ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin Gülnaz CANLI

MEMELİLERDE (*Rattus norvegicus* var. albinos) NANOPARTİKÜLLERİN (Al_2O_3, CuO, TiO_2) METABOLİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2015

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEMELİLERDE (*Rattus norvegicus* var. albinos) NANOPARTİKÜLLERİN (Al_2O_3, CuO, TiO_2) METABOLİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esin Gülnaz CANLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 21/12/2015 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

….....	…….	……
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Prof. Dr. Hasan Basri İLA	Prof. Dr. İskender EMRE
DANIŞMAN	2. DANIŞMAN	ÜYE

……..	…….
Doç. Dr. Gülüzar ATLI	Yrd. Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2015-3806

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEMELİLERDE (*Rattus norvegicus* var. albinos) NANOPARTİKÜLLERİN (Al_2O_3, CuO, TiO_2) METABOLİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esin Gülnaz CANLI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
2. Danışman : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Yıl: 2015, Sayfa**:** 81

Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. İskender EMRE
Doç. Dr. Gülüzar ATLI
Yrd. Doç. Dr. Tamer KAYIŞ

Bu çalışmada, memeli metabolizmasının metal nanopartiküllerine olan tepkileri kan parametreleri kullanılarak belirlenmiştir. Yetişkin dişi sıçanlar (*Rattus norvegicus* var. albinos) alüminyum, bakır ve titanyum nanopartiküllerinin (Al_2O_3, CuO, TiO_2) farklı dozlarının (0, 0.5, 5, 50 mg/kg) etkilerine oral olarak 14 gün süre ile maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda sıçan serumunda farklı sistemlere özgün parametrelerin (glikoz, kolesterol, kreatinin, üre, trigiliserit, biluribin, protein, ALP, ALT, AST, kortizol, T3, T4, estradiol, prolaktin, IgG, IgM, IgE, toplam oksidan, toplam antioksidan) düzeyleri ve eritrositlerde ozmoregülasyon enzim (Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz, Ca-ATPaz) aktiviteleri belirlenmiştir (toplam 24 parametre).

Sonuçlar nanopartikül etkisinde kalan sıçanların bazı serum parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler olduğunu göstermiştir. TiO_2, karaciğer enzim düzeylerini artırırken, Al_2O_3 ve CuO genel olarak diğer biyokimyasal parametreleri üzerinde etkili olmuştur. CuO, IgM düzeyleri azaltırken, Al_2O_3, TiO_2 immün sistem üzerinde etkili olmamışlardır. Serumda toplam oksidan artışlar görülürken, toplam antioksidan düzeyleri artmamıştır. Sıçan serum parametreleri için etki sıralaması; CuO> Al_2O_3> TiO_2 şeklinde olmuştur. Eritrosit ozmoregülasyon enzim aktiviteleri ciddi şekilde nanopartiküllerden etkilenmişlerdir. Bütün nanopartiküller Na,K-ATPaz aktivitesini azaltmış, buna karşın, TiO_2 alan sıçanlarda Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinde artışlar olmuştur. Bu çalışma, nanopartiküllerin memeli metabolizmasına özgü farklı sistemler üzerinde toksik etkileri olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Memeli, Nanopartikül, Serum, Eritrosit, Metabolizma

ABSTRACT
MSc THESIS

INVESTIGATION ON THE METABOLIC EFFECTS OF NANOPARTICLES (Al_2O_3, CuO, TiO_2) IN MAMMALS (*Rattus norvegicus* var. albinos)

Esin Gülnaz CANLI

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Co-Supervisor : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Year: 2015, Page: 81

Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. İskender EMRE
Assoc. Prof. Dr. Gülüzar ATLI
Asst. Prof. Dr. Tamer KAYIŞ

In this study, response of mammalian metabolism against metal nanoparticles were determined using the blood parameters. Mature female rats (*Rattus norvegicus* var. albinos) were exposed orally to aluminum, copper and titanium nanoparticles (Al_2O_3, CuO, TiO_2) for 14 days using different doses (0, 0.5, 5, 50 mg/kg). At the end of this period, the levels of serum biomarkers (glucose, cholesterol, creatinin, urea, trigiliserid, biluribin, protein, ALP, ALT, AST, cortizol, T3, T4, estradiol, prolactin, IgG, IgM, IgE, total oxidant, total antioxidant) belonging to different metabolic systems and the activities of osmoregulation enzymes (Na,K-ATPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase) were measured (a total of 24 parameters).

