

Demir (III) oksit (Fe₂O₃) nanopartiküllerinin genotoksitesinin *Drosophila* hemositlerinde KOMET yöntemi ile araştırılması

*Investigation of genotoxicity of iron (III) oxide (Fe₂O₃) nanoparticles in *Drosophila* hemocytes by COMET method*

Burçin YALÇIN^{1,a}, Merve GÜNEŞ^{1,b}, İbrahim Hakkı CİĞERCİ^{2,c}, Bülent KAYA^{*1,d}

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 07070, Antalya

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 03200, Afyonkarahisar

• Geliş tarihi / Received: 10.11.2020

• Düzeltilecek geliş tarihi / Received in revised form: 31.03.2021

• Kabul tarihi / Accepted: 07.04.2021

Öz

Nanopartikül (NP) kaynaklı ürünlerin giderek çeşitlenmesi ve bu ürünlerin ekonomik, çevresel ve insan sağlığı yararına fayda sağlaması nedeni ile NP'lerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Ancak bu yoğun kullanım beraberinde bazı endişelerin oluşmasına da yol açmıştır. NP'ler kimyasal bileşimlerine, yapılarına, partikül büyüklüklerine, yüzey alanlarına ve şekillerine göre farklı toksik etkiler gösterebilmektedir. Şekilleri ve boyutları NP'lerin hücre alımları ve potansiyel toksisitesinde önemli belirleyicilerdir. Demir (III) oksit (Fe₂O₃) NP'leri, manyetik rezonans görüntüleme, ilaç dağıtımında, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu gibi birçok biyomedikal ve biyomühendislik alanlarında kullanıma sahiptir. Bu çalışmada Fe₂O₃ NP'lerinin genotoksitesinin partikül boyutu ve şekli ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Drosophila* hemositleri ile KOMET (alkali tek hücre jel elektroforez) analizi gerçekleştirilmiştir. KOMET sonucuna göre, <50 nm boyutlu ve küre forma sahip Fe₂O₃ NP'leri ile <100 nm boyutlu ve çubuk forma sahip Fe₂O₃ NP'lerinin genotoksik etkileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak her iki Fe₂O₃ NP uygulamasında da çalışılan 3 farklı dozdan (1, 2 ve 5 mM) sadece 1 mM'lık uygulamada kontrol grubu distile suya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde genotoksitesinin indüklendiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Demir oksit, *Drosophila*, Genotoksitesite, KOMET, Nanopartikül

Abstract

The use of nanoparticles (NPs) has become widespread due to the increasing diversification of products from NP and the benefit of these products for economic, environmental and human health. However, this overutilize has also led to some concerns. NPs can show different toxic effects depending on their chemical composition, structure, particle size, surface area and shape. Their shape and size are important determinants in the cellular uptake and potential toxicity of NPs. Iron (III) oxide (Fe₂O₃) NPs are used in many biomedical and bioengineering fields such as magnetic resonance imaging, drug delivery, detoxification of biological fluids. In this study, COMET (alkaline single cell gel electrophoresis) analysis was performed with *Drosophila* hemocytes to determine the relationship between the genotoxicity of Fe₂O₃ NPs and particle size and shape. According to the result of COMET, no statistically significant difference was found in terms of genotoxicity when Fe₂O₃ NPs with of <50 nm and sphere form and Fe₂O₃ NPs with of <100 nm and rod form were compared. However, in both Fe₂O₃ NP treatments, it was determined that only 1 mM dose (between 1, 2 and 5 mM) was induced statistically significant level of genotoxicity compared to the control group distilled water.

Keywords: Iron oxide, *Drosophila*, Genotoxicity, COMET, Nanoparticle

*d Bülent KAYA; bkaya@akdeniz.edu.tr, Tel: (0242) 310 23 50, orcid.org/0000-0002-0491-9781

^a orcid.org/0000-0002-9694-5839

^b orcid.org/0000-0003-3278-0542

^c orcid.org/0000-0002-3626-7730

1. Giriş

Metal oksit nanopartikülleri ticari, endüstriyel ve medikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerin (NP'lerin) bir sınıfıdır. En sık kullanılan temel metal oksit NP'leri; titanyum dioksit (TiO₂), seryum oksit (CeO₂), demir oksitler (Fe₂O₃, FeO, Fe₃O₄ vb.), alüminyum oksit (AlO), silica (SiO₂) ve çinko oksit (ZnO) NP'leridir (Ju-Nam ve Lead, 2008; Johnston vd., 2010). Metal oksit NP'lerinin kullanım alanlarına baktığımızda ise kozmetikten, gıda paketlemeye, güneş pillerinden, ilaç taşıyım sistemlerine pek çok alanı kapsadığı bilinmektedir (Ju-Nam ve Lead, 2008). Bu farklı uygulamalarından dolayı metal oksit NP'lerine insan ve çevresel kaynaklı maruziyetin giderek artacağı düşünülmektedir ve beraberinde yol açabileceği olumsuz etkiler konusundaki endişeler de giderek artmaktadır (Ma vd., 2015; Scherer vd., 2019). Nanopartiküller oksidatif hasara neden olabilmekte ve dolaylı olarak DNA'da hasar yaratabilmektedir. Bunun yanında yeterince küçük NP'ler nükleus porlarından geçerek DNA'ya ulaşım direkt olarak da zarar verebilmektedir (Singh vd., 2009). Ayrıca partiküllerden salınan metal iyonları membran yapılarına zarar verebilmektedir (Sukhanova vd., 2018). Lizozom membranında oluşacak hasar DNaz gibi yıkıcı enzimlerin sitoplazmaya salınmasına neden olabilmekte bunun sonucunda da DNA'da kırıklar oluşabilmektedir (Karlsson, 2010; Karlsson vd., 2015). Dolayısıyla, bu NP'lerin çevre ve canlı organizmalar üzerindeki risk değerlendirmesi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

