



**YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLMİŞ PALADYUM
NANOPARTİKÜLLERİNİN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE
DNA ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF ETKİ POTANSİYELİNİN
VE HÜCRE İÇİ VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÖHRE AKDOĞAN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
TEMMUZ - 2025**

**YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLMİŞ PALADYUM
NANOPARTİKÜLLERİNİN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE
DNA ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF ETKİ POTANSİYELİNİN
VE HÜCRE İÇİ VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zöhre AKDOĞAN
ORCID ID: 0009-0001-3236-5253

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN VE JÜRİ ÜYELERİ

DANIŞMAN : Prof. Dr. Ayla ÇELİK
(ORCID: 0000-0002-0127-3639)
JÜRİ ÜYESİ : Prof. Dr. Rıza BİNZET
JÜRİ ÜYESİ : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

MERSİN
TEMMUZ- 2025

ÖZET

YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLMİŞ PALADYUM NANOPARTİKÜLLERİNİN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDEDNA ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF ETKİ POTANSİYELİNİN VE HÜCRE İÇİVARLIĞININ GÖSTERİLMESİ

Bu çalışma, yeşil sentez yaklaşımıyla *Paliurus spina-christi* (Körçalı) meyve ekstraktı kullanılarak elde edilen paladyum (Pd) nanopartiküllerinin insan periferik kan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ve hücre içi varlığının belirlenmesini amaçlamaktadır.

Elde edilen Pd nanopartikülleri dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle karakterize edilmiş, ortalama partikül boyutu 20 nm ve zeta potansiyeli -35,8 mV olarak belirlenmiştir. Hücresel düzeyde genetik hasar, Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet) testi, kromozomal hasar ise Mikronükleus (MN) testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin hücre içi varlığı Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) ile görüntülenmiştir.

Komet testi sonuçlarına göre, Pd nanopartiküllerine maruz bırakılan lenfositlerde DNA hasarı anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu artış, hem Genetik Hasar İndeksi (GHI) hem de Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Mikronükleus testi ise, Pd nanopartiküllerinin genotoksik hasara yol açtığını destekler nitelikte olup, mikronükleus frekansında bir artışa yol açtığı ve ayrıca, Sitokinez Bölünme İndeksi (CBPI) değerinde anlamlı bir azalma gözlenmiş, bu da nanopartiküllerin hücre çoğalmasını inhibe edici etkisini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, yeşil sentezle elde edilen Pd nanopartikülleri, insan lenfositlerinde DNA ve kromozomal düzeyde genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olmaktadır. Bu çalışma, Pd nanoparçacıklarının potansiyel biyomedikal kullanımına dair güvenlik değerlendirmelerinin önemini vurgulamakta; nanopartikül temelli biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesinde genetik toksisite risklerinin de dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Artan nanomalzeme kullanımı, özellikle biyomedikal alanda nanopartiküllerin potansiyel biyolojik etkilerinin değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Paladyum Nanopartikülü, Yeşil Sentez, Komet Testi, Mikronükleus Testi, GEM.

Danışman: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

DEMONSTRATION OF THE OXIDATIVE EFFECT POTENTIAL ON DNA AND INTRACELLULAR PRESENCE OF PALLADIUM NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS IN LYMPHOCYTE CULTURES

This study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of palladium (Pd) nanoparticles synthesized via a green chemistry approach using *Paliurus spina-christi* fruit extract on human peripheral blood lymphocytes under in vitro conditions.

The biosynthesized Pd nanoparticles were characterized using Dynamic Light Scattering (DLS), which revealed an average particle size of 20 nm and a zeta potential of -35.8 mV. Genotoxic effects were evaluated using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, while chromosomal damage was assessed through the Micronucleus (MN) assay. Additionally, the intracellular localization of Pd nanoparticles was confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM).

Comet assay results indicated a significant increase in DNA damage in lymphocytes exposed to Pd nanoparticles, as evidenced by elevated Genetic Damage Index (GDI) and Damaged Cell Percentage (DCP) values ($p < 0.001$). Furthermore, the micronucleus assay revealed a statistically significant increase in micronucleus frequency in Pd-exposed cells compared to the control group ($p < 0.001$), indicating chromosomal instability. A marked decrease in the Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI) was also observed, suggesting impaired cellular proliferation and potential cytostatic effects of Pd nanoparticles.

In conclusion, Pd nanoparticles synthesized via green methods demonstrate significant genotoxic and cytotoxic effects on human lymphocytes, including DNA fragmentation and chromosomal abnormalities. These findings underscore the importance of comprehensive safety evaluations in the biomedical application of Pd-based nanomaterials and highlight the necessity of incorporating genotoxicity assessments into the design and development of nanoparticle-based therapeutic and diagnostic platforms. With the increasing use of nanomaterials in biomedical applications, thorough assessment of their potential biological effects, particularly at the genetic level, is essential.

Keywords: Palladium Nanoparticles, Green Synthesis, Comet Assay, Micronucleus Test, TEM.

Advisor: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Department of Biology, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve desteğiyle her zaman yanımda olan; bilimsel katkıları ve rehberliğiyle çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Ayla ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda yer alan yeşil sentez sürecine katkıları, bilgi ve deneyimleriyle destek olan Sayın Prof.Dr. Rıza BİNZET'e ve Doç. Dr. Ersan TURUNÇ'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarda kullandığım kan örneklerinin temininde gönüllü olarak destek veren katılımcılara ve Elektron Mikroskop çalışmalarında bilimsel ve teknik destek sağlayan Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ'a şükranlarımı sunarım.

Komet sayımları sürecinde, floresan mikroskop kullanımına yönelik laboratuvar desteği sağlayarak çalışmama katkıda bulunan Prof. Dr. Gökhan CORAL'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları ve teknik analizler sürecinde katkılarını esirgemeyen; yol gösterici tavsiyeleriyle çalışmama önemli ölçüde katkı sağlayan Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, sevgisi, sabrı ve fedakârlığıyla bana güç veren sevgili annem Zübeyde AKDOĞAN'a ve babam Adem AKDOĞAN'a minnettarım.

Ayrıca, manevi destekleriyle bu süreci benim için kolaylaştıran dostlarıma ve özellikle çalışmamın her aşamasında moral kaynağım olan Hakan ABACI'ya içtenlikle ve özel sektörde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve bu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli iş arkadaşlarım Büşra ÇAM ve Banu YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 2023-2-TP2-4983 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmalar, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18/10/2023 tarih ve 2023/683 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	5
2.1 Nanoteknoloji ve Tarihçesi	5
2.2. Nanomalzemeler	5
2.3. Nanopartiküller	5
2.3.1. Nanopartikül Türleri ve Özellikleri	6
2.4.1. Yeşil Sentez	8
2.5. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri	8
2.5.1. Hücresel Seviyede Toksisite	8
2.5.2. Enflamasyon ve İmmün Sistem Üzerindeki Etkiler	9
2.5.3. Organlara Spesifik Toksisite	9
2.5.4. Gelişimsel ve Üreme Toksisitesi	9
2.5.5. Biyoakümülyasyon ve Çevresel Toksisite	9
2.5.6. Genotoksisite ve DNA Hasarı	10
2.6. Paladyum	10
2.7. Paladyum Nanopartikülü	10
2.8. Genotoksisite	11
2.9. Genotoksisite Değerlendirme Testleri	11
2.9.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (KOMET)	12
2.9.2. Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminin Aşamaları	14
2.10. Mikronükleus (MN) Testi	16
2.11. Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM)	16
2.11.1. GEM Ölçüm Yöntemi	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyaller	19
3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması:	19
3.1.2.1. Lenfosit İzolasyonu ve Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması:	19
3.1.2.1.1. Gönüllü Seçimi ve Kan Örneği Toplama	19
3.1.2.1.2. Lenfosit İzolasyonu	19
3.1.3. Kimyasal Solüsyonun Hazırlanması	19
3.1.3.1. Paladyum Nanopartikül Çözeltilisinin Hazırlanması	19
3.1.3.2. Pozitif Kontrol Solüsyonun Hazırlanması	19
3.1.3.3. Besiyeri	20
3.1.3.4. Carnoy Fiksatif Solüsyonun Hazırlanması	20
3.1.3.5. Hipotonik Solüsyonun Hazırlanması	20
3.1.3.6. Fitohemaglutinin Çözeltisi	20
3.1.3.7. Liziz Çözeltisi	20
3.1.3.8. Fosfat Tamponu	20
3.1.3.9. Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA)	20
3.1.3.10. Yüksek Erime Noktalı Agaroz (NMA)	21
3.1.3.11. Elektroforez Çözeltisi	21

3.1.3.12. Nötralizasyon Solüsyonunun Hazırlanması	21
3.1.3.13. Etidyum Bromür Boya Solüsyonunun Hazırlanması	21
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Yeşil Sentez:	21
3.2.1.1. <i>P. spina christi</i> (Körçalı) Bitkisinin Meyve Ekstraktının Hazırlanması:	22
3.2.1.2. Paladyum Nanopartiküllerinin (PdNP) Sentezi ve Karakterizasyonu:	22
3.2.1.2.1. PdNP Sentezi:	22
3.2.1.2.2. PdNP Karakterizasyonu:	23
3.2.2. Hücre Kültürü Deney Gruplarının Hazırlanması	23
3.2.2.1. İnkübasyon Süreci	23
3.2.2.2. Test Uygulamaları	23
3.2.3. Komet Yönteminin Aşamaları:	23
3.2.4. Mikronükleus için Gerekli Kimyasal Maddeler:	24
3.2.4.1. Mikronükleus Testi Yöntemi (MN):	24
3.2.4.2. Proliferasyon İndeksi (PI) Hesaplanması	25
3.2.5. GEM Analizi için Gerekli Kimyasal Maddeler:	25
3.2.5.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) Analizi Protokolü	25
3.3. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Bulgular	27
4.1.1. Yeşil Sentez ile Elde Edilmiş Pd Nanopartiküllerinin Boyutu, Zeta Potansiyeli Değerleri ve Elektron Mikroskop Analiz Sonuçları	27
4.1.2. İnsan Kan Lenfositleri Üzerinde Uygulanan Komet Testinde Elde Edilen Sonuçlar	29
4.1.2.1. Kan Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi ve Genetik Hasar İndeksi Sonuçları	29
4.1.3. İnsan Kan Lenfositlerinde Mikronükleus Testi Analiz Sonuçları	32
4.1.4. Geçirimli Elektron Mikroskop (GEM) Analiz Sonuçları	33
4.2. Tartışma	34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Nanopartikül türleri, yapısı, özellikleri ve kullanım alanları (Arsalan ve Younus, 2018).	6
Tablo 2.2. Nanopartikül sentez yöntemi, avantajları ve dezavantajları (Gürmen vd., 2008)	7
Tablo 4.1. Pd nanopartikülleri ile muamele edilmiş lenfosit hücrelerinde komet sayım verileri	29
Tablo 4.2. Pd Nanopartikülleri ile muamele edilmiş insan kan lenfositlerinde komet test parametrelerine ait istatistiksel sonuçlar	30
Tablo 4.3. Pd nanopartikül ile muamele edilmiş insan kan Lenfositlerinde Mikronükleus parametleri, istatistiksel sonuçları ve Sitokinez-Blok Proliferasyon İndeksi (CBPI)	32
Tablo 4.4. Pd Nanopartikülü ile muamele edilmiş insan kan Lenfositlerinde Komet test parametrelerine ait istatistiksel sonuçlar	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Hasarlı DNA görüntülerinin Komet yönteminde değerlendirme aşamaları (Dinçer ve Kankaya ,2010).	14
Şekil 2.2. Mikronükleuslu hücreler (Pongsavee, 2015).	16
Şekil 4.1. Yeşil sentez ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin Zeta potansiyelini gösteren DLS sonuçları.	27
Şekil 4.2. Yeşil sentez ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin boyutunu gösteren DLS sonuçları.	28
Şekil 4.3. <i>P. spina-christi</i> (Körçalı) özütü yardımı ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin TEM görüntüsü	28
Şekil 4.4. Komet analiz sonuçlarının farklı konsantrasyonlar arasındaki dağılımı ve ilgili istatistiksel değerlendirmeleri.	30
Şekil 4.5. İnsan kan lenfositlerinden elde edilmiş komet görüntüleri	31
Şekil 4.6. Mikronükleus analiz sonuçlarının farklı konsantrasyonlara göre dağılımı ve istatistiksel analizleri.	33
Şekil 4.7. İnsan kan lenfosit kültürlerinde dört nukleuslu (a) üç nukleuslu (b) ve mikronükleuslu hücre (c-d) görüntüleri	33
Şekil 4.8. Pd Nanopartikülü ile muamele edilmiş lenfosit hücrelerinin GEM görüntüsü (a-b) negatif kontrol kültürlerinde lenfosit hücrelerinin GEM görüntüsü (c-d)	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
GEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
TEM	Transmission Electron Microscopy (GEM ile eş anlamlı)
°C	Santigrat ve Celsius
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Pd	Paladyum Metali
PdNP	Paladyum Nanopartikülleri
MN	Mikronükleus
CBPI	Sitokinez-Blok Proliferasyon İndeksi
GHI	Genetik Hasar İndeksi
HHY	Hasarlı Hücre Yüzdesi
DLS	Dinamik Işık Saçılması (Dynamic Light Scattering)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
NMA	Yüksek erime noktalı agaroz
Rpm	Devir/dakika (rotasyon hızı)
Nm	Nanometre
µg/ml	Mikrogram / mililitre (konsantrasyon birimi)
p<0.05 / p<0.001	İstatistiksel Anlamlılık Düzeyleri
SiO ₂	Silisyum Oksit
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
NPs	Nanopartiküller
Pt	Platin Elementi
CO	Karbonmonoksit
ROS	Reaktif oksijen türleri
NO _x	Azot Oksitler
HCs	Yanmamış Hidrokarbonlar
TWC	Katalitik Konvertöler
VEK	Araç Egzoz Katalizörleri
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
KCl	Potasyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
TiO ₂	Titanyum Dioksit
ZnO	Çinko Oksit
AgNP	Gümüş Nano Partikülü
PM	Partikül Madde
KeV	Kiloelektronvolt
MeV	Megaelektronvolt

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji nano boyutun karakterizasyonu, uygulanması ve malzemelerin sentezi için kullanılan bir alandır (Eren, 2020). Nanoteknoloji maddeye atom ve moleküler düzeyde kimyasal, biyolojik, fiziksel özellikler bakımından yeni kazanımlar yüklemeyi amaçlamaktadır. Nanopartikül terimi boyutları 1-100 nanometre (nm) boyut aralığında olan materyallere verilen bir isimdir. ‘Nano’ kelimesi Yunanca’dan gelmektedir. Yunanca da cüce anlamına gelen bir nanometre, metrenin milyarda birine denk gelmekte olan bir uzunluk birimidir. Nanopartiküllerin küçük ebatlara ve geniş yüzey alanlarına sahip olmalarından dolayı farklı elektriksel, mekaniksel veya kimyasal özellikleri bulundurdıkları bilinmektedir. Bundan dolayı elektronik, gıda, tekstil, boya, hayvancılık ve tarım, doku mühendisliği, kanser teşhisinde ve tedavisinde, ilaç, tıp ve genetik gibi birçok farklı alanlarda kullanılmaktadır (Bayğu, 2020).

Ayrıca, nanoteknoloji ile enerji yoğunluğu artırılarak ve şarj süresi kısaltılarak süper kapasitörler ve piller gibi enerji depolama alanının gelişmesinde büyük öneme sahiptir. Aynı zamanda, sürdürülebilirliği artırmak için hava filtrasyonu ve su arıtma alanlarında çevresel iyileştirme için de nanoteknoloji alanından fayda sağlanmaktadır.

Günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan nanopartiküller, araba sektöründe, ilaç üretiminde, kozmetikten, su arıtımına, beton- taş- mermer uygulamalarından, besin ve besin takviyelerine, giysilerden, duvar boyalarından, seramik üretiminde, uçaklardan, kendini temizleyen camlara, bilgisayar parçalarından, nano robot yapımına kadar her türlü alanda ve her türlü sanayi sektöründe karşımıza çıkmaktadır. Paladyumun en yaygın kullanımı otomobil sektörüdür. Arabalarda kullanılan katalitik konvertörlerin üretiminde paladyum kullanılmaktadır. Bu konvertörler, gaz emisyonunu düşürmek için ve egzoz çıkışında kullanılmaktadır. Paladyum tuzu olarak bilinen “paladlı diamino dinitrit”, elektronik malzemelerde ve telefon parçaları için gerekli olan sülfamat banyosunun hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidrojen yakıtı hücrelerde katalizör olarak kullanılmaktadır. Hidrojeni depolamak ve filtrelemek için kullanım açısından büyük öneme sahip olan bir metaldir (Grochala ve Edwards, 2004).

