansında, sadece 10 ve 15 µg/mL'lik dozlarda anlamlı artışlar gözlenmiştir. ZnO uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır.

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF ZnO NANOMATERIALS IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

SUMMARY

Key Words: ZnO, Nanomaterials, Chromosome aberration, Micronucleus, Lymphocytes

In this study, possible genotoxic effects of ZnO nanoparticles on *in vitro* human peripheral lymphocytes were investigated by using chromosome aberrations (CA) and micronucleus assays (MN). For this purpose, the cells were treated with 1, 2, 5, 10, 15 and 20 µg/mL concentrations of ZnO for 24 and 48 hours. In result of research, four types of chromosome aberrations were observed as chromatid and chromosome break, fragment and dicentric chromosome. In ZnO treatments for 24 hour were observed statistically significant increases at 1, 5, 10 and 20 µg/mL doses both in abnormal cell percentage and chromosome aberration per cell compared with control. In 48 hour treatments, while ZnO nanomaterials induced significant increase only 10 µg/mL dose for abnormal cell percentage, 5 and 10 µg/mL doses for chromosome aberration per cell compared with control. On the other hands, it was observed that ZnO nonmaterial statistically significant decreased the mitotic index in all the 24 hour treatments but no effected in 48 hour. In micronucleus frequency, it was observed significantly increase only in 10 and 15 µg/ml doses compare with control. Cytokinesis-block proliferation index was not effected by ZnO treatment.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Son yıllarda, bilimsel çalışmalar sonucunda ortaya çıkan gelişmelerin en ilgi uyandıran kısmı nanoteknolojidir. Moleküler üretim olarak adlandırılan nanoteknoloji, maddeyi nanometre seviyesinde işleyerek ve bu boyutlarda maddenin kazandığı değişik fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri de kullanarak çalışan cihazlar ve sistemler elde etmeyi amaçlamaktadır (Konuk ve Oktay, 2007).

Nanoteknoloji, malzemelerin nanometre boyutlarında işlenerek pek çok farklı özellik kazanmalarını sağlamıştır. Bu özellikler, malzemelerden yeni nano ürünler üretimine izin vermiştir. Bu şekilde nanomalzemeler çok çeşitli alanlarda hızla yaşamımıza girmiştir. Günümüzde elektronik, bilişim, savunma sanayi, uzay ve uçak teknolojileri, filtreler, kompozitler, biyomedikal uygulamalar gibi pek çok alanda nanomalzemeler kullanılmaktadır (Doğan ve Başal, 2009).

Nanoteknoloji alanında önümüzdeki yıllarda beklenen gelişmelerin büyük kısmı tıp alanında gerçekleşecektir (Gök, 2007). Özellikle biyomedikal alanındaki nanoteknoloji uygulamaları bir çok hastalığa karşı yeni imkanlar sunmaktadır. Bir sonraki potansiyel gelişim alanı kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklarla ilgili moleküllerin ve patolojik bakteriler, mantarlar, HIV gibi enfektif mikroorganizmaların saptanmasıdır (Logothetidis, 2006). Sadece hastalığın bulunduğu ve/veya yayıldığı bölgelere saldırarak ilaç veren makinalar, insan vücudu içinde hareket edilmesine olanak sağlayan teşhis araçları, nanoteknolojinin tıp ve sağlık sektörü üzerindeki potansiyel uygulama örneklerinden bazılarıdır (Özdoğan ve ark., 2006). Nanoteknolojilerin uygulamasında bir diğer önemli alan ise ortopedik implantlar ve doku mühendisliği ürünlerindeki biyogereçlerdir (Logothetidis, 2006).

Nanoteknolojinin uygulama alanlarından biri de kozmetiktir. Bugün 20'den fazla ülke 600'den fazla türde nano ürün içeren kozmetik ürünleri kullanmaktadır. Güneş kremleri, nano parçacıkların en sık kullanıldığı kozmetik malzemelerin başında gelmektedir. Genellikle güneş koruyucu kremlerin içerisinde en çok ZnO (çinko oksit) ve TiO₂ (tityum dioksit) nano parçacıkları kullanılmaktadır. Özellikle bu partiküllerde nano boyuta inildiğinde görünür ışık daha iyi tutulmaktadır (Sharma ve ark., 2009).

Nano ürünlerin birçok alanda kullanımının yanında, insan sağlığı ya da çevreye olabilecek zararlı etkileri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Her ne kadar nanoteknolojik ürünler pazarda yerini alsada toksik yan etkileri hakkında bilgi ve literatür sınırlıdır (Logothetidis, 2006). İnsanlarda bu parçacıkların akciğer, bağırsak ve hatta deri yolu ile kolaylıkla kana karışabildiği bilinmektedir (Hoet ve ark., 2004). Çinko oksit nano partiküllerinin toksik etkisinin ortaya konulduğu çalışmalar hızla artmakta olmasına rağmen hala bu partiküllere ait veriler yetersizdir (Sharma ve ark., 2009).

Sharma ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada, insan epidermal hücrelerinde ZnO nano partiküllerinin DNA hasar potansiyelini araştırarak, insan epidermal hücrelerine uygulanan ZnO nanopartiküllerinin konsantrasyonunun artmasıyla DNA'da belirgin bir zarar gözlemlenmiştir. Brayner ve arkadaşları (2006), bakteriler üzerine yaptıkları bir çalışmada, ZnO nano partiküllerinin toksik etkisini bildirmişlerdir. Gojova ve arkadaşları (2007), ZnO nano partiküllerinin insan endotel hücreleri üzerine yapmış oldukları çalışmalarda, ZnO nano partiküllerinin klastojenik etkisinin varlığını ortaya koymuşlardır. Jeng ve Swanson (2006), farelerin nöroblastom hücreleri üzerinde ZnO nanopartiküllerini yapmış oldukları çalışmada, ZnO nano partiküllerine maruz bırakılan fare nöroblastom hücre hattının anormal morfolojide olduğu ve hücresel büzülmenin gerçekleştiğini görmüşlerdir.

Nanoteknoloji uygulamalarının mevcut sağlık problemleri karşısında etkili olup olmayacağı konusunda çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Bu tür çalışmaların yanında canlılar üzerinde olumsuz etkilerinin olup olmayacağını ortaya çıkarmak da

en az yapılan diğer araştırmalar kadar önemlidir. Bu araştırmada; ZnO nanopartiküllerinin insan lenfosit hücrelerinde *in vitro* genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

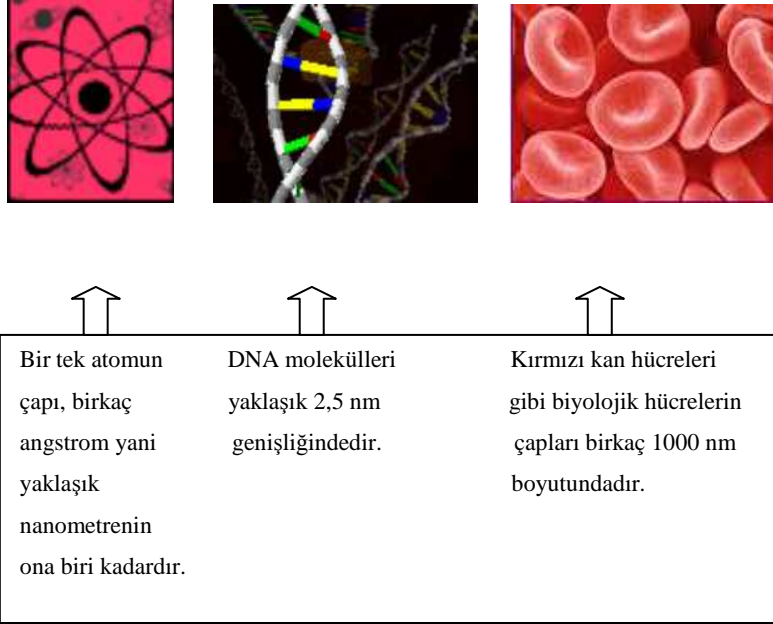
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

Yirmibirinci yüzyıla girilmesiyle birlikte stratejik bir önem kazanmış olan nanoteknoloji, birçok alanda kullanılarak yaşamımıza girmeye başlamıştır. Gıda, tekstil, ilaç, kozmetik, biyoloji, biyoteknoloji, kimya, malzeme, bilişim, otomobil ve metal endüstrileri gibi birçok alanda her geçen yıl yaygınlaşmakta ve artık insan hayatının vazgeçilmezi olmaktadır.

Nano terimi Yunanca'da "cüce" anlamına gelmektedir (Durucan, 2006). Nanoteknoloji ismi, köken olarak ölçü birimi olan 'nanometre' den gelmektedir. Nanometre (nm) ölçü olarak metrenin milyarda birini ifade etmekte ve bir nanometre düzlemine 2-3 tane atomun dizilebileceği kadar küçüktür (Çıracı, 2005). Nanoteknoloji, maddenin atom seviyesinde bilinçli olarak işlenmesi ile daha gelişmiş ve değişmiş materyaller, araçlar sistemlerin elde edilmesi için kullanılan bir terimdir. Bu teknoloji, boyutları 1-100 nm arasında değişen materyal veya sistemler üzerinde yapılan araştırmaları kapsamaktadır (Durucan, 2006). Maddenin boyutu nanometre mertebesine kadar küçüldükçe mekanik, elektrik, ısı, optik ve kimyasal özellikleri ve çevresi ile ilişkileri çok değişmekte, önceden öngörülmeven büyük hacimli aynı maddeden çok daha farklı özellik ve davranış gösterebilmektedir. Bazı hallerde bu yeni özellik, büyük boyuttaki maddeden çok üstün niteliğe sahip malzemelerin ve sistemler geliştirmesine imkan vermektedir (Doğan, 2006). Bahsedilen boyut gerçekte maddenin temel yapı taşları ve moleküllerin sahip olduğu büyüklüğü temsil etmektedir. Örnek vermek gerekirse bir nanometre insan saç telinin 1/80000'ini oluşturmaktadır. Ayrıca biyolojik bilgiyi taşıyan ve çeşitli görevleri olan protein, DNA gibi biyolojik yapılar da fiziksel boyut açısından nanoteknolojinin içinde yer