Metal oksit NP'leri arasında yer alan demir oksit NP'lerinin fizikokimyasal özelliklerinden dolayı *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar için yaygın uygulamaları bulunmaktadır (Sadeghi vd., 2015a; Caro vd., 2019). 21. yüzyıl başlarından itibaren özellikle son 10 yıldır demir oksit NP'leri ile ilgili yayınlar artış göstermektedir (PubMed, 2020). Aynı zamanda manyetik özellikleri nedeniyle de manyetik rezonans görüntüleme, ilaç veya genlerin hedefli verilmesi, doku mühendisliği, hedeflenen tümörün yok edilmesi, gibi pek çok çeşitli uygulamalarda benzersiz bir potansiyele sahiptir (Wu vd., 2012; Sadeghi vd., 2015a; Katz, 2019; Yousef vd., 2019). Demir oksit NP'lerinin nano boyutlarda olması onları özellikle onkoloji tedavilerinde kullanımı için önemli adaylardan biri haline getirir de küçük boyutlarda olması özellikle kan beyin bariyerini aşabilme ve biyolojik sistemlerde oksidatif stres oluşturma, nükleer zara hasar vererek mutasyonlara yol açma risklerini de

ortaya çıkarmaktadır (Dahman, 2019). Boyutlarının dışında NP'lerin şekilleri de NP'lerin hücre içerisine girişini etkilemekte ve buna bağlı olarak toksisitelerinin seviyesi de değişebilmektedir (Dong vd., 2019; Bai ve Tang, 2020). Ancak literatürdeki çalışmalara bakıldığında demir oksit NP'lerinin toksikolojik değerlendirmesi ile ilgili kısıtlı çalışma bulunmaktadır.

Drosophila melanogaster, kısa hayat döngüsü, basit bir şekilde kültüre edilmesi, yüksek üreme potansiyeline sahip olması gibi avantajlarından genetik çalışmalarda kullanım açısından ideal bir model organizmadır. Ayrıca memeliler ile arasında birçok temel biyolojik, fizyolojik ve nörolojik özellikler korunmakta ve insan hastalık genlerinin yaklaşık %77'sinin *Drosophila*'da fonksiyonel bir homoloğu bulunmaktadır (Reiter vd., 2001; Alaraby vd., 2016). *Drosophila*, insan ile yüksek homoloji gösterdiği için NP'lerin toksisitesinin belirlenmesinde sıkça kullanılan önemli bir model organizmadır (Carmona vd. 2015; Demir vd., 2015; Güneş vd., 2018). Alkali tek hücre jel elektroforez (KOMET) testi, ökaryotik hücrelerde farklı bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir tekniktir ve genotoksikite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Shukla, 2011; Ertuğrul vd., 2020). Bu bağlamda demir (III) oksit (Fe₂O₃) NP'lerinin farklı partikül boyutuna (<50 nm ve <100 nm) ve farklı partikül şekline (küre ve çubuk) göre genotoksitesinde meydana gelebilecek değişikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Fe₂O₃ NP'lerinin ön denemelerle belirlenen 3'er farklı konsantrasyonunun (1, 2 ve 5 mM) genotoksik etkisi *Drosophila* hemositlerinde KOMET testi ile araştırılmıştır.

2. Materyal ve metot

2.1. Kimyasallar

<50 nm ve <100 nm olmak üzere iki farklı partikül boyutuna sahip Fe₂O₃ NP'leri (CAS No:1309-37-1), pozitif kontrol grubu olarak kullanılan etil metan sülfonat (EMS, CAS No: 62-50-0), etidyum bromür (EtBr), EDTA, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve n-feniltiyoüre Sigma Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Sodyum klorür (NaCl), düşük erime ısısına sahip agar (LMA), normal erime ısısına sahip agar (NMA) ve Tris AppliChem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2. Nanopartikül karakterizasyonu ve konsantrasyonların hazırlanması

Kullanılan Fe₂O₃ NP'lerin partikül boyut ve şekilleri JEOL 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile zeta potansiyelleri de Parçacık Boyut Analiz Cihazı ve Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında görüntülenmiştir.

Toz halde satın alınan Fe₂O₃ NP'leri 10 mM'lık bir konsantrasyonda ana stok hazırlanması için hassas bir terazide (Precisa XB 220A) tartılmış ve distile su ile karıştırılmıştır (1,5969 mg/ml). Ardından karışımın homojen bir şekilde olabilmesi için 1 saat boyunca sonikatörde (Bandelin Sonorex, 35 kHz, 80/320 W) oda sıcaklığında tutulmuştur. Uygulaması yapılan 1, 2 ve 5 mM'lık konsantrasyonlar, hazırlanan bu 10 mM'lık ana stoktan distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar, KOMET testi için *Drosophila* larvalarına uygulanmadan hemen öncesine kadar çökelme olmaması için sonikatörde tutulmuştur.

2.3. *Drosophila melanogaster*

Bu çalışmada KOMET yönteminde *Drosophila* Oregon R+ hattı kullanılmıştır. Fe₂O₃ NP'lerinin uygulaması gerçekleştirilene kadar *Drosophila* kültürü, standart *Drosophila* besiyerinde (Lewis besini: mısır unu, şeker, maya, agar, asit karışımı) (Demir vd., 2015), 25±1°C ve %60 bağıl neme sahip ortamda idame ettirilmiştir.