Paladyum son zamanlarda yatırım sektöründe önemli ölçüde işlem gören değerli metaller arasında yer almaktadır. Paladyum metali, platin ve altın metallerinden sonra işlem gören değerli metal ürünü olan beyaz altın üretiminde kullanılmaktadır. Beyaz altın, paladyum alaşımından ve rengi alınmış altından üretilmektedir. Paladyum karışımları metal mücevherlere nitelik ve görünüş açısından önemli özellikler katmaktadır. Bazı sektörlerde paladyum platin metali yerine kullanılmaktadır. Atmosfer şartlarına dayanıklı olması nedeniyle laboratuvar ekipmanlarında ve tıbbi cihazların yapım aşamasında önemli oranda tercih edilme sebebidir. Diş için kullanılan ürünlerde paladyum önemli bir alaşımdır. Aşınmaya dayanıklı bir metal olan paladyum sigortalarda, elektrikli ev aletlerinde ve alarm

sistemlerinde kullanılan rölelerin ara ürünü olarak kullanılmaktadır. Metallerin mekanik direncini artırmak için paladyumun bakır ve gümüş alaşımları kullanılmaktadır. Nikel kaplamalarda başlangıç maddesi olarak da alternatif kullanımı mevcuttur (Chen vd.,2013).

Paladyum metalinin diğer kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır:

- Yakıt Pillerinde (hidrojen absorpsiyonu),
- Etanol yakıtı üretiminde (Wacker Prosesi),
- Madeni para yapımında,
- Petrol arıtma işleminde (katalitik reformasyon ve hidrolik işleme),
- Polyester (saflaştırılmış tereftalikasit),
- Fotoğrafçılık (Platinotip Süreci),
- Su arıtımı ve
- Tıp sektöründe (Chen vd.,2013).

Geçiş metali olan nanopartikülleri parçacık boyutu 1-100 nm arasında olan koloidal halde bulunan tanecikler olarak tanımlanabilmektedir. Nanopartiküllerin sahip olması gereken bazı özellikler aşağıda sıralanmıştır:

- Parçacık boyutunun ortalama standart sapması %15 'den küçük olmalıdır.
- 100 nm boyutundan daha küçük olmalıdır.
- Parçacıkların sentezlenmesi tekrarlanabilir olmalıdır.
- Parçacıkların bileşimi kolayca tanımlanabilmelidir.

-Metal nanopartikülleri, metalden nano boyuta küçültüldüklerinde, yığın halindeki metallerden farklı özellikler sergilerler. Boyutları küçüldükçe, katalitik ömürleri ve aktivite düzeyleri artar, bu da onları daha kullanışlı hale getirir. Metal nanopartikülleri, sahip oldukları farklı özellikler nedeniyle pek çok alanda tercih edilmektedir. Geçiş metali nanoparçacıkları, yüksek yüzey alanına sahip olmaları ve seçici, aktif ve kararlı özellikleri sayesinde katalizör olarak kullanılmaya oldukça uygundur. Ayrıca, kolayca sentezlenebilmeleri ve kimyasal açıdan kolayca modifiye edilebilmeleri nedeniyle endüstriyel ürünlerde, makine sanayisinde, tüketim ürünlerinde, askeri uygulamalarda ve özellikle tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Kristal yapıları ve güçlü metalik bağları sayesinde, metal nanopartiküller ve alaşımları, iskelet-kas sisteminin mekanik koşullarına en iyi uyum sağlayan malzemeler arasında yer alır (Aiken vd., 1996). Paladyum (Pd), atom numarası 46 ve atom ağırlığı 106,42 olan, platine benzer özellikler gösteren bir elementtir. 1803'te William Hyde Wollaston tarafından keşfedilmiş olan platin metalinden sonraki en önemli metal paladyumdur (Atkins ve Jones, 2007). Pd periyodik cetvelde geçiş metalleri arasında yer almakta olup, nikelin üstünde olmasına rağmen ondan daha fazla hidrojen absorbe etme kapasitesine sahiptir. Paladyum içinde çözünmüş hâlde bulunan hidrojen, yüksek reaktivitesi sayesinde doymamış organik bileşiklerin hidrojenasyonunda etkin bir katalizör olarak kullanılır. İlaveten, gaz geçirmez özellikte olan paladyum levhaları, hidrojen gazına karşı geçirgenlik göstermektedir. Paladyum, genellikle +2 oksidasyon durumunda kararlı olan bileşikler oluşturur ve bu kahverengi renklidir. Pd nanopartikülleri içeren elektrotlar, özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi

önemli substratların elektrokimyasal dönüşümüne yönelik araştırmalarda seçicilik sergileyen nanomalzemeler ve yüksek oranda elektrokatalitik aktiviteye sahip nanomalzemeler olarak bilinmektedir. Pd nanopartikülleri, çok yüksek yüzey alanı sağlayarak katalitik etkinliğini artırır. Pd, Platin (Pt) metali ile benzer oranda korozyona ve oksidasyona karşı çok yüksek direnç göstermekte olup üstün katalitik özelliklere sahip olan bir metaldir. Bu özelliklerin esas nedeni, Pd'nin kendi hacminin yaklaşık olarak 900 katı kadar hidrojen gazını absorbe edebilme kapasitesidir. Diğer bir nedeni ise kimyasal olarak iletken ve kararlı bir yapıya sahip olmasıdır. Elektronik endüstrisinde geniş çapta kullanım alanı oluşturmaktadır (Hosseini vd., 2014).

Bu doğrultuda, bu çalışma; yeşil sentez yaklaşımı kullanılarak *Paliurus spina-christi* P. Mill. (Körçalı) meyve ekstraktı ile elde edilen paladyum nanopartiküllerinin (PdNPs), insan periferik kan lenfositlerinde yol açabileceği genetik ve kromozomal düzeydeki olası toksik etkilerini in vitro koşullarda değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Çalışmada, PdNP'lerin hücrelerde oluşturabileceği DNA hasarını belirlemek amacıyla Tek Hücre Jel Elektrofrez (Komet testi), kromozomal bozulmaları ortaya koymak üzere Mikronükleus (MN) testi ve nanopartiküllerin hücre içi lokalizasyonunu gözlemlemek için Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) kullanılmıştır. Bu kapsamda, PdNP'lerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, biyomedikal alanda kullanım potansiyeline sahip bu tür nanoparçacıkların güvenlik değerlendirmelerine katkı sunmayı hedeflemektedir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1 Nanoteknoloji ve Tarihçesi

Nanoteknoloji, maddelerin atomik ve moleküler düzeyde kontrol edilerek yeni işlevsel özellikler kazandırılması ve bu özelliklerin bilimsel ve endüstriyel uygulamalarda değerlendirilmesini konu alan disiplinler arası bir alandır (Bhushan, 2017). Bu alanın temel bileşenlerinden biri olan nanomalzemeler, 1 ila 100 nanometre arasındaki boyutlarıyla yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptir ve optik, elektriksel ve kimyasal açıdan geleneksel malzemelere kıyasla üstün performans sergiler (Roco, 2003; Farokhzad ve Langer, 2009).

Nanoteknoloji kavramının tarihsel temelleri, ilk olarak Amerikalı fizikçi Richard P. Feynman'ın 1959 yılında Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirdiği "*There's Plenty of Room at the Bottom*" başlıklı konferansa dayanmaktadır. Feynman bu konuşmasında, maddenin atom ve moleküler düzeyde kontrol edilmesinin mümkün olabileceğini öne sürmüştür; her ne kadar "nanoteknoloji" terimini kullanmamış olsa da bu alanın teorik altyapısını oluşturan fikirleri dile getirmiştir.

"Nanoteknoloji" terimi ise ilk kez Japon araştırmacı Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında kullanılmıştır. Taniguchi, bu terimi nanometre boyutunda gerçekleştirilen ultra-ince işleme süreçlerini tanımlamak amacıyla ortaya koymuş ve böylece nanoteknolojinin ilk kavramsal çerçevesini bilim dünyasına kazandırmıştır (Erkoç, 2007; Beykaya ve Çağlar, 2016).

2.2. Nanomalzemeler

Nanomalzemeler içinde özel bir yere sahip olan nanopartiküller (NP), ilaç taşıma sistemlerinden görüntüleme tekniklerine, katalizörden sensör teknolojilerine ve çevre mühendisliğine kadar çok sayıda alanda kullanılmaktadır (Salata, 2004). Özellikle metalik nanoparçacıklar, yüzey reaktiviteleri, biyouyumlu yapıları ve fonksiyonelleştirme kolaylıkları sayesinde biyomedikal uygulamalarda dikkat çekici bir potansiyele sahiptir (Iravani, 2011).

2.3. Nanopartiküller

Nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri; boyut, morfoloji, yüzey yükü, yüzey modifikasyonları ve sentez yöntemine bağlı olarak değişmekte ve bu değişkenler biyolojik etkileşimleri ile toksikolojik profillerini doğrudan etkilemektedir (Nel vd., 2006). Son yıllarda, çevresel ve sağlık açısından daha güvenli üretim yöntemleri geliştirmek amacıyla, bitki ekstraktları ve mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynakların indirgeme ve stabilizasyon ajanı olarak kullanıldığı yeşil sentez yaklaşımları öne çıkmaktadır (Ahmed vd., 2016).

2.3.1. Nanopartikül Türleri ve Özellikleri

Nanopartiküller 7 grupta sınıflandırılmaktadır. Nanopartikül türleri, yapısı, özellikleri ve kullanım alanları, Tablo 2.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Nanopartikül türleri, yapısı, özellikleri ve kullanım alanları (Arsalan ve Younus, 2018).

Nanopartikül Türü	Yapısı / İçeriği	Öne Çıkan Özellikleri	Kullanım Alanları
Metal nanopartiküller	Altın (Au), Gümüş (Ag), Demir (Fe), vb.	Yüksek yüzey reaktivitesi, optik özellikler	Biyosensörler, ilaç taşıma, antimikrobiyal uygulamalar
Metal oksit nanoparçacıklar	ZnO, TiO ₂ , Fe ₃ O ₄ , CuO	Fotokatalitik aktivite, UV emilimi, mıknatıslanabilirlik	Güneş kremleri, çevre arıtımı, manyetik rezonans görüntüleme
Karbon bazlı nanopartiküller	Fullerenler, grafen, karbon nanotüpler	Elektriksel iletkenlik, mekanik dayanıklılık	Elektronik, enerji depolama, kompozit malzemeler
Polimerik nanopartiküller	Doğal/sentetik polimerler	Biyobozunur, kontrollü salım imkânı	İlaç taşıma, aşı sistemleri, biyomedikal kaplamalar
Lipid bazlı nanopartiküller	Lipozomlar, solid lipid NPs	Biyouyumlu, hedefe yönelik taşıma yeteneği	İlaç ve gen taşıma sistemleri, kozmetik ürünler
Silika nanoparçacıkları	SiO ₂	Gözenekli yapı, yüzey fonksiyonelleştirmeye uygun	Kataliz, ilaç salımı, sensör teknolojileri
Kuantum noktaları	CdSe, CdTe vb. yarıiletken kristaller	Floresan özellikler, boyuta bağlı optik özellikler	Görüntüleme sistemleri, biyosensörler, LED teknolojileri
Seramik nanoparçacıklar	Al ₂ O ₃ , ZrO ₂	Yüksek ısıya ve aşınmaya dayanıklılık	Kaplamalar, kataliz, doku mühendisliği

2.4. Nonopartikül Sentez Yöntemleri

Nanopartiküllerin sentezinde iki temel yöntem grubu bulunmaktadır: aşağı yönlü (top-down) ve yukarı yönlü (bottom-up) yaklaşımlar. Aşağı yönlü yöntemler, makroskobik boyuttaki materyallerin mekanik veya fiziksel işlemlerle nano boyuttaki yapı birimlerine indirgenmesini ifade ederken; yukarı yönlü yöntemler, atomik ve moleküler düzeydeki bileşenlerin kimyasal reaksiyonlar yoluyla kontrollü bir biçimde bir araya getirilerek nanopartiküllerin oluşturulmasını kapsamaktadır (Roco, 2003; Bhushan, 2017). Nanopartiküllerin sentez yöntemleri Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Nanopartikül sentez yöntemi, avantajları ve dezavantajları (Gürmen vd., 2008)

Yöntem Türü	Yöntem Adı	Temel İlke / Açıklama	Avantajları	Dezavantajları
Aşağı Yönlü	Mekanik Öğütme (Ball Milling)	Malzemenin fiziksel olarak parçalanması	Ucuz ve yaygın bir yöntem	Düzensiz parçacık boyutu, kontaminasyon riski
Aşağı Yönlü	Litografi	Işık veya elektron demetleri ile desenleme	Yüksek hassasiyetli yapı oluşturulabilir	Pahalı ekipman, düşük üretim hacmi
Aşağı Yönlü	Lazer Ablasyon	Lazerle malzeme yüzeyinden buharlaştırma	Temiz yöntem, kontrollü parçacık boyutu	Yüksek enerji gereksinimi
Yukarı Yönlü	Sol-Gel	Alkoksitlerin hidrolizi ve kondenzasyonu	Yüksek saflık ve homojenlik	Uzun işlem süresi, organik solvent kullanımı
Yukarı Yönlü	Kimyasal İndirgeme	Metal iyonlarının indirgenmesi	Basit ve ekonomik	Partikül aglomerasyonu riski
Yukarı Yönlü	Ko-çöktürme	Farklı iyonların eş zamanlı çöktürülmesi	Kolay uygulanabilir, kontrol edilebilir boyutlar	Kristal yapının iyi kontrol edilmesi zor olabilir
Yukarı Yönlü	Termal Ayırışma	Ön maddelerin yüksek sıcaklıkta ayrıştırılması	Saf ürün elde edilebilir	Yüksek sıcaklık ihtiyacı
Yukarı Yönlü	Hidrotermal /Solvotermal	Kapalı sistemlerde yüksek sıcaklık ve basınçta sentez	İyi kristal yapı, boyut kontrolü	Yavaş süreç, özel donanım ihtiyacı
Yukarı Yönlü	Yeşil Sentez	Bitkisel ekstrakt veya biyolojik ajanlarla çevre dostu üretim	Ekolojik, toksik olmayan çözümler	Reprodüksiyon problemi, sınırlı reaktivite kontrolü

2.4.1. Yeşil Sentez

Nanoparçacıkların çevre dostu yöntemlerle üretimine yönelik artan ilgi, sürdürülebilir nanoteknoloji uygulamalarının gelişmesine katkı sağlamaktadır. Bu çerçevede, yeşil sentez yöntemleri; bitkiler, bakteriler, mantarlar ve algler gibi çeşitli biyolojik sistemlerin kullanıldığı, toksik kimyasallar yerine doğadan elde edilen biyoaktif bileşiklerin tercih edildiği çevreye duyarlı bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Söz konusu yöntem, klasik kimyasal indirgeme tekniklerinde karşılaşılan çevresel ve toksikolojik riskleri en aza indirerek, biyoyumlu ve güvenli nanoparçacıkların elde edilmesini mümkün kılmaktadır (Iravani vd., 2014; Khan vd., 2019).

Biyolojik sistemler, nanoparçacık sentez sürecinde hem indirgeme hem de stabilizasyon işlevlerini eşzamanlı olarak yerine getirebilmektedir. Özellikle bitki özütlerinde bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve diğer ikincil metabolitler; metal iyonlarının indirgenmesini sağlarken aynı zamanda aglomerasyonu önleyici kaplama etkisi göstermektedir (Mittal vd., 2013). Ayrıca, mikroorganizmaların hücre içi ve hücre dışı mekanizmalar yoluyla nanoparçacık sentezleyebilme potansiyeli, üretim koşullarının daha kontrollü ve tekrarlanabilir şekilde optimize edilmesine olanak tanımaktadır (Narayanan ve Sakthivel, 2010; Singh vd., 2016).

Yeşil sentez yöntemlerinin başlıca avantajları; düşük maliyetli üretim, biyoyumluluk, çevresel sürdürülebilirlik ve enerji verimliliği olarak sıralanabilir. Ancak, bu yöntemin bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Reaksiyon koşullarının tam olarak standardize edilememesi, sentez mekanizmalarının kompleks doğası ve elde edilen nanoparçacıkların boyutlarında görülebilecek tutarsızlıklar, yöntemin geniş çapta endüstriyel uygulanabilirliğini sınırlandıran faktörler arasında yer almaktadır. Bu nedenle, yeşil sentez tekniklerinin daha etkin ve kararlı hale getirilmesi amacıyla ileri düzeyde karakterizasyon çalışmaları ve süreç optimizasyonu büyük önem arz etmektedir.

2.5. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri

2.5.1. Hücresel Seviyede Toksisite

- **Oksidatif stres:** NP'ler, hücre içine alındıklarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırabilir. Oluşan bu oksidatif stres, hücre zarında lipid peroksidasyonuna, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel bozulmasına, DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne (apoptoz) yol açabilir.
- **Apoptoz ve nekroz:** Hücreler ya kontrollü (apoptoz) ya da kontrolsüz (nekroz) şekilde ölebilir. Bazı nanopartiküller bu hücre ölümlerini tetikleyebilir.

- **Mitokondriyal hasar:** NP'ler mitokondriye girerek enerji üretimini bozar ve hücrel metabolizmayı olumsuz etkiler.

