

NiFe₂O₄ Nanokompozitinin Olası Toksik Etkisine Karşı Oleuropein'in Koruyucu Rolü

Burhan NAS¹, Deniz ALTUN ÇOLAK^{2*}

¹Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan, Türkiye

²Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

(Geliş Tarihi/Received: 11.10.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 07.11.2016)

ÖZET

Nikel demiroksit (NiFe₂O₄) nanokompozitinin fotoelektrik cihazlar ve sensörlerin yapımı ile modern sanayi alanından manyetik rezonans görüntüleme ve hedeflenmiş ilaç tedavisi gibi biyomedikal uygulamalara kadar hayatımızın pek çok önemli alanında kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada, metal oksit nanopartiküller arasında yer alan NiFe₂O₄ (30 nm) nanopartikülünün *Drosophila melanogaster*'in yabancıl soyu üzerinde olası toksik etkisine karşı zeytin yaprağından elde edilen Oleuropein'in koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, *D. melanogaster* larva ve ergin bireylerine farklı konsantrasyonlarda NiFe₂O₄ (25, 50, 75, 100, 200 ve 500 µg/mL) ve Oleuropein (100 µM) uygulanarak yaşama yüzdesi ve yavru birey sayısı deneyleri yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sonuçların istatistiksel analizleri için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda yaşama yüzdesi deneylerinden elde edilen verilere göre, larvalara uygulanan NiFe₂O₄ nanopartikülünün tüm konsantrasyonları kontrole göre yaşam yüzdesini azaltırken, Oleuropein uygulaması yaşama yüzdesini arttırmıştır. Bununla birlikte, etkisi araştırılmak üzere bir deney setinde yalnızca ergin dişi bireylere, diğer deney setinde ise yalnızca ergin erkek bireylere NiFe₂O₄ ve Oleuropein uygulamalarının yapıldığı yavru birey sayısı deneyleri sonucunda, NiFe₂O₄ nanokompozitinin konsantrasyon artışına bağlı olarak F₁ neslinde toplam yavru döl sayısının azaldığı, Oleuropein uygulanan deney setlerine ait F₁ neslinde ise bu sayının artarak kontrole yaklaştığı görülmüştür ($p < 0.05$). Yaşama yüzdesi ve yavru birey sayısı deneylerinde NiFe₂O₄ nanokompozitinin toksik etkisine karşı serbest radikal oluşumunu engelleme ve detoksifikasyon enzimlerini uyarma özelliği bulunan Oleuropein'in koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Drosophila melanogaster*, NiFe₂O₄, Oleuropein, Yaşama Yüzdesi, Yavru Birey Sayısı.

Protective Role of Oleuropein Against the Potential Toxicity of NiFe₂O₄ Nanocomposite

ABSTRACT

Nickel iron oxide (NiFe₂O₄) nanocomposites are known to be used in many important areas of our lives from photoelectric devices and modern industrial area to magnetic resonance imaging and to biomedical applications like targeted drug therapy. In this study, whether Oleuropein, derived from olive leaves have preventive effect on *Drosophila melanogaster* wild type strains against the possible toxic effects one of metal oxide nanoparticles, NiFe₂O₄ (30 nm) were investigated. For this purpose, different concentrations of NiFe₂O₄ (25, 50, 75, 100, 200 and 500 µg/mL) and Oleuropein (100 µM) were used to

investigate the percentage of life span and the number of the offspring on *D. melanogaster* larvae and adults. For statistical analysis of the control and treatment groups' results One-way analysis of variance (ANOVA) and based on data obtained from the input data, all applied concentrations of nanoparticles $NiFe_2O_4$ reduce the percentage of living when compares the control group, and applied Oleuropein increased the survival rate of the larvae. However, to investigate the effect of the $NiFe_2O_4$ and Oleuropein on the number of the offspring, in a set of experiment only adult female individuals were subjected to $NiFe_2O_4$ and Oleuropein while in the other set of experiment only male individuals do. In parallel with the increased concentration of $NiFe_2O_4$ reduce the number of offspring of the F_1 generation in total and in Oleuropein applied groups it increased the number of offspring belong to F_1 generation approaching the control ($p < 0.05$). In the lifespan and number of offspring studies, against the toxic effect of $NiFe_2O_4$ nanocomposites, Oleuropein is thought to have a protective role by of blocking the formation of free radicals and inducing the detoxification enzymes.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, $NiFe_2O_4$, Oleuropein, Lifespan, Number of Offspring.