Data showed that there were several alterations in some serum parameters in rats exposed to the nanoparticles. TiO_2 increased the activities of the liver enzymes, while Al_2O_3 and CuO were effective on the biochemical serum parameters. CuO decreased the levels of IgM, while Al_2O_3, TiO_2 did not affect the immune system. There were increases in total oxidant levels in the serum, while there was significant change in total antioxidant levels. The effect order of nanoparticles in the serum of rats were; $CuO>Al_2O_3>TiO_2$. Osmoregulation enzymes were strongly affected from nanoparticle application of rats. All nanoparticles decreased the activity of Na,K-ATPase in the erythrocytes, though there were increases in the activities of Mg-ATPase and Ca-ATPase after TiO_2 exposure. This study demonstrated the toxic effects of nanoparticles on different systems belonging to mammalian metabolism.

Keywords: Mammal, Nanoparticle, Serum, Erythrocyte, Metabolism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyen ve yol gösterici olan danışmanım sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte çalışmalarımda bana yol gösteren ikinci tez danışmanım sayın Prof.Dr. Hasan Basri İLA'ya, ayrıca tez çalışmalarım ve diğer bilimsel çalışmalarımız esnasında bana her türlü yardımı yapan ve birçok konuda desteğini gördüğüm sayın Doç. Dr. Gülüzar ATLI'ya, çok teşekkür ederim. Ayrıca, deneylerimin sürdürülmesi esnasında yardım eden ve yol gösteren sayın hocam Doç.Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU'na ve Biyoloji Bölüm Başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Elif KANAK ve babam İsmail KANAK'a sonsuz teşekkür ederim. En özel teşekkürlerim, hayatıma kattıkları ve bana çok güzel duygular yaşattığı için sevgili oğlum Mustafa Bilge içindir. Ayrıca bu tezi canım oğluma ithaf ediyorum.

Bu Tez, TÜBİTAK'ın "2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı" kapsamında 1649B021500253 proje kodu ile desteklenmiştir (2015 Yılı 1. Dönem). Bunun için TÜBİTAK'a çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ..... VI
ŞEKİLLER DİZİNİ..... VII
1. GİRİŞ..... 1
1.1. Nanotoksikoloji..... 2
1.2. Memeli Hayvanlarda Nanotoksikoloji..... 3
1.3. Serum Biyo-belirteçleri..... 6
1.3.1. Endokrin Sistem..... 6
1.3.2. Karaciğer Enzimleri..... 7
1.3.3. İmmün Sistem..... 7
1.3.4. Biyokimyasal Biyo-belirteçler..... 8
1.3.5. Oksidanlar ve Antioksidan Sistem..... 9
1.4. Eritrosit Ozmoregülasyon Sistemi..... 10
1.5. Test Organizması Olarak Memeli Hayvanlar..... 12
1.6. Metal Nanopartiküllerinin Kullanım Alanları..... 13
1.7. Amaç..... 15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 18
3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 24
3.1. Materyal..... 24
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar..... 24
3.1.1.1. Nanopartiküller..... 24
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar..... 24
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar..... 24
3.1.1.4. Serum Parametreleri Analizinde Kullanılan Kimyasallar..... 25
3.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar..... 25
3.2. Yöntem..... 26

3.2.1. ATPaz Aktivitesinin Ölçümü..... 28
3.2.2. İnorganik Fosfat Tayini..... 29
3.2.3. İstatistik..... 33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 34
4.1. Bulgular..... 34
4.1.1. Karaciğer Enzim (ALP, ALT, AST) Aktiviteleri..... 34
4.1.2. Diğer Biyokimyasal Belirteçler..... 36
4.1.3. Hormon Düzeyleri..... 41
4.1.4. İmmünoglobulin (IgG, IgM, IgE)..... 45
4.1.4. Toplam Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri..... 46
4.1.6. Eritrosit ATPaz Aktiviteleri..... 48
4.2. Tartışma..... 54
4.2.1.Karaciğer Enzimleri..... 56
4.2.2.Endokrin Sistem..... 58
4.2.3.İmmün Sistem..... 61
4.2.4.Diğer Biyokimyasal Belirteçler..... 63
4.2.5. Toplam Oksidan ve Toplam Antioksidan Düzeyleri..... 64
4.2.6.Eritrosit ATPaz Aktiviteleri..... 65
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 68
5.1. Sonuçlar..... 68
5.2. Öneriler..... 68
KAYNAKLAR..... 70
ÖZGEÇMİŞ..... 81

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların deneyin başlangıcı ve sonunda ölçülen ağırlık ortalamaları ve ilgili standart hataları…….. 33