2.5.2. Enflamasyon ve İmmün Sistem Üzerindeki Etkiler

- Vücuda giren NP'ler bağışıklık sistemi tarafından “yabancı madde” olarak algılanabilir.
- Bu da kronik inflamasyona, bağışıklık cevabının bozulmasına veya otoimmün reaksiyonlara yol açabilir.

2.5.3. Organlara Spesifik Toksisite

- **Solunum sistemi:** Solunum yoluyla alınan nanopartiküller, akciğerlerde inflamasyon, fibrozis ve hatta tümör oluşumuna neden olabilir.
- **Karaciğer ve böbrek:** Oral yolla alınan NP'ler, metabolizma ve detoksifikasyon organları olan karaciğer ve böbreklerde birikerek hasar oluşturabilir.
- **Beyin:** Bazı NP'ler kan-beyin bariyerini geçerek nörotoksisiteye neden olabilir.

2.5.4. Gelişimsel ve Üreme Toksisitesi

- Gebelikte alınan NP'lerin plasentayı geçebildiği ve fetus gelişimini olumsuz etkileyebildiği gösterilmiştir.
- Erkeklerde sperm kalitesini ve hareketliliğini azaltıcı etkiler de bildirilmiştir.

2.5.5. Biyoakümülyasyon ve Çevresel Toksisite

- NP'ler doğada çözünmeden kalabilir, çevrede birikebilir ve ekosisteme zarar verebilir.
- Suda yaşayan organizmalarda genotoksik ve üreme üzerine olumsuz etkiler gözlenmiştir.

2.5.6. Genotoksisite ve DNA Hasarı

- Bazı nanopartiküller DNA ile doğrudan etkileşime girerek kırıklar, mutasyonlar veya kromozom anomalilerine neden olabilir.
- Bu durum, kanser gelişimi gibi uzun vadeli sağlık sorunlarına zemin hazırlayabilir (Buzea ve Pacheco, 2019).

2.6. Paladyum

Paladyum (Pd), atom numarası 46 ve atom ağırlığı 106.42 olan, platin grubuna ait değerli bir metaldir. 1803 yılında William Hyde Wollaston tarafından keşfedilen bu element, platin grubundaki metaller arasında platin sonrası en önemli unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir. İnce dağılmış formda olduğunda, periyodik tabloda kendisinin üzerinde yer alan nikelden daha fazla hidrojen gazını absorbe edebilme kapasitesine sahiptir. Paladyumun içinde çözünmüş hâlde bulunan hidrojen, nikelde olduğu gibi oldukça reaktif olup doymamış organik bileşiklerin hidrojenasyon reaksiyonlarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. İlginç bir şekilde, diğer gazlara karşı geçirimsiz olan paladyum levhaları, yalnızca hidrojen gazını geçirebilme özelliği göstermektedir. Kimyasal bileşiklerinde genellikle +2 oksidasyon durumunda bulunan paladyumun tuzları kahverengi renktedir (Fuentes vd., 2015).

2.7. Paladyum Nanopartikülü

Paladyum nanopartikülleri (PdNP'ler), platin grubu metallere ait olan paladyumun nano boyuttaki türevleri olup, özellikle yüksek katalitik etkinlikleri, kimyasal kararlılıkları ve geniş yüzey alanları sayesinde son yıllarda dikkat çeken nanomalzemelerdendir. Çapları genellikle 1–100 nm arasında değişen bu partiküller, boyut küçüldükçe yüzey-hacim oranı arttığından daha reaktif hale gelirler. Bu özellik, hem endüstriyel süreçlerde hem de biyomedikal uygulamalarda PdNP'lerin tercih edilme nedenlerinden biridir (Wiseman ve Zereini 2009; Balaram vd., 2016; Sen vd., 2016).

PdNP'ler; kimyasal indirgeme, elektrokimyasal yöntemler, sol-jel yöntemi, mikrodalga destekli sentez gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle sentezlenebilir. Son yıllarda ise çevre dostu üretim tekniklerinin önemi artmış ve biyolojik organizmaların (örneğin bitki özleri, bakteri veya enzimlerin) kullanıldığı yeşil sentez yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bu yöntemlerle elde edilen PdNP'ler genellikle daha biyoyoumlu ve düşük toksisiteye sahip olmaktadır (Gürmen ve Ebin, 2008).

PdNP'lerinin uygulama alanları oldukça geniştir. Katalitik reaksiyonlarda (özellikle Suzuki, Heck ve Sonogashira bağ oluşturma reaksiyonları gibi çapraz bağlama işlemlerinde) yaygın olarak

kullanılırken, aynı zamanda yakıt hücrelerinde, çevre kirliliğiyle mücadelede, sensör teknolojilerinde ve ilaç taşıma sistemlerinde de kullanılmaktadır. Bunun yanında, PdNP'lerin antibakteriyel ve antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiş; özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yoluyla hücre içi hasar mekanizmalarını tetikleyebildiği gözlemlenmiştir (Samim, 2022).

2.8. Genotoksisite

Genotoksisite, bir ajanın hücrel genetik materyal üzerinde kalıcı yapısal veya işlevsel bozulmalara yol açma potansiyelini ifade eder. Bu bozulmalar, DNA'da kırıklar, mutasyonlar, kromozomal anormallikler veya replikasyon hataları şeklinde ortaya çıkabilir ve hücrel düzeyde genetik istikrarı tehdit eder. Genotoksik etkiler yalnızca hücrenin işlevini bozmakla kalmaz, aynı zamanda kanser, kalıtsal hastalıklar ve gelişimsel bozukluklar gibi ciddi patolojik sonuçlara da neden olabilir (Tice vd., 2000).

NP'lerin genotoksik etkileri son yıllarda yoğun şekilde araştırılmaktadır. Özellikle metal bazlı nanopartiküller (örneğin paladyum, gümüş, titanyum dioksit ve çinko oksit nanopartikülleri) hücre içine alındıktan sonra DNA ile doğrudan veya dolaylı yollardan etkileşime girebilmektedir. Bu etkiler, çoğunlukla ROS üretimi yoluyla meydana gelir. ROS, DNA zincirlerinde tek veya çift sarmal kırıklara, baz değişikliklerine ve kromozomal kırılmalara neden olabilir. Ayrıca nanopartiküller hücre döngüsünü bozarak mitotik anomalilere ve genetik materyalin yanlış dağılımına da yol açabilmektedir (Tice vd., 2000; Atlı Şekeroğlu vd., 2019). Genotoksisite değerlendirmesinde kullanılan başlıca testler arasında Komet testi (tek hücre jel elektroforezi), mikronükleus testi, sister kromatid değişim analizi ve Ames testi gibi yöntemler yer almaktadır. Bu testler hem in vitro (hücre kültürü) hem de in vivo (hayvan modeli) sistemlerde uygulanabilmekte, nanopartiküllerin DNA'ya olan etkileri kantitatif ve kalitatif olarak değerlendirilebilmektedir (Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011). Paladyum nanopartikülleri (PdNP'ler) özelinde yapılan çalışmalar, bu materyallerin yüksek dozlarda DNA bütünlüğünü bozabildiğini ve oksidatif stres aracılığıyla genotoksik hasara yol açabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, PdNP'lerin genotoksik etkilerinin partikül boyutu, yüzey kaplaması, dozajı ve hücre tipi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği de bildirilmiştir. Bu nedenle PdNP'lerin biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarda güvenli kullanımı için genotoksisite değerlendirmeleri büyük önem taşımaktadır (Fuentes vd., 2015).

2.9. Genotoksisite Değerlendirme Testleri

Nanopartiküller, ilaçlar, endüstriyel ve kozmetik ürünler, gıda katkı maddeleri ve doğal toksinlerin düzenleyici amaçlarla değerlendirilmesinde, bu bileşenlerin genetik materyal üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin belirlenmesi kritik bir öneme sahiptir. Mutajenite ve genotoksisite

analizleri, bu tür bileşiklerin DNA'ya verdiği zararları saptamak için yaygın olarak kullanılan temel testlerdir. Bu bağlamda, genetik toksisiteyi değerlendirebilmek amacıyla çeşitli in vitro ve in vivo test yöntemleri uygulanmaktadır. Kullanılan başlıca test yöntemleri arasında, genetik materyalin bütünlüğünü ve hücre üzerindeki etkilerini analiz etmeye yönelik aşağıdaki yöntemler yer almaktadır:

- Ames Testi
- Alkali Elüsyon Testi
- Alkali Çözme ve Hidroksiapatit Elüsyonu Testi
- Kromozomal Düzensizlik Testi
- Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi
- Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Komet Testi)
- Mikronükleus Testi (Dusinska vd., 2012; Turkez vd., 2017).

2.9.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (KOMET)

Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Komet Testi), DNA üzerindeki genotoksik etkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan, fiziksel ve kimyasal mutajenik ajanların DNA'da oluşturduğu hasarı görsel olarak gösteren ve bu hasarın nicel ölçümünü sağlayan bir tekniktir (Ritter ve Knebel, 2009). Bu yöntem, basitliği, hızının yanı sıra yüksek hassasiyet sunması nedeniyle tercih edilmektedir. Temel çalışma prensibi, izole edilen tek hücrelerin, DNA hasarına bağlı olarak agaroz jel elektroforez ortamında farklı yük ve moleküler ağırlıklara sahip DNA fragmanlarının hareket etmesi ve DNA'ya özgü floresan boyalarla boyanarak floresan mikroskop altında görselleştirilmesidir (Çelik vd., 2014).

Komet Yöntemi, DNA hasarını tespit etmek için kullanılan sitogenetik analiz yöntemleri arasında bazı önemli avantajlara sahiptir:

- Testin yapılabilmesi için yalnızca az sayıda hücrenin yeterli olması,
- Hücrelerin mitotik aktivitesinin dikkate alınmaması,
- Tek çekirdekli hücre içeren büyük canlı popülasyonlarında rahatlıkla kullanılabilmesi (Battal vd., 2015).

Bu yöntem, DNA kırıklarını belirleme prensibine dayanarak, birçok ksenobiyotiğin hücrelerde yol açtığı DNA hasarının saptanmasında, kanserli dokularda DNA hasarının onarım derecesinin ölçülmesinde, kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında ve artmış DNA hasarının gözlemlenmesinde önemli bir biyoizleme testi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, genotoksinlerin ilk etki alanında analiz edilebilmesi, tüm çekirdek içeren ökaryotik hücrelerde uygulanabilirliği, düşük seviyelerdeki DNA hasarını dahi tespit edebilmesi ve çok sayıda hücre gerektirmemesi gibi üstünlükleri nedeniyle ucuz,

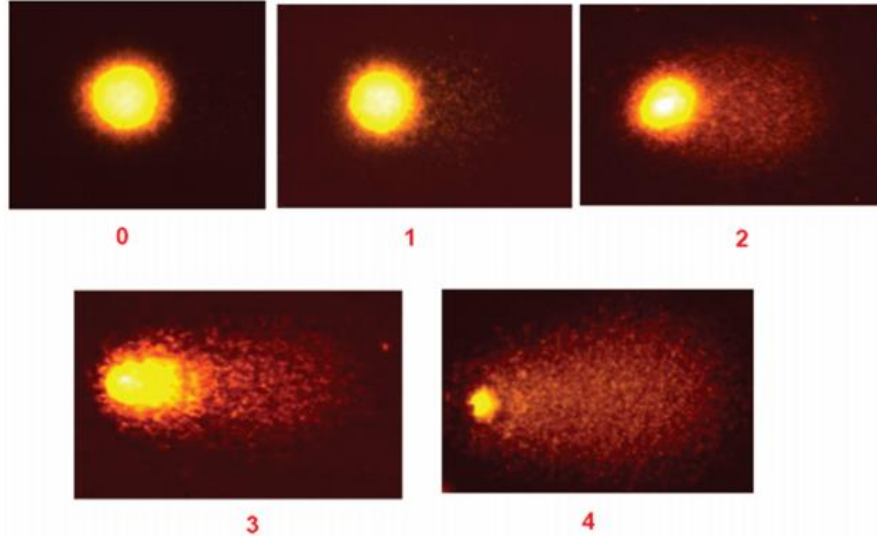
hızlı ve pratik bir test olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Choy, 2001; Dinçer ve Kankaya, 2010; Şekeroğlu vd., 2011).

Komet Yöntemi, yüksek alkali pH ortamında, farklı moleküler kütle ve elektriksel yüklere sahip DNA moleküllerinin elektroforetik alanda farklı göç hareketi sergilemesi ilkesine dayanır. Bu yöntemde, hücreler öncelikle agaroz jel içine yerleştirilir, ardından hücrelerin liziz işlemi gerçekleştirilir ve alkali elektroforez tamponu içinde elektroforez işlemi yapılır. Bu işlem, hücrelerdeki DNA'nın hasar düzeyine bağlı olarak floresan boya ile boyanır. Floresan mikroskop altında incelenen hücresel preparatlarda, zarar görmemiş DNA molekülleri kuyruk oluşturmazken, hasar görmüş DNA molekülleri, farklı moleküler ağırlıkta fragmentler oluşturur. Bu fragmentler, farklı elektrik yüklerine sahip oldukları için elektroforez alanında farklı hızlarla hareket ederler ve bu sayede çekirdekten dışarı doğru bir göç hareketi sergilerler. Bu fenomen, kuyruklu yıldız görüntüsüne (komet şeklinde) yol açar (Şekil 2.1). Bu görsel özelliklerinden dolayı, bu teknik "Komet" olarak adlandırılmıştır (McKelvey-Martin vd., 1993; Albertini vd., 2000; Dinçer ve Kankaya, 2010).

Agaroz jelde yer alan hücrelerde, negatif yüklü DNA'nın kırık uçları elektroforez sırasında, pozitif elektrot yönüne doğru hareket etmeye başlar. Bu hareket, floresan boya ile boyanan DNA fragmentlerinin mikroskop altında kuyruklu yıldız (komet) benzeri bir görünüm almasına neden olur (Joint, 1991).

Hasarlanmış DNA'lar, hasar derecelerine göre beş farklı kategoride sınıflandırılmaktadır:

- **Seviye 0:** Hiçbir kuyruk oluşturmeyen, tamamen sağlam olan DNA molekülleri (hasarsız).
- **Seviye 1:** Çok hafif düzeyde hasar görmüş DNA molekülleri.
- **Seviye 2:** Az miktarda hasar içeren DNA molekülleri.
- **Seviye 3:** Belirgin şekilde hasarlanmış, ancak tamamen kopmamış DNA molekülleri.
- **Seviye 4:** Yoğun şekilde hasar görmüş, ciddi derecede parçalanmış DNA molekülleri (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010)



Şekil 2.1. Hasarlı DNA görüntülerinin Komet yönteminde değerlendirme aşamaları (Dinçer ve Kankaya ,2010).

2.9.2. Tek Hücre Jel Elektroferez Yönteminin Aşamaları

1.Lamların Agarla Kaplanması: Agaroz jel kaplamalı lamaların hazırlanmasındaki temel amaç, jelin, deneysel aşamalar tamamlanana kadar yırtılmadan veya çatlamadan kalmasını sağlamak, böylece mikroskop altında yapılan incelemelerde kusursuz ve net bir görüntü elde edilmesidir. Deneysel çalışmaya başlamadan 24 saat önce, normal erime noktasına sahip agaroz jel lamaların üzerine tamamen yayılır. Bu şekilde, jel tabakaları arasında hücrelerin düzgün bir şekilde gömülmesi sağlanır. Doğru sonuçların elde edilebilmesi için, agaroz jelin konsantrasyonu ile birlikte jel içinde bulunan hücrelerin konsantrasyonları da dikkatle ayarlanmalıdır (Green vd., 1996).

2.Hücre Materyalinin Hazırlanma Aşaması: Komet testinin sonuçlarının güvenilirliği, test materyalinin hazırlama hassasiyetine büyük ölçüde bağlıdır. DNA hasarı analizlerinde kan örnekleri kullanılacaksa, heparinize edilmiş kan, kültür ortamına alındıktan sonra, düşük erime noktasına sahip agaroz ile karıştırılır. Bu işlem, hücrelerin uygun koşullarda korunmasını ve DNA'nın doğru şekilde analiz edilebilmesini sağlar (Green vd., 1996).

3.Liziz Aşaması: Agaroz jel donduktan sonra, lamalar üzerindeki jel tabakaları kaldırılır ve hücreler, yüksek tuz ve deterjan konsantrasyonuna sahip liziz çözeltisinde en az iki saat, en fazla 24 saat süreyle inkübe edilir. Liziz işlemi sırasında, kan ve doku örneklerindeki eritrositlerin parçalanmasıyla serbest radikallerin salınımı engellenmeye çalışılır. Özellikle demire bağlı serbest radikallerin DNA'ya zarar verebileceği göz önünde bulundurularak, liziz çözeltisine %10 dimetil sülfoksit (DMSO) eklenir. Liziz işleminin amacı, hücre zarlarını parçalayarak çekirdek içeriğini serbest bırakmaktır. Bu işlem sonrasında hazırlanan preparatlar, bir sonraki aşama için hazır hale gelir (Green vd., 1996).