2.4. *Drosophila* hemositlerinde alkali tek hücre jel elektroforez testi (KOMET)

Bu çalışma kapsamında iki farklı boyuta ve şekle sahip Fe₂O₃ NP'lerinin *Drosophila* hemositlerinde muhtemel DNA tek iplik kırığı oluşturma potansiyeli KOMET testi ile belirlenmiştir. Yeterli miktarda çoğaltılan *Drosophila* Oregon R+ hatlarından taze besinlerde 8 saat boyunca yumurta toplanmıştır. Toplanan yumurtalar 72 ± 4 saatlik larval evreye (3. larval evre) ulaştıklarında iki farklı boyuttaki Fe₂O₃ NP'lerinin 3 farklı konsantrasyonuna (1, 2 ve 5 mM) maruz bırakılmıştır. NP maruziyeti, hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki NP çözeltilerinin 9 mL'si ile ıslatılan 4.5 gramlık *Drosophila* hazır standart besi yerine larvaların aktarılması ile gerçekleştirilmiş ve 25±1°C ve %60 bağıl neme sahip ortamda 24 saat maruziyet gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik maruziyetten sonra larvalar 96±4 saatlik olduklarında 0.2 mm gözenek çapına sahip elek

yardımı ile çeşme suyu altında yıkanarak besi yerinden ayrılması sağlanmış ve larvaların yüzey dezenfeksiyonu amacı ile %5 sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra musluk suyunda yıkanarak hemosit izolasyonuna geçilmiştir. *Drosophila* larvalarından hemositler Irving vd. (2005) metoduna göre toplanmıştır. Her bir uygulama için 40-60 larva seçilerek stereo mikroskop altında iki ince uçlu pens yardımı ile içerisinde %0.07 feniltiyöre bulunan PBS solüsyonu içerisine hemositler toplanmıştır. Hemosit izolasyonundan sonra 300 g'de (10 dk +4°C) santrifüj edilerek elde edilen pellet üzerine soğuk PBS (20 µL) eklenmiştir. Sonra hemositler 80 µL LMA (%0.75) ile karıştırılıp 100'er µL olacak şekilde bir gün önceden NMA (%1) ile kaplanmış olan lamalar üzerine yayılarak lamel ile kapatılmıştır. 10 dk buz üzerinde bekletildikten sonra lameller dikkatli bir şekilde çıkartılarak lamalar üzerine tekrar 80 µL LMA eklenerek lamel ile kapatılmış ve 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda lameller çıkartılmış ve lamalar taze lizis solüsyonuna (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA, %1 Triton X-100 ve %1 N-lauril sarkosinat, pH 10) konularak 1 saat +4 °C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. Lizis aşamasından sonra lamalar soğuk elektroforez tamponu (1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH, pH >13) içerisine alınarak 30 dk bekletilmiş ve sonra hücreler aynı tampon içerisinde 30 dk 25 V 300 mA'de yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra elektroforezden alınan lamalar 400 mM Tris solüsyonu (pH 7.5) içerisinde 5 dk bekletilmiş ve aynı işlem 2 kez daha tekrar edilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak da lamalar 50 µL EtBr (60 µg/mL) ile boyanarak 20 dk +4°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığında birkaç dakika bekletilen preparatların floresan mikroskop (Nikon Eclipse E200) altında değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen preparatlarda her bir uygulama için rasgele 50 hücre olmak üzere 40X büyütmede floresan mikroskop altında KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk yoğunluğu (%DNA) ve kuyruk momenti (iki parametrenin kombinasyonu) parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak 4 mM EMS kullanılırken, negatif kontrol grubu olarak da Fe₂O₃ NP'lerin farklı konsantrasyonları hazırlanırken kullanılan distile su kullanılmıştır.

2.5. İstatiksel analiz

KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçümü sonrasında elde edilen sonuçlar IBM SPSS

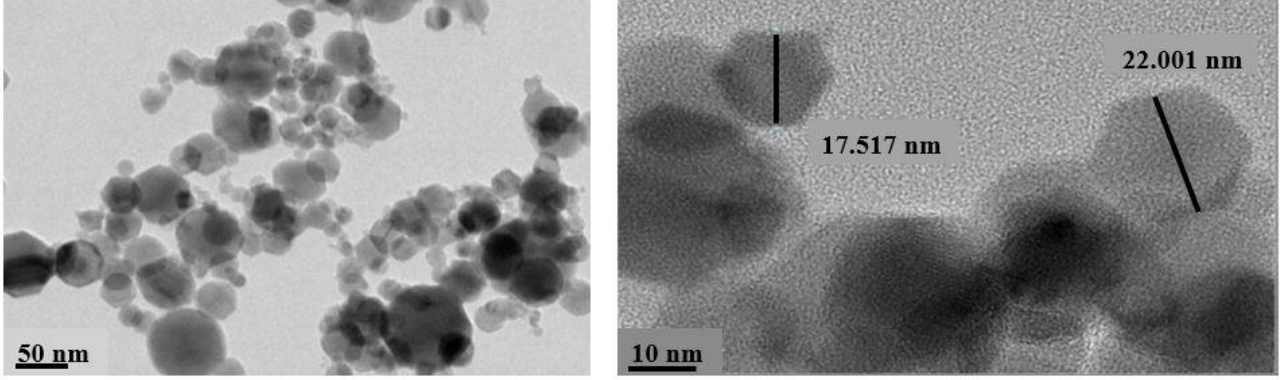
İstatistik 23 paket programı ile One-way ANOVA (Dunnet testi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve tartışma