Çizelge 4.1. Serum parametrelerinde gözlemlenen ve istatistiksel olarak anlamlı olan değişimlerin % oranları…… 52

Çizelge 4.2. Eritrosit ATPaz aktivitelerinde gözlemlenen ve istatiksel olarak anlamlı olan değişimlerin % oranları……..…… 53

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil. 1.1. Memelilerde toksik maddelerin alınım yolları ve metabolizması…….. 4
Şekil.1.2. Na,K-ATPaz'ın yapısı ve iyon transfer mekanizması özellikleri…… 12
Şekil.1.3. Al_2O_3 (A) , CuO (B) ve TiO_2 (C) nanopartiküllerinin TEM (geçirimli elektron mikroskobu) görüntüleri……... 14
Şekil 3.1. ATPaz aktivitelerinin ölçümünün şematik görünümü…….29
Şekil 3.2. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki…….. 30
Şekil 3.3. Protein derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki…… 32
Şekil 4.1. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında ALP aktiviteleri……..….. 35
Şekil 4.2. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında ALT aktiviteleri…… 36
Şekil 4.3. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında AST aktiviteleri…… 36
Şekil 4.4. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında glikoz düzeyleri…….……... 38
Şekil 4.5. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında üre düzeyleri……..……... 38
Şekil 4.6. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında kreatinin düzeyleri……..…….. 39
Şekil 4.7. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplan protein düzeyleri…….……...39
Şekil 4.8. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplam bilirubin düzeyleri…… 40
Şekil 4.9. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplam kolesterol düzeyleri…….……. 40
Şekil 4.10. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında trigliserit düzeyleri…….……41
Şekil 4.11. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında serbest T3 düzeyleri…….……...43

Şekil 4.12. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında serbest T4 düzeyleri…….……....43
Şekil 4.13. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında kortizol düzeyleri……44
Şekil 4.14. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında eatradiol düzeyleri…….. 44
Şekil 4.15. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında prolaktin düzeyleri……..45
Şekil 4.16. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında IgG düzeyleri……..46
Şekil 4.17. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında IgM düzeyleri…….…….…….….. 46
Şekil 4.18. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında TOS düzeyleri…….……....47
Şekil 4.19. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında TAS düzeyleri…….…….….. 48
Şekil 4.20. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam ATPaz aktiviteleri……..49
Şekil 4.21. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam Mg-ATPaz aktiviteleri……50
Şekil 4.22. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam Na,K-ATPaz aktiviteleri….……..… 50
Şekil 4.23. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde Ca-ATPaz aktiviteleri……... 51

1. GİRİŞ

İnsan kaynaklı aktivitelerin artışına paralel olarak ağır metallerin çevreye salınımını son yıllarda artmıştır. Ağır metallerin kullanım alanları arasında piller, boyalar, elektronik cihazlar, koruyucular, plastik sanayi, petrol ürünleri vb. sayılabilir. Bu endüstriyel alanlarda ve evsel amaçlar için kullanılan metaller çevreye faklı yollarla (hava, su, katı) atılmaktadır ve memeliler bu maddelere, hava, su ve gıda yoluyla maruz kalabilmektedir. Bu kontrolsüz ve çoğunlukla arıtmasız olarak yapılan salınımlar sonucu, çeşitli hayvanlarda zehirlenme olayları ve hatta insan ölümleri olduğuna ilişkin literatür verileri mevcuttur (Goyer, 1991). Bunlardan en ünlü olanlarından birisi Minamata körfezi (Japonya) faciasıdır (Mance, 1987). Bu olay 1932 yılında Japonya'nın Minamata ilçesinde gerçekleşmiş olup, temelinde cıva ile kontamine olmuş balıkları yiyen insanların onlarcasının ölmesine veya sakat kalmasına neden olan vakadır. Diğer bir ağır metal zehirlenme vakası ise yine Japonya'da meydana gelmiştir (Jintsu Nehri civarı). Bu olayda, yüksek düzeyde kadmiyum içeren suda yetişen pirinçleri yiyen insanlarda "itai itai" hastalığı ortaya çıkmıştır. Bu hastalıkta yaklaşık 100 kişinin ölmesine ve çok daha fazlasının da sakat kalmasına yol açmıştır (Goyer, 1991).