4.DNA Sarmalının Açılması Aşaması (Unwinding): Liziz işleminin ardından, preparat üzerinde bulunan DNA'nın çift sarmal yapısının açılması için, elektroforez işleminden önce, pH değeri alkali özellikte ($pH > 13$) olan bir elektroforez tamponu içinde bekletilir. Bu işlem sırasında, alkali ortamda çift sarmal DNA'daki zincir kırıkları açılmaya başlar. Bu süreç, genellikle 20-25 dakika arasında sürer ve deneysel laboratuvarlara göre değişiklik gösterebilir (Collins, 2004).

5.Elektroforetik Alanda İşlem Aşaması: DNA sarmalının alkali pH ortamında açılmasının ardından, jel içerisinde bulunan tek zincirli DNA fragmanlarına elektroforez uygulanır. Elektrik akımı altında, negatif yüklü DNA molekülleri anoda doğru hareket eder. Bu hareket, DNA'nın hasar durumuna bağlı olarak kuyruklu yıldız (komet) şeklinde bir görünüm oluşturur. Hasarsız DNA, çekirdekten çıkamayıp yalnızca nokta şeklinde gözlemlenir. Elektroforez işlemi, 25 dakika süreyle, 25V ve 300 mA akımda gerçekleştirilir (McKelvey-Martin vd.,1993).

6.Nötralizasyon Aşaması: Bu aşamanın amacı, jel ortamının pH değerini nötralize etmektir. Bu işlem için, preparatlar pH değeri 7,5 olan bir tampon çözeltisi ile üç kez yıkanır. Bu yıkama işlemi, elektroforez sonrası jel ortamını nötralize ederek, DNA'nın boyama işlemine uygun hale gelmesini sağlar (Green vd., 1996).

7.Preparatların Boyanması ve Görüntülenmesi: Boyama ve görüntüleme işlemi için yaygın olarak etidyum bromür floresan boyası kullanılır. Boyama sonrası, floresan mikroskop altında yapılan incelemelerde, hasar görmüş DNA'dan anoda doğru hareket eden DNA parçaları, kuyruklu yıldız (komet) şeklinde gözlemlenirken, hasarsız DNA yalnızca nokta şeklinde görünür (McKelvey-Martin vd., 1993; Green vd., 1996; Collins, 2004).

8. Komet Görüntülerinin Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi:

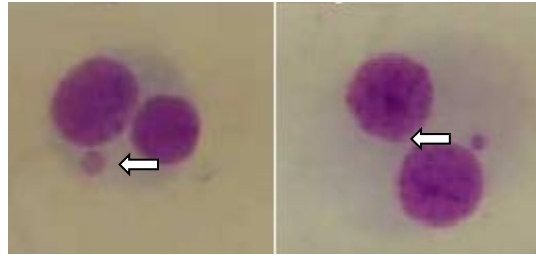
Görsel Değerlendirme: Değişik derecelerde hasara uğramış DNA'nın gösterdiği kuyruklu yıldız görüntüleri, insan gözü tarafından kolaylıkla ayırt edilebilir. Görsel değerlendirme, DNA'nın göç uzunluğuna dayalı olarak beş farklı kategoride tanımlanır (Şekil 2.1.). Bu değerlendirme, DNA hasarının şiddetini belirlemek için kullanılan en temel yöntemlerden biridir (McKelvey-Martin vd., 1993;Green vd., 1996; Collins, 2004).

Bilgisayarlı Görüntü Analizi: Komet testinde elde edilen görüntülerin daha hassas ve objektif bir şekilde analiz edilebilmesi için mikroskopa bağlı dijital kamera sistemleri kullanılır. Bu sistemler, otomatik olarak kuyruklu yıldız görüntülerini analiz eder. Görüntü analizi için birçok ticari yazılım mevcuttur ve bu yazılımlar, kuyruklu yıldızın baş kısmını kuyruğundan ayırt edebilecek şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca, bu yazılımlar; kuyruk moment, kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans

yoğunluğu gibi çeşitli parametreleri belirlemeye olanak tanır. Bu sayede DNA hasarının daha hassas bir şekilde ölçülmesi ve kategorize edilmesi sağlanır (McKelvey-Martin vd., 1993; Green vd., 1996; Magdolenova vd., 2014).

2.10. Mikronükleus (MN) Testi

Mikronükleus (MN), mitoz bölünme geçirmiş bir hücrede, esas çekirdeğe entegre olmayan, sentromer içeren kromozom parçaları veya asentrik kromozom parçalarından kaynaklanan oluşumlardır. Hücrelerde çeşitli ajanların oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı bir göstergesi, MN sayısındaki artıştır (Zuno vd., 1994). Anöplodik ajanlar, sentromerdeki bölünme hatalarına ve iç ipliklerindeki fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenik ajanlar ise kromozomlarda kırık oluşturmak suretiyle MN oluşumuna neden olmaktadır (Vanderkerken vd., 1989). MN testinin, genetik toksikoloji araştırmalarında yaygın bir test haline gelmesinin temel nedeni, mitoz ile oluşan tüm hücre tiplerinde hem in vitro hem de in vivo olarak uygulanabilir olmasıdır (Kirsch-Volders vd., 1997; Stopper ve Müller, 1997). In vitro MN testinde, uygun ortamlarda kültür şartlarına bırakılan hücre kültürlerine, kültürün yaklaşık 44. veya 46. saatinde Sitokalsin-B solüsyonu eklenir. Bu madde, sitoplazma bölünmesini baskılayarak bir hücre siklusunu tamamlayan çift nükleuslu hücrelerin oluşmasını sağlar. Kültür süresi sonunda, hücreler protokollere uygun şekilde işlenir ve preparatlarda MN içeren iki nükleuslu hücrelerin oranı belirlenir (Krishna ve Hayashi, 2000; Fenech ve Morley, 1986) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Mikronükleuslu hücreler (Pongsavee, 2015).

2.11. Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM)

Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) nanometre ölçeğinde ince alanlardan yüksek büyütmelemlerle malzemenin kristalografik ve morfolojik özelliklerinin aynı anda belirlenmesini sağlayan bir tekniktir (Ersöz, 2010). GEM’de elektronlar, 100 KeV veya daha yüksek (1 MeV) enerjilere kadar hızlandırılarak yoğunlaştırıcı mercekle aracılığıyla ince (200 nm’den küçük) bir numune üzerine yönlendirilir ve numunenin içinden geçirilir (Şentürk vd., 2012). GEM’in en büyük avantajı, yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlayabilmesi ve aynı örnekten hem görüntü hem de kırınım verisi elde edilebilmesidir. Ancak, numune hazırlama sürecinin uzun olması ve temsili bir görüntü elde etmek için

çok sayıda görüntü alınması gerekliliği, yöntemin zaman alıcı bir işlem olmasına neden olmaktadır (Bee vd.,2018).

GEM, numuneden geçirilen elektronların numune ile etkileşimi sonucu görüntü elde edilmesine dayanır. Elektron demetinin geçtiği bölgelerde meydana gelen genlik ve faz değişimleri, numune kalınlığı ve malzeme özelliklerine bağlı olarak görüntü kontrastını oluşturur. Elektron demetleri kullanıldığı için GEM, ışık bazlı mikroskopi tekniklerine kıyasla çok daha yüksek çözünürlük sunar. Hızlandırılmış elektronların düşük de Broglie dalga boyu, oldukça detaylı görüntülerin elde edilmesini sağlar. Numuneden geçen elektronlar doğrudan görüntü elde etmede kullanılabilirken, kırınım desenleri de aydınlık ve karanlık alan teknikleri ile görüntüleme için kullanılabilir (Hall vd., 2007; Williams ve Carter, 2009).

2.11.1. GEM Ölçüm Yöntemi

GEM kullanılarak NP'lerin başarılı bir şekilde görüntülenmesi, numunenin arka plana göre kontrastına bağlıdır. Numuneler, görüntüleme için karbon kaplı bakır ızgaralar üzerine kurutularak hazırlanır. Elektron yoğunlukları amorf karbona göre yüksek olan malzemeler kolaylıkla görüntülenebilir. Bu malzemeler arasında metaller (örneğin gümüş, altın, bakır, alüminyum), oksitler (örneğin silika, alüminyum oksit, titanyum oksit), polimer nanopartiküller, karbon nanotüpler, kuantum noktaları ve manyetik nanopartiküller bulunur. GEM, doğrudan parçacık büyüklüğü, tane boyutu, büyüklük dağılımı ve nanopartiküllerin morfolojisini belirlemek için tercih edilen bir tekniktir. Ölçüm doğruluğu genellikle gerçek değer %3'lük hata payı içerisinde kabul edilir. GEM görüntülerini elde etmek için, numunenin sıvı çözeltisinden 8-10 µL'lik bir damla, 50 Å kalınlığında ve 3 mm çapındaki karbon kaplı bakır ızgaralar üzerine damlatılır ve kurutulur. Daha sonra GEM cihazı ile parçacıkların morfolojik yapısı, çapı ve boyut dağılımını gösteren görüntüler elde edilir. Ayrıca, ImageJ gibi yazılımlar kullanılarak nanopartiküllerin boyut dağılımı oransal olarak analiz edilebilir (Hall vd., 2007; Williams ve Carter, 2009)



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması:

Çalışma kapsamında, sağlıklı dört erkek bireyden heparinli kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri, Mikronukleus testi, Komet testi ve Geçirimli Elektron Mikroskobu analizleri için gruplara ayrıldı. Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri, sigara kullanmayan ve herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan sağlıklı dört erkek gönüllüden alınmıştır.

3.1.2.1. Lenfosit İzolasyonu ve Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması:

3.1.2.1.1. Gönüllü Seçimi ve Kan Örneği Toplama

- Sigara ve alkol kullanmayan, sağlıklı 4 erkek bireyden heparinli tüplere kan örnekleri alınmıştır.

3.1.2.1.2. Lenfosit İzolasyonu

- 5 mL Histopaque-1077 üzerine 5 mL tam kan eklenmiştir.
- Örnekler 2000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Lenfosit tabakası, mikro pipet yardımıyla dikkatlice ayrılmıştır.
- 500 µL PBS + 500 µL lenfosit karışımı hazırlanmıştır.

3.1.3. Kimyasal Solüsyonun Hazırlanması

3.1.3.1. Paladyum Nanopartikül Çözeltilisinin Hazırlanması

10 mg Pd nanopartikülü 20 ml steril distile suda çözündürülmüştür. 1 saat sonik banyoda ve 24 saat manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Konsantrasyonu 40 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.3.2 Pozitif Kontrol Solüsyonun Hazırlanması

Pozitif kontrol gruplarında 10 mM H₂O₂ kullanılmıştır. %30’luk H₂O₂ çözeltisinden 102 µL alınmış ve 100 mL’ye kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Ayrıca Mikronükleus testi için

mitomycin C toz maddesi 2 µg/mL konsantrasyonu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol gruplarına hiçbir kimyasal eklemesi yapılmamıştır.

3.1.3.3. Besiyeri

100 mL besiortamı (RPMI 1640 Sigma)' na 25 mL fetal calf serumu (Biochrom AG). 0,5 mL Penisilin-streptomisin (Biochrom Ag) eklenerek hazırlanmıştır.

3.1.3.4. Carnoy Fiksatif Solüsyonun Hazırlanması

3:1 oranında Metanol, asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3.5. Hipotonik Solüsyonun Hazırlanması

Hipotonik çözelti: KCl çözeltisi 0,5592 g KCl 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.6. Fitohemaglutinin Çözeltisi

0,2 mg fitohemaglutinin (Biochrom AG) 5 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.7. Liziz Çözeltisi

75,05 gr NaCl (Merck), 18,6 gr EDTA, 0,6 gr Trizma (Tris) (Sigma) üzerine 350 mL saf su ilave edilmiştir. 20 dakikalık süreden sonra 4 gr NaOH (Merck) eklenerek saf su ile 445 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyondan 71 mL alınmış, üzerine 8 mL DMSO (Carlo Erba) ve 1 mL Triton-X-100 (Sigma) eklenerek hazırlanmıştır.

3.1.3.8. Fosfat Tamponu

0,96 gr PBS (sigma) 100 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.9. Düşük Erime Noktalı Agaroza (LMA)

0.065 gr LMA (bioshop) 10 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.10. Yüksek Erime Noktalı Agaroz (NMA)

0,25 gr NMA (sigma) 50 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.11. Elektroforez Çözeltisi

18 gr NaOH (300 mM NaOH), 0,63 gr EDTA (1 mM EDTA) üzerine 1.5 lt olana kadar saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.1.3.12. Nötralizasyon Solüsyonunun Hazırlanması

24 gr Trisma base (Sigma) 500 mL'ye kadar saf su ile hazırlanmıştır.

3.1.3.13. Etidyum Bromür Boya Solüsyonunun Hazırlanması

5 mg etidyum bromür 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanan stok çözeltiden 1:4 oranında seyreltme yapılarak hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

Cihazlar

- Floresan mikroskop (Olympus, BX51 mikroskop)
- Hassas terazi (Kerni ALJ 220-4)
- Elektroforez (Thermo Scientific, EC300X12)
- PH metre (Inolab wtw)
- Etüv (Nüve-EN 400)
- Santrifüj (Nüve-NF 815)
- Manyetik karıştırıcı (Misung Scientific, MS300HS)
- Sıcak su banyosu (Nahita, 601/12)
- Geçirimli Elektron Mikroskop

3.2. Yöntemler

3.2.1. Yeşil Sentez:

Bu çalışmada kullanılacak *P. spina-christi* (Körçalı) bitkisi, 2023 yılının Eylül ayında, vejetasyon dönemi sırasında Mersin'in Emirler Köyü kuzey yamaçlarında belirlenen lokalitelerden toplanmış ve sistematik kaynaklar kullanılarak teşhisi gerçekleştirilmiştir.

Kingdom: Plantae

Clade: Tracheophytes

Clade: Angiosperms

Clade: Eudicots

Clade: Rosids

Order: Rosales

Family: Rhamnaceae

Genus: *Paliurus*

Species: *P. spina-christi*

3.2.1.1. *P. spina christi* (Körçalı) Bitkisinin Meyve Ekstraktının Hazırlanması:

- *P. spina-christi* türüne ait meyveler, saf su ile 2-3 kez yıkandıktan sonra oda sıcaklığında, gölgede kurutulmuştur.
- Kurutulan meyveler, öğütücü ile ince toz haline getirilmiştir.
- Elde edilen tozdan 5 g, yuvarlak dipli balon içerisine alınmıştır.
- Üzerine 250 mL saf su eklenerek, 60 °C sıcaklıkta geri soğutucu altında manyetik karıştırıcıda 30 dakika ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.
- Süre tamamlandıktan sonra karışım, oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmıştır.
- Daha sonra Whatman No.1 filtre kâğıdı ile süzülerek partiküllerden arındırılmıştır.
- Elde edilen ekstrakt, +4 °C’de saklanarak kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.2. Paladyum Nanopartiküllerinin (PdNP) Sentezi ve Karakterizasyonu:

3.2.1.2.1. PdNP Sentezi:

- 80 mL Potasyum Hekzakloropalladat (K_2PdCl_6 , 1.0 mM) çözeltisi, manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
- Çözeltiye 20 mL bitki ekstraktı ilave edilir ve PdNP oluşumu, renk değişimi ile takip edilmiştir.
- Reaksiyon tamamlandıktan sonra, nanopartikülleri süspansiyondan ayırmak için çözelti 13.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen pellet (çökelti), iki kez saf su ile yıkanarak tekrar santrifüj edilir ve böylece bitki kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Son olarak, nanopartiküller kurutularak saklanmıştır.

3.2.1.2.2. PdNP Karakterizasyonu:

- **Hücre içi varlığı:** Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) kullanılarak incelenmiştir.
- **Boyut dağılımı ve Zeta potansiyeli:** Dinamik Işık Saçılması (DLS) yöntemi ile ölçülmüştür ve görüntü analiz Taramalı elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hücre Kültürü Deney Gruplarının Hazırlanması

- İçerisinde 5 mL kan örneği bulunan deney tüpüne histopak 1077 solüsyonundan 5 mL eklenerek 30 dakika süre ile 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Lenfosit tabakası mikropipet yardımıyla alınmıştır.
- İçerisinde 5 mL RPMI-1640 bulunan, etiketlenmiş tüplere PBS ile karıştırılmış lenfosit örneğinden 300 µL eklenmiştir.
- Paladyum (Pd) nanopartikül solüsyonları deney gruplarına eklenmiştir. (40µg/ml)
- Pozitif kontrol grubu için 10 mM H₂O₂ uygulanmıştır.

3.2.2.1. İnkübasyon Süreci

- Tüplerin ağzı kapatılarak 45°’lik açı ile 37°C’lik etüvde 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.2. Test Uygulamaları

- 72. saatin sonunda tüpler etüvden çıkarılmıştır.
- Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Testi) ve Mikronükleus (MN) Testi uygulanmıştır.