1. Giriş

Nanoteknoloji; ölçeği küçük etkisi büyük olan, maddeyi yeniden şekillendiren ve temel özelliklerini değiştiren bir dünyadır. Geleceğin anahtarı olarak kabul edilen nanoteknoloji ile fotokatalitik kirlenmeyen maddeler, nanotüpler, grafin, atomik anahtarlar, nano gözetleme, nano ilaçlar gibi hastalıkları anında tespit ve tedavi eden ürünler elde edilmeye başlanmıştır (Yin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Hajalilou *et al.*, 2014). Her yeni teknoloji, sunduğu fırsatlarla birlikte çeşitli riskleri de beraberinde getirmektedir. Nanoteknoloji günümüzde kullanılan teknolojilerin yeniden şekillenmesini sağlamakla birlikte, kullanımı yaygınlaştıkça bu teknolojinin çevreye, doğaya ve organizmalara verdiği zararın boyutu da artacaktır. Bu sebeple, nanoteknolojinin imkânlarından azami ölçüde istifade ederken, nanoteknolojiden kaynaklanan sorunlar ortaya çıkmadan önce gerekli önlemler alınarak çalışmaların yapılması, geriye dönüşü mümkün olmayan felaketlerin önüne geçilmesini sağlayacaktır

(Berk ve Akkurt, 2012). Nanopartiküller nano boyutlarından dolayı fonksiyonellik, eşsiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin bir sonucu olarak büyük oranda dikkat çekmiştir. Metal esaslı nanomateryaller mevcut özelliklerinden dolayı tüm bilim dallarında yeni bir ilgi alanı oluşturmuş ve bu nanopartiküller yeni pratik ürünlerin geliştirilmesine imkân sağlamıştır. Nanoteknolojinin kullanım alanının genişliği ve hızla gelişip yayılması göz önünde bulundurulduğunda, nanopartiküllerin toksikolojik etkilerinin belirlenmesi çevre ve halk sağlığını korumada oldukça önemlidir. Bu nedenle, son yıllarda özellikle metal nanopartiküllerin canlılar üzerindeki sitotoksitesite ve genotoksitesitesini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sayısının giderek arttığı görülmektedir. Nikel Demir Oksit ($NiFe_2O_4$) nanokompoziti, manyetik ekstraksiyon, manyetik rezonans görüntüleme, hücre etiketleme, ilaç dağılımı ve kanser tedavi yöntemlerinden biri olan hipertermi dahil olmak üzere pek çok alanda

yaygın kullanıma sahiptir (Willard *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2007; Chertok *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). NiFe₂O₄ nanokompozitinin kullanım alanlarının sürekli artmasına rağmen hücresel ve moleküler düzeyde toksisite çalışmalarının az olması ise ciddi bir eksiklik (Yin *et al.*, 2005; Baldi *et al.*, 2007; Tomitaka *et al.*, 2009; Beji *et al.*, 2010).

Bu çalışmada, yaygın kullanım alanına sahip olan ancak toksik etkileri üzerinde yeterli çalışma bulunmayan nikel demir oksit nanokompozitinin (NiFe₂O₄) *Drosophila melanogaster*'de olası toksik etkisine karşı güçlü bir antioksidan olan Oleuropein'in (OLE) koruyucu rolü belirlenmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Deney Gruplarına Uygulanan Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

NiFe₂O₄ nanokompozitinin ve OLE'nin *D. melanogaster* larvaları üzerine LD50 dozunu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyon aralıklarında (5- 500 µg/mL) 24 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Uygulamalar sonucunda NiFe₂O₄ için tespit edilen LD50 dozuna (100 µg/mL) göre, çalışma konsantrasyonları 25, 50, 75, 100, 200 ve 500 µg/mL olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde iyileştirici olarak kullanılacak Oleuropein'in doz miktarı da 100 µM olacak şekilde belirlenmiştir.

2.2. NiFe₂O₄ ve Oleuropein'in Sulu Süspansiyonlarının (Test Çözeltilerinin) Hazırlanması

İstenilen konsantrasyonlarda stok çözeltisi hazırlamak için test maddesi olan NiFe₂O₄ nanopartikülleri deiyonize suda dispersiyonla hazırlanmıştır. NiFe₂O₄ ve OLE'nin suda çözünmesini artırarak maksimum dağılımını sağlamak için ultrasonik su banyosu kullanılmıştır. Su banyosunda 48 saat bekletilen stok çözeltiler daha sonra +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

2.3. Ergin Sineklerin Toplanması

Deneysel olarak kullanılan sinekler, *D. melanogaster*' in Oregon R soyuna ait dişi ve erkek bireylerdir. Sineklerin toplanabilmesi için Standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) içeren kültür şişelerinde 5 ♀ X 5 ♂ şeklinde çaprazlamalar yapılarak ön stoklar oluşturulmuştur. Pupadan çıkan aynı yaşlı (1-3 günlük) çiftleşmemiş dişi ve erkek sinekler, her deney grubu ve bunlara ait kontrol grupları için ayrı ayrı toplanmış ve deneylerimiz için kullanılacak bütün sinekler hazırlanmıştır. Çalışmalar sırasında sinekler sadece, eşleştirme, aktarma, virjin toplama, larva toplama işlemleri için aydınlık ortama alınmıştır. Stokların yenilenme işlemi, ortalama her 15 günde bir tekrarlanmıştır.