İlk geniş çaplı metal zehirlenmeleri olaylarını takiben çözünmüş metallerin memeli hayvanlar üzerine olan etkileri çeşitli laboratuvarlar tarafından araştırılmış ve bu konuda doyurucu kanıtlar bulunmuştur. Bu çalışmalar, ağır metal etkisinde maruz kalan memelilerde metallerin alınım yoluna (oral, inhalasyon, intraperitonal) ve süreye bağlı olarak farklı dokularda farklı düzeylerde biriktikleri ve farklı sistemlerde metal tipine bağlı olarak çeşitli toksik etkiler olduğunu göstermiştir (Goyer, 1991). Genellikle, ağır metallerin memelilerin sinir sistemi, boşaltım sistemi, dolaşım sistemi, üreme sistemi ve ozmoregülasyona olan olumsuz etkilerinin yanında, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin de olabileceğini göstermiştir (Fine ve ark., 1979; Suszkiwve ark. 1984; Ewers ve Schlipköter, 1991; Sandhir ve Gill, 1994). Ayrıca bu metallerin hamilelik esnasında alınmasıyla plasenta aracılığı ile fetüse geçtiği de bilinmektedir (Ay ve Canli, 1997; Suszkiw ve ark., 1984, Barański, 1987; Levin ve ark., 1987; Chan ve Cherian, 1993). Metallerin toksik etkilerinin başlaması,

genellikle onların depolanma, detoksifiye edilme ve vücuttan atma oranlarının alınım oranlarına yetmediği durumlarda başlamaktadır. Bu da metaller arasında fark göstermektedir (Jorgensen, 2010).

1.1. Nanotoksikoloji

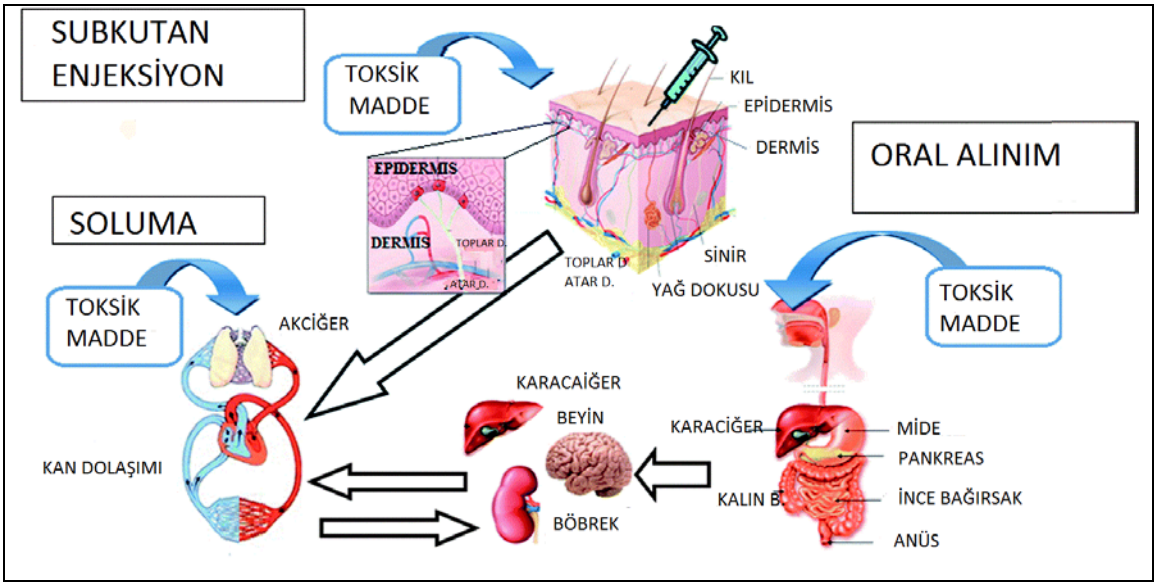
Son yıllarda nanoteknoloji alanında görülen ilerlemelerle birlikte metaller çok küçük nanopartikül (<100 nm) şeklinde insan yaşamına hızlı bir giriş yapmıştır. Nanopartiküller ilaç endüstrisi, dokuma sanayi, filtreler, diş macunu, güneş kremi, çocuk oyuncakları, nemlendirici, paketleme ürünleri, beyaz eşya, elektronik cihazlar ve besin endüstrisi gibi çok farklı alanlarda insan yaşamında kullanılmakta olup, uygulama alanları gittikçe artmaktadır (Handy ve Benjamin, 2007; AshaRani, ve ark., 2008; Schrand ve ark., 2010). Metal nanopartikülleri çok farklı amaçlar için üretilen nano-materyallerdir. Özellikle Ag-nanopartikülü ve Cu-nanopartikülü istenmeyen bakterilerin, mantarların ve alglerin üremesini engellemek için kullanılmaktadır. Fakat nanopartikül üretici fabrikalardan veya kişisel kullanımlardan salınan bu maddeler kanalizasyona karışarak hedef dışı mikroorganizmalara ve sucul organizmalara zarar verebilir (Bondarenko ve ark., 2013). Nanopartiküllerin insan yaşamını kolaylaştıran, üretim maliyetlerini azaltan, yaygın kullanım alanlarına sahip olmaları gerçeğine karşın, nanopartiküllerin çevresel akıbeti hakkında yeterli bilgi yoktur (Jeng ve Swanson, 2006; Xia ve ark., 2009; Ahamed ve ark., 2010; Bondarenko ve ark., 2013; Shrivastava ve ark., 2013). Bununla birlikte, son yıllarda bu konularda çok farklı deney ortamlarında ve deney organizmaları kullanılarak nanopartiküllerin toksik etkilerinin olup olmadığı ile ilgili çalışmalar artmıştır. Literatür incelendiği zaman nanopartiküllerin bakterilerden başlayarak, insana kadar çok farklı organizmada farklı sistemler üzerine toksik etkileri olabileceğini göstermiştir (Hussain, ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2008; AshaRani ve ark., 2008; Kasemets ve ark., 2009; Shoults-Wilson ve ark., 2011; Yong-Wook ve Youn-Joo, 2011; Gereats ve ark., 2014; Amara ve ark., 2014).