3.2.3. Komet Yönteminin Aşamaları:

- Eppendorf tüplerine PBS (Fosfat Tamponlu Salin Çözeltilisi) eklenerek üzerine Pd nanopartiküllerine maruz bırakılmış, negatif kontrol ve pozitif kontrol grubuna ait kan örnekleri ilave edilmiştir.
- Pozitif kontrol tüplerine Hidrojen Peroksit (H₂O₂), negatif kontrol tüplerine ise distile su eklenerek 2500 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası hücreler, Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA) ile karıştırılır.
- Önceden NMA ile kaplanmış lamalar üzerine yayılır ve lamel ile kapatılmıştır.
- Preparatlar 15-20 dakika boyunca buzdolabında bekletilerek jelleşmesi sağlanmıştır.

- Lameller kaldırılarak preparatlar liziz solüsyonuna aktarılır ve 2- 2.5 saat boyunca +4°C’de liziz solüsyonunda inkübasyona bırakılmıştır.
- Bekleme süresinin ardından soğuk elektroforez çözeltisi hazırlanarak elektroforez tankına eklenmiştir ve 20 dakika çalıştırılmadan bekletilmiştir.
- Lamalar elektroforez tankına yerleştirilir ve 25V, 300mA koşullarında 20 dakika elektroforez işlemi uygulanmıştır.
- Elektroforez sonrası lamalar 5 dakika boyunca nötralizasyon tamponunda bekletilmiştir.
- Nötralizasyon sonrası lamalar %100’lük etil alkol ile fıkse edilmiştir.
- Preparatlar, üzerine etidyum bromür damlatılarak boyanmıştır.
- Lamalar lamel ile kapatılıp ve floresan mikroskop altında analiz edilmiştir.
- Her preparattan 100 komet hücre seçilerek değerlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Mikronükleus için Gerekli Kimyasal Maddeler:

Pozitif kontrol grubu için:

- MN testi kapsamında Mitomisin-C,
- Komet testi kapsamında Hidrojen Peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır.
- Negatif kontrol grubu için ise steril distile su kullanılmıştır.

3.2.4.1. Mikronükleus Testi Yöntemi (MN):

- Önceden hazırlanmış ve numaralandırılmış, besi ortamı içeren tüplere kan örnekleri eklenmiştir.
- Her birey için nanopartikül solüsyonu, pozitif kontrol ve negatif kontrol grupları hazırlanmıştır.
- Dört farklı bireyden alınan kan örnekleri kullanılarak, her biri dört kez tekrarlanmış olacak şekilde MN testi için tüplere kan eklenmiştir.
- Tüm tüplere fitohemaglutinin solüsyonu eklenmiştir.
- Pozitif kontrol tüplerine Mitomisin-C (2 μ g/ml) solüsyonu, negatif kontrol tüplerine ise steril saf su eklenmiştir.
- Tüpler, 72 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon süresinin 44. saatinde tüm MN tüplerine Sitokalsin-B (6 μ g/ml) eklenmiştir.
- Hücre süspansiyonları santrifüj edilerek çökelti elde edilmiştir.
- Çökelti üzerine hipotonik solüsyon eklenerek oda ısısında 5 dakika süre ile hücrelerin şişmesi sağlanmıştır.
- 10 dakika süre ile 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Pellet üzerine fiksasyon solüsyonu eklenerek santrifüj edilmiştir. Ve bu işlem en az 4 kez tekrarlanmıştır.
- Son aşamada çökelti üzerine fiksatif solüsyon eklenerek preparatlar lamlara yayılmıştır.
- Hazırlanan MN preparatları Giemsa boyası (%5'lik) ile boyanmıştır.
- Işık mikroskobu kullanılarak preparatlar incelenmiştir. Ve her preparatta 2000 adet ikinükleuslu hücre analiz edilerek MN içeren hücreler sayılmıştır. Ve binde değer olarak not edilmiştir.

3.2.4.2. Proliferasyon İndeksi (PI) Hesaplanması

Proliferasyon İndeksi, hücre popülasyonunun ne kadarının bölünme sürecine girdiğini gösterir. Bu indeks, farklı çekirdek sayısına sahip hücrelerin oranlarına dayanarak hesaplanır.

$$CBPI=1(M1)+2(M2) +3(M3)/ N$$

M1: Tek çekirdekli hücre sayısı

M2: İki çekirdekli hücre sayısı

M3: Üç veya daha fazla çekirdekli hücre sayısı

N: Toplam hücre sayısı (M1 + M2 + M3) (Çelik, 2006).

3.2.5. GEM Analizi için Gerekli Kimyasal Maddeler:

- PBS (Sigma,ABD)
- Glutaraldehit
- Osmiyum tetraoksit
- Etanol
- Heksametil-disilazan (Wako)
- Epoksi reçinesinesi

3.2.5.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) Analizi Protokolü

- TEM analizi için, nanopartikül (NP) ile inkübe edilen ve edilmeyen hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Ardından hücreler, %2,5 glutaraldehit içinde 24 saat boyunca fikse edilmiştir.
- Son fikse işlemi, hücrelerin %1 osmiyum tetraoksit içinde 1 saat süreyle bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

- Dehidrasyon işlemi, artan etanol konsantrasyonlarında (%50, %60, %70, %80, %90 ve %100) ve ardından heksametil-disilazan (Wako) ile yıkama adımlarıyla tamamlanmıştır.
- TEM analizi için hücre numuneleri gözeneklerinden süzülerek Epoksi reçinesine (EPON 812, TAAB, Berks, UK) gömülmüştür.
- Ultra ince kesitler (~90 nm), Sorvall MT-5000 mikrotomu (DuPont, Wilmington, DE, ABD) ve elmas bıçak kullanılarak hazırlanmıştır.
- Kesitler bakır ızgaralar üzerine alınarak doymuş sulu uranil asetat ile boyanmıştır.
- %4 kurşun sitrat ile karşıt boyama işlemi uygulanarak TEM (H-7100; Hitachi, Tokyo, Japonya) ile gözlem gerçekleştirilmiştir (Hashimoto ve ark., 2015).

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm parametreler için normallik kontrolü Shapiro Wilk's testi ile yapılmıştır. Deney protokolleri sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 20.0 analiz programı kullanılmıştır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla uygulanan konsantrasyon hem pozitif kontrol değerleri hem de negatif kontrol değerleri arasında kıyaslanmıştır. Tüm analizler yapılırken deney protokollerinden elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark ANOVA programı ile analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar arasındaki fark LSD test yöntemiyle elde edilmiştir. Değerlendirilmeler yapılırken p değeri 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

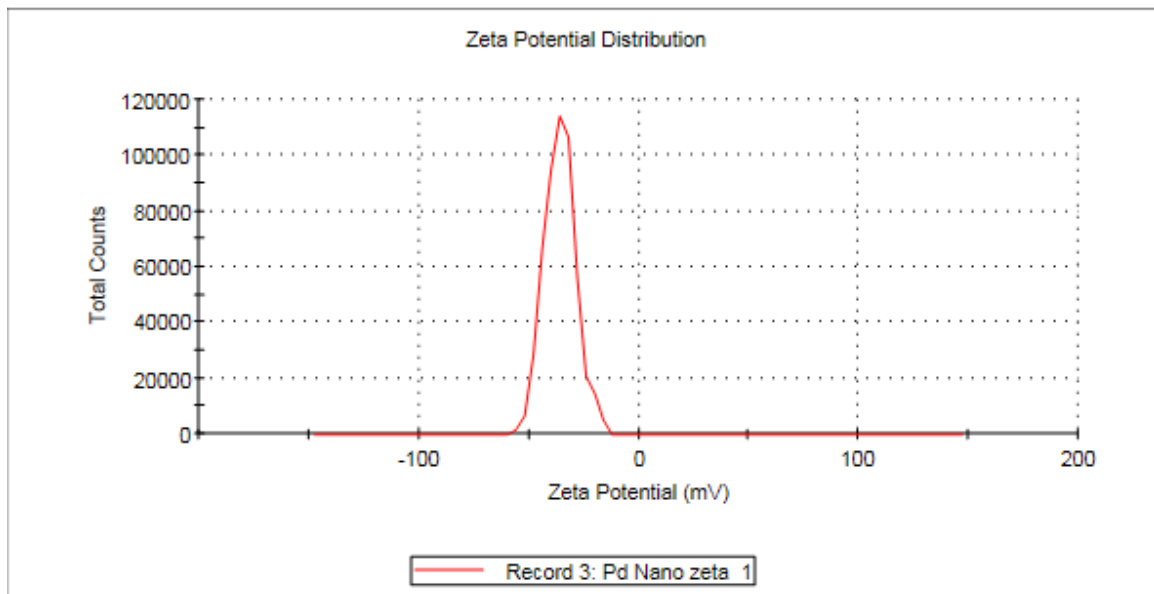
4.1. Bulgular

Bu çalışmada, yeşil sentez yöntemi ile paladyum nanopartikülleri sentezlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda paladyum nanopartikülleri lenfosit hücreleri ile muamele edilmiştir. Pd nanopartiküllerinin boyutu ve zeta potansiyeli DLS yöntemine göre ölçülmüştür. Oksidatif hasar parametresi tek hücre jel elektroforezi (komet) yöntemi ve genotoksik etkisi mikronukleus test yöntemi ile ve hücre içi varlığının gösterilmesi, ise transmisyon (geçirimli) elektron mikroskobu (GEM) analizi ile belirlenmiştir.

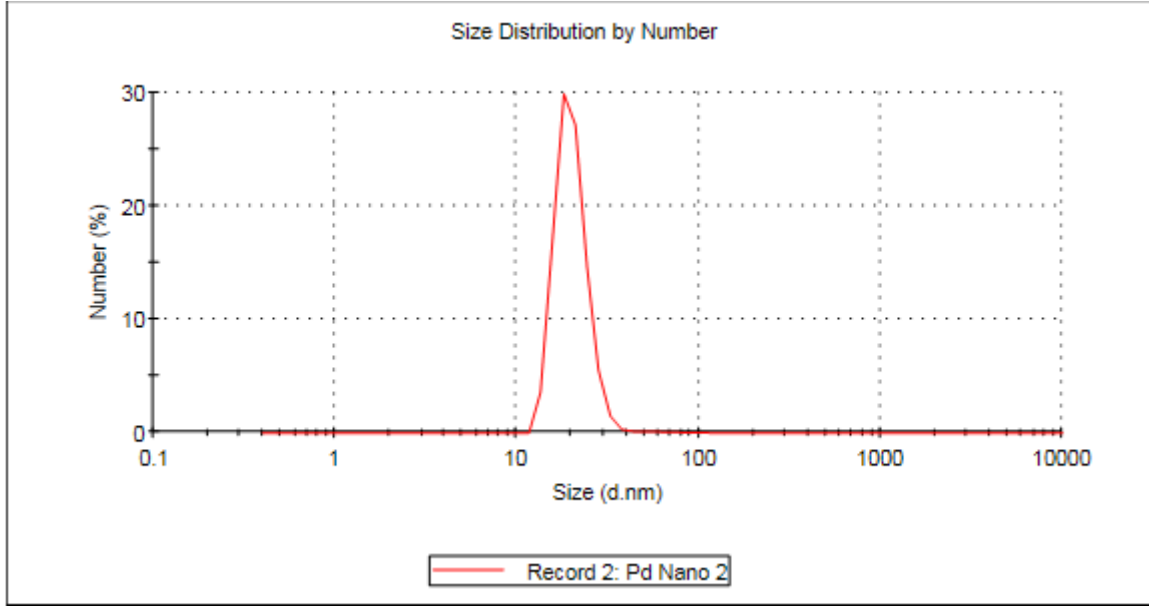
4.1.1. Yeşil Sentez ile Elde Edilmiş Pd Nanopartiküllerinin Boyutu, Zeta Potansiyeli Değerleri ve Elektron Mikroskop Analiz Sonuçları

P. spina-christi (Körçalı) bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen Pd nanopartiküllerinin partikül boyutu DLS yöntemine göre ölçülmüştür. Sentezlenen nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu 20 nm olarak ölçülmüştür. Sentezlenen Pd nanopartiküllerinin zeta potansiyeli -35,8 mV. olarak ölçülmüştür. Zeta potansiyelinin eksi değerlerde olması sentezlediğimiz Pd nanopartiküllerinin yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca nanopartiküllerin yüzeyindeki negatif yüklü grupların nanopartiküllerin kümeleşmesini engellediği düşünülmektedir. Ölçüm sonucunda elde edilen partikül boyutu ve zeta potansiyeli sonuçları şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

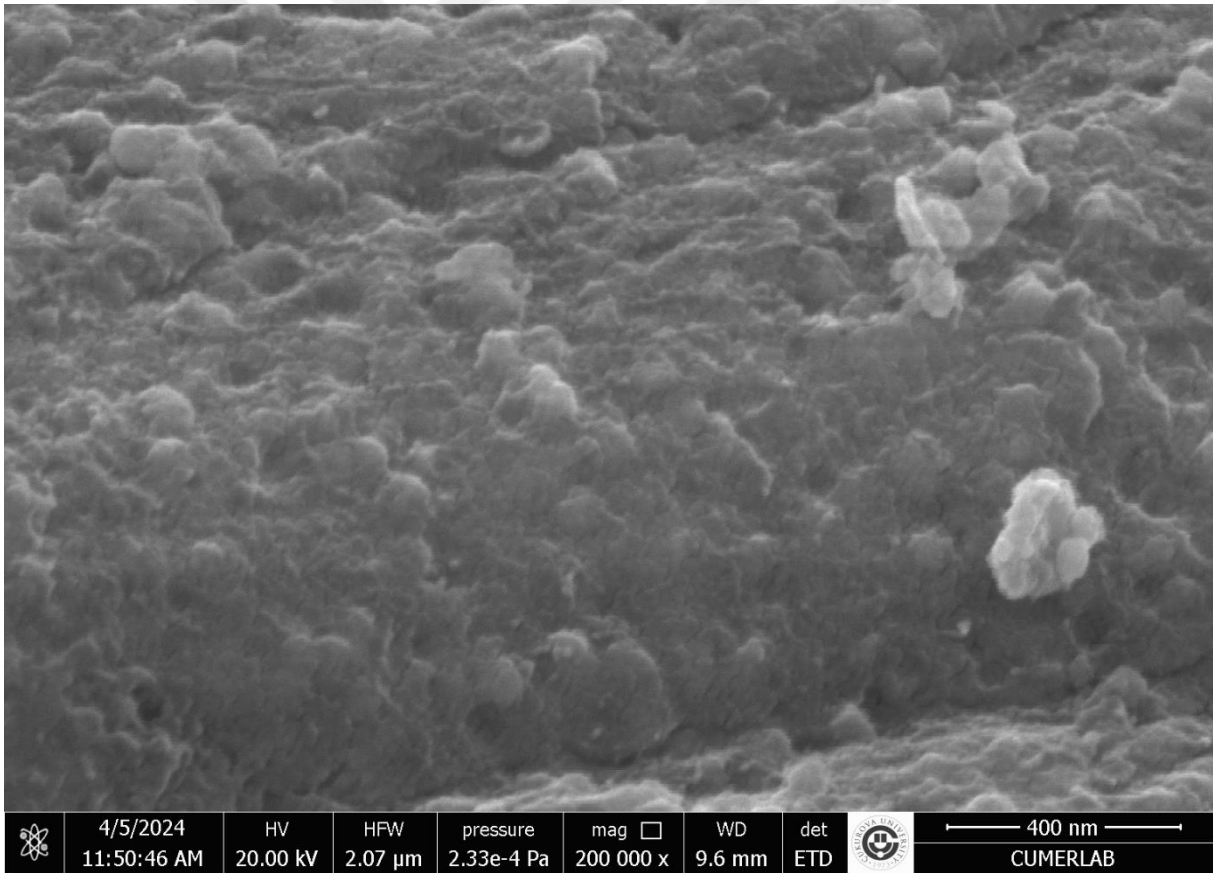
PdNP'üne ait Taramalı Elektron mikroskop (TEM) görüntüsü 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Yeşil sentez ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin Zeta potansiyelini gösteren DLS sonuçları.



Şekil 4.2. Yeşil sentez ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin boyutunu gösteren DLS sonuçları.



Şekil 4.3. *P. spina-christi* (Körçalı) özütü yardımı ile elde edilmiş Pd nanopartiküllerinin TEM görüntüsü

Bu çalışmada, yeşil sentez yoluyla elde edilmiş 20 nm boyutunda Pd nanopartikülüne belirlenen konsantrasyonda (40µg/mL) maruz bırakılmış 4 farklı bireyden alınan kan lenfosit hücreleri üzerinde

yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen oksidatif DNA hasar verileri Komet test yöntemi ile belirlenmiştir. Komet deneyi sonunda hazırlanan preparatlar etidyum bromür boya solüsyonu ile boyanmıştır. Her bir bireye ait bir konsantrasyon için 100 hücre sayılmış ve sayılan hücreler uğramış oldukları hasara göre Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3, Tip 4 olmak üzere beş grupta sınıflandırılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda hasarlı genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

Genetik hasar indeksi (GHI)=Arbitrary Unit:[(Tip 0x0) + (Tip1x1) + (2xTip 2) + (3xTip 3) + (4xTip 4)]

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY): (Tip 2) + (Tip 3) + (Tip 4) (Sınacı vd., 2023)

4.1.2. İnsan Kan Lenfositleri Üzerinde Uygulanan Komet Testinde Elde Edilen Sonuçlar

Pd nanopartikülü uygulanmasıyla elde edilen Komet analiz sonuçları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntüler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

4.1.2.1. Kan Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi ve Genetik Hasar İndeksi Sonuçları

Tablo 4.1.'de belirtilen verilerden elde edilen HHY ve GHI değerleri, bu değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir. Genel olarak Pd nanopartikülü uygulanmasıyla HHY ve GHI artış görülmüştür. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.001$).