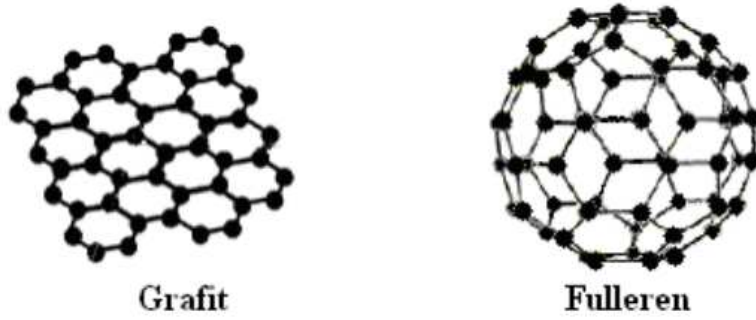
almaktadır (Durucan, 2006). Nanometre boyutunu gösteren bazı örnekler Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nanometre boyutunu anlatan örnekler (Bozkaya, 2006)

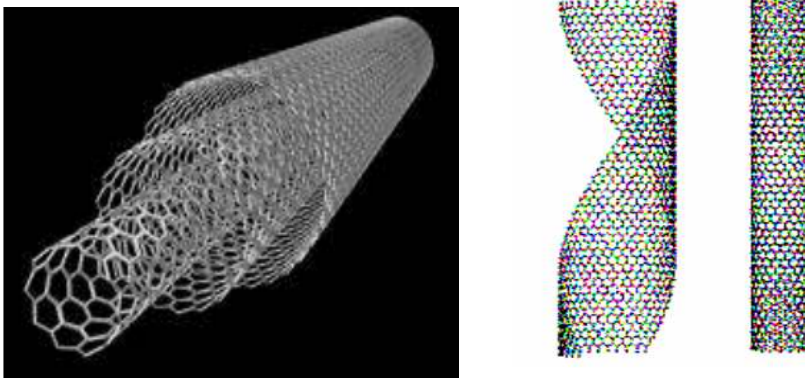
Nano yapıların olağanüstü özellikleri çok önceden tahmin edilmekteydi. Fizikçi Richard Feynman, 1960’lı yıllarda bilim adamlarının dikkatini nanometre boyutlarına çekmeye çalışmıştır (Konuk ve Oktay, 2007). Feynman’ın ardından gelen en büyük gelişme, 1981’de Binning ve Rohrer tarafından icat edilen Taramalı Tünelleme Mikroskobu (Scanning Tunneling Microscopy, STM) ile nano yapıların gözlenebilmesi, atomik boyutta ilk görüntülerin alınmasıdır. Araştırmacılar bu buluşları ile 1986 yılında Nobel Fizik ödülünü almışlardır (Binnig ve ark., 1986). Ancak STM sadece iletken numunelere ait ölçümlere imkan sağladığından, iletken olmayan numunelerden de görüntü alma ihtiyacı duyulması ile Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope, AFM) geliştirilmiştir. İlk AFM Binning ve arkadaşları tarafından 1986 yılında geliştirilirken, ilk ticari AFM 1989 yılında Digital Instruments firması tarafından üretilmiştir (Butt ve ark., 2005). Nano boyutta görüntü alabilmenin ardından, atomik boyutta birbiri ardınca yeni keşifler yapılmıştır (Benli, 2008).

Nano yapılar ilk kez, 1985’de Richard E. Smalley ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda “fulleren” adını verdikleri yapının keşfiyle ortaya çıkmıştır. “Fulleren” diğer bir ismiyle karbon nanotoplar, 60 ya da daha fazla karbon atomunun yüzeysel bir örgü oluşturacak şekilde birbirine hegzagonal bağlanmasıyla oluşturduğu grafit plakasının kıvrılarak futbol topuna benzer yapı meydana getirmesiyle elde edilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Grafit tabakası (Mceuen ve ark, 2002) ve bundan oluşmuş fulleren yapısı (Smalley, 2001)

Değişik elektronik ve optik özelliğe sahip olduğu fark edilen karbon nanotoplar üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmış ve daha sonraları 1991’de Iijima’nın arkadaşlarının, buharlaştırma yöntemiyle “fulleren” elde etme çalışmaları sırasında tesadüfen karbon nanotüpler elde edilmiştir. Karbon nanotüpler, grafit plakasının silindirik şekilde kıvrılarak içi boş tüp görünümünü aldığı halidir. Nanotüplerin uçları açık ya da kapalı, duvarları ise tek ya da iç içe geçmiş silindirler halinde çok katmanlı olabilmektedir (Şekil 2.3) (Lee ve ark., 2003; Topçuoğlu , 2001).

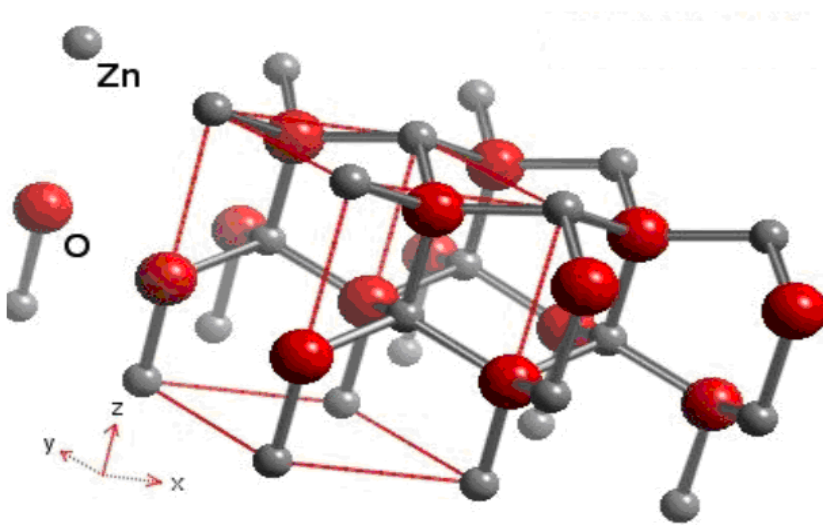


Şekil 2.3. Çok duvarlı ve tek duvarlı karbon nanotüp (Konuk, 2007)

Art arda tekrar eden altıgen şekillerden oluşmuş grafit plakasının kıvrılmasıyla oluşan nanotüplerin uç kısımlarına bu altıgenlerin köşesi ya da kenarının gelmesine göre nanotüpler zikzak ya da koltuk tipi gibi isimler alır (Lee ve ark., 2003; Topçuoğlu , 2001).

Karbon nanotüplerde tüp boyunca değişen çap ve kiriş açısına göre değişik elektriksel özelliklerin gözlenmesi, araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu konuda yapılan çalışmaları hızlandırmıştır. Yapılan çalışmalar C (Karbon) atomundan başka diğer elementler ve bunların oksit bileşikleri üzerine genişletilmiştir. Bunlar arasında SiO_2 (silisyum dioksit), ZnO (çinko oksit), MgO (magnezyum oksit), CaO (kalsiyum oksit), CdO (kadmiyum oksit), Cu_2O (bakır I oksit), Ga_2O_3 (galyum III oksit), TiO_2 (titanyum dioksit), vs. sayılabilir (Wu ve ark., 2003; Smalley, 2001). Bu çalışmada test maddesi olarak ZnO nanopartikülü kullanılmıştır.

Çinko oksit (ZnO) hegzagonal (Şekil 2.4) (Wurtzit) yapılı, üstün özellikleri olan saydam ve yarı iletken bir malzemedir (Hartnagel, 1995; Dulda, 2006). Yüksek saydamlık, iyi ışık yakalama karakteristiğine sahip sayılı materyallerdendir (Minami, 1985) .



Şekil 2.4. ZnO 'in kristal yapısı (Bilgen, 2008)

ZnO nanopartiküller günlük hayatımızda ilaçlar ve kozmetikler gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Zheng ve Li, 2009). Güneş kremleri, nanopartiküllerin en sık kullanıldığı kozmetik malzemelerin başında gelmektedir. Genellikle güneş koruyucu kremlerin içerisinde en çok ZnO ve TiO₂ nanopartikülleri kullanılmaktadır. Özellikle bu partiküllerde nanoboyuttan dolayı görünür ışık daha iyi tutulmaktadır (Sharma ve ark., 2009). Mikrofine ZnO gitgide daha popüler olmaktadır, çünkü geniş bir UVA (320-400 nm) aralığında koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Fotostabildir ve diğer organik güneş koruyucularla reaksiyona girmez (Mitchnick ve ark., 1999).

Amerika Birleşik Devletleri'nde güneş koruyucu ajanlar reçetesiz ürünler şeklinde Amerikan Gıda ve İlaçlar Dairesi (FDA) tarafından düzenlenir. FDA'nın son güneş koruyucu monografında 16 ajan bulunmaktadır. Bunların ikisi dışında tümü organik UV emici filtredir. Yalnızca TiO₂ ve ZnO inorganik UV emici filtredir (Kullavanijaya ve Lim, 2005). Avrupa yönetmeliği son olarak 26 güneş filtresi içinde TiO₂ tek mineral filtre olduğunu açıklamıştır. Konsantrasyon seviyesinde herhangi bir sınırlama olmadığı için ZnO Avrupa'da da onaylanmıştır. Ticari ürünlerin büyük çoğunluğu bu filtrelerden birini içermektedir (Couteau ve ark., 2008).

2.2. Mutajenite Testleri

Son yıllarda çağımızın en önemli sorunlarından biri, tüm canlıları, özellikle insanları olumsuz yönde etkileyen çevresel tehlikelerin giderek artmasıdır. Yediğimiz, içtiğimiz, kullandığımız ve çevremizde maruz kaldığımız bir çok madde insan sağlığını tehdit etmektedir. Bundan dolayı, canlılar üzerinde bu maddelerin herhangi bir anormalliğe yol açıp açmadığının anlaşılabilmesi için çeşitli test metotları geliştirilmiştir. Kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri olarak bilinen bu metotlar bir kimyasal ya da etken maddenin potansiyel olarak mutajen ya da kanserojen olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Aksoy, 2006). Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen bu metodlar; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994) ve mikronükleus (MN) (Heddle ve

ark., 1991; Fenech, 2002) testleridir. Bu testlerden KA ve KKD ilk defa Perry ve Evans'ın 1975'deki uygulamaları ile başlamıştır. Bu iki yöntemin oldukça duyarlı bir test olduğunun anlaşılmasından sonra bir çok araştırmacı bu yöntemleri kullanarak çeşitli ajanların genetik etkilerini incelemeye başlamıştır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995).