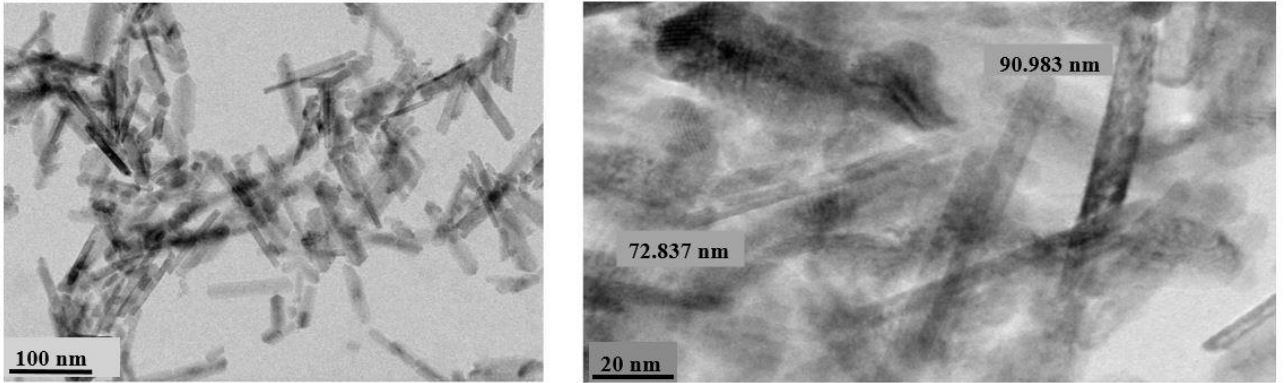
3.1. Nanopartikül karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan Fe_2O_3 NP'lerin partikül boyut ve şekillerinin TEM ile karakterizasyonu sonucunda elde edilen TEM görüntüleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre <50 nm Fe_2O_3 NP'lerinin partikül boyutu yaklaşık 15-

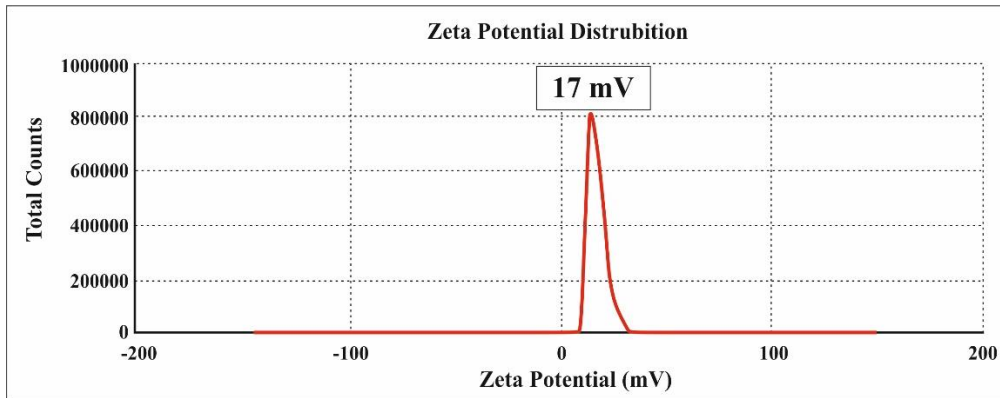
25 nm olarak ölçülmüş ve küre forma sahip oldukları gösterilmiş, <100 nm Fe_2O_3 NP'lerinin partikül boyutu ise yaklaşık olarak 70-90 nm olarak ölçülmüş ve çubuk forma sahip oldukları gösterilmiştir. Zeta potansiyeli analizi sonuçlarına göre, <100 nm Fe_2O_3 NP'lerinin zeta potansiyeli 17 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 3). <50 nm Fe_2O_3 NP'lerinin çökelme potansiyeli çok fazla olduğu için Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı tarafından yapılan analizlerde zeta potansiyel ölçümü gerçekleştirilememiştir.



Şekil 1. <50 nm Fe_2O_3 NP'nin yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü



Şekil 2. <100 nm Fe_2O_3 NP'nin yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü



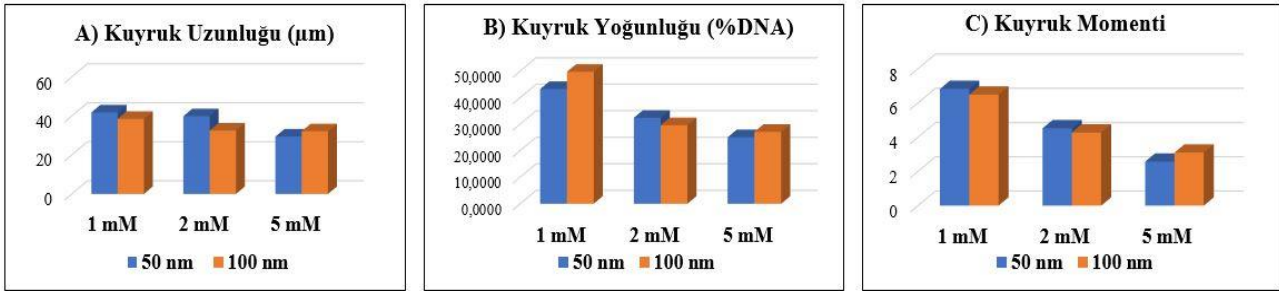
Şekil 3. <100 nm Fe_2O_3 NP'nin zeta potansiyeli