2.4. Yavru Döl Sayısı Deneyleri

NiFe₂O₄ nanokompozitinin ve OLE'nin dişi ve erkek bireylerde yavru döl sayısı üzerine olan etkileri ömür uzunluğu deneylerinde olduğu gibi dişi ve erkek populasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Kontrol ve uygulama grupları 25, 50, 75, 100, 200 ve 500 µg/mL NiFe₂O₄; OLE ve NiFe₂O₄+OLE için 5 ♀ X 5 ♂ bireyin

kullanıldığı deney setleri oluşturulmuştur. Her uygulama grubunda, bir deney setinde sadece dişi bireylere kimyasal uygulanırken, aynı uygulama grubuna ait diğer deney setinde yalnızca erkek bireylere kimyasal uygulanmıştır. Kimyasal uygulaması yapılırken; taze hazırlanmış 25 mL besiyerlerine, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik NiFe₂O₄ ve 100 µM'lık OLE çözeltilerinden pipet yardımıyla 2.5 mL alınarak karıştırılmıştır. Aynı şekilde NiFe₂O₄+OLE uygulaması için 2.5 mL OLE ve 2.5 mL NiFe₂O₄ içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Kimyasala maruz bırakılmayan deney setindeki bireyler ise Standart *Drosophila* Besiyerine alınmıştır. Tüm uygulama gruplarına ait kültür şişeleri, 25±1°C ve %40-60 bağıl neme sahip etüvde 5 gün aydınlığa çıkarılmadan bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, her uygulama grubunda; önce kimyasalda beslenen dişilerle Standart *Drosophila* Besiyerinde beslenen erkekler daha sonra da kimyasalda beslenen erkeklerle Standart *Drosophila* Besiyerinde beslenen dişiler, taze besiyerlerine alınarak çiftleştirilmiştir. Çiftleştirme işleminde 5 ♀♀ X 5 ♂♂ birey kullanılmıştır. 5 gün sonra ebeveynler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tekrar etüve alınan kültür şişelerindeki pupa gelişimi takip edilerek, ilk ergin bireyin çıktığı andan itibaren, sinekler 7 gün boyunca eşeylerine göre ayrılarak sayım yapılmıştır. Deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

2.5. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneyleri

Yaşama yüzdesi deneyleri için önceden stok halinde elde edilmiş 1-3 günlük çiftleşmemiş

Drosophila bireyleri 5 ♀♀ X 5 ♂♂ olacak şekilde taze besiyerlerine aktarılarak 3 gün boyunca 25±1°C ve %40-60 bağıl neme sahip etüvde tutulmuştur. 3. günün sonunda larvaları toplamak için ebeveynler besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra temiz bir petri kabına distile su konularak, 3. evre larvalarını (72±4 saatlik) barındıran besiyerlerinden bir parça alınarak distile suda larvaların ayrılması sağlanmıştır. Kontrol ve uygulama grupları için 100 larva sayılmıştır. Kültür ortamları; 25 mL besiyerlerine, 25, 50, 75, 100, 200 ve 500 µg/mL'lik NiFe₂O₄ çözeltilerinden pipet yardımıyla 2.5 mL alınarak karıştırılıp hazırlanmıştır. OLE'nin iyileştirici etkisini gözlemlemek için hazırlanan iki uygulama grubunda birinci besiyerine ise 2.5 mL OLE ve 2.5 mL NiFe₂O₄, ikinci besiyerine ise sadece 2.5 mL OLE eklenmiştir. Daha sonra sayılan larvalar bu kültür ortamlarına gömülmüştür. Kontrol grubundaki larvalar ise Standart *Drosophila* Besiyerine gömülmüştür. Şişelerin ağızları pamuk tıkaçlarla kapatılmış ve etüvlere konularak larvaların ergin hale ulaşması sağlanmıştır. Bu süreçte tüm deney grupları her gün kontrol edilerek kültür şişelerinde görülen ilk ergin sinek çıkışından itibaren 7 gün sayım yapılmıştır. Sayım, günde iki kez, dişi ve erkek ayrımı yapılarak not edilmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

2.6. İstatistiksel Analiz

Gelişim parametreleri deneylerinden elde edilen verilerle ilgili istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarının ortalama

ömür uzunluğu değerlerini karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ değeri dikkate alınmıştır. Hayatta kalış eğrileri ile F1 nesillerine ait birey sayılarını gösteren grafikler de Microsoft Windows Office- Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