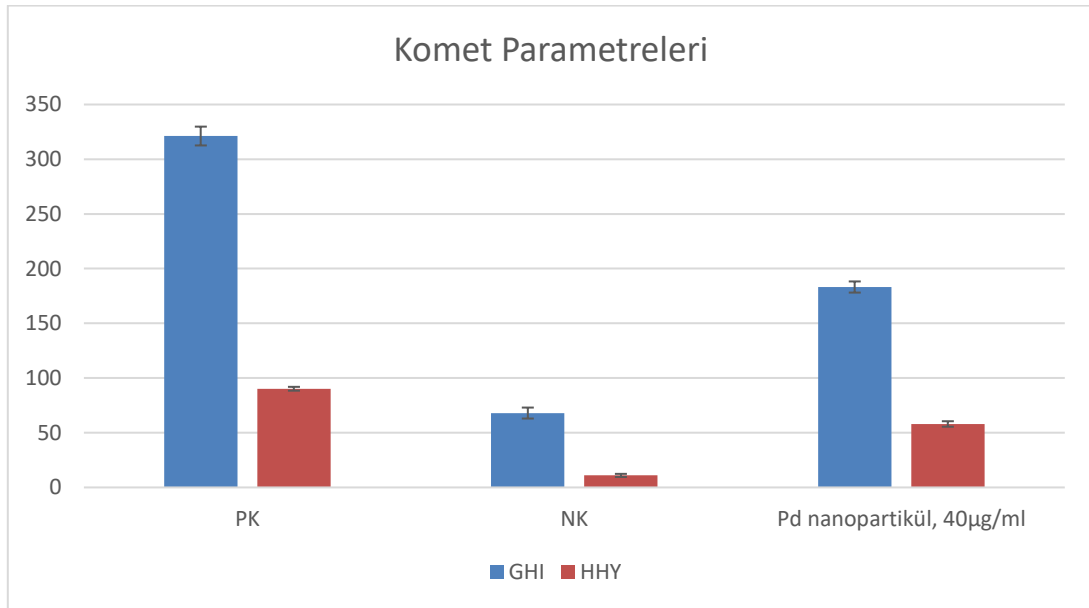
Tablo 4.1. Pd nanopartikülleri ile muamele edilmiş lenfosit hücrelerinde komet sayım verileri

	Donor	0	1	2	3	4	AU (GHI)	HHY
PK (H ₂ O ₂) 10mM	1	4	10	14	24	48	302	86
	2	1	5	7	28	59	339	94
	3	2	6	8	26	58	332	92
	4	2	9	15	23	51	312	89
NK	1	55	36	6	3	0	57	9
	2	48	37	7	7	1	76	15
	3	40	49	7	2	2	77	11
	4	51	40	6	2	1	62	9
Pd nanopartikül 40µg/ml	1	24	25	22	16	13	169	51
	2	20	21	21	23	15	192	59
	3	12	25	33	22	8	189	63
	4	23	18	22	27	10	183	59

Tablo 4.2. Pd Nanopartikülleri ile muamele edilmiş insan kan lenfositlerinde komet test parametrelerine ait istatistiksel sonuçlar

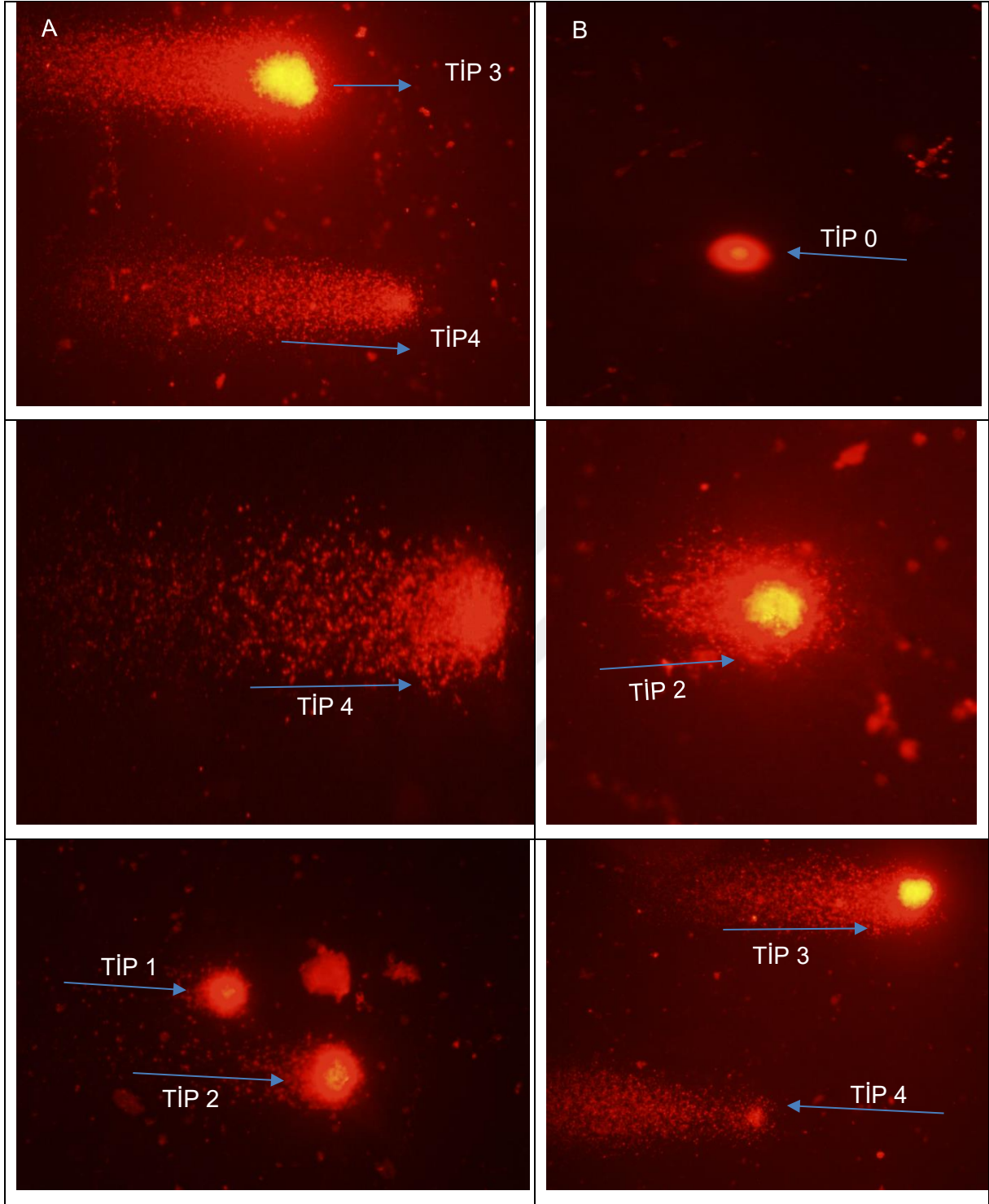
UYGULAMA	GHI Ortalama $\pm$ standart hata	HHY Ortalama $\pm$ standart hata
PK	321,2 $\pm$ 8,59***	90,2 $\pm$ 1,75***
NK	68,0 $\pm$ 5,01	11,0 $\pm$ 1,41
Pd nanopartikül 40 μ g/ml	183,2 $\pm$ 5,10***	58,0 $\pm$ 2,51***

Negatif kontrol ile kıyaslandığında *** p<0.001,



NK: Negatif kontrol- PK: Pozitif kontrol (H₂O₂)- GHI: Genetik Hasar İndeksi- HHY: Hasarlı Hücre Yüzdesi

Şekil 4.4. Komet analiz sonuçlarının farklı konsantrasyonlar arasındaki dağılımı ve ilgili istatistiksel değerlendirmeleri.



Şekil 4.5. İnsan kan lenfositlerinden elde edilmiş komet görüntüleri

4.1.3. İnsan Kan Lenfositlerinde Mikronükleus Testi Analiz Sonuçları

Kan hücrelerinde yapılan MN testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Pd nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak MN değerlerinde artış, Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi (CBPI) değerlerinde azalma görülmüştür. Pd nanopartikül konsantrasyonu negatif kontrole göre artış göstermiştir (Tablo 4.3., Tablo 4.4. ve Şekil 4.4.). Mikronükleus frekansındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Sitokinez-Blok Proliferasyon İndeksi değerlerinde negatif kontrole göre azalma gözlenmiştir. Gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

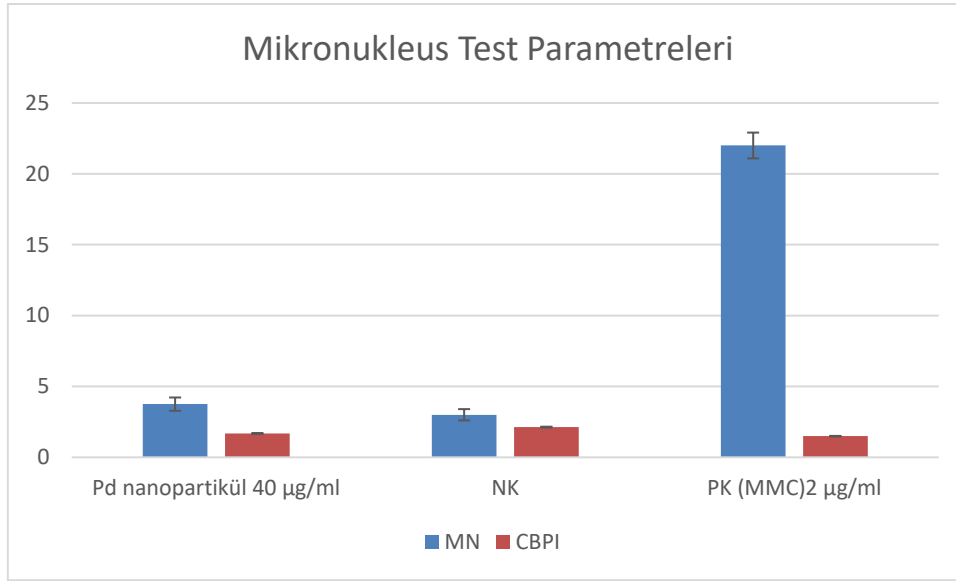
Tablo 4.3. Pd nanopartikül ile muamele edilmiş insan kan Lenfositlerinde Mikronükleus parametreleri, istatistiksel sonuçları ve Sitokinez-Blok Proliferasyon İndeksi (CBPI)

Uygulama	Donor	CBPI	MN
40 µg/ml Pd	1	1,66	3
	2	1,71	3
	3	1,70	4
	4	1,66	5
Pozitif Kontrol	1	1.52	21
	2	1.53	20
	3	1.50	23
	4	1.44	24
Negatif Kontrol	1	2.20	3
	2	2.17	2
	3	2.09	4
	4	2.06	3

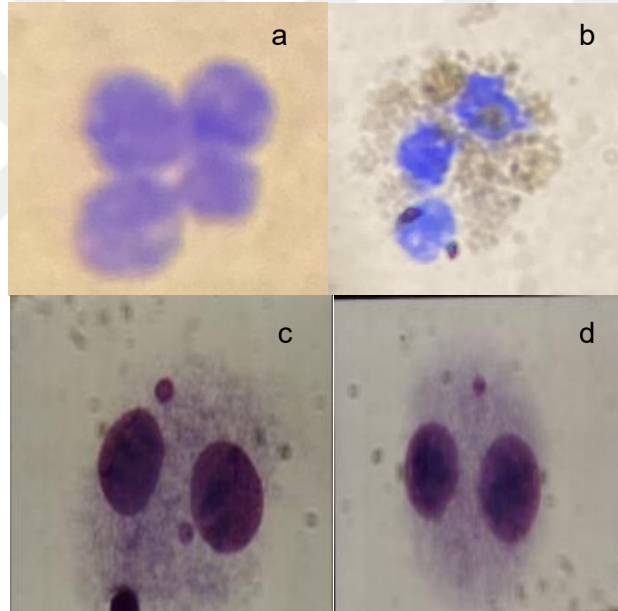
Tablo 4.4. Pd Nanopartikülü ile muamele edilmiş insan kan Lenfositlerinde Komet test parametrelerine ait istatistiksel sonuçlar

UYGULAMA	MN Ortalama $\pm$ SH	CBPI Ortalama $\pm$ SH
Pd nanopartikül 40 µg/ml	3,75 $\pm$ 0,47	1,68 $\pm$ 0,01***
NK	3,00 $\pm$ 0,40	2,13 $\pm$ 0,03
PK (MMC) 2 µg/ml	22,0 $\pm$ 0,91***	1,49 $\pm$ 0,02***

Negatif kontrol ile kıyaslandığında *** $p<0.001$,



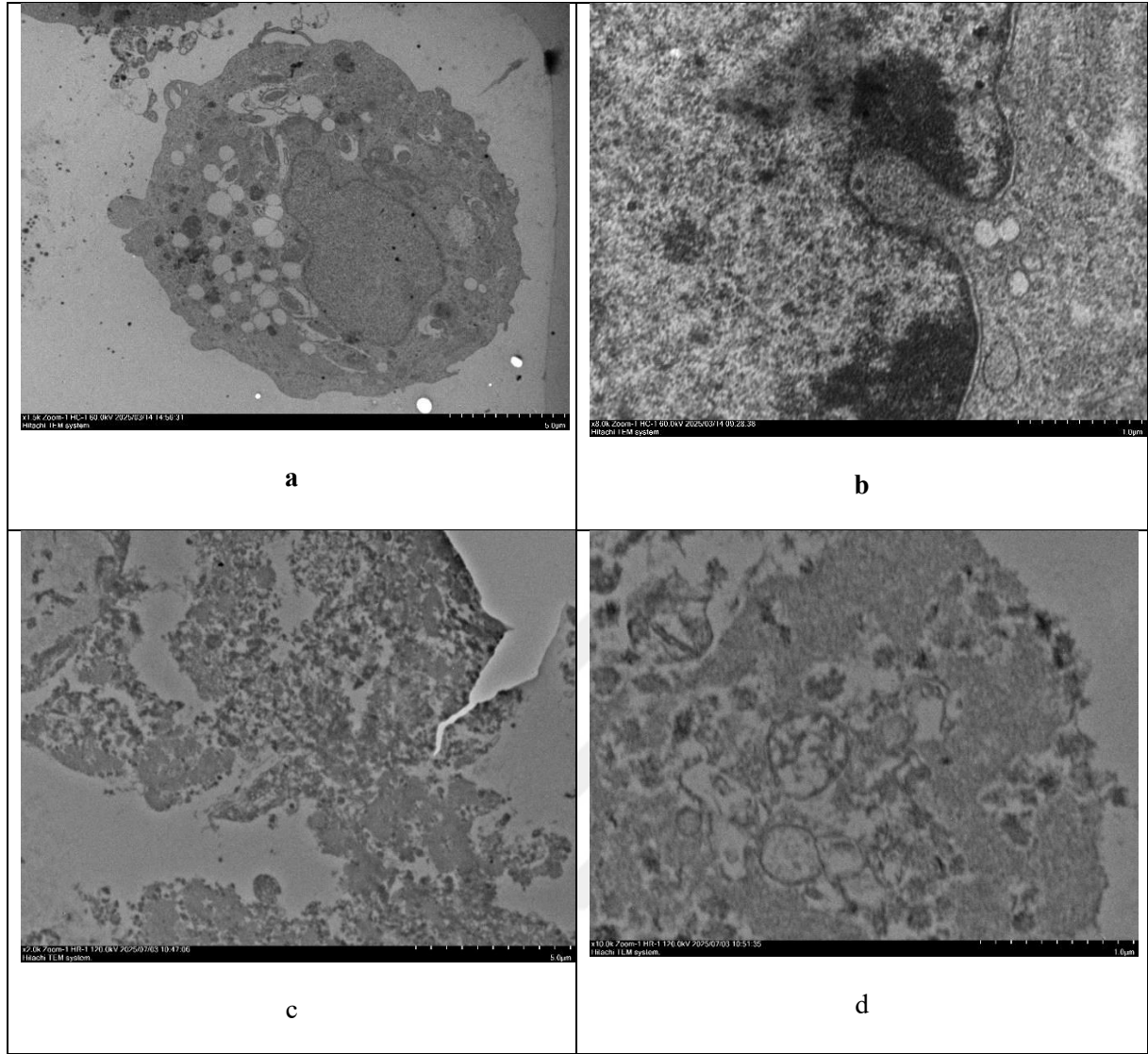
Şekil 4.6. Mikronükleus analiz sonuçlarının farklı konsantrasyonlara göre dağılımı ve istatistiksel analizleri.