2.2.1. Kromozom anormallikleri (KA) metodu

Bu yöntemle kültüre alınmış periferik lenfositlerdeki kromozom anormallikleri incelenmektedir. Oldukça yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. Yapısal değişimler, kromozomal anormallik tekniği kullanılarak, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir (Çakmak, 2000). Kromozom anormalliklerinin oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve ark., 2000; Bonassi ve ark., 2000; Bonassi ve ark., 2004; Bonassi ve ark., 2005). İnsan popülasyonları üzerine yapılan çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı (pozitif korelasyon) olduğunu ortaya koymaktadır (Natarajan, 2002; Bolognani, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Yılmaz ve ark., 2008). Bu yöntemle incelenebilen yapısal aberasyonlar; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister union), translokasyon, izokromozom ve endoreduplikasyondur (Hagmar ve ark., 1994; Bonassi ve ark., 1995).

Kromatid kırıkları, bir kromozoma ait iki kromatitten bir tanesinin kırık olması durumudur. Kromozom kırıkları ise her iki kromatitte birden kırıkların olmasıdır. İki kromozomun uçlarındaki kırılma ve sonra bu iki kromozomun kırılan uçlarının birleşmesiyle de disentrik kromozomlar oluşmaktadır. Bir kromozomun her iki kromatidinin uçlarındaki kırılma sonrasında, bu kromatidlerin birleşmesi ile de kardeş kromatidlerde birleşme denilen kromozomal anormallikler oluşmaktadır.

Fragmentler ise kromozomlardan kopan parçaların kromozomdan ayrı bir yerde bulunması durumudur (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995).

2.2.2. Mikronukleus (MN) metodu

Mikronukleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom, sentrik veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (Zijno ve ark., 1994; Vanparys ve ark., 1990). Fenech ve arkadaşları (1985), tarafından geliştirilen bloklanmış MN metodu, klasik MN testlerinde karşılaşılan bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metod, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cytochalasin B ilavesiyle, ilk nukleus bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş binukleuslu hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (Fenech ve ark., 1985). MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıklarını oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunurlar (Zijno ve ark., 1994; Vanparys ve ark., 1990). Klastojenik etki sonucu oluşan ve asentrik kromozom fragmentleri içeren MN'ların, aneujenik etki sonucu oluşan tam bir kromozom içeren MN'lardan daha küçük olduğu kabul edilmektedir (Sato ve Tomita, 2001).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen 20 ve 30 yaş aralığında olan bir bayan ve bir erkekten alınan periferik kan, test maddesi olarak Kırıkkale Üniversitesi Kimya Bölümü'nde üretilen ve partükül çapı 45 nm, parça büyüklüğü 450 nm olan ZnO nanopartikülü kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer maddeler:

- Chromosome Medium B (Katalog No: F 5023)
- Mitomisin-C (Katalog No: M 0503)
- Kolkisin (Katalog No: C-64-86-8)
- KCl (Katalog No: 7447-40-7)
- Giemsa (Katalog No: 109-204)
- Cytocalcin B (Katalog No: 14930-96-2)
- Heparin (Katalog No: 63231-57-2)
- HNO₃ (Katalog No: 443)

3.1.1. Lamların temizlenmesi

Lamlar şaleye dizilerek 1 N nitrik asit (HNO₃) ile doldurulmuş ve ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda yıkayıp birkaç kez saf sudan geçirildikten sonra şale % 70'lik alkol ile doldurularak kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kromozom anormalliklerini (KA) belirlemek amacıyla insan lenfosit hücre kültüründeki çalışmalar

Sağlıklı, sigara içmeyen 20-30 yaş aralığında olan 1 bayan ve 1 erkek bireyden alınan, 1/10 oranında heparinize edilmiş kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilerek lenfosit kültürleri hazırlanmıştır. Daha sonra kültür tüpleri etüve kaldırılarak 37 °C'de 72 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. ZnO nanopartikülünün etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala ZnO'in daha önceden belirlenmiş olan 1, 2, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL'lik dozları kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC (20 µg/mL) kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe 0,06 µg/mL olacak şekilde kolkisin ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan hücreleri bulduran 0,5-0,7 mL'lik kısım vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Sonra bu tüplere 37°C'de bekletilen 0,075 M KCl hipotonik solüsyonundan, vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere önceden buzdolabında soğutulan metanol: asetik asitten (3:1) oluşan soğuk fiksatif, vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiş ve buzdolabında 45 dakika bekletilmiştir. Bu tüpler 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Fiksatifle yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Böylece tüpte kalan sıvının tamamen berraklaşması sağlanmıştır.

Son fiksatif işleminin sonunda tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti, pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, daha önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde -20 °C'de bekletilen nemli lamlar üzerine 40-50 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak

hücrelerin patlatılması ve kromozomların yayılmaları sağlanmıştır. Hazırlanan bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan preparatlar kuruduktan sonra direkt olarak Sorenson tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa boyama tekniği ile 15-20 dakika boyanmıştır. Giemسادan çıkarılan preparatlar üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek, boyanın fazlasının akması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

3.2.2. Mikronukleus (MN) sayısını belirlemek amacıyla insan lenfosit hücre kültüründeki çalışmalar

Sağlıklı, sigara içmeyen 20-30 yaş aralığında olan 1 bayan ve 1 erkek bireyden alınan, 1/10 oranında heparinize edilmiş kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi ortamına (Chromosome Medium B) ortamına ekilerek lenfosit kültürleri hazırlanmıştır. Daha sonra kültür tüpleri etüve kaldırılarak 37 °C 'de 72 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra ZnO'in daha önceden belirlenmiş olan 1, 2, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL'lik dozları kültür tüplerine ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak MMC ekimi yapılmıştır (20 µg/mL). Kültür süresinin 44. saatinde Cytochalasin-B uygulaması (5,2 µg/mL) yapılmıştır.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan hücreleri bulunduran 0,5-0,7 mL'lik kısım vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Sonra bu tüplere 37 °C'de bekletilen 0,075 M KCl hipotonik solüsyonundan, vorteks üzerinde damla damla (5mL) ilave edilmiştir. Tüpler 5 dakika boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere önceden buzdolabında soğutulan metanol: asetik (3:1) asitten oluşan soğuk fiksatif, vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Bu tüpler 1000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant kısımları atılmıştır. Bu işlem iki kez daha yapılip her işlemde sonra tüpler 5 dakika buzdolabında (+4 °C) bekletilmiştir. Üçüncü fiksatife % 1'lik

olacak şekilde formaldehit eklenmiştir. Son fiksatif işleminin sonunda 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısımları atılıp tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, daha önceden 1 N HNO₃'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde -20 °C'de bekletilen nemli lamlar üzerine 10-15 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak hücrelerin patlatılması ve yayılmaları sağlanmıştır. Hazırlanan bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan preparatlar kuruduktan sonra direkt olarak Sorenson tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa boyama tekniği ile 13-14 dakika boyanmıştır. Giemسادan çıkarılan preparatlar üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek, boyanın fazlasının akması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

3.2.3. Mitotik indeks (MI) ve kromozom anormalliklerinin saptanması

Mitotik indeksin saptanmasında, dişi ve erkek bireye ait preparatlarda her doz için 3000 (toplam 6000) hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücreye oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks belirlenmiştir. Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, her bir kişi için hazırlanan preparatlardan her doz için kromozomları iyi dağılmış olan 100'er hücre (toplam 200 hücre) incelenmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı (KA/ Hücre) saptanmıştır.

3.2.4. Nükleer bölünme indeksi (NBI) ve mikronukleus frekansının saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla erkek ve dişi bireye ait preparatlarda her bir doz için toplam 2000 binükleat hücre incelenerek mikronukleuslu hücreler ve mikronukleus taşıyan hücrelerdeki mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam 2000 hücre içinde mikronukleuslu hücre oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Nükleer bölünme indeksinin saptanmasında, herbir bireyde her bir doz için 500 hücre

sayılmış ve $(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times (N_3 + N_4)) / n$ (n, incelenen toplam hücre sayısı) formülünden yararlanılarak 1, 2, 3, 4 çekirdekli hücrelerin sayısına göre nükleer bölünme indeksi belirlenmiştir

3.2.5. İstatistiksel bulgular

Yapılan çalışmada, mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi ve mikronukleus frekansının istatistiksel değerlendirilmesinde z-testi, kromozom anormalliklerinin istatistiksel değerlendirilmesinde ise t-testi kullanılmıştır

BÖLÜM 4. BULGULAR

Bu çalışma sonucunda, insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* ZnO uygulaması ile dört tip yapısal anormalliğin oluştuğu saptanmıştır. Oluşan bu yapısal anormallikler kromatid kırığı, kromozom kırığı , fragment ve disentrik kromozomlardır. Bu anormalliklerden en sık rastlanılan kromatid kırığı ve kromozom kırığıdır (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Yapılan analizlerde anormal hücre yüzdesi bakımından 24 saatlik uygulamada 1, 5, 10 ve 20 µg/mL’lik dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise sadece 10 µg/mL’lik dozda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artışı gözlenmiştir. Hücre başına düşen kromozom anormalliği bakımından, 24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi ile aynı dozlarda kontrole göre anlamlı artışlar gözlenirken, 48 saatlik uygulamada 5 ve 10 µg/mL’lik dozlarda anlamlı artışlar gözlenmiştir (Tablo 4.1). 24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi bakımından doza bağlı olarak çok az bir artış söz konusu iken ($r=0,43$) (Şekil 4.2), 48 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi bakımından doza bağlı herhangi bir artış ve azalış söz konusu değildir ($r= -0,08$) (Şekil 4.3). Hücre başına düşen anormallikte hem 24 saatlik, hem de 48 saatlik uygulamada doza bağlı olarak herhangi bir artış yada azalış söz konusu değildir ($r=0,40$, $r=0,07$) (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Mitotik indekste 24 saatlik uygulamada bütün uygulama gruplarında kontrole göre anlamlı azalışlar görülürken, doza bağlı zayıf bir azalma görülmektedir ($r=-0,45$) (Tablo 4.1, Şekil 4.6). 48 saatlik uygulamada ise kontrole göre herhangi bir farklılık gözlenmediği gibi doza bağlı olarak da herhangi bir değişme gözlenmemiştir ($r=0,11$) (Tablo 4.1, Şekil 4.7).