3.2. *Drosophila* hemositlerinde KOMET testi

NP'ler, kimyasal bileşimlerine, kimyasal yapılarına, partikül büyüklüklerine, yüzey alanlarına ve şekillerine göre farklı toksik etkiler gösterebilmektedir (Xia vd., 2008; Rosenkranz vd., 2012). Şekilleri ve boyutları, NP'lerin hücre alımları ve potansiyel toksisitesinde önemli belirleyicilerdir. Çünkü NP'lerin şekilleri hücre zarından girişlerini etkileyebilmekte ve küçük boyutlara sahip olması aynı boyut aralığına sahip olduğu DNA ile etkileşime girerek farklı tepkiler verilmesine yol açabilmektedir (Dong vd., 2019; Bai ve Tang, 2020). NP'lerin toksisitesine bakıldığında bu partiküllerin indüklediği toksik ve genotoksik mekanizmaların sadece DNA ile etkileşime geçerek değil ayrıca mitoz bölünme görev alan proteinleri etkileyerek, ROS (reaktif oksijen türleri) üreterek ve hücrelerdeki antioksidan bariyerinin (Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon (GSH)) kırılmasına neden olarak da gerçekleşebilmektedir (Carmona vd., 2015, 2016). NP'lerin küçük boyutu büyük yüzey alanına sahip olmalarına yol açmakta ve bu da NP'leri biyolojik olarak daha aktif hale getirmektedir. Partiküllerin yüzey kimyası, doğrudan ROS oluşumuna neden olabilmektedir (Singh vd., 2016a). Bu nedenle ROS üretimi ve oksidatif stres hasarı NP toksisitesi için bir paradigma haline gelmiştir (Xia vd., 2008). ROS, DNA hasarı, gen mutasyonu, MN (mikronükleus), kromozom bozuklukları gibi olaylarla genotoksisiteye neden olabilmektedir (Kumari vd., 2014). Özellikle son yıllarda teknolojinin

gelişmesiyle değişen yaşam stili sonucunda, yaygın olarak hayatımıza dâhil olan ve insan sağlığı üzerine potansiyel etkileri hâlâ büyük ölçüde bilinmeyen NP'lerin, çeşitli yöntemler ve model organizmalar kullanılarak farklı etkilerinin saptanması gerekmektedir. Bu nedenlerle, son yıllarda pek çok alanda çeşitli amaçlarla kullanılan NP'lerden Fe₂O₃ NP'lerinin boyut ve şekil farklılığına bağlı olarak genotoksitesinin güvenilir ve hızlı bir test olan KOMET yöntemi ile *in vivo* değerlendirilmesi önemlidir.

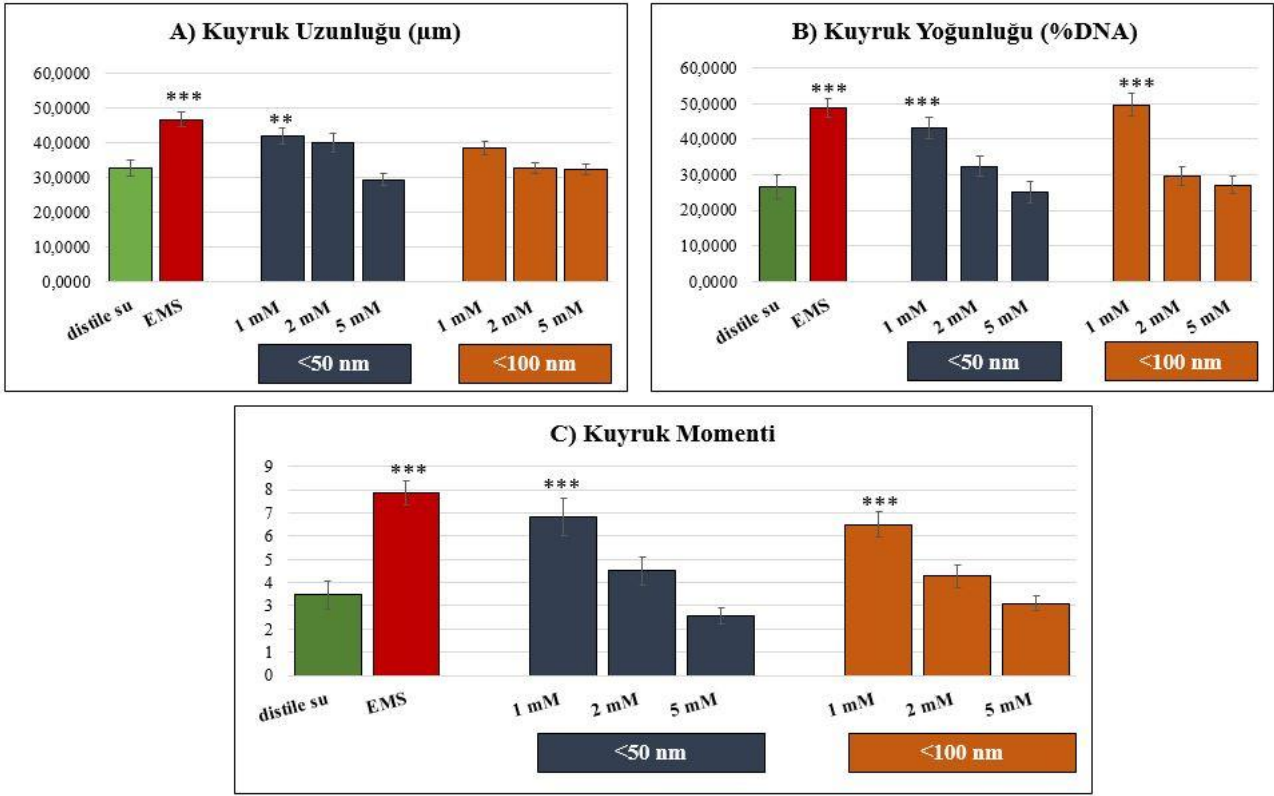
Bu çalışmada *Drosophila* hemositlerinde KOMET ile genotoksik potansiyelleri değerlendirilen Fe₂O₃ NP'lerinin uygulamalarından elde edilen sonuçlar Şekil 4 ve Şekil 5'te gösterilmiştir. Çalışma sonucunda Fe₂O₃ NP'lerinin <50 nm ve <100 nm olmak üzere farklı boyutlarının kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ölçüm sonuçları (Şekil 4) birbiri ile karşılaştırıldığında <50 nm boyutundaki küre formulu Fe₂O₃ NP'lerinin <100 nm boyutundaki çubuk formulu Fe₂O₃ NP'lerine göre DNA hasarını arttırdığı görülmektedir ancak oluşan hasarın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılığa neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu artışın sebebi küçük boyutlu ve küre forma sahip NP'lerin hücre içerisine daha kolay girip intrasellüler membran boyunca daha kolay taşınmasından kaynaklanmaktadır. Hücre içerisine erişimin daha kolay olması da metal iyonlarının doğrudan hücrelere salınmasına ve hasarın oluşmasına yol açmaktadır (Dong vd., 2019; Dlugosz vd., 2020).