1.2. Memeli Hayvanlarda Nanotoksikoloji

Memeli hayvanlarla yapılan çalışmaların çoğu fare ve sıçan metabolizması üzerine metal-nanopartiküllerin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan gelmektedir. Bununla birlikte insan hücreleri üzerine nanopartiküllerin in vitro toksik etkileri de yaygın bir şekilde araştırılan konular arasındadır. Nanopartiküllerin toksik etkilerinin kendi kimyasal ve fiziksel özellikleriyle beraber, uygulanan doz, alınım yolu ve etkilenen organ ve sistemlere göre oldukça farklılık gösterdiği bulunmuştur (Geraets ve ark., 2014). Tang ve ark. (2011) solunum yoluyla TiO_2 alan sıçanlarda serum biyokimyasal parametrelerde önemli değişimler olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Kaewamayawong ve ark. (2013) solunum yoluyla Ag nanopartikülü verilen farelerde doza bağlı olarak dolaşım bozukluğu ile birlikte birçok biyokimyasal parametrede de değişimler olduğunu belirtmişlerdir. Derialtına enjekte edilen Ag nanopartiküllerinin albino sıçanlar üzerindeki toksik etkileri Sarhan ve Hussein (2014) tarafından araştırılmıştır. Bu bilim adamları, nanopartiküllerin farklı dozlarda sıçanlara enjeksiyonu sonucu böbrek, karaciğer gibi organlarda yapısal ve fonksiyonel hasarların meydana geldiğini göstermiştir. Lee ve ark. (2014) Ag-nanopartiküllerin fare embriyolarında otofajik, apoptik ve sitotoksik etkilerinin yanında, oksidatif strese de neden olduklarını göstermişlerdir. Benzer şekilde Yu ve ark. (2014) Ag-nanopartiküllerin gebe sıçanlara verilmesiyle, embriyoların gelişim bozukluğu gösterdiğinin ve aynı zamanda katalaz ve glutatyon reduktaz aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Mohammadipor ve ark. (2014) Ti-nanopartikülü etkisinde kalan gebe sıçanlardan doğan yavruların olumsuz etkilendiğini ve bu etkilenmenin en fazla beyin hücrelerinde olduğunu vurgularken, hafıza kaybının da olduğunu belirtmişlerdir. Ti-nanopartiküllerin beyin üzerine olan toksik etkilerini Ze ve ark (2014) da araştırmışlardır. Doksan gün boyunca Ti-nanopartikül alan farelerin beyninde birçok reseptörün aktive edildiği ve tümör nekrozları oluştuğu gösterilmiştir. Araştırıcılar titanyumun özellikle gıda endüstrisindeki kullanımı nedeniyle insan merkezi sinir sistemi üzerinde oluşabilecek hasarlara dikkat çekmişlerdir. Nanopartikül etkisinde kalan sıçanların etkilenen sistemlerinden biri de immün sistemdir. Vandebriel ve ark. (2014) 28 gün süre ile damardan Ag-

nanopartikülü verilen sıçanlarda immün sistemin baskılandığını göstermişlerdir. Damardan verilen Ag-nanopartiküllerin farelerin testosteron düzeyinde etkili olduğunu Garcia ve ark. (2014) göstermişlerdir. Guo ve ark. (2013) çinko oksit nanopartiküllerin sıçan retina hücrelerinde Ca-ATPaz aktivitesini azalttığını belirtmiştir.