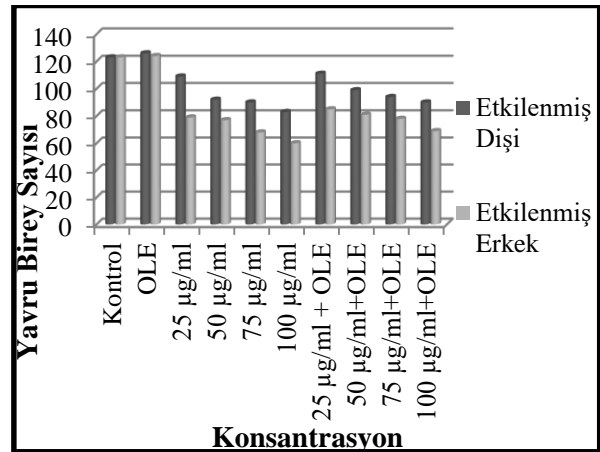
3. Bulgular

Bu çalışmanın ilk aşamasında, $NiFe_2O_4$ nanokompozitinin *D. melanogaster*'in yavru döl sayısı ve yaşama yüzdesi üzerine etkileri araştırılmış, ikinci aşamasında ise $NiFe_2O_4$ nanokompozitinin olası toksik etkilerinin OLE ile giderilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

3.1. Yavru Döl Sayısı Denejlerinden Elde Edilen Bulgular

Çalışmanın bu aşamasında, yalnızca SDB içeren kontrol, OLE (100 μM), farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, ve 100 $\mu g/mL$) $NiFe_2O_4$, ve $NiFe_2O_4+OLE$ içeren uygulama grupları için 5 dişi ile 5 erkek çaprazlaması yapılmıştır. Elde edilen verilere göre sadece dişi bireylere farklı konsantrasyonlarda $NiFe_2O_4$ uygulamasının yapıldığı tüm deney setlerinde toplam yavru döl sayısının kontrole göre düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca OLE uygulamasına maruz bırakılan dişilerde yavru döl sayısının kontrolden daha fazla olduğu, $NiFe_2O_4+OLE$ uygulamasına maruz bırakılan dişilerde ise yavru döl sayısının kontrole yaklaştığı görülmüştür. Birey sayısındaki bu farklılık, hem kontrol grubu ile deney grupları hem de

deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 1). Dişilerde en fazla yavru döl sayısının 126.67 \pm 3.75 birey ile OLE grubuna ait olduğu, en az yavru döl sayısının ise 83.33 \pm 1.20 birey ile 100 $\mu g/mL$ 'lik uygulama grubuna ait olduğu görülmektedir. Sadece erkek bireylere $NiFe_2O_4$ uygulamasının yapıldığı deney setlerinde de yavru döl sayısının $NiFe_2O_4$ konsantrasyonuna paralel olarak kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği saptanmıştır (Tablo 1). Aynı şekilde OLE grubundaki yavru döl sayısının kontrolden fazla olduğu, $NiFe_2O_4+OLE$ grubuna ait yavru döl sayısının ise kontrole yaklaştığı görülmüştür. Erkek bireylerde en fazla yavru döl sayısı OLE grubunda 124.33 \pm 2.33 birey olarak ölçülmüşken en az yavru döl sayısı ise 100 $\mu g/mL$ 'lik uygulama grubunda 60.00 \pm 0.57 birey olarak ölçülmüştür.



Şekil 1. $NiFe_2O_4$ ve $NiFe_2O_4+OLE$ 'nin *D. melanogaster*'in yavru döl sayısı üzerine etkisi

Bu değerler yalnızca etkilenmiş dişi populasyon için $r = -0.514$ ve yalnızca etkilenmiş erkek populasyon için $r = -0.559$ olarak belirlenmiştir ($p < 0.01$).

Şekil 1’de dişi ve erkek bireyler karşılaştırıldığında erkek bireylerin NiFe₂O₄ nanokompozitinden daha fazla etkilendiği görülmektedir ($p < 0.05$). Ayrıca yalnızca etkileniş dişi populasyon ve yalnızca

etkilenmiş erkek populasyona ait deney setlerinden elde edilen toplam yavru birey sayısı ile NiFe₂O₄ konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Tablo 1. NiFe₂O₄ ve NiFe₂O₄+OLE’nin *D. melanogaster*’in yavru döl sayısı üzerine etkisi