Şekil 4. Fe₂O₃ NP'lerinin farklı partikül boyutlarının (<50 ve <100 nm) DNA hasar karşılaştırılması

Uygulanan NP'lerin her iki boyutunun kendi içerisinde farklı konsantrasyonları (1, 2 ve 5 mM) negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise çalışılan en düşük dozda (1mM) DNA hasarının

tüm parametreler açısından (kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti) kontrol grubu distile suya göre anlamlı düzeyde indüklendiği görülmüştür (Şekil 5).



Şekil 5. KOMET yönteminde *Drosophila* hemositlerinde Fe₂O₃ NP'leri uygulamasından sonra meydana gelen DNA hasarı (0.01<*<0.05, 0.001<*<0.01, ***<0.001)

Partikül boyut ve şeklinin yanında, maruz kalınan doz toksisiteyi belirleyen en temel faktörlerdendir. Uygun dozda kullanılmadığı takdirde her madde olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir. Ancak burada çalışma sonucunda uygulanan doz arttıkça oluşan DNA hasarının azaldığı görülmektedir. Doz arttıkça çözeltideki birim hacimdeki Fe₂O₃ NP'lerin miktarı/yoğunluğu artmakta ve kümeleşerek çökme eğilimi göstermektedir (Honary ve Zahir, 2013; Singh, 2016b). Ayrıca NP'ler kararsız olduklarında da kümeleşerek çökmektedir. Bu nedenle NP'lerin toksisitesi değerlendirilirken kararlılıkları da önemli konulardan biridir. Zeta potansiyelinin ölçümü NP'lerin kararlılığı hakkında çıkarım yapmaya olanak sağlamaktadır. NP'ler zeta potansiyeli 30 mV üzerindeki değerlerde ise iyi bir kararlılık sağlarken 20 mV değerinde ise sadece kısa süreli bir kararlılık sağlamaktadır. Bu nedenle NP'ler zeta potansiyeli >20-30 mV arasındaki değerlerdeyken kararlıdır, ancak bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve çökme yoluyla kümeleşme eğilimindedir (Honary ve Zahir 2013). Bu çalışmada kullanılan NP'lerin, kararsız olduklarını ve kümeleşme eğiliminde olduklarını gösteren zeta potansiyel değerlerine (<100 nm Fe₂O₃ NP: 17mV ve <50 nm Fe₂O₃ NP: ölçüm gerçekleştirilemeyecek boyutta bir kararsız) sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada

sadece düşük dozda toksisitenin indüklenip doz arttıkça hasarın azalma sebebi olarak NP'lerin çökerek kümeleşmesi sonucu partikül boyutunun artması ile hücreye girişinin zorlaşmasından ve kümeleşmeye bağlı olarak yüzey alanının azalması etkinliğinin değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1 mM'da meydana gelen etki de Fe₂O₃ NP'lerinin geniş yüzey alanından dolayı yüksek miktarda Fe²⁺ / Fe³⁺ iyonu oluşması ile açıklanabilir. Serbest kalan iyonlar, farklı serbest radikallerin oluşumuna neden olabilmektedir. Demir iyonlarının salınması ile hücre zarları hasara uğrayabilir ve lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek aşırı ROS üretimine yol açabilmektedir (Horie vd., 2012; Abakumov vd., 2018).

Literatürdeki Fe₂O₃ NP'leri ile ilgili çalışmalara bakıldığında çalışmamızı destekler nitelikte yayınlar bulunmaktadır. Yousef vd. (2019) yetişkin erkek Wistar ratları ile yaptıkları araştırma sonucunda Fe₂O₃ NP'lerinin belirgin DNA kırıklarına, mtTFA (mitokondriyal transkripsiyon faktörü A)'nın aşağı doğru-regülasyonuna, PGC-1α (peroksizom çoğaltıcı ile aktive olan reseptör gama koaktivatör 1-alfa) ifadesinin yukarı doğru-regülasyonuna, asetilkolin esteraz, norepinefrin, serotonin, dopamin ve antioksidan enzimlerinde düşüşe, lipit peroksidasyonu, nitrik oksit, tümör