Çinko oksit nanopartiküllerinin fare karaciğerinde hücresel oksidatif strese neden olduğu ve antioksidan sistemin de bundan etkilendiği Syama ve ark. (2013) tarafından göstermiştir. Nanopartiküllerin hücresel hareketi Shrivastava ve ark. (2013) tarafından gösterilmiştir. Araştırıcılar TiO_2, ZnO ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin fare karaciğer ve beyninde histolojik değişimlere neden olduğunu ve ayrıca oksidatif strese de neden olduklarını belirtmişlerdir. Bu nano partiküllerin sitoplazma ve nükleusun içine kadar girdiklerini TEM yardımıyla görüntülemişlerdir. Sıralama yapıldığında çinko, alüminyum ve titanyum en fazla etki göstermiştir.



Şekil. 1.1. Memelilerde toksik maddelerin alınım yolları ve metabolizması http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/mt/c3mt00302g'den

Çevreye salınan kirleticilerin büyük çoğunluğu yağmur sularının yıkayıcı etkisi ile sucul ekosistemlere taşınmaktadır. Dolayısıyla suda bulunan nanopartiküller sucul memelileri ve insanları da ilgilendirebilir. Özellikle akarsular ve göller gibi tatlısu ekosistemleri, denizlere göre hacimlerinin küçük olması nedeniyle, yoğun bir

şekilde antropojenik aktiviteler sonucu kirletilebilmektedir. Çevreye salınan bazı kirleticiler (pestisitler, deterjanlar ve yağ türevleri) çeşitli oranlarda yıkıma uğrayarak zararsızlaşırken, ağır metal türevleri diğer kirleticilerden farklı olarak, yıkımı ve yok edilmesi hemen hemen imkansız olan elementlerdir. Bu metaller çevreye salındıktan sonra besin zincirinin çeşitli tropik düzeylerinde dolaşarak, sucul memelilere, hatta insana kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle, ağır metallerin toksik etkilerinin ekosistem elemanlarında ciddi zararlar oluşturmadan belirlenmesi çok önemlidir. Bununla ilgili olarak subletal metal etkisine duyarlı olan bazı biyobelirteçler etkin bir şekilde kullanılmakta olup, "erken uyarıcı sistem" gibi görev yapabilmektedir. Son zamanlarda kullanım alanları ve miktarları gittikçe artan nanopartiküllerin sucul ortamlarda oluşacakları toksik etkilerde çevrecilerin ilgisini çekmiş ve bu konuda son birkaç yıldır çok sayıda makale üretilmiştir. Bütün bu çalışmalar nanopartiküllerin çözünmüş metaller kadar olmasa da toksik etkileri olduğunu ve sucul organizmalarda çeşitli metabolik belirteçlerin düzeylerini değiştirebildiklerini göstermiştir. En önemli konu ise nanopartiküllerde bağlı olan metallerin zamanla molekülden ayrılabileceği ve çevre kirliliğinin çok fazla artacağı yönündedir. Buna bağlı olarak metal nanopartiküllerin alınımı, atılımı ve metabolik etkileri ile ilgili çalışmalar balıklar üzerinde de yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Jang ve ark., 2014). Çözünmüş metal etkilerinde olduğu gibi suyun kimyası ve sıcaklığı sucul organizmalarda nanopartikül toksisitesini etkileyebilmektedir (Villarreal ve ark., 2014; Wong ve Leung, 2014). Balıklar memeliler için besin kaynağı olması bakımından çok önemlidir. Metal nanopartiküller balık dokularında histopatolojik etkilerin yanı sıra, genotoksik ve sitotoksik etkileri de olan maddelerdir (Vevers ve Jha, 2008; Jayaseelan ve ark., 2014). nanopartiküllerin toksik etkileri çevresel faktörlerin etkisi ile değişmesi yanında partikül boyutu ve belirli bir grup hayvan sınıfında türler arasında da fark göstermektedir (Song ve ark., 2014). Genel olarak balıklar düşünüldüğünde çözünmüş metaller ile metal nanopartiküllerin toksik etkilerinin benzer olduğu bilgisi son zamanlarda sık sık vurgulanmaktadır (Wang ve ark., 2014).