Konsantrasyon	Etkilenmiş Dişi Populasyon			Etkilenmiş Erkek Populasyon			
	♀♀ Birey Sayısı	♂♂ Birey sayısı	Toplam Birey Sayısı	♀♀ Birey Sayısı	♂♂ Birey sayısı	Toplam Birey Sayısı	
KONTROL	KONTROL	71.00±8.18 ^a	52.33±1.20 ^a	123.33±8.81 ^a	71.00±8.18 ^a	52.33±1.20 ^a	123.33±8.81 ^a
	OLE (100 µM)	74.33±4.91 ^a	52.33±2.02 ^a	126.67±3.75 ^a	76.00±2.64 ^a	48.33±0.88 ^a	124.33±2.33 ^a
	25µg/mL	69.00±1.73 ^a	40.33±2.02 ^{bc}	109.33±0.33 ^b	44.33±2.02 ^b	35.33±2.40 ^{bc}	79.67±0.88 ^b
NiFe ₂ O ₄	50µg/mL	56.67±2.02 ^{bcd}	35.33±3.18 ^c	92.00±1.15 ^{cd}	41.00±2.08 ^b	36.67±1.76 ^{bc}	77.67±0.33 ^{bcd}
	75µg/mL	49.67±3.75 ^{bcd}	40.33±4.09 ^{bc}	90.00±0.57 ^{cd}	38.67±0.66 ^b	30.00±2.08 ^{cd}	68.67±1.45 ^{de}
	100µg/mL	47.00±1.52 ^d	36.33±2.33 ^c	83.33±1.20 ^d	34.33±1.66 ^b	25.67±1.76 ^d	60.00±0.57 ^e
NiFe ₂ O ₄ +OLE	25µg/mL+100µM	59.67±1.85 ^{ab}	52.00±1.15 ^a	111.67±0.88 ^b	44.33±0.66 ^b	41.00±1.52 ^b	85.33±0.88 ^b
	50µg/mL+100µM	56.33±0.88 ^{bcd}	43.00±2.30 ^{bc}	99.33±1.45 ^c	41.67±3.52 ^b	39.67±3.28 ^b	81.33±0.33 ^b
	75µg/mL+100µM	49.67±2.72 ^{bcd}	45.00±3.78 ^{ab}	94.67±1.20 ^c	40.67±2.33 ^b	37.67±2.60 ^b	78.33±0.33 ^{bc}
	100µg/mL+100µM	46.67±0.88 ^d	43.33±1.20 ^{bc}	90.00±0.57 ^{cd}	39.67±3.48 ^b	29.67±3.18 ^{cd}	69.33±0.33 ^{cd}
M							

^{a-c}: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.2. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

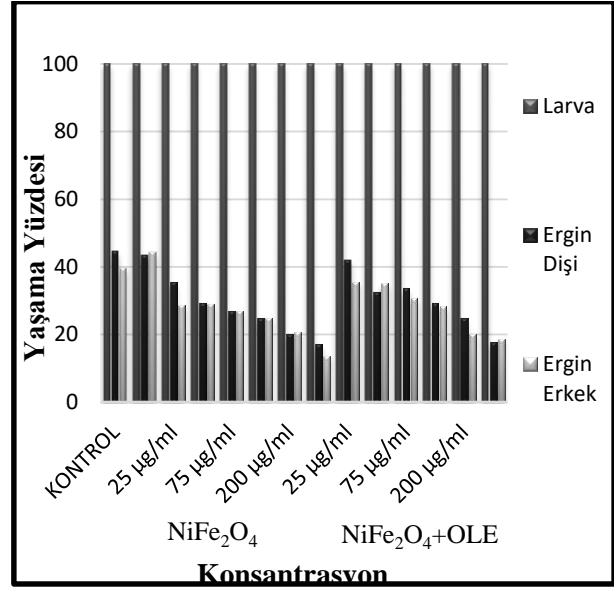
Bu aşamada NiFe₂O₄ nanokompozitinin ve OLE’nin larvadan ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 72 saatlik 100’er adet larva hem kontrol hem de farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100,

200 ve 500 µg/mL) NiFe₂O₄, OLE (100 µM) ve NiFe₂O₄+OLE içeren uygulama gruplarına ait besiyerlerine konulmuştur. Tüm gruplarda larvadan ergine gelişebilen bireyler dişi ve erkek olarak ayrı ayrı sayılmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre hayatta kalış oranları Tablo 2 ve Şekil 2’de verilmiştir. Larvadan ergine gelişebilen hem dişi hem erkek birey sayıları ile NiFe₂O₄

konsantrasyonu arasında da negatif bir korelasyon olduğu istatistiksel olarak bulunmuş ve bu değerlerin dişiler için $r = -0.497$ iken erkekler için ise $r = -0.492$ olduğu görülmüştür ($p < 0.01$). Yaşama yüzdesi deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubunda erginleşen birey sayısı 84.33 ± 0.88 olup, bu bireylerden 39.67 ± 2.02 'si erkek ve 44.67 ± 1.85 'i dişidir. OLE grubunda ise erginleşen birey sayısı 87.67 ± 2.90 olup bu bireylerden 44.33 ± 1.76 'sı erkek ve 43.33 ± 1.33 'ü dişidir. Tablo 2 incelendiğinde, $25 \mu\text{g/mL}$ 'lik uygulama grubunda erginleşen birey sayısı 64.00 ± 0.57 olup bunlardan 28.67 ± 1.33 'ü erkek ve 35.33 ± 0.88 'i dişidir. En yüksek konsantrasyon olan $500 \mu\text{g/mL}$ 'lik uygulama grubunda erginleşen birey sayısı 13.67 ± 1.33 'ü erkek ve 7.00 ± 0.57 'si dişisi olmak üzere toplam 30.67 ± 1.85 bireydir. Son olarak $25 \mu\text{g/mL} + 100 \mu\text{M}$ grubundan çıkan toplam birey sayısı 77.33 ± 0.88 olup bu bireylerin 35.33 ± 2.18 'i erkek ve 42.00 ± 3.00 'i dişisi iken $500 \mu\text{g/mL} + 100 \mu\text{M}$ $\text{NiFe}_2\text{O}_4 + \text{OLE}$ grubundan çıkan toplam birey sayısı 36.33 ± 0.66 olup bu bireylerin 18.67 ± 0.66 'sı erkek ve 17.67 ± 0.66 'sı dişidir.