Tablo 4.1. ZnO uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

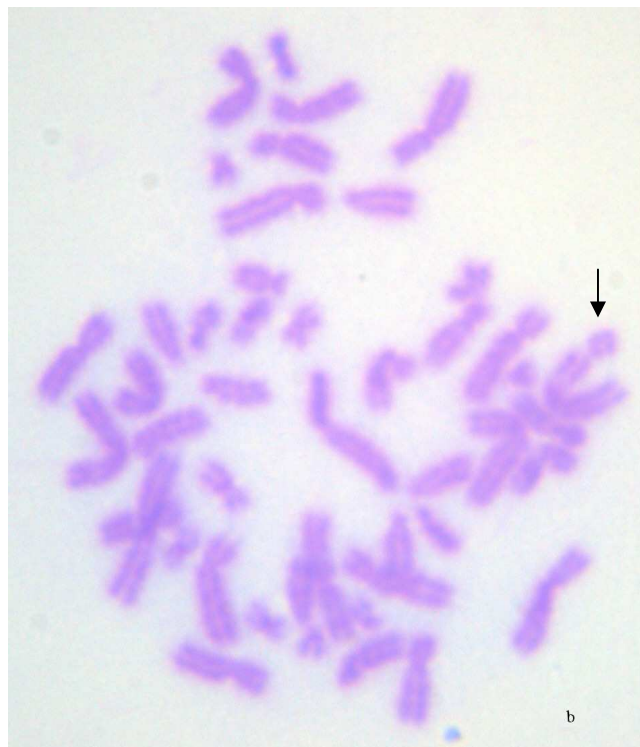
Test Maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal Hücre \pm SH (%)	KA/Hücre \pm SH	Mitotik İndeks (%)
	Süre (Saat)	Doz (μ g/mL)	Ktk	Kzk	F	Ds	Kkb	Ktd			
Kontrol	24	0	2	2	2	-	-	-	2,50 \pm 1,10	0,030 \pm 0,012	5,83 \pm 0,30
Poz Kont		0,20	22	12	7	3	10	8	24,50 \pm 1,69	0,310 \pm 0,032	3,43 \pm 0,35
ZnO		1	10	3	4	-	-	-	8,50 \pm 1,97**	0,085 \pm 0,020*	3,03 \pm 0,22***
		2	6	2	5	-	-	-	6,00 \pm 1,68	0,065 \pm 0,017	3,75 \pm 0,25***
		5	7	4	4	-	-	-	7,50 \pm 1,86*	0,075 \pm 0,019*	3,68 \pm 0,24***
		10	11	5	1	-	-	-	7,50 \pm 1,86*	0,085 \pm 0,020*	3,11 \pm 0,22***
		15	5	5	1	-	-	-	5,50 \pm 1,61	0,055 \pm 0,016	4,15 \pm 0,26***
		20	13	2	3	-	-	-	9,00 \pm 2,02**	0,090 \pm 0,020*	2,76 \pm 0,21***
Kontrol	48	0	2	3	2	-	-	-	3,50 \pm 1,30	0,035 \pm 0,013	5,55 \pm 0,30
Poz Kont		0,20	30	14	10	5	13	10	32,50 \pm 2,26	0,410 \pm 0,034	4,15 \pm 0,45
ZnO		1	5	5	4	-	-	-	7,00 \pm 1,80	0,070 \pm 0,018	6,15 \pm 0,31
		2	6	4	3	1	-	-	6,50 \pm 1,74	0,070 \pm 0,018	5,92 \pm 0,31
		5	9	4	3	1	-	-	8,00 \pm 1,92	0,085 \pm 0,020*	5,81 \pm 0,30
		10	15	8	2	-	-	-	11,50 \pm 2,26**	0,125 \pm 0,023**	6,38 \pm 0,32
		15	4	1	3	-	-	-	4,00 \pm 1,39	0,040 \pm 0,014	6,03 \pm 0,31
		20	3	5	2	-	-	-	5,00 \pm 1,54	0,050 \pm 0,015	5,75 \pm 0,30

Anormal hücre %'si ve KA/Hücre değerlendirilmesinde her uygulama grubunda 200 metafaz hücre kromozomu incelenmiştir. Mitotik indeks için her uygulama grubundan 6000 hücre sayılmıştır. Ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, kkd: kardeş kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, f: fragment

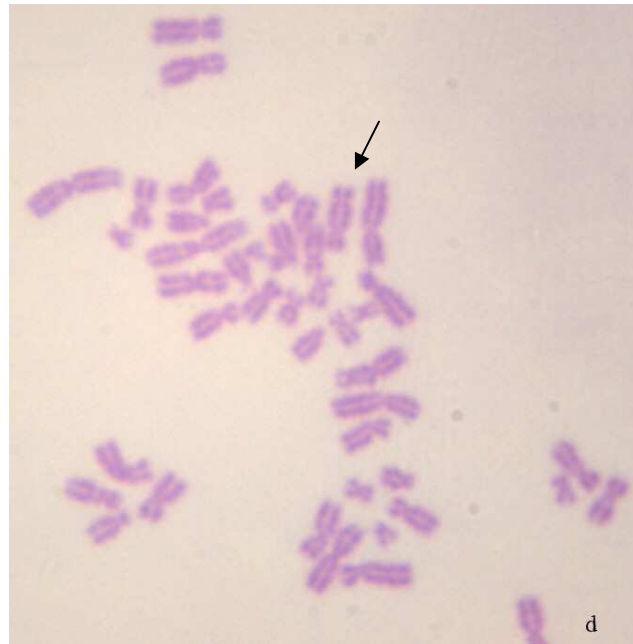
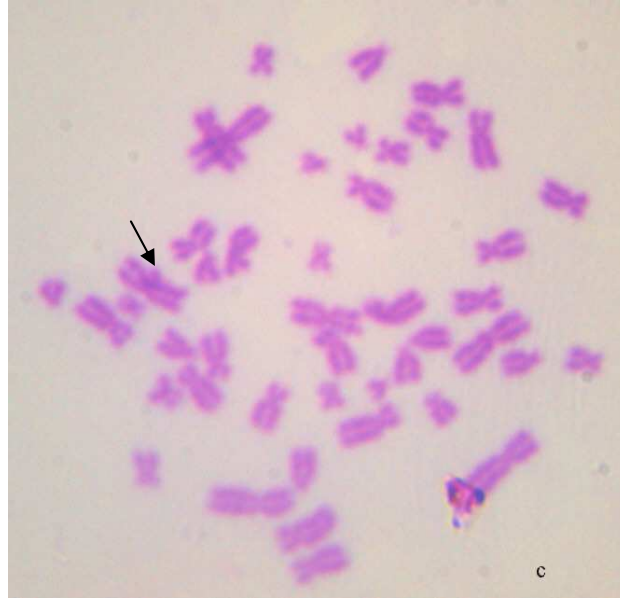
*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı

**Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı

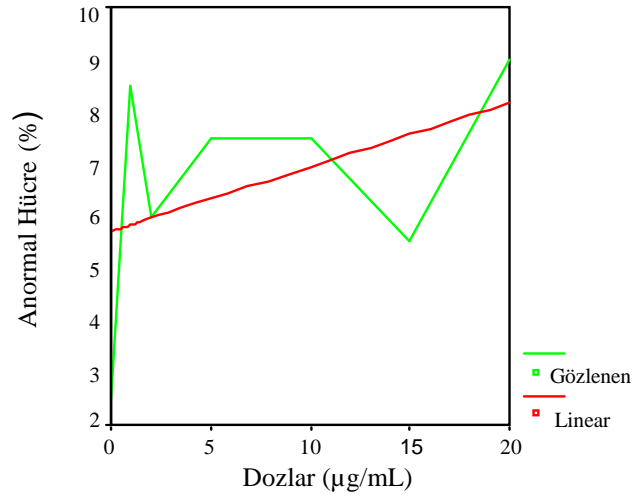
***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı



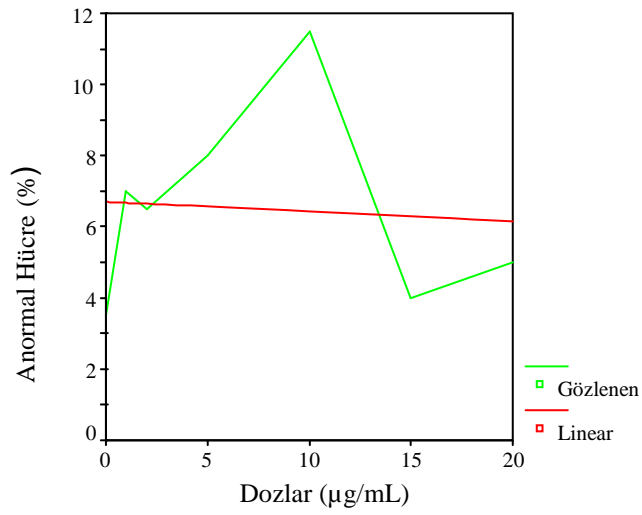
Şekil 4.1. İnsan periferel lenfositlerinde ZnO uygulaması sonucu oluşan kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı c) frgment d) disentrik kromozom



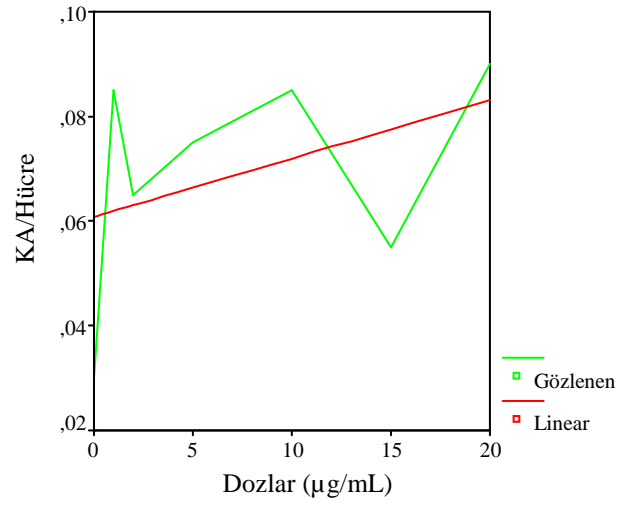
Şekil 4.1 (Devam) İnsan periferel lenfositlerinde ZnO uygulaması sonucu oluşan kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı c) fragment d) disentrik kromozom