1.3. Serum Biyo-belirteçleri

Memeli kan dokusu organizmanın genel sağlığı hakkında en hızlı ve etkili sonuçların alınabildiği bir doku olması nedeniyle tıbbi ve deneysel araştırmalarda çok önemli bir dokudur. Alınması çok kolay olduğundan ve farklı sistemlere özgün fazla sayıda analiz yapma olanağı tanıdığından insan ve hayvan sağlığı taramalarında en başta kullanılan araçtır. Bu çalışmada kullanılan serum parametrelerinin işlevlerini şu şekilde özetlemek mümkündür.

1.3.1. Endokrin Sistem

Endokrin sistem organizmanın homeostasisinde çok önemli bir yer tutmaktadır. Hormon seviyesinde meydana gelebilecek küçük bir değişiklik ciddi sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına yol açabilir. Hormonlar üretim yerlerinden hedef organ veya dokuya serum aracılığı ile taşındığından, serumdaki düzeylerinin bilinmesi, organizmanın sağlığı açısından önemli bilgiler verebilmektedir. Bazı önemli hormonlar ve görevleri şu şekilde özetlenebilir.

Triiyodotironin (T3): Yapısında iyot bulunan bu hormon tiroit bezinden salgılanmaktadır. Görevi genel olarak bazal metabolizma hızını artırmak ve büyümeyi düzenlemektir.

Tiroksin (T4): Bu hormonun da yapısında iyot bulunur ve tiroit bezinden salgılanmaktadır. T3 gibi bazal metabolizma hızını artırmasının yanı sıra, vücudun katekolaminlere olan duyarlılığını artıran bir hormondur.

Estradiol (Östrojen): Memelilerin dişilerinde östrus döngüsünde görevli olup, hem erkek hem de dişilerde bulunmasına rağmen, dişilerde seviyeleri çok daha fazladır. Dişilerin menstrual döngülerinde rol oynayan steroid hormondur.

Prolaktin: Bu hormon hipofiz bezinin ön lobundan salgılanmaktadır. Önemli görevleri arasında süt salgısını düzenlenmesi, cinsel bezleri gelişimi ve gonadotropin salgılanmasını uyarmak sayılabilir.

Kortizol: Bu hormon böbrek üstü bezinin kabuk bölgesinden salgılanmaktadır. Vücudun strese girmesiyle kan basıncı ve kan şekerini artıran bir hormondur.

1.3.2. Karaciğer Enzimleri

Karaciğer, çok farklı görevleri olan bir organdır. En önemli görevlerinden biri vücuda giren ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesi veya zararsızlaştırılmasıdır. Bu nedenle, bir çok toksik madde için hedef organ da olabilir ve bu toksik maddeler veya onların türevleri için birikim yeri de olabilir. Bu nedenle, karaciğer enzimlerinin aktivitelerini belirlemek, karaciğerin tepkisi ve genel sağlığı açısından anlamlı veriler verebilir. En önemli karaciğer enzimleri ve bunların görevleri kısaca şöyle sıralanabilir.

Alkalin fosfataz (ALP): Karaciğerin safra kanalına bağlı hücrelerinde bulunan ve bu organlarda meydana gelen deformasyonlarda seviyesi artan bir enzim olup, karaciğer hasarlarında bir biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır.

Aspartat transaminaz (AST): Serum glutamik oksaloasetik transaminaz veya aspartat aminotransferaz olarak da bilinir. Karaciğer hastalıklarında olduğu gibi, iskelet kası, kırmızı kan hücreleri ve kalpte oluşan hastalıklarda da aktivitesi artan bir enzimdir ve bu nedenle bir biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır.

Alkalen fosfataz (ALP): Bu enzim defosforilasyonda görevli olan hidrolaz grubu bir enzimdir. Kemik, karaciğer, plasenta ve bağırsak tarafından oluşturulan ve kemik, karaciğer ve safra yolları hastalıklarında bir biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır.

1.3.3. İmmün Sistem

Organizmalarda, yabancı maddeler veya organizmaları yok etmek amacıyla ve onlara tepki amacıyla sentezlenen antikorlar vardır. Serumda bağışıklık sistemine özgün immünoglobulinlerin düzeyinin belirlenmesi, vücuda alınan yabancı maddelerin düzeyi ve tehdidi hakkında bilgi verebilmektedir. Serumda bağışıklık sistemine özgün immünoglobulinlerin düzeyinin belirlenmesi, vücuda alınan yabancı

maddelerin düzeyi ve tehdidi hakkında bilgi verebilmektedir. Başlıca serum immünoglobulinleri arasında şunlar sayılabilir.