Sonuç olarak, NiFe_2O_4 nanokompozitinin *D. melanogaster*'e ait larvaların yaşama yüzdesi üzerinde konsantrasyon artışına paralel olarak toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca OLE grubundaki yaşama yüzdesinin kontrol grubundan fazla, $\text{NiFe}_2\text{O}_4 + \text{OLE}$ grubundaki yaşama yüzdesinin ise kontrol grubuna yakın olduğu da gözlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeye göre de kontrol ve deney

grupları arasındaki bu fark $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır.



Şekil 2. NiFe_2O_4 ve $\text{NiFe}_2\text{O}_4 + \text{OLE}$ 'nin *D. melanogaster*'de yaşama yüzdesi oranları

Larvadan ergine gelişebilen hem dişi hem erkek birey sayıları ile NiFe_2O_4 konsantrasyonu arasında da negatif bir korelasyon olduğu istatistiksel olarak bulunmuş ve bu değerlerin dişiler için $r = -0.497$ iken erkekler için ise $r = -0.492$ olduğu görülmüştür ($p < 0.01$).

Tablo 2. NiFe₂O₄ ve NiFe₂O₄+OLE'nin *D. melanogaster*'de yaşama yüzdesi üzerine etkisi

Konsantrasyon		Ortalama Yaşama Yüzdesi±Standart Hata		
		♂♂ Populasyon	♀♀ Populasyon	Toplam Populasyon
KONTROL	KONTROL	39.67±2.02 ^b	44.67±1.85 ^a	84.33±0.88 ^b
	OLE (100 µM)	44.33±1.76 ^a	43.33±1.33 ^a	87.67±2.90 ^a
NiFe₂O₄	25 µg/mL	28.67±1.33 ^{de}	35.33±0.88 ^b	64.00±0.57 ^d
	50 µg/mL	29.00±2.00 ^{de}	29.33±2.33 ^{cd}	58.33±0.88 ^e
	75 µg/mL	27.00±0.57 ^{de}	27.00±1.15 ^{de}	54.00±0.57 ^f
	100 µg/mL	24.67±1.66 ^{ef}	24.67±1.85 ^e	49.33±0.33 ^g
	200 µg/mL	20.67±0.88 ^{fg}	20.00±0.57 ^f	40.67±0.33 ⁱ
	500 µg/mL	13.67±1.33 ^h	17.00±0.57 ^f	30.67±1.85 ^k
	25 µg/mL +100 µM	35.33±2.18 ^c	42.00±3.00 ^a	77.33±0.88 ^c
NiFe₂O₄ + OLE	50 µg/mL +100 µM	35.00±1.52 ^c	32.33±1.20 ^{bc}	67.33±0.33 ^d
	75 µg/mL +100 µM	30.67±0.66 ^d	33.67±0.88 ^{bc}	64.33±0.33 ^d
	100 µg/mL +100 µM	28.33±0.88 ^{de}	29.33±0.33 ^{cd}	57.67±0.66 ^e
	200 µg/mL +100 µM	20.00±0.57 ^g	24.67±0.66 ^e	44.67±0.88 ^h
	500 µg/mL +100 µM	18.67±0.66 ^g	17.67±0.66 ^f	36.33±0.66 ^j

^{a-k}: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

4. Sonuçlar ve Tartışma

Demir bazlı metal oksit nanopartiküllerin toksik etkileriyle ilgili literatür sınırlı sayıdadır. Yapılan bir çalışmada, 0- 100 µg/mL konsantrasyon aralığında NiFe₂O₄ nanokompozitinin A549 hücrelerinde sitotoksikite ve oksidatif strese neden olduğu, 5- 25 µg/mL konsantrasyon aralığında ise

artan doza bağlı olarak HepG2 ve MCF-7 hücre hatlarında sitotoksikiteye neden olduğu gösterilmiştir (Ahamed *et al.*, 2011; Ahamed *et al.*, 2015). HeLa hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, koloni oluşturma ve hücre canlılığı deneylerinde 100 µg/mL konsantrasyonda Fe₂O₃ (20- 30 nm), ZnFe₂O₃ (15- 20 nm) ve NiFe₂O₃ (20- 30 nm)