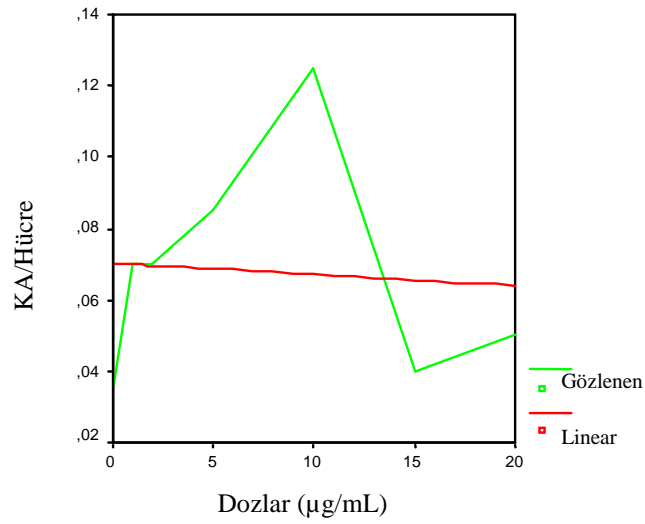
Şekil 4.2. ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı değişimi



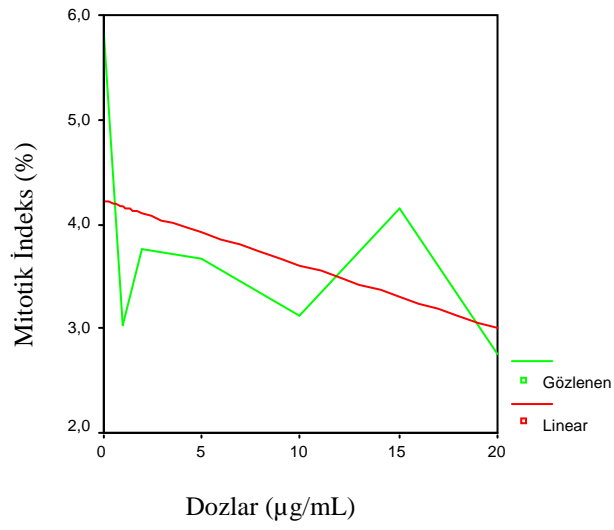
Şekil 4.3. ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı değişimi



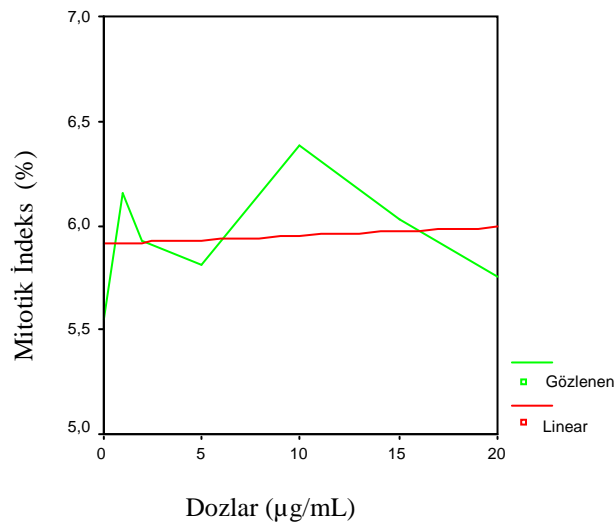
Şekil 4.4. ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde doza bağlı KA/Hücre değişimi



Şekil 4.5. ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde doza bağlı KA/Hücre değişimi



Şekil 4.6. ZnO ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı değişimi



Şekil 4.7. ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı değişimi

İnsan lenfositlerinde *in vitro* kültür ortamında 48 saat süreyle uygulanan ZnO nanomateryali, sadece 10 ve 15 µg/mL’lik dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda mikronukleus artışına neden olmuştur (Tablo 4.2). İnsan lenfositlerinde ZnO uygulamasıyla bir, iki ve üç mikronukleuslu binükleat hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.8). Mikronukleus frekansında doza bağlı olarak düşük bir oranda artış söz konusudur ($r=0,51$) (Şekil 4.9). Bununla birlikte ZnO’ün nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.2).

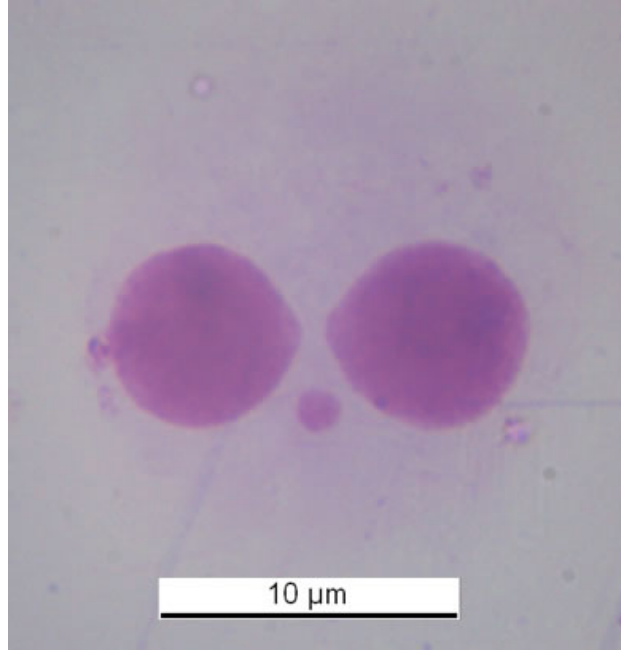
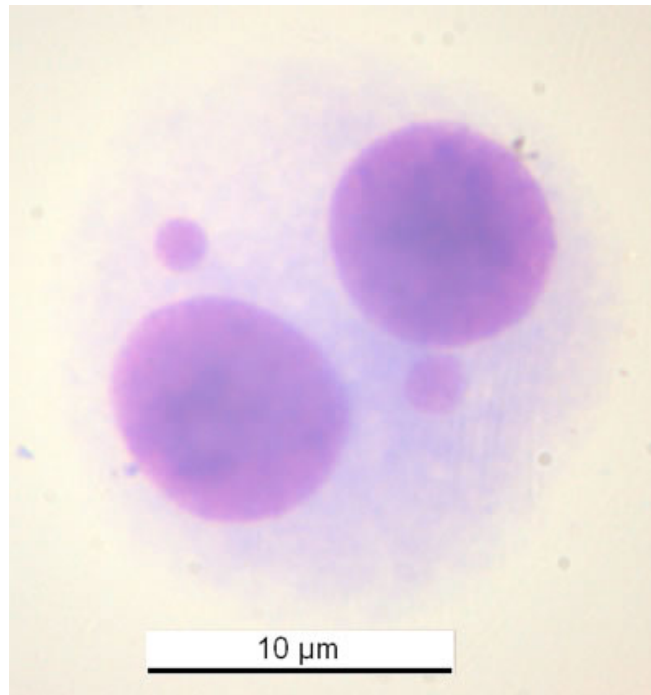
Tablo 4.2. ZnO uygulamasının insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN±SH (%)	Nükleer bölünme indeksi±SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/mL)	(1)	(2)	(3)		
Pozitif kontrol	48	0,20	68	8	4	0,48±0,01	1,10±0,035
ZnO	48	1	9	1	-	0,55±0,17	2,11±0,048
		2	11	1	-	0,65±0,18	1,63±0,032
		5	9	2	-	0,65±0,18	2,05±0,046
		10	16	1	1	1,05±0,23**	2,05±0,046
		15	16	-	-	0,80±0,20*	20,5±0,046
		20	13	-	-	0,65±0,18	2,08±0,045

MN değerlendirilmesinde her uygulama grubu için 2000 binükleat hücre, NBI için 1000 hücre incelenmiştir.

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

** Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı

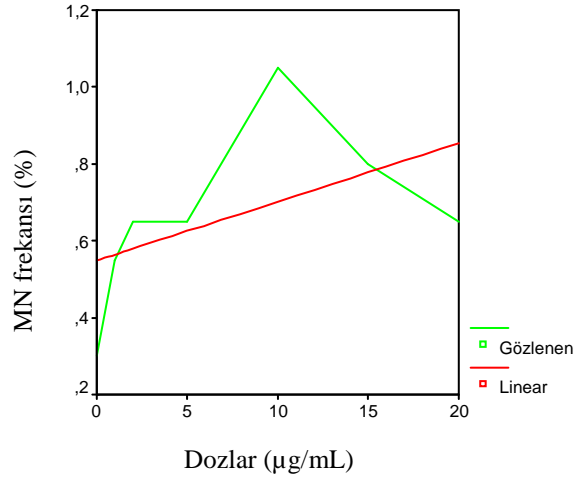
**a****b**

Şekil 4.8. ZnO uygulamasıyla insan periferel lenfositlerinde oluşan mikronukleuslu binükleat hücreler; a) bir mikronukleuslu hücre, b) iki mikronukleuslu hücre c) üç mikronukleuslu hücre



c

Şekil 4.8. (Devam) ZnO uygulamasıyla insan periferal lenfositlerinde oluşan mikronukleuslu binükleat hücreler; a) bir mikronukleuslu hücre, b) iki mikronukleuslu hücre c) üç mikronukleuslu hücre