baskılayıcı gen p53, tümör nekroz faktörü- α , interlökin-6, asetilkolin ve norepinefrinde artışına neden olarak farklı yollarla nörotoksisite ve inflamasyona neden olduğunu saptamışlardır. **Wu vd. (2012)** yaptıkları çalışmada *Caenorhabditis elegans* üzerinde DMSA (dimerkaptosüksinik asit) kaplı Fe₂O₃ NP'lerinin gelişim ve davranış hareketleri üzerine etkileri ve ROS üretimine etkisini araştırmışlardır. L4 evre larvalara 24 saat maruziyetten ve L1 evreden erişkinliğe kadar süren maruziyetten sonra sırasıyla 50 µg/L ve 500 µg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda nematodlar üzerinde gelişim, üreme ve hareket davranışlarında bozukluklara ve ROS üretiminde artışa yol açtığını saptamışlardır. Fe₂O₃ NP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada 28 gün boyunca haftada 1 kez maruz bırakılan Wistar ratlarında antioksidan enzim aktivitesinin (SOD, katalaz (CAT) ve GSH) doza bağlı inhibisyonuna ve malondialdehit seviyesinde doza bağlı artışa yol açarak oksidatif strese yol açtığı bulunmuş ancak bizim çalışmamızın aksine KOMET yöntemi ile önemli bir DNA hasarına yol açmadığını bulmuşlardır (**Gaharwar ve Paulraj, 2015**). **Alarifi vd. (2014)** insan meme kanseri hücrelerinde MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]) testi, laktat dehidrogenaz (LDH) testi ve KOMET yöntemi ile Fe₂O₃ NP'lerinin etkilerini araştırdıkları çalışmada konsantrasyon ve zamana bağlı olarak ROS üretiminde ve lipit peroksidasyonunda artış ve SOD, GSH ve CAT aktivitelerinde azalma ile oksidatif stresin indüklendiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde KOMET yöntemi sonucuna göre DNA hasarında doza ve zamana bağlı artışın olduğu ve kaspaz-3 aktivitesinin indüklendiğini göstermişler böylece DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. **Sadeghi vd. (2015a)** çalışmalarında HepG2 (insan karaciğer kanseri) hücre hattı üzerinde Fe₂O₃ NP'lerinin MTT ve LDH testleri ile sitotoksik etkisini araştırmışlar ve hücre canlılığının doza bağlı bir şekilde azaldığını ve ROS üretiminin arttığını saptamışlardır ayrıca fosforile H2AX (H2A ailesinden bir tür histon proteini) ölçümü ile DNA hasarı değerlendirilmiş doza ve zaman bağlı olarak DNA kırıklarında önemli düzeyde artışın olduğunu bulmuşlardır. **Wang vd. (2010)** erkek Wistar ratlarında inhalasyon yolu ile Fe₂O₃ NP'lerine maruziyetin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 3 gün boyunca günde iki kez 8.5 mg/kg maruziyet gerçekleştirmişler ve alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalın fosfataz, toplam protein, kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz seviyelerinde önemli ölçüde azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca karaciğer ve akciğer

dokularında ciddi hasara neden olduğunu saptamışlardır. **Singh vd. (2013)** dişi Wistar ratlarında 30 nm ve kalıp (bulk) formdaki Fe₂O₃ NP'lerinin 500, 1000, 2000 mg/kg maruziyeti sonucunda genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada her iki Fe₂O₃ NP'lerinin de lökositlerde KOMET, periferik kan hücrelerinde MN ve kemik iliği hücrelerinde kromozom anormallikleri (CA) testi sonuçlarına göre tüm dozlarda istatistiksel olarak DNA hasarında artışa yol açmadığını saptamışlar ve bizim çalışmamızın aksine genotoksik potansiyelinin olmadığını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada yetişkin erkek Wistar ratlarında inhalasyon yolu ile Fe₂O₃ NP'lerinin akciğer dokusu üzerine etkileri araştırılmıştır ve doza bağlı olarak akciğer dokusunda serbest radikallerin belirgin şekilde arttığını ve GSH'nin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca histolojik çalışmalar sonucunda da akciğerlerde amfizem, interstisyel hipertermi ve inflamasyonun oluştuğunu bulmuşlardır (**Sadeghi vd., 2015b**). Daha önceki çalışmalarla bu çalışmadan elde edilen bazı sonuçlardaki farklılıklar, çalışılan dozların aynı olmaması ve kullanılan farklı model organizmalar nedeni ile olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler iki farklı nano boyuta ve şekle sahip Fe₂O₃ NP'lerinin genotoksik etkilerinin karşılaştırılması bakımından da ayrı bir öneme sahiptir.

4. Sonuç

Nanoteknoloji endüstrisi yaşam kalitesini yükseltmek için her geçen gün yeni ürünler ortaya koyarken bu ürünlerin yaratabileceği potansiyel toksisitesinin de araştırılmasının önemi göz önünde bulundurulmalıdır. Genotoksisite çalışmaları sırasında yapılan testler farklı prensiplere dayanmaktadır. Sonuç olarak, farklı test sistemleri farklı sonuçlar sunabilir. Bu nedenle nanopartiküllerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini ve oluşabilecek genotoksisitenin etki mekanizmalarının aydınlatılması bakımından daha fazla çalışmanın yapılması önemli olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma FBG-2019-4977 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan Fe₂O₃ NP'leri Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 13.FENBİL.22 numaralı projeden temin edilmiştir.