nanokompozitlerinin toksik olduğu belirlenmiştir (Tomitaka *et al.*, 2009). Pek çok nanopartikülün omurgasız organizmaların ömür uzunluğu ve morfolojileri üzerine olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (Özkan *et al.* 2015; Dağlıoğlu *et al.* 2016; Özkan *et al.* 2016). Yine, zebra balığı (*Danio rerio*) üzerinde 31 nanopartikülün toksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise NiFe₂O₃, Fe₂O₃ ve NiO (> 50 nm) nanopartiküllerinin toksik olduğu tespit edilmiştir (Kovrižnych *et al.*, 2013). He *et al.*, (2011) tarafından metal oksit nanopartiküller arasında yer alan Fe₂O₃ nanopartiküllerinin *E. coli*'de mutasyon sıklığını artırıp protein ve DNA yapısında değişime sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra, insan beyin, kalp ve böbrek hücreleriyle yapılan çalışmalarla Fe₂O₃ nanopartiküllerinin biyoyumlu olup çok düşük toksisitesiye sahip olması sebebiyle metal nanopartikül kaplamalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir (Mahmoudi *et al.*, 2009). Benzer şekilde, insan akciğer epitel hücre hattında (A549) birçok metal oksitin toksisitesi incelediğinde 20- 80 µg/mL konsantrasyonlar arasında Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ (20- 60 nm) nanopartiküllerinin sıfır veya çok düşük toksisite gösterdiği (Karlsson *et al.*, 2008), sıçan karaciğer ve böbrek hücrelerinde 1 mL/kg FeO (7.5 nm) nanopartikülünün herhangi toksisitesine rastlanmadığı (Popa *et al.*, 2016) bulunmuştur.

Zeytin yaprağından elde edilen ve güçlü bir antioksidan olan Oleuropein maddesinin farelerde kanserli hücrelerin yayılmasını ve tümör büyümesini inhibe ettiği (Kimura *et al.*, 2009); insanlarda karaciğer, prostat ve meme kanseri üzerinde antitümör etkisinin olduğu (Köçkar *et al.*, 2010) ve *D. melanogaster*'de metal oksit nanopartiküllerin sebep olduğu toksik etkiyi azalttığı (Atıcı, 2016) tespit edilmiştir.

D. melanogaster'in yabanıl soyu üzerine etkileri araştırılan 5- 500 µg/mL konsantrasyon aralığında NiFe₂O₄ (30 nm) nanokompozitinin konsantrasyon artışına paralel olarak yaşam yüzdesi ve yavru birey sayısının azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, NiFe₂O₄ nanokompozitinin doz artışına bağlı olarak sebep olduğu toksik etkiyi gidermek ya da en aza indirmek amacıyla kullanılan son yıllarda etkili bir antioksidan olduğu tespit edilen Oleuropein (OLE) maddesinin yaşam yüzdesi ve yavru birey sayısı değerlerini kontrole yaklaştırdığı da belirlenmiştir.

Demir (2016) tarafından nanopartiküller ile canlılar arasındaki etkileşimin altında yatan moleküler mekanizmanın halen tam olarak anlaşılmamış olduğu, nanopartiküllerin toksisite ve biyoyumluluklarının pek çok faktöre (canlılık, doğurganlık, ROS gibi) göre değişkenlik gösterebileceği ifade edilmiştir. Nanopartiküllerle oluşacak genetik hasarın karsinogeneze yol açabileceği düşünülürse,

nanopartiküllerinin olası epigenetik etkilerini ve etki mekanizmalarını anlayabilmek için, hücre döngüsü ve DNA tamiri konularını da kapsayan detaylı *in vivo* ve *in vitro* sitotoksosite ve genotoksosite araştırmalarının yapılması insan sağlığı bakımından önem arz etmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlardan hareketle OLE'nin kuvvetli antioksidan özellik göstermesine bağlı olarak iyileştirici etkiye sahip olduğu ve NiFe₂O₄+OLE uygulama gruplarında yaşama yüzdesi ve yavru birey sayısı bakımından gözlenen değerlerin kontrole yaklaştırdığı; artan NiFe₂O₄ konsantrasyonu ile gözlenen bu toksik etkinin muhtemel sebebinin ise oluşan serbest radikallerden kaynaklandığı kanaatindeyiz. Yeni teknolojilerin üretime hız kazandırdığı bu çağda, çok fazla nanopartiküllerin üretimi ve çeşitli testlerinden geçirilmeden piyasaya sürülmesinin kaçınılmaz sonuçları ardından gelecektir. Nanopartiküllerin üretimi ve yaygınlaştırılmasının belli kriterlere göre yapılması ve ekosistemler üzerinde kalıcı ve yıkıcı etkiye sahip olan nanopartiküllerin üretiminin önüne geçilmesi ya da sınırlandırılması gerekmektedir.

Kaynaklar

Ahamed, M., Akhtar, M. J., Siddiqui, M. A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., AlSalhi M.S., & Alrokayan, S. A. 2011. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite

nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*, 283 (2), 101- 108.

Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., Khan, M. M., & Alrokayan, S. A. 2015. Comparative cytotoxic response of nickel ferrite nanoparticles in human liver HepG2 and breast MFC-7 cancer cells. *Chemosphere*, 135, 278- 288.

Atıcı, T., 2016. *Drosophila melanogaster*'de ZnOTiO₂ nanokompozitinin *in vivo* toksik potansiyeline karşı oleuropein'in kullanılması. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.