Şekil 4.9. ZnO ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde mikronukleus frekansı yüzdesinin doza bağlı değişimi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde nanopartiküller bir çok alanda yaygın bir şekilde kullanılarak hayatımıza girmeye başlamıştır. Son iki yıl içerisinde % 185 oranında nanopartikül temelli tüketim malzemelerinin marketlerde yer aldığı bildirilmiştir. Bugün 20'den fazla ülke 600 den fazla türde nanopartikül içeren kozmetik vb. ürünleri üretmekte ve kullanmaktadır (Sharma ve ark., 2009). Güneş kremleri nanopartiküllerin kullanıldığı kozmetik ürünlerin başında gelmektedir. Bu çalışmada kullanılan ZnO nanopartikülü ise güneş koruyucu ürünler içerisinde oldukça sık kullanılmaktadır. ZnO nanopartikülünün toksik etkilerinin ortaya konulduğu çalışmalar olmasına rağmen bu etkiler tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, ZnO nanopartikülünün genotoksik etkiye sahip olup olmadığını insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada, insan periferik lenfositlerine çeşitli konsantrasyonlarda ZnO uygulamasına bağlı olarak çeşitli yapısal kromozom anormallikleri görülmüştür. Görülen bu anormallikler kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment ve disentrik kromozomlardır. En çok görülenler kromatid kırığı ve kromozom kırığıdır. Yapılan analizlerde, ZnO'in 24 saatlik uygulamasında, hem anormal hücre yüzdesi bakımından hem de hücre başına düşen kromozomal anormallik bakımından 1, 5, 10 ve 20 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise, anormal hücre yüzdesi bakımından sadece 10 µg/mL'lik dozda kontrole göre anlamlı artış gözlenirken, hücre başına düşen kromozomal anormallik açısından 5 ve 10 µg/mL'lik dozlarda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Mitotik indeks, ZnO'in 24 saatlik uygulamasında, tüm dozlarda kontrole göre anlamlı derecede azalma gösterirken, 48 saatlik uygulamaların hiç birinde kontrole göre anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir. Mikronukleus frekansında sadece 10 ve 15 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı artış olduğu

görülmüştür. ZnO'in nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bolt ve arkadaşları (2001), güneş koruyucu olarak kullanılan UV filtrelerinin endokrin etkilerinin henüz kesinlik kazanmadığını, ve deneysel modeller ve teknikler konusunda yanıtlanmayı bekleyen sorular bulunduğunu belirtmişlerdir. Kullavanijaya ve Lim (2005), dermal uygulama testi için kullanılan hayvan modelinin yetersiz olduğunu düşündüklerini ve *in vivo* hayvan çalışmalarında önemli teknik eksikliklerin mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılarında belirttiği gibi, genel olarak güneş koruyucu UV filtrelerinin insanlardaki etkileri tam olarak açıklanamamış ve yapılan çalışmalarda eksiklikler bulunmaktadır.

Yapılan literatür taramasında ZnO nanopartikülünün mikronukleus oluşumuna (MN) etkisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Kromozom aberasyonuna (KA) etkisi üzerine yapılan çalışmaların ise birkaç tane ile sınırlı olduğu görülmüştür. Bu alanda Someya ve arkadaşları (2008), insan diş pulpası hücrelerinde endodontik ilaçlarla 3 ve 30 saatlik uygulama süresi ile yapmış oldukları çalışmada, ZnO'in 30, 100 ve 300 μM 'lık konsantrasyonlarını kullanmışlardır. 30 saatlik uygulama sonucunda kromatid gapların da değerlendirilmeye alınmasına bağlı olarak anormal metafaz yüzdesinin kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artış gösterdiğini ve gözlemlenen anormalliklerin ise kromatid gap ve kromatit kırığı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda nm boyutunda ZnO kullanılmıştır ve gaplar anormallik olarak değerlendirilmeye alınmamıştır. En çok kromatid kırığına rastlanılmasından dolayı bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda ayrıca kromozom kırığı, fragment ve disentrik kromozomlar gözlemlenmiştir. Anormal hücre yüzdesi bakımından 24 saatlik uygulama sonucunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artış meydana gelmiştir. Dufour ve arkadaşları (2006), çin hamsterlarının yumurtalık hücrelerinde ZnO (100 nm) ile karanlık, eş zamanlı radyasyona maruz bırakılma ve daha önceden radyasyona maruz bırakılma şeklinde gerçekleştirdikleri uygulama sonucunda, gaplar hariç kromozom anormalliklerinin görülme sıklığının eş zamanlı radyasyona maruz bırakılan ve daha önceden radyasyona bırakılan hücrelerde karanlıktakine göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Dufour ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma bizimle uyum

göstermektedir. Bu sonuçlardan, ZnO nanopartikülünün kromozom anormalliklerinin oluşumunu uyardığı söylenebilir.

Sharma ve arkadaşları (2009), insan epidermal hücrelerinde ZnO nanopartiküllerinin DNA hasar potansiyelini araştırmak için yapmış oldukları çalışmada, ZnO'in 0.008, 0,08, 0,8, 5, 8 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarını kullanarak insan epidermal hücrelerini 3, 6, 24 ve 48 saatlik uygulamaya tabi tutmuşlardır. Çalışma sonucunda, ZnO nanopartiküllerine maruz kalan hücrelerin normal morfolojilerini kaybederek büzüştüğünü ve kümeleşme meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 24 saatlik uygulama sonucunda glutatyon (GSH) seviyesinde 0,08 ve 0,8 µg/mL'lik dozlarda, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitesinde 0,8, 0,08, 0,008 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı azalma görülürken, aynı dozlarda H₂O₂ seviyesinde kontrole göre anlamlı artışların olduğunu belirtmişlerdir. Laktat dehidrogenaz (LDH) seviyesinde 24 ve 48 saatlik uygulama süresinin sonunda 5, 8 ve 20 µg/mL'lik dozlarda artışlar görüldüğünü, yine comet testi sonuçlarına göre DNA kuyruk yüzdesi ve kuyruk momentinde de 0,8 ve 5 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı artışların olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda insan epidermal hücrelerinde ZnO nanopartiküllerinin sitotoksikite ve oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2009), primer fare fibroblast hücrelerinde içerisinde ZnO'in de bulunduğu çeşitli nanopartiküllerle 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat uygulama ile yapmış oldukları çalışmada, doza bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve LDH seviyesinde anlamlı artış, GSH ve SOD seviyesinde ise anlamlı derecede azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir. Malondialdehit (MDA) seviyesinde ise 20, 50 ve 100 µg/mL'lik dozlarda anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları comet test çalışması sonuçlarına göre de DNA kuyruk uzunluğu, DNA kuyruk yüzdesi ve kuyruk momentinde de 5 ve 10 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı artışlar gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, ZnO nanopartiküllerinin yüksek dozda sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve oksidatif hasara neden olduğunu bildirmişlerdir. Gerloff ve arkadaşları (2009), insan bağırsak Caco-2 (kolon adeno karsinoma) hücrelerinde ZnO ve çeşitli nanopartiküllerin oksidatif DNA hasarını belirlemek için yapmış oldukları çalışmada, ZnO nanopartikülünün 20 ve 80 µg/cm² yüzey alanında, 4 ve 24 saatlik uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. 24 saatlik uygulama sonucunda LDH seviyesinde

kontrole göre anlamlı derecede artış olduğunu, 4 saatlik uygulama sonucunda ise GSH seviyesinde anlamlı azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Comet test sonuçlarında ise DNA kuyruk yüzdesinde kontrole göre anlamlı artışlar olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca 4 saatlik uygulamada $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'de, 24 saatlik uygulamada ise 20 ve $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'de metabolik aktivite bozukluğu, $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'de DNA zincir kırıkları ve oksidatif DNA hasarı üzerine ZnO'in etkilerinin önemli derecede olduğunu belirtmişlerdir. Jeng ve Swanson (2006), fare nöroblastom hücrelerinde 30-45 nm çapında olan ZnO ve çeşitli nanopartiküllerin 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasındaki konsantrasyonlarını kullanarak 2-72 saatlik uygulama sonucunda, ZnO nano partiküllerine maruz bırakılan fare nöroblastom hücre hattının anormal morfolojide olduğunu ve hücre sel büzülmelerin gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarda ZnO'e maruz kalan hücrelerde LDH seviyesinde önemli artış ve mitokondriyal fonksiyonda ise anlamlı azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. ZnO'e maruz kalan hücrelerde apoptozisin ortaya çıktığını da bildirmişlerdir. Lin ve arkadaşları (2009), A549 (bronko alveolar karsinoma) hücrelerinde 70 ve 420 nm çapında ZnO nanopartiküllerinin 8-18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasındaki konsantrasyonlarını kullanarak 6, 12 ve 24 saatlik uygulama gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, GSH seviyesinde doza bağlı azalma ve LDH seviyesinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. ZnO'in doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ve oksidatif DNA hasarına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Musarrat ve arkadaşları (2009), ZnO nano partiküllerine (<20 nm) maruz bırakılan insan lenfositlerinde yaptıkları çalışmada comet testi ile DNA kuyruk momentinde belirgin bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca ZnO nanomateryalinin mitokondriyal membran potansiyelinin belirgin bir şekilde azalttığını ve oksidatif stresi artırdığını belirtmişlerdir. Zhu ve arkadaşları (2009), ZnO nanomateryalinin zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarının gelişimi üzerine etkilerini incelemek için oldukça geniş doz (0,1, 0,5, 1, 5, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve zaman (6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 saat) aralığı kullanmışlar ve ZnO'e maruz kalmış embriyolarda ROS seviyesinin arttığını ve bunun hücre sel oksidatif stresin artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Kim ve arkadaşları (2010), sıçan alveolar epitel hücre tabakasında yapmış oldukları çalışmada ise, ZnO nanopartiküllerine 24 saatlik apikal maruz kalma sonucunda, 176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda mitokondriyal aktivitede azalma, LDH salınımında ve hücre içi ROS seviyesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Yukarıda bahsedilen araştırma

sonuçları birbirleri ile uyumluluk göstermekte ve ZnO nanopartikülünün hücrelerde GSH, SOD, katalaz aktivitelerini azaltarak ve LDH seviyesini artırarak ROS oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Hücreler, metabolik prosesin bir parçası olarak sürekli serbest radikaller ve süperoksit anyon, peroksil, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri üretirler. Bu serbest radikaller katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve vitamin A, E ve C gibi enzimatik olmayan oksidanlardan oluşan bir antioksidan savunma sistemi ile nötralize edilirler (Urso ve Clarkson, 2003). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, SOD aracılığında hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini engellerken, lipid peroksidasyonunu hızlandırırlar (Kaya ve ark. 1998; Mates, 2000). Lipid peroksidasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkan malondialdehit gibi sitotoksik aldehitler DNA ve proteinlere bağlanarak kalıcı hasara neden olur (Çiçek, 2005). Reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmasının yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi hasarlara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey, 2000; Cooke ve ark., 2003). Bu çalışmaların sonuçlarından ZnO'in ROS oluşumuna neden olduğu ve buna bağlı olarak da DNA hasarını uyardığı söylenebilir. Bizim çalışmamızda da en sık kromatid kırığı ve kromozom kırığına rastlanılmıştır. DNA ipliğinde meydana gelen bu kırılmaların ZnO nanopartikülünün neden olduğu düşünülen reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikallerden kaynaklandığını söyleyebiliriz. DNA'daki iplik kırılmaları sonucunda da kromozom ve kromatid kırıkları oluşmaktadır. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda comet test sonuçlarına bakıldığında da ZnO'in DNA'da kırılmalarına bağlı hasar meydana getirdiği gözlemlenmektedir.