İmmünoglobulin G (IgG): Kan damarlarını duvarlarında kolayca geçip doku sıvısına ulaşabilen, dolaşan antikorlar içinde sayıca en fazla bulunan monomer yapılı bir immünoglobülin çeşididir. IgG en küçük antikordur ve vücutta en fazla özellikle kan ve lenf sıvısında bulunur.

İmmünoglobulin E (IgE): Kandaki antikorlarda sayıca az ve IgG molekülüne göre daha büyük olan bir antijence tetiklendiğinde hücrelerde alerjik ve histaminik tepkimeler meydana getirerek çeşitli kimyasalların salgılanmasını sağlayan monomer yapılı bir immünoglobülin çeşitidir. IgE alerjik reaksiyonlarda sentezlenen bir antikor olup, vücuda giren yabancı madde düzeylerinin artışında tepki verebilmektedir.

İmmünoglobulin M (IgM): Çok sayıda antijen bağlanma bölgesine sahip olan, varlığı enfeksiyonun devam ettiğini gösteren ve antijenlere karşı ilk cevap oluşturan pentamer yapılı bir immünoglobülin çeşitidir. IgM en büyük antikor olup, hastalık anında ilk sentezlenen proteindir. Antijenleri çöktürerek onları etkisiz hale getirir.

1.3.4. Biyokimyasal Biyo-belirteçler

Glikoz: Vücuttaki bütün hücreler tarafından kullanılan glikoz başlıca enerji kaynağıdır ve kan şekerini oluşturmaktadır. Glikozun fazlası karaciğerde glikojen olarak depolanan karbonhidratların en küçük (6 karbonlu) yapı birimidir.

Kolesterol: Hücre zarlarının yapımı ve bakımında, steroid hormonların ve safranın sentezinde görevli olup, yapısında steroid, sterol ve alkol bulunur.

Kreatinin: Böbrekte, karaciğerde ve pankreasta sentezlenen ve daha sonra kalp, beyin, iskelet kasında kreatin fosfat olarak depolanan omurgalılarda doğal olarak oluşan organik bir asittir.

Bilirubin: Etobur hayvanların safrasındaki boya maddesidir. Alyuvarların dalakta yıkımı sırasında hemoglobin moleküllerinin parçalanmasıyla oluşur. Kansızlık durumlarında, sarılık ya da safra yollarının tıkanmasında serum seviyesi yükseldiğinden bir biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır.

Üre: Memelilerde proteinlerin sindirimiyle açığa çıkan amonyağın karaciğerde CO_2 ile tepkimeye girmesi sonucu meydana gelir. Esas olarak idrarda bolca bulunmasına rağmen, eser miktarda gözyaşı, ter ve sütte de bulunabilmektedir. Karbonik asidin diamidi olan üre, aynı zamanda karbamik asidin de amidi olduğundan karbamid adı ile de bilinir.

Trigliserit: Gliserol (gliserin) ve üç yağ asidinden oluşan bir esterdir. Enerji kaynağı olarak metabolizmada önemli rol oynar. Sindirimi ince bağırsakta lipaz ve safra ile gerçekleşmektedir.

Proteinler: Hücre haberleşmesi, bağışıklık yanıtı, hücre tutunması ve hücre bölünmesinde görevli, kimyasal sindirimleri midede başlayan çok sayıda amino asitin bir araya gelmesiyle oluşmuş polipeptitlerdir.

1.3.5. Oksidanlar ve Antioksidan Sistem

Aeorobik organimalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Serafini ve Del Rio, 2004; Mercan, 2004). Hücrelerde gerek dışarıdan alınan (ağır metaller, pestisitler, vb.) gerekse organizmanın kendinin ürettiği (reaktif oksijen türevleri v.b.) oksidan maddeleri bertaraf etmek amacıyla sentezlenen çok önemli enzimler veya enzimatik olmayan maddeler vardır. Önemli antioksidan enzimlerden olan; süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen süperoksit dismutaz, bu hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan katalaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan savunma sisteminin birinci hattında görev alan duyarlı stres göstergelerindendir. Bunun yanında, GSH bağımlı bir enzim olan glutatyon S-transferaz ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyerek eliminasyonlarında görev alırken, glutatyon redüktaz okside glutatyonun redükte glutatyona redüksiyonunu katalizlemektedir. Diğer yandan, alfa tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), beta-caroten, flavonoid, koenzim q ve likopen gibi maddeler enzimatik olmayan ve antioksidan özellikleri olan maddelerdir. Enzimatik ve enzimatik olmayan çok sayıda parametreyi tek tek ölçmenin yanında