Baldi, G., Bonacchi, D., Franchini, M. C., Gentili, D., Lorenzi, G., Ricci, A., & Ravagli, C. 2007. Synthesis and coating of cobalt ferrite nanoparticles: a first step toward the obtainment of new magnetic nanocarriers. *Langmuir*, 23 (7), 4026- 4028.

Beji, Z., Hanini, A., Smiri, L. S., Gavard, J., Kacem, K., Villain, F., Grenèche, J. M., Chau, F., & Ammar, S. 2010. Magnetic properties of Zn-substituted MnFe₂O₄ nanoparticles synthesized in polyol as potential heating agents for hyperthermia. Evaluation of their toxicity on Endothelial cells. *Chemistry of Materials*, 22 (19), 5420- 5429.

Berk, S., & Akkurt, İ., 2012. Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası. *Tuberk Toraks*, 60 (2), 180- 184.

Chertok, B., Moffat, B. A., David, A. E., Yu, F., Bergemann, C., Ross, B. D., & Yang, V. C. 2008. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI

- monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29 (4):487- 496.
- Dağhoğlu, Y., Altınok, İ., İlhan, H., & Sokmen, M. 2016. Determination of the acute toxic effect of ZnO-TiO₂ nanoparticles in brine shrimp (*Artemia salina*). *Acta Biologica Turcica*, 29 (1), 6- 13.
- Demir, E. 2016. Nanomateryallerin toksisite ve genotoksisite çalışmalarında bir *in vivo* model organizma olarak *Drosophila melanogaster* (meyve sineği)'in kullanılması. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9 (1), 01- 11.
- Hajalilou, A., Haşim, M., Ebrahimi-Kahrizsangi, R., Kamari, M. H., & Sarami, N. 2014. Synthesis and structural characterization of nano-sized nickel ferrite obtained by mechanochemical process. *Ceramics International*, 40 (4), 5881- 5887.
- He, S., Feng, Y., Gu, N., Zhang, Y., & Lin, X. 2011. The effect of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on *Escherichia coli* genome. *Environmental Pollution*, 159 (12), 3468- 3473.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21 (9), 1726- 1732.
- Kimura, Y., & Sumiyoshi, M. 2009. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *The Journal of Nutrition*, 139 (11), 2079- 2086.
- Kovrižnych, J. A., Sotníková, R., Zeljenková, D., Rollerová, E., Szabová, E., & Wimmerová, S. 2013. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages—comparative study. *Interdisciplinary toxicology*, 6 (2), 67- 73.
- Köçkar, F., Türkoğlu Aydoğan, S., & Aydın, M. 2009. Oleuropein'in Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve hepatoma (HEP3B) kanser hücrelerinde anti-tümör etkisinin belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3 (2), 185- 190.
- Lee, J. H., Huh, Y. M., Jun, Y. W., Seo, J. W., Jang, J. T., Song, H. T., Kim, S., Cho, E. J., Yoon, H. G., Suh, J. S., & Cheon, J. 2007. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine*, 13 (1), 95–99.
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S., & Stroeve, P. 2009. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336 (2), 510- 518.
- Özkan, Y., Irende, İ., Akdeniz, G., Kabakçı, D., & Sökmen, M. 2015. Evaluation of the Comparative Acute Toxic Effects of TiO₂, Ag-TiO₂ and ZnO-TiO₂ Composite Nanoparticles on Honey Bee (*Apis mellifera*). *Journal of International Environmental Application and Science*, 10 (1), 26.

- Özkan, Y., Altinok, I., Ilhan, H., & Sokmen, M. 2016. Determination of TiO₂ and AgTiO₂ Nanoparticles in *Artemia salina*: Toxicity, Morphological Changes, Uptake and Depuration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96 (1), 36- 42.
- Popa, C. L., Prodan, A. M., Ciobanu, C. S., & Predoi, D. 2016. The tolerability of dextran-coated iron oxide nanoparticles during *in vivo* observation of the rats. *General Physiology and Biophysics*, 35 (3), 299-310.
- Rana, S., Gallo, A., Srivastava, R. S., & Misra, R. K. 2007. On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic carrier for drug delivery: functionalization, conjugation and drug release kinetics. *Acta Biomaterialia*, 3 (2), 233- 242.
- Sun, C., Lee, J. S., & Zhang, M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (11), 1252- 1265.
- Tomitaka, A., Hirukawa, A., Yamada, T., Morishita, S., & Takemura, Y. 2009. Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using HeLa cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321 (10), 1482-1484.
- Willard, M. A., Kurihara, L. K., Carpenter, E. E., Calvin, S., & Harris, V. G. 2004. Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*, 49 (3-4), 125- 170.
- Yin, H., Too, H. P., & Chow, G. M. 2005. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials*, 26 (29), 5818–58526.
- Zhao, H., Sun, X., Mao, C., & Du, J. 2009. Preparation and microwave-absorbing properties of NiFe₂O₄-polystyrene composites. *Physica B: Condensed Matter*, 404 (1), 69- 72.