Dechsakulthorn ve arkadaşları (2007), insan deri fibroblast hücrelerinde 50 ve 70 nm çapında ZnO nanopartiküllerle *in vitro* kolorimetrik MTS test metodunu kullanarak yaptıkları çalışmada, ZnO nanopartiküllerine 4 ve 24 saat maruz bırakılan hücrelerde

yüksek toksisite meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Gojova ve arkadaşları (2007), insan endotel hücrelerinde ZnO'nin farklı konsantrasyonlarını (0.001-50 µg/mL) kullanarak 1-8 saatlik uygulama sonucunda, mRNA upregülasyonu meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca daha yüksek konsantrasyonlarda ZnO'nin sitotoksik etkisinin arttığını ve ayrıca iltihabi yanıtı neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Zheng ve Li (2009), 20 nm çapında ZnO nanomateryali ile *in vivo* ve *in vitro* olarak L929 (fare fibroblast hücreleri) ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat sürelerle yapmış oldukları uygulama sonucunda, hücrelerin bölünme aktivitelerinin bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda, ZnO'nin 24 saatlik uygulamasında mitotik indeksin azalmasına bağlı olarak, mitoz bölünmeyi inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Ancak nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca istatistiksel olarak sonuçlara bakıldığında, 1, 5, 10 ve 20 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı farklılık gözlenirken 2 ve 15 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Maddenin boyutu nanometre seviyesine kadar küçüldükçe büyük hacimli aynı maddeden çok daha farklı özellik ve davranış gösterebilmektedir. Boyutun nanoboyuta kadar küçülmesi farklı sonuçlara neden olabilir. Nanopartiküllerin hücrelerdeki etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamadığından bizim çalışmamızda dozlar arasındaki farklılığın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Nanopartiküllerin canlılardaki uygulamalarının uzun dönem etkileri hakkında toksisite testlerinin sınırlı olmasından dolayı, bu partiküllerin dozu ve potansiyel zararlarının açıklanabilmesi için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada kullanılan ZnO nanopartikülü özellikle kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır. Başta EPA (Çevre Koruma Örgütü) olmak üzere ABD'de çok sayıda laboratuvar nanokozmetik ürünlerin risklerini ortaya koymaya çalışmaktadır. Nanoteknolojinin potansiyel fayda ve risklerini inceleyen oluşumlardan bir diğeri de CRN (Nanoteknoloji'den Sorumlu merkez) dir. Bugüne kadar araştırmalardan elde edilen sonuçlar kesin olmadığından birçok bilim adamı güvenlik açısından önlemler alınmasını ve ürünlerin içerisinde nanopartikül bulunduğunu belirten uyarı konulması gerektiğini düşünmektedir (Gök, 2007)

ZnO'nin mikroorganizmalar üzerine olan etkilerini incelemek için de bazı çalışmalar yapılmıştır. Jones ve arkadaşları (2008), bir çok mikroorganizma üzerinde yapmış

oldukları çalışmada ZnO nanopartiküllerinin önemli antibakteriyel etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Brayner ve arkadaşları (2006), *Escherichia coli* bakterileriyle yaptıkları çalışmada, ZnO'nun *E. coli* bakterilerinde hasar meydana getirdiğini ve üç kat daha fazla membran düzensizliğine neden olduğunu bildirmişlerdir. Hıdaka ve arkadaşları (2006), yapmış oldukları bir başka çalışmada ise UV ışığı altında ZnO, CeO₂ ve TiO₂ nanopartiküllerinin jel elektroforez yöntemini kullanarak DNA plazmitlerine olan hasarını incelemişler ve ZnO'nun daha hızlı ve daha büyük DNA hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir.

ZnO nanopartikülü ile yapılan çalışmalarda negatif sonuçlarında alındığı araştırmalarda bulunmaktadır. Yoshida ve arkadaşları (2009), TMAOH (tetrametilamonyumhidroksit) ile kaplanmış ZnO nanopartiküllerinin mutajenik aktivitesini belirlemek için ames testi ile, *Salmonella typhimurium*'in TA98, TA100, TA1535, TA1537 suşlarını ve *Escherichia coli*'in WP2uvrA⁻ suşu kullanılarak yapılan çalışmadan negatif sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan TMAOH'in yine aynı suşlar kullanılarak daha önce yapılan başka bir çalışmada negatif sonuç verdiği bildirildiğinden (Biosafety Research Center, Foods, Drugs and pesticides, 1999) Yoshida ve arkadaşları, çıplak ZnO'nun mutajenitesinin de negatif olduğunu belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi ames testi ile elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların ve bizim sonuçlarımızdan farklılık göstermektedir. Bu konuda kesin yargıya varmak için *in vivo* testler ile ZnO nanopartikülünün muhtemel genotoksik etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda gözlemlenen mikronukleus (MN) oluşumlarının, ZnO'nun kromatid kırığı, kromozom kırığı ve fragment oluşumuna neden olmasından dolayı klastojenik etkisinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Comet testi ile yapılan daha önceki çalışmalarda DNA kırıklarını uyarması yönüyle ZnO'nun klastojenik etkiye sahip olduğu yönündeki sonuçlarımızı desteklemektedir. ZnO nanopartikülünün gerek sitotoksik ve gerekse genotoksik etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Daha öncede belirtildiği gibi gerek ZnO ve gerekse diğer nanoürünler üzerine yapılan araştırmalar oldukça yetersizdir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmada, ZnO nanopartikülünün *in vitro* insan lenfositlerinde kromozomal anormallikleri ve

mikronukleus oluşumunu uyardığı gözlemlenmiştir. ZnO nanopartikülünün canlılar üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının kesinleşmesi, etkisi olduğu takdirde hangi konsantrasyonlarda ve hangi düzeyde olduğunun ortaya çıkartılabilmesi için gerek *in vitro* ve gerekse *in vivo* araştırmaların artırılması gerekmektedir. Bu süreçte aynı zamanda ZnO ile birlikte nanopartiküllerin etki mekanizmalarının da aydınlatılabilmesi için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışma, bu alanda araştırmalar yapmak isteyen bilim insanlarına ışık tutacak ve aynı zamanda kaynak sağlamış olacaktır.

KAYNAKLAR

AKSOY, H., Elektromanyetik Alanların İnsan Lenfosit Kültürü ve Bazı Bitkiler Üzerine Etkileri, Gazi Üniversitesi, Doktora Tezi, Ocak 2006.

ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E., TICE, R., WATERS, M.D. and AITIO, A., IPCS Guidelines For the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. International Programme on Chemical Safety, 463(2): 111-72, 2000.

ANDERSON, D., Human Biomonitoring. Mutation Research, 204: 353-541, 1988.

BENLİ, B., Nanoteknoloji ve Antik Çağlara Uzanan Killi Nanoyapılar. Kibited, 1(3): 143-162, 2008.

BİLGİN, Y., Sol-Gel Yöntemiyle Üretilen Nanokristal ZnO:Ga İnce Filmlerinin Optik ve Mikroyapısal Özelliklerinin İncelenmesi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.

BINNIG, G., QUATE, C.F., and GERBER, CH., Atomic Force Microscope. Physical Review Letters, 56(9): 930-933, 1986.

BIOSAFETY RESEARCH CENTER, FOODS, DRUGS AND PESTICIDES, Reverse Mutation Test of Tetramethylammonium Hydroxide on Bacteria. URL: <http://wwwdb.mhlw.go.jp/ginc/dbfile1/file/file75-59-2.html>, 2010.

BOLOGNESI, C., Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. Mutation Research, 543: 251-272, 2003.

BOLT, H. M., GUHE, C., DEGEN, G. H., Comments on *in vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. Environ Health Perspect, 109: A358-61, 2001.

BONASSI, S., ABBONDANDOLO, L., CAMURRI, L., DE FERRARI, M., DEGRASSI, F., Are Chromosome Aberrations in Circulating Lymphocytes Predictive of A Future Cancer Onset in Humans ? Preliminary Results of An Italian Cohort Study. Cancer Genetics and Cytogenetics, 79: 133-135, 1995.

BONASSI, S., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., MONTAGUD, A.H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I.L., KNUDSEN, L.E. and NORPPA, H., Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. Cancer Research, 60: 1619-1625, 2000.

BONASSI, S., ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L. Chromosomal Aberrations and Risk of Cancer in Humans: an Epidemiologic Perspective. *Cytogenetic and Genome Research*, 104: 376-382, 2004.

BONASSI, S., UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STRÖMBERG, U., VERMEULEN, R., TUCKER, J.D., Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 258-270, 2005.

BRAYNER, R., FERRARI-LLIOU, R., BRIVOIS, N., DJEDIAT, S., BENEDETTI, M.F., Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano letters*, 6: 866-870, 2006.

BUTT, H.J., GRAF, K., KAPPL, M., *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley-VCH, 2005.

CARRANO, A.V. and NATARAJAN, A.T., Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Research*, 204: 379-406, 1988.

COOKE, M. S., EVANS, M. D., DİZDAROĞLU, M., JUNEC, J., Oxidative DNA Damage: Mechanism Mutation and Disease. *The Fasebj Journal*, 17(10): 1195-214, 2003

COUTEAU, C., ALAMI, S., GUITTON, M., PAPARIS, E., COİFFARD, L. J., Mineral Filters in Sunscreen Products-Comparison of the Efficacy of Zinc Oxide and Titanium Dioxide by *In Vitro* Method. *Pharmazie*, 63(1): 58-60, 2008.