Kaynaklar

- Abakumov, M.A., Semkina, A.S., Skorikov, A.S., Vishnevskiy, D.A., Ivanova, A.V., Mironova, E., Davydova, G.A., Majouga, A.G. and Chekhonin, V.P. (2018). Toxicity of iron oxide nanoparticles: Size and coating effects. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(12), e22225. <https://doi.org/10.1002/jbt.22225>.
- Alaraby, M., Annangi, B., Marcos, R. and Hernández, A. (2016). *Drosophila melanogaster* as a suitable in vivo model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 19(2), 65-104. <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1166466>.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S. and Alhaber, M.S. (2014). Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biological Trace Element Research*, 159, 416-424. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9972-0>.
- Bai, C. and Tang, M. (2020). Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 37-63. <https://doi.org/10.1002/jat.3910>.
- Carmona, E.R., Inostroza-Blancheteau, C., Rubio, L. and Marcos, R. (2015). Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.006>.
- Carmona, E.R., Inostroza-Blancheteau, C., Rubio, L. and Marcos, R. (2016). Genotoxic and oxidative stress potential of nanosized and bulk zinc oxide particles in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Industrial Health*, 32(12), 1987-2001. <https://doi.org/10.1177/0748233715599472>.
- Caro, C., Egea-Benavente, D., Polvillo, R., Royo, J.L., Leal, M.P. and Garcia-Martin, M.L. (2019). Comprehensive toxicity assessment of PEGylated magnetic nanoparticles for in vivo applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.051>.
- Dahman, Y. (2019). *Biomaterials science and technology fundamentals and developments* (Vol. 1). Boca Raton: CRC Press.
- Demir, E., Aksakal, S., Turna, F., Kaya, B. and Marcos, R. (2015). In vivo genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silica nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.029>.
- Dlugosz, O., Szostak, K., Staron, A., Pulit-Prociak, J. and Banach, M. (2020). Methods for reducing the toxicity of metal and metal oxide NPs as biomedicine. *Materials*, 13(2), 279. <https://doi.org/10.3390/ma13020279>.
- Dong, L., Tang, S., Deng, F., Gong, Y., Zhao, K., Zhou, J., Liang, D., Fang, J., Hecker, M., Giesy, J.P., Bai, X. and Zhang, H. (2019). Shape-dependent toxicity of alumina nanoparticles in rat astrocytes. *Science of the Total Environment*, 690, 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.532>.
- Gaharwar, U.S. and Paulraj, R. (2015). Iron oxide nanoparticles induced oxidative damage in peripheral blood cells of rat. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 8(4), 274-286. <https://doi.org/10.4236/jbise.2015.84026>.
- Güneş, M., Yalçın, B., Ertuğrul, H. and Kaya, B. (2018). Ascorbic acid ameliorates genotoxic effects of cobalt nanoparticles and cobalt chloride in in vivo *Drosophila* assays. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 2380-2391.
- Ertuğrul, H., Yalçın, B., Güneş, M. and Kaya, B. (2020). Ameliorative effects of melatonin against nano and ionic cobalt induced genotoxicity in two in vivo *Drosophila* assays. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(3), 279-286. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1585444>.
- Honary, S. and Zahir, H. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems- a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265-273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- Horie, M., Fujita, K., Kato, H., Endoh, S., Nishio, K., Komaba, L.K., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Hagihara, Y., Niki, E., Yoshida, Y. and Iwahashi, H. (2012). Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*, 4(4), 350-360. <https://doi.org/10.1039/c2mt20016c>.
- Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C. and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology*, 7(3), 335-350. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x>.
- Johnston, B.D., Scown, T.M., Morger, J., Cumberland, S.A., Baalousha, M., Linge, K., van Aerle, R.,

- Jarvis, K., Lead, J.R. and Tyler, C.R. (2010). Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. *Environmental Science and Technology*, 44(3), 1144–1151. <https://doi.org/10.1021/es901971a>.
- Ju-Nam, Y. and Lead, J.R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, 400(1-3), 396–414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042>.
- Karlsson, H.L., Di Bucchianico, S., Collins, A.R. and Dusinska, M. (2015). Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 82-96. <https://doi.org/10.1002/em.21933>.
- Karlsson, H.L. (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 651-666. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3977-0>.
- Katz, E. (2019). Synthesis, properties and applications of magnetic nanoparticles and nanowires—A brief introduction. *Magnetochemistry*, 5(4), 61. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040061>.
- Kumari, M., Kumari, S.I. and Grover, P. (2014). Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*, 29(6), 467–479. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu038>.
- Ma, H., Diamond, S., Hinkley, G. and Roberts, S.M. (2015). *Nanotoxicology*. Roberts, S.M., James, R.C., Williams, P.L. (Ed.), Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications (s. 359-372)., Canada: John Wiley and Sons.
- PubMed. (2020, 31 Ekim). Iron oxide nanoparticle, Results by year. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=iron+oxide+nanoparticles>.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>.
- Rosenkranz, P., Fernández-Cruz, M.L., Conde, E., Ramírezfernández, M.B., Flores, J.C., Fernández, M. and Navas, J.M. (2012). Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology. *Toxicology in vitro*, 26(6), 888–896. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.019>.
- Sadeghi, L., Tanwir, F. and Babadi, V.Y. (2015a). In vitro toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on HepG2 cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.11.010>.
- Sadeghi, L., Yousefi Babadi, V. and Espanani, H.R. (2015b). Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislavske Lekarske Listy*, 116(6), 373 – 378. https://doi.org/10.4149/BLL_2015_071.
- Scherer, M.D., Sposito, J.C.V., Falco, W.F., Grisolia, A.B., Andrade, L.H.C., Lima, S.M., Machado, G., Nascimento, V.A., Gonçalves, D.A., Wender, H., Oliveira, S.L. and Caires, A.R.L. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of the Total Environment*, 660, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.444>.
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A. and Nabiev, I. (2018). Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>.
- Shukla, A.K., Pragma, P. and Chowdhuri, D. (2011). A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 726(2), 222-226. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.017>.
- Singh, A.K. (2016a). Structure, synthesis, and application of nanoparticles. Singh, A.K. (Ed.), *Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity* (s. 19-76). USA: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00002-9>.
- Singh, A.K. (2016b). Mechanisms of nanoparticle toxicity. Singh, A.K. (Ed.), *Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity* (s. 295-341). USA: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00007-8>.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G, Wright, C.J. and Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23-24), 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>.
- Singh, S.P., Rahman, M.F., Murty, U.S.N. and Grover, P. (2013). Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron

- oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(1), 56–66.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.016>.
- Wang, L., Wang, L., Ding, W. and Zhang, F. (2010). Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), 8617–8624.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2483>.
- Wu, Q., Li, Y., Tang, M. and Wang, D. (2012). Evaluation of environmental safety concentrations of DMSA coated Fe₂O₃-NPs using different assay systems in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plos One*, 7(8), e43729.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043729>.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I. and Nel, A.E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2(10), 2121-2134.
<https://doi.org/10.1021/nn800511k>.
- Yousef, M.I., Abuzreda, A.A. and El-Nabi Kamel, M.A. (2019). Neurotoxicity and inflammation induced by individual and combined exposure to iron oxide nanoparticles and silver nanoparticles. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 570-578.
<https://doi.org/10.1080/16583655.2019.1602351>.