Şekil 4.7. İnsan kan lenfosit kültürlerinde dört nukleuslu (a) üç nukleuslu (b) ve mikronükleuslu hücre (c-d) görüntüleri

4.1.4. Geçirimli Elektron Mikroskop (GEM) Analiz Sonuçları

GEM analizi için nanopartikül (NP) ile inkübe edilen lenfosit hücreleri belirli işlemlerden geçirildikten sonra elde edilen gridler hizmet alımı yapılmak üzere Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi'ne (DAYTAM) gönderilmiştir. Yapılan analiz sonucunda hücre içindeki Pd nanopartikül varlığı tespit edilmiştir. Nanopartikül varlığı Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Pd Nanopartikülü ile muamele edilmiş lenfosit hücrelerinin GEM görüntüsü (a-b) negatif kontrol kültürlerinde lenfosit hücrelerinin GEM görüntüsü (c-d)

4.2. Tartışma

Bu çalışmada, *P. spina-christi* bitkisi kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen paladyum (Pd) nanopartiküllerinin insan periferik kan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Genotoksisite, Komet ve Mikronükleus (MN) testleri ile belirlenmiş; ayrıca nanopartiküllerin hücre içi varlığı Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) ile gösterilmiştir.

Komet testi sonuçlarına göre Pd nanopartikül uygulanan gruplarda, negatif kontrol gruplarına kıyasla Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) değerlerinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.001$). Bu bulgular, Pd nanopartiküllerinin DNA'da tek sarmal kırıkları oluşturabilecek düzeyde oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir.

MN testi bulguları da Komet testi sonuçlarını destekleyici niteliktedir. Pd nanopartikülüne maruz bırakılan lenfositlerde MN frekansında artış, CBPI değerinde ise anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p<0.001$).

GEM analizi ile elde edilen görüntüler, Pd nanopartiküllerinin hücre zarını geçerek sitoplazmaya ve olasılıkla nükleus çevresine kadar ilerleyebildiğini göstermiştir.

Paladyum nanoparçacıkların (PdNP'ler) çevresel düzeylerindeki artışın başlıca kaynağı olarak, motorlu taşıtlarda egzoz emisyonlarını azaltmak amacıyla kullanılan üç yollu katalitik konvertörler (TWC'ler) gösterilmektedir (Palacios vd., 2000; Gómez vd., 2002; Ravindra vd., 2004; Wang ve Li, 2012). Bu konvertörler, zararlı egzoz gazlarını (karbon monoksit [CO], azot oksitler [NO_x] ve yanmamış hidrokarbonlar [HCs]) dönüştürerek hava kalitesini iyileştirmeyi hedefleyen araç egzoz katalizörleri (VEK'ler) olarak işlev görmektedir. Dünya genelinde yılda yaklaşık 7 milyon insanın ölümüne neden olan hava kirliliği, günümüzde en ciddi çevresel sağlık tehditlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Dijkhoff vd., 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre, dünya nüfusunun yaklaşık %90'ı, yüksek düzeyde kirlenici içeren (CO, NO_x, HCs, organik kirleniciler, ağır metaller ve partikül madde [PM]) havaya maruz kalmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2016; Lelieveld vd., 2020). TWC'ler bu bağlamda, zararlı gazların dönüştürülmesinde etkin rol oynayarak atmosferik kirlenicilerin azaltılmasına önemli katkılar sunmuştur. Ancak, yüksek sıcaklık, mekanik aşınma, sinterleşme ve kimyasal reaksiyonlar gibi çeşitli çevresel ve operasyonel etkenler, bu sistemlerin katalitik yüzeylerinde bozulmalara neden olmakta ve bu durum, içerdikleri aktif paladyumun egzoz gazlarıyla birlikte çevreye salınmasına yol açmaktadır. Salınan paladyum, solunabilir boyutlarda (10–0.1 µm) ve nano ölçekte (1–100 nm) partiküller şeklinde çevrede birikerek yeni ve potansiyel olarak toksik bir kirlenici kaynağı oluşturmaktadır (Whiteley ve Murray, 2003; Jackson vd., 2007; Leopold vd., 2008; Prichard ve Fisher, 2012).

Nanopartikül maruziyetini işaret eden in vitro ve in vivo çalışmalarda yol açtığı toksisiteyi kanıtlayan veriler rapor edilmiştir.

Yapılan birçok in vitro çalışmalarda nanopartiküllerin hücre içi varlığı gösterilmiştir. Hashimoto ve Imazato, (2015) tarafından yapılan çalışmada günümüzde dental malzeme olarak kullanılan alüminyum oksit (Al₂O₃, 13 nm) ve silisyum oksit (SiO₂, 12 nm) nanoparçacıklarının kültüre edilmiş makrofaj hücrelerinde (RAW264) biyolojik etkilerini sitotoksosite ve genotoksosite analizleri ile değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Sitotoksosite değerlendirmesi WST-8 hücre canlılığı testi ve Hoechst/PI apoptoz testiyle; genotoksosite değerlendirmesi ise mikronükleus analizi, nükleer şekil değişiklikleri (deforme çekirdekler), komet testi ve konfokal mikroskopi ile yapılmıştır. Mikromorfolojik analizler taramalı ve geçirimli elektron mikroskopları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki nanoparçacık tipine maruz bırakılan hücrelerde immün boyama ile yapılan genotoksosite testlerinde çekirdek ve DNA hasarı gözlemlenmiştir. Sitotoksosite ile genotoksosite arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır. Hücrelerde çok sayıda nanoparçacık veziküller içinde büyük agregalar halinde gözlenmiş; ancak çekirdek ya da sitoplazma içinde nanoparçacık alımı az ya da hiç olmamıştır. Bu

morfolojik bulgular, hücre bozulmasının birincil nedeninin, her iki nanoparçacık tipinde de veziküllerin düşük pH ortamında meydana gelen kimyasal değişiklikler (örneğin Al_2O_3 veya SiO_2 'nin iyonlaşması) olduğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da genotoksisitenin ölçüldüğü komet testinde GHI ve HHY değerlerindeki artış DNA'nın oksidatif hasarını MN frekansındaki artış ise genotoksik hasarı işaret etmektedir. Hücrelerde mitotik aktivitenin ve bölünme kinetiğinin bir göstergesi olan CBPI değerindeki azalma ise PdNP'lerinin sitotoksik etkisini göstermektedir (Çelik, 2006; Sınacı vd., 2023). Hem genotoksik hem de sitotoksik etkiler açısından bu iki çalışma birbirini destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda da PdNP'ünün lenfosit hücre içi varlığı GEM analizi ile görüntülenmiş olması nanopartiküllerin hücre membranı üzerinde göstermiş oldukları etkinin nanopartikülün yüzey kimyası ve morfolojisine bağlı olduğu rapor edilmiştir (Kahraman vd., 2025; Hashimoto ve Imazato, 2015). Bu düzeyde internalizasyonu, genetik materyalle doğrudan etkileşme olasılığını artırmakta ve genotoksik etki mekanizmasını desteklemektedir. Literatürde de benzer şekilde, metal esaslı nanopartiküllerin hücre içinde birikim gösterdiği ve organellerde yapısal bozulmalara yol açabildiği ifade edilmiştir. GEM analizi, Pd nanopartiküllerinin hücre zarını geçerek sitoplazmaya ulaştığını ve hücre içi dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, nanopartiküllerin genetik materyal ile doğrudan temas kurarak hasar oluşturabileceği mekanizmasını desteklemektedir (Chen vd., 2013; Hashimoto ve Imazato, 2015).

Oksidatif stres aracılığıyla DNA hasarına neden olan nanopartikül etkileri, daha önce farklı metal nanopartikülleri (örneğin TiO_2 , ZnO , AgNP) ile yapılan çalışmalarda da benzer şekilde rapor edilmiştir (Aiken vd., 1996; Battal vd., 2015). İster ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nano boyuttaki sistemlerin etkinliğini artırmak, isterse de mühendislik ürünü nanomalzemelerin oluşturabileceği tehlikelerden kaçınmak amaçlansın, nanopartiküllerin insan hücreleri tarafından alım kinetiği ve hücre içindeki dağılımı temel öneme sahiptir. Nanoölçekli yapıların kendine özgü özellikleri, bu partiküllerin moleküler türlerden farklı bir şekilde hücreler tarafından alınmasına ve hücre içinde taşınmasına neden olur (Åberg, 2021). Bu bağlamda, Pd nanopartiküllerinin sitogenetik düzeyde önemli düzeyde DNA hasarı oluşturduğu görülmektedir. Fromell vd., (2023) solunan havadaki nanopartiküllerin sağlık üzerine oluşturmuş oldukları yan etkileri incelemek için üç farklı in vitro sistem kullanmışlardır (İnsan akciğer hücreleri, endotelial hücreler ve kan hücreleri). Kullanmış oldukları hücreleri in vitro olarak ortalama 37 nm boyutundaki PdNP'lerine maruz bırakmışlardır. Akciğer hücrelerindeki canlılık oranında düşüş gözlemişlerdir. Endotelial hücrelerin PdNP'lerine maruziyeti sonucunda nanoparçacık içermeyen kontrole kıyasla belirgin şekilde daha fazla ölü hücre gözlenmiştir. İnsan tam kanına 1 saat süreyle Pd nanoparçacıklarının (PdNP'ler) eklenmesi, trombosit sayısındaki azalma ile ölçülen bir trombosit aktivasyonuna yol açmıştır. PdNP'lerle inkübasyon sonrası trombosit sayısında ortalama %45'lik bir düşüş gözlenmiştir (Fromell vd., 2023). Sitotoksisite oluşturmak için normal akciğer hücrelerinde, küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerine kıyasla daha yüksek paladyum (Pd) konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmuştur. NSCLC hücrelerinde ise artmış apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, oksidatif DNA hasarı ve antioksidan protein düzeylerinde azalma belirgin şekilde gözlemlenmiştir (Gurunathan vd., 2020). Bizim çalışmamızda da lenfosit kültürlerinde hücrenin

mitotik aktivitesini ve bölünme kinetiğini ölçen parametre olan CPBI değerindeki azalma hücrelerde meydana gelen toksisiteyi kanıtlamaktadır. Toksisite açısından bu iki çalışma birbirini destekler niteliktedir.

Toksik etkileri araştırmak amacıyla genellikle farklı türlerde hayvan modelleri kullanılmaktadır. İn vivo çalışmalar, patolojik değişikliklerin, biyodağılımın ve eliminasyonun değerlendirilmesine olanak tanısa da; bu yöntemler hem etik açıdan sınırlamalar getirmekte hem de türler arası farklılıklardan kaynaklanan sonuç çarpıtmaları nedeniyle bazı kısıtlamalar içermektedir. Bu nedenle, havayla taşınan ince partiküller ve nanoparçacıkların tetiklediği patolojik olayların değerlendirilmesi amacıyla, insan akciğeri ile çevresindeki kan ve damar sistemini taklit eden üç farklı in vitro sistemi bir araya getirerek özgün bir model geliştirilmiştir (Fromell vd., 2023). Daha yüksek dozlarla inkübe edilen PBEC hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ve kaspaz aktivasyonu belirgin hale gelirken, bu etkiler A549 hücrelerinde gözlenmemiştir. Bu çalışmalar, havayla taşınan otomotiv kaynaklı Pd kirliliğinin sağlık etkilerinin değerlendirilmesinde tasarlanmış Pd nanoparçacıklarının kullanılabilirliğini göstermektedir (Wilkinson vd., 2011). Apoptoz ile DNA hasarı arasındaki ilişki, ciddi düzeyde DNA hasarının oluşumu ile açıklanabilir. Komet analizi ile belirlenen DNA hasar düzeyi ile apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur (Dikomey vd., 1998; Cregan vd., 1999; Roser vd., 2001; Barut ve Çelik., 2025). Gurunathan vd., (2020) Palladyum nanopartiküllerinin (PdNP) uygulanması; oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz ve immünomodülasyon mekanizmaları aracılığıyla eksozom biyogenezi ve salınımını artırmıştır. Yapılan analizler sonucunda, eksozomların küresel morfolojide olduğu ve ortalama çaplarının 50–80 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. Eksozom üretimi; toplam protein konsantrasyonu, eksozom sayısı, asetilkolinesteraz aktivitesi ve nötral sfingomiyelinaz aktivitesinin ölçülmesiyle doğrulanmıştır. PdNP ile muamele edilen hücrelerde, eksozom belirteçleri olan TSG101, CD9, CD63 ve CD81'in ifade düzeyleri kontrol grubu hücrelerine kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca, PdNP ile işlenen THP-1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda, kontrol grubuna göre sitokin ve kemokin düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (Gurunathan vd., 2020). Bizim çalışmamızda da PdNP uygulanmış olan lenfosit kültürlerinde yapılan komet analizinde negatif kontrole göre Tip 4 oluşumundaki artış hücrelerde toksisiteye bağlı hücre ölümü göstermektedir.

MN oluşumunun artması, Pd nanopartiküllerinin hücre bölünmesi sırasında kromozomal ayrılma bozukluklarına veya kromozom kırıklarına neden olabileceğini göstermektedir. CBPI'deki düşüş, hücre çoğalmasının baskılandığını ve bu nanopartiküllerin mitotik aktivite üzerinde inhibitör etki oluşturduğunu işaret etmektedir. Bu sonuçlar, MN testinin genotoksik ajanların tespiti konusundaki duyarlılığını bir kez daha ortaya koymaktadır (Fenech, 2000; Krishna ve Hayashi, 2000; Magdolenova vd., 2014).

Çalışmada kullanılan Pd nanopartiküllerinin yaklaşık 20 nm boyuta ve -35,8 mV zeta potansiyeline sahip olması, nanopartiküllerin yüksek stabiliteye sahip olduğunu ve kolloidal kümeleşme eğilimlerinin düşük olduğunu göstermektedir. Negatif yüzey yükü, biyolojik membranlarla etkileşimi

artırmakta ve bu durum nanopartiküllerin hücre içi taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Bu fizikokimyasal özellikler, genotoksisite üzerindeki etki mekanizmalarının anlaşılmasında kritik öneme sahiptir (Fröhlich, 2012; Hosseini vd., 2014; Zhang vd., 2020).

Komet testi ve akım sitometrisi ile analiz edilen genotoksisite, özellikle rGO ve rGO-PdNC'lerin daha yüksek düzeyde apoptoz ve nekroz indüklemesiyle birlikte anlamlı DNA hasarı ve lenfosit canlılığında azalma ortaya koymuştur. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite testleri, 77,73 ila 115,30 µg/mL arasında değişen IC₅₀ değerleriyle belirgin sitotoksik etkiler göstermiştir. Buna karşılık, sağlıklı CRL-4010 hücrelerinde daha yüksek IC₅₀ değerleri elde edilmiş, bu da toksisitenin daha düşük olduğunu göstermektedir. Genel olarak çalışma, bitki kökenli grafen bazlı nanomalzemelerin antimikrobiyal, antioksidan, genotoksik ve antikanser özelliklere sahip çok işlevli ajanlar olma potansiyelini vurgulamaktadır (Kahraman vd., 2025). Çalışmamızda, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen 20 nm boyutundaki Pd nanoparçacıklarının (PdNP'ler) lenfosit hücreleri tarafından alımının ardından elde edilen genotoksik ve sitotoksik verilerin birbiriyle uyumlu olduğu ve birbirini destekler nitelikte sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir. Komet testi sonuçlarına göre Pd nanopartikül maruziyeti, kontrol gruplarına kıyasla Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) parametrelerinde anlamlı artışa neden olmuştur (p<0.001). Bu artış, nanopartiküllerin oksidatif stres aracılığıyla DNA zincir kırıklarına yol açtığını göstermektedir (Ahamed vd., 2010; Liu vd., 2013).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son yıllarda çevre dostu yaklaşımların önem kazanmasıyla birlikte, metal nanopartiküllerin bitkisel kaynaklı yöntemlerle sentezlenmesine yönelik çalışmalar artış göstermiştir. Bu tez çalışmasında, *P. spina-christi* (Körçalı) bitkisi kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen paladyum nanopartiküllerinin insan periferik kan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri in vitro koşullarda değerlendirilmiştir.

Karakterizasyon analizleri sonucunda, PdNP'lerin yaklaşık 20 nm boyutunda ve -35,8 mV zeta potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu özellikler, nanoparçacıkların kolloidal ortamda kararlı olduğunu ve hücre zarlarıyla etkileşime girme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle negatif yüzey yükünün, hücre zarındaki pozitif yüklü yapılara bağlanmayı kolaylaştırarak nanoparçacıkların hücre içine alımını artırdığı düşünülmektedir.

Komet testi sonuçlarına göre, PdNP ile muamele edilen lenfositlerde GHI ve HHY değerlerinde, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bu durum, PdNP'lerin DNA üzerinde tek sarmallı kırıklar oluşturabileceğini düşündürmektedir. MN testi bulguları da bu sonucu desteklemiş; PdNP'ye maruz kalan hücrelerde mikronükleus oluşum sıklığı artmış, buna karşılık bölünme aktivitesini yansıtan CBPI değerlerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular, PdNP'lerin kromozomal bozukluklara ve hücre bölünmesini baskılayan etkilere neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, PdNP'lerin sadece genetik materyale değil, aynı zamanda hücre metabolizması, redoks dengesi ve mitotik aktivite gibi temel süreçlere de zarar verebildiğini ortaya koymuştur.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (GEM) ile yapılan analizlerde, PdNP'lerin hücre zarını geçerek sitoplazma ve nükleer bölgelere kadar ilerleyebildiği gözlemlenmiştir. Bu durum, nanoparçacıkların hücre içi organellerle doğrudan etkileşime geçebileceğini ve yüksek penetrasyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen PdNP'lerin insan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olabileceği bu çalışmada ortaya konulmuştur. PdNP'lerin hücre içine alınıp DNA bütünlüğünü bozması ve hücre bölünmesini engellemesi, çevresel maruziyet ve potansiyel biyomedikal uygulamalar açısından risk teşkil etmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bilimsel bulgular doğrultusunda aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

1. PdNP'lerin farklı hücre hatları (epitel, endotel, nöron, hepatosit vb.) üzerindeki etkileri değerlendirilerek dokuya özgü toksisite mekanizmaları ortaya konmalıdır.
2. Moleküler toksisite mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla, gen ekspresyon analizleri, oksidatif stres belirteçleri ve proteomik çalışmalar gibi ileri düzey analizlere yer verilmelidir.

3. Kronik maruziyeti modelleyen uzun süreli in vitro ve in vivo çalışmalarla, PdNP'lerin biyobirikim potansiyeli ve kalıcı toksik etkileri daha kapsamlı şekilde araştırılmalıdır.
4. Farklı sentez yöntemleriyle üretilen PdNP'lerin biyolojik etkileri karşılaştırılarak yeşil sentezin avantajları ortaya konmalıdır.
5. Özellikle otomotiv sektöründen kaynaklı çevresel PdNP maruziyetinin azaltılması için alternatif katalitik materyaller geliştirilmelidir.
6. PdNP maruziyetini izlemeye yönelik biyobelirteçlerin geliştirilmesi, çevresel ve mesleki maruziyetlerin erken tanı ve takibi açısından önemlidir.
7. Nanotoksikoloji alanında kullanılan testlerin standardize edilmesi, bilimsel çalışmaların karşılaştırılabilirliğini ve güvenilirliğini artıracaktır.

KAYNAKLAR:

- Åberg, C. (2021). Kinetics of nanoparticle uptake into and distribution in human cells. *Nanoscale advances*, 3(8), 2196-2212. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1NA00004E>
- Ahamed, M., AlSalhi, M. S., & Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta*, 411(23-24), 1841-1848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*, 7(1), 17-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Aiken III, J. D., Lin, Y., & Finke, R. G. (1996). A perspective on nanocluster catalysis: polyoxoanion and (n-C₄H₉)₄N⁺ stabilized Ir (0)~ 300 nanocluster ‘soluble heterogeneous catalysts’. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 114(1-3), 29-51. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(96\)00302-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(96)00302-0)
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., ... & Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 118, 1833-1847. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030>
- Atkins, P., & Jones, L. (2007). *Chemical principles: The quest for insight*.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Uçgun, E., Konaş Yedier, S., & Aydın, B. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of clothianidin in human lymphocytes with or without metabolic activation system. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(4), 364-370. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1438458>

- Balaram, V., Kamala, C. T., Rao, A. S., Satyanarayanan, M., Subramanyam, K. S. V., & Sawant, S. S. (2016). Platinum, Palladium and Rhodium in Road Dust/Top Soils from Major South Indian Cities: Implications on Environment and Human Health. In *Geostatistical and Geospatial Approaches for the Characterization of Natural Resources in the Environment: Challenges, Processes and Strategies* (pp. 415-420). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-25331-1_51
- Barut, G., & Çelik, A. (2025). Gene expression profiles related to apoptosis and levels of DNA oxidative damage in primary dermal fibroblast cells (ATCC® PCS-201-012TM) treated with zirconium oxide nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 115446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2025.115446>
- Battal, D., Celik, A., Güler, G., Aktaş, A., Yildirimcan, S., Ocakoglu, K., & Çömelekoğlu, Ü. (2015). SiO₂ Nanoparticle-induced size-dependent genotoxicity—an in vitro study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay. *Drug and chemical toxicology*, 38(2), 196-204. DOI: <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.928721>
- Bayğu, G. (2020). Cimin üzümü yaprağı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülünün genotoksik etkisinin kanat benek testi ile belirlenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü). Tez No: 644563
- Bee, S. L., Abdullah, M. A. A., Bee, S. T., Sin, L. T., & Rahmat, A. A. (2018). Polymer nanocomposites based on silylated-montmorillonite: A review. *Progress in Polymer Science*, 85, 57-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.003>
- Beykaya, M., & Çağlar, A. (2016). Bitkisel özütler kullanılarak gümüş-nanopartikül (AgNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. *Afyon Kocatepe üniversitesi fen ve mühendislik bilimleri dergisi*, 16(3), 631-641. DOI: <https://doi.org/10.5578/fmbd.34220>
- Bhushan, B. (Ed.). (2017). *Springer Handbook of Nanotechnology* (4th ed.). Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3>
- Buzea, C., & Pacheco, I. (2019). Toxicity of nanoparticles. In *Nanotechnology in eco-efficient construction* (pp. 705-754). Woodhead Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102641-0.00028-1>
- Chen, Q., Wang, H., Liu, H., & Cao, Y. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of palladium nanoparticles to human skin keratinocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 206(2), 210–216.

- Chen, X. M., Cai, Z. X., Huang, Z. Y., Oyama, M., Jiang, Y. Q., & Chen, X. (2013). Ultrafine palladium nanoparticles grown on graphene nanosheets for enhanced electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 97, 398-403. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.02.047>
- Choy, C. N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment (pp. 29-187). W. N. Choy (Ed.). New York: Marcel Dekker.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. DOI: <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Çelik, A. (2006). The assesment of genotoxicity of carbamazepine using cytokinesis-block (CB) micronucleus assay in cultured human blood lymphocytes. *Drug and chemical Toxicology*, 29(2), 227-236. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480540600566832>
- Çelik, A., Ekinci, S. Y., Güler, G., & Yildirim, S. (2014). In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA and cell biology*, 33(3), 148-154. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2158>
- Dikilitaş, M., & Koçyiğit, A. (2010). Canlilarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14(2), 77-89. DOI: <https://dergipark.org.tr/en/pub/harranziraat/issue/18431/194158>
- Dikomey J. Dahm-Daphı I. Brammer R. Martensen B. Kaina, E. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology*, 73(3), 269-278. DOI: <https://doi.org/10.1080/095530098142365>
- Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Carreira, S. C., & Saunders, M. (2012). Critical evaluation of toxicity tests. In B. Fadeel, A. Pietroiusti, & A. A. Shvedova (Eds.), *Adverse effects of engineered nanomaterials* (pp. 63-83). Academic Press.
- Dinçer, Y., & Kankaya, S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(4), 1365-1373. DOI: <https://doi.org/10.5336/medsci.2009-15258>

- Eren A., (2020). The Effect of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles on Germination of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds ISPEC Journal of Agricultural Sciences, 4(2), 358-365. DOI: <https://doi.org/10.46291/ISPECJASvol4iss2pp223-230>
- Erkoç, Ş. (2007). Nanobilim ve Nanoteknoloji, Odtü Yayıncılık, 2. Baskı, Ankara, Kasım.
- Ersöz, A. (2010). Aletli analiz teknikleri (Yayın No. 359). Anadolu Üniversitesi Yayınları.
- Fadeel, B., Pietroiusti, A., & Shvedova, A. A. (Eds.). (2017). Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health. Academic Press. https://search.worldcat.org/title/adverse-effects-of-engineered-nanomaterials-exposure-toxicology-and-impact-on-human-health/oclc/1004971060?utm_source=chatgpt.com
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS nano, 3(1), 16-20. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1-2), 81-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 161(2), 193-198. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90010-2)
- Fromell, K., Johansson, U., Abadgar, S., Bourzeix, P., Lundholm, L., & Elihn, K. (2023). The effect of airborne Palladium nanoparticles on human lung cells, endothelium and blood—A combinatory approach using three in vitro models. Toxicology in Vitro, 89, 105586. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105586>
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. International journal of nanomedicine, 5, 577-5591. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

- Fuentes, A. S., Filippin, A. F., & Aguirre, M. D. C. (2015). Pd nucleation and growth mechanism deposited on different substrates. *Procedia Materials Science*, 8, 541-550. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.04.107>
- Fuentes, L., Martínez-Mera, I., Camacho-López, M. A., & Gutiérrez-Cortés, A. (2015). Palladium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic properties. *Journal of Nanomaterials*, 2015, Article ID 507583. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/507583>
- Gomez, B., Palacios, M. A., Gomez, M., Sanchez, J. L., Morrison, G., Rauch, S., ... & Wass, U. (2002). Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities. *Science of the Total Environment*, 299(1-3), 1-19. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00038-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00038-4)
- Green, M. H., Lowe, J. E., Delaney, C. A., & Green, I. C. (1996). Single-cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Methods in Enzymology*, 269, 243-266. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)69021-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)69021-3)
- Grochala, W., & Edwards, P. P. (2004). Thermal decomposition of the non-interstitial hydrides for the storage and production of hydrogen. *Chemical reviews*, 104(3), 1283-1316. DOI: [10.1021/cr030691s](https://doi.org/10.1021/cr030691s)
- Gurunathan, S., Jeyaraj, M., Kang, M. H., & Kim, J. H. (2020). Melatonin enhances palladium-nanoparticle-induced cytotoxicity and apoptosis in human lung epithelial adenocarcinoma cells A549 and H1229. *Antioxidants*, 9(4), 357. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9040357>
- Gürmen, S., Ebin, B., & İtö, M. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metalurji Dergisi*, 150, 31-38.
- Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2007). Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*, 2(6), 789-803. DOI: <https://doi.org/10.2217/17435889.2.6.789>
- Hashimoto, M., & Imazato, S. (2015). Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dental Materials*, 31(5), 556-564. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.02.009>

Hashimoto, M., Watanabe, T., Yasuda, K., & Takeyama, H. Cellular localization and cytotoxicity of palladium nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 2015,2(3), 324–332.

DOI: <https://doi.org/10.1039/C5EN00041A>

Hosseini, H., Rezaei, S. J. T., Rahmani, P., Sharifi, R., Nabid, M. R., & Bagheri, A. (2014).

Nonenzymatic glucose and hydrogen peroxide sensors based on catalytic properties of palladium nanoparticles/poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) nanofibers. *Sensors and actuators B: Chemical*, 195, 85-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.015>

Hosseini, S. M., Mahdavi, M., & Fazilati, M. (2014). The use of palladium nanoparticles in biomedical applications. *Journal of Nanomedicine Research*, 1(2), 00010.

DOI: <https://doi.org/10.15406/jnmr.2014.01.00010>

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green chemistry*, 13(10), 2638-2650. DOI: <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(6), 385-406. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9(6):p 385-406, Nov–Dec 2014.

Jackson, M. T., Sampson, J., & Prichard, H. M. (2007). Platinum and palladium variations through the urban environment: evidence from 11 sample types from Sheffield, UK. *Science of the Total Environment*, 385(1-3), 117-131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.004>

Joint, F. A. O. (1991). UNEP Programme for the Operation of Prior Informed Consent. Decision Guidance Documents: Chlordimeform.

https://www.pic.int/Portals/5/DGDs/DGD_Chlordimeform_EN.pdf

Kahraman, O., Cevik, P. K., Turunc, E., Çelik, A., Koyuncu, İ., & Binzet, R. (2025). Eco-friendly synthesis and biomedical assessment of graphene nanomaterials using a holoparasitic plant template. *Diamond and Related Materials*, 112551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2025.112551>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Krishna, G., & Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2)

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., & Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2), 19-30.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00042-6)

Lelieveld, J., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Haines, A., & Münzel, T. (2020). Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovascular research*, 116(11), 1910-1917.

DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa025>

Leopold, K., Maier, M., Weber, S., & Schuster, M. (2008). Long-term study of palladium in road tunnel dust and sewage sludge ash. *Environmental Pollution*, 156(2), 341-347.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.02.005>

Liu, Z., Sun, L., Su, Y., & Zhao, Y. (2013). Effects of engineered nanoparticles on the activation and expression of transcription factors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(2), 178-183.

Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233-278.

DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>

McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90207-V](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90207-V)

Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>

- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in colloid and interface science*, 156(1-2), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622-627. DOI: 10.1126/science.1114397
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Palacios, M. A., Gomez, M. M., Moldovan, M., Morrison, G., Rauch, S., McLeod, C., ... & Torrens, J. M. (2000). Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. *Science of the Total Environment*, 257(1), 1-15. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00464-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00464-2)
- Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., ... & Hyun, J. W. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology letters*, 201(1), 92-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>
- Pongsavee, M. (2015). Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes. *BioMed research international*, 2015(1), 103512. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/103512>
- Prichard, H. M., & Fisher, P. C. (2012). Identification of platinum and palladium particles emitted from vehicles and dispersed into the surface environment. *Environmental science & technology*, 46(6), 3149-3154. DOI: <https://doi.org/10.1021/es203666h>
- Cregan P., Smith BP, Brown DL, Mitchel REJ, S. (1999). Two pathways for the induction of apoptosis in human lymphocytes. *International journal of radiation biology*, 75(9), 1069-1086. DOI: <https://doi.org/10.1080/095530099139539>
- Ritter, D., & Knebel, J. (2009). Genotoxicity testing in vitro—development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in vitro*, 23(8), 1570-1575. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.007>

- Roco, M. C. (2003). Broader societal issues of nanotechnology. *Journal of nanoparticle research*, 5, 181-189. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025548512438>
- Roser, S., Pool-Zobel, B. L., & Rechkemmer, G. (2001). Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497(1-2), 169-175. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00255-8)
- Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2, 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
- Samim, M. (2022). Palladium nanoparticles as emerging pollutants from motor vehicles: an in-depth review on distribution, uptake and toxicological effects in occupational and living environment. *Science of the Total Environment*, 823, 153787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153787>
- Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., & Kasper, G. (2010). Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—a review. *Toxicology*, 269(2-3), 92-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.013>
- Sen, I. S., Mitra, A., Peucker-Ehrenbrink, B., Rothenberg, S. E., Tripathi, S. N., & Bizimis, M. (2016). Emerging airborne contaminants in India: Platinum Group Elements from catalytic converters in motor vehicles. *Applied Geochemistry*, 75, 100-106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.10.006>
- Sınacı, C., Çelik, A., Yetkin, D., Çevik, S., & Güler, G. (2023). Sulfoxaflor insecticide exhibits cytotoxic or genotoxic and apoptotic potential via oxidative stress-associated DNA damage in human blood lymphocytes cell cultures. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(5), 972-983. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2114006>
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(7), 588-599. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.005>
- Stopper, H., & Müller, S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vitro*, 11(5), 661-667. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00084-2)

Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., & Kolören, Z. (2011). The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5(1), 49-54.

DOI: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jabs/issue/34913/387226>

Şekeroğlu, V., & Atlı-Şekeroğlu, Z. (2011). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252.

DOI:10.5505/TurkHijyen.2011.06977

Şentürk, E., Okur, İ., Duman, S., & Akbulut, S. (2012). *Nanoteknolojiye Giriş Kitabı. Değişim Yayıncılık*, 291.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.

DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(10), 1089-1098.

DOI: <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>

Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, L., & Kirsch-Volders, M. (1989). The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4(1), 6-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.6>

Zhang, Q., Yin, L., Wu, T., Qi, Y., & Xu, Y. (2020). The impact of nanoparticle surface charge on the toxicity to different cell lines in vitro. *Nanomaterials*, 10(5), 846.

DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10050846>

Zuno, A., Marcon, F., Leopardi, P., Salvatore, G., Carere, A., & Crebelli, R. (1994). An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Food and chemical toxicology*, 32(2), 159-163. DOI:

DOI: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90178-3)

Wang, Y., & Li, X. (2012). Health risk of platinum group elements from automobile catalysts. *Procedia Engineering*, 45, 1004-1009.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.08.273>

- Whiteley, J. D., & Murray, F. (2003). Anthropogenic platinum group element (Pt, Pd and Rh) concentrations in road dusts and roadside soils from Perth, Western Australia. *Science of the Total Environment*, 317(1-3), 121-135. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00359-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00359-0)
- Wilkinson, K. E., Palmberg, L., Witasz, E., Kupczyk, M., Feliu, N., Gerde, P., ... & Kessler, V. G. (2011). Solution-engineered palladium nanoparticles: model for health effect studies of automotive particulate pollution. *ACS nano*, 5(7), 5312-5324. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn1032664>.
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* (2. baskı, ss. 3–22). Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3>
- Wiseman, C. L., & Zereini, F. (2009). Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: a review of recent evidence. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2493-2500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.057>
- World Health Organization, 2016. *Ambient Air Pollution: A Global Assessment of Exposure and Burden of Disease*. [cited 2019 Jul 16]; Available from: WHO. <https://www.who.int/phe/publications/air-pollution-global-assessment/en/>.



ÖZGEÇMİŞ