ÇAKMAK, G., Trafik Polisi ve taksi sürücülerini hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-107, 2000.

ÇIRACI, S., *Bilim ve Teknik Eki Yeni Ufuklar*, Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi, vol.453, c.38, 1-10, 2005.

DECHSAKULTHORN, F., HAYES, A., BAKAND, S., JONEG, L., WINDER, C., *In Vitro* Cytotoxicity Assessment of Selected Nanoparticles Using Human Skin Fibroblasts. *Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*, 397-400, 2007.

DOĞAN, G., BAŞAL, G., Elektrolif Yöntemine Göre Çekilen Biyopolimer Nanoliflerin İlaç Salınım Sistemleri, Yara Örtüsü ve Doku İskelesi Olarak Kullanımı. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2): 58-70, 2009.

DOĞAN, M., *Nanoteknoloji ve Uygulamaları Kimya ile ilişkisi*. *Kimya ve Sanayi Dergisi*, 39: 12-18, 2006.

DUFOUR, K. E., KUMARAVEL, T., NOHYNEK J. G., KİRKLAND D., TOUTAIN H., Clastogenicity, Photo-clastogenicity or Pseudo-clastogenicity:

Genotoxic Effects of Zinc Oxide in The Dark, in Pre-irradiation or Simultaneously Irradiated Chinese Hamster Ovary Cells. *Mutation Research*, 607: 215-224, 2006

DULDA, A., II-VI Grubu Nanoyapıların Sentezlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2006.

DURUCAN, C. Biyomedikal ve Biyoteknolojik Uygulamalar. *Bilim ve Teknik*, 465: 43, 2006.

ÇİÇEK, E., Nükleer tıp uygulamalarının Hastalardaki Serbest Radikaller Üzerine Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, 2005

FENECH, M., MORLEY, A. A., Measurement of Micronuclei in Lymphocytes, *Mutation Research*, 147: 29-36, 1985.

FENECH, M., Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181: 411-416, 2002.

GERLOFF, K., ALBRECHT, C., BOOTS, W. A., FÖRSTER, I., SCHINS, F. P. R., Cytotoxicity and Oxidative DNA Damage by Nanoparticles in Human Intestinal Caco2 Cells. *Nanotoxicology*; 3(4): 355-364, 2009.

GOJOVA, A., GUO, B., KOTA, R.S., RUTLEDGE, J.C., KENNEDY, I.M., BARAKAT, A.I., Induction of Inflammation in Vascular Endothelial Cells by Metal Oxide Nanoparticles: Effect of Particle Composition, *Environmental Health Perspectives*, 115: 403-409, 2007.

GÖK, H., Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Uzmanlarının Nanoteknolojiden Beklentileri. *Türk Fiz Tıp Rehabilitasyon Dergisi*, 53 (2): 13-7, 2007.

HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I.L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S. and SORSA, M., Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Research*, 54: 2919-2922, 1994.

HARTNAGEL, H.L., DAWAR, A.L., JAİN, A.K., JAGADİSH, C. , Semiconducting Transparent Thin Films. *Institute of Physics Publishing* , 202–210, 1995.

HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P. and Mac GREGOR, J.T., Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277-291, 1991.

HIDAKA, H., KOBAYASHI, H., KOIKE, T., SATO, T., SERPONE, N., DNA Damage Photoinduced by Cosmetic Pigments and Sunscreen Agents Under Solar Exposure and Artificial UV Illumination. *Journal of Oleo Science*, Vol.55, No.5, 249-261, 2006.

HOET, P., HOHLFELD, I., SALATA, O., Nanoparticles—known and Unknown Health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, (2): 1–15, 2004.

JENG, H.A., SWANSON, J., Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *Journal of Environmental, Science Health*, 41: 2699-2711, 2006.

JONES, N., RAY, B., RANJIT, T. K., MANNA, C. A., Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle Suspensions on A Broad Spectrum of Microorganisms. *FEMS Microbial Letters*, 279: 71-76, 2008.

KAYA, S., PİRİNÇÇİ, A., BİLGİLİ A., Veteriner hekimliğinde toksikoloji. *Medison Yayın Serisi*, 35: 222-355, 1998.

KIM, Y. H., FAZLOLLAHI, F., KENNEDY, M. I., YACOBI, R.N., HAMM-ALVAREZ, S. F., BOROK, Z., KIM, K. J., CRANDALL, E. D., Alveolar Epithelial Cell Injury Due to Zinc Oxide Nanoparticle Exposure. *American journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 20639441, 2010.

KONUK, M., OKTAY,S., Biyolojik Sistemlerde Uygulamalara Yeni Bir Yaklaşım: Nanoteknoloji ve Nanomateryaller. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (3): 23-34, 2007.

KULLAVANIJAYA, P., LIM, W. H., Fotokorunma. *Journal of The American Dermatology*,52(6): 937-958, 2005.

LEE, C. Y., TSENG, T. Y., LI, S. Y., and LIN P., *Tamkang Journal of Science and Engineering*, 6: 127-132, 2003.

LIN, W., XU, Y., HUANG, C. C., MA, Y., SHANNON, K. B., CHEN, D. R., HUANG, Y. W., Toxicity of Nano and Micro-sized ZnO Particles in, Human Lung Epithelial Cells, *Journal Nanoparticle Research*, 11: 25-39, 2009

LOGOTHEİDİS, S., Nanosistem ve Nanometroloji. *Hippokratia*, 10(1): 7- 21, 2006.

MATES J. M., Effects of antioxidant enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104, 2000.

MENCELOĞLU, Z. Y., KIRCA, M. B., Nanoteknoloji ve Türkiye, *TÜSİAD. Tüsiad-T*, 11/474, 2008.

McEUN, P. L., FUHRER, M. S. and PARK, H., Single Walled Carbon Nanotube Electronics. *IEEE Transaction on Nanotechnology*, 1: 78-85, 2002.

MINAMI, T., SATO, H., TAKATA, S., Group III Impurity Doped Zinc Oxide Thin Films Prepared by RF Magnetron Sputtering. *Japanese Journal of Applied Physics*, 781-784, 1985.

- MITCHNICK, M. A., FAIRHURST D., PINNEL S. R., Microfine Zinc Oxide (Zcote) as a Photostable UVA/UVB Sunblock Agent. *Journal of the American Academy Dermatology*, 40: 143-50, 1999.
- MUSARRAT, J., SAQUIB, Q., AZAM, A., NAQVI, H. A. S., Zinc Oxide Nanoparticles-Induced DNA Damage in Human Lymphocytes. *International Journal of Nanoparticles*, Vol:2, No:1-6; 402-415, 2009.
- NATARAJAN, A.T., Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutation Research*, 504: 3-16, 2002.
- PERRY, P. and EVANS, H.J., Cytological Detection of Mutagen- Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258: 121-125, 1975.
- SATO, S, TOMITA, I, Short-Term Screening Method for the Prediction of Carcinogenicity of Chemical Substances: Current Status and Problems of an in vivo Rodent Micronucleus Assay. *Journal of Health Science*, 47: 1, 1–8, 2001.
- SHARMA, V., SHUKLA, K, R., 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.
- SMALLEY, R. E., Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications, Springer.USA, 3540410864, 2001.
- SOMEYA, H., HIGO, Y., OHNO, M., TSUTSUI, T.W., and TSUTSUI, T., Clastocenic Activity of Seven Endodontic Medications Used in Dental Practice in Human Dental Pulp Cells. *Mutation Research*, 650: 39-47, 2008.
- TOPAKTAŞ, M. ve RENCÜZOĞULLARI, E., Sitogenetik , Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 68-113, 1995.
- TOPÇUOĞLU, A., *Bilim ve Teknik Dergisi*. Tübitak, 1-15, Ocak 2001.
- TUCKER, J.D., AULETTA, A., CIMINO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R. and CARRANO, A.V., Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 297: 101-180, 1993.
- URSO,M.L., CLARKSON, P.M., Oksidatif Stress, Exercise and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*, 189: 41-54, 2003.
- VANPARYS, P, VERMEIREN, F, SYSMANS, M, Temmerman R. The Micronucleus Assay as a Test For The Detection of Aneugenic Activity. *Mutation Research* , 244: 95-103, 1990.
- WILLIAMS, G. M., JEFFREY, A. M., Oxidative DNA Damage: Endogenous and Chemically Induced. *Regul Toxicol Pharmacol*, 32(3): 283-92, 2000.

WU, J. J., WEN, H. I., TSENG, C. H. and LIU, S. C., Well-Aligned ZnO Nanorods via Hydrogen Treatment of ZnO Films. *Advanced Functional Materials*, 13, No. 1, January 2003.

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*, 29:69-78, 2009.

YILMAZ, S., AKSOY, H., ÜNAL, F., ÇELİK, M., YÜZBAŞIOĞLU, D., Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. *Russian Journal of Genetics*, 44 (3): 273-278, 2008.

YOSHIDA, R., KITAMURA, D., MAENOSONO, S., Mutagenicity of Water – Soluble ZnO Nanoparticles in Ames Test. *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol.34, No.1: 119-122, 2009.

YÜZBAŞIOĞLU, D., ÇELİK, M., YILMAZ, S., ÜNAL, F., AKSOY, H., Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604 (1-2): 53-59, 2006.

ZHENG, Y., LI R., *In vitro* and *in vivo* Biocompatibility Studies of ZnO Nanoparticles. *International Journal of Modern Physics B*, Vol. 23, Nos. 6 and 7, 1566-1571, 2009.

ZHU, X., WANG, J., ZHANG, X., CHANG, Y., CHEN, Y., The Impact of ZnO Nanoparticle Aggregates on The Embryonic Development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20-195103, 2009.

ZIJNO, A., MARCON, F., LEOPARDI, P., SALVATORE G., CARERE A., CREBELLÌ R. An Assessment of The *In Vivo* Clastogenicity of Erythrosine. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 159-63, 1994.

ÖZGEÇMİŞ

Duygu Gümüş, 15.08.1981 de Artvin’de doğdu. İlk öğrenimini Artvin’de orta ve lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2000 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünü 2004 yılında bitirdi. 2005 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programını 2006 yılında tamamladı. 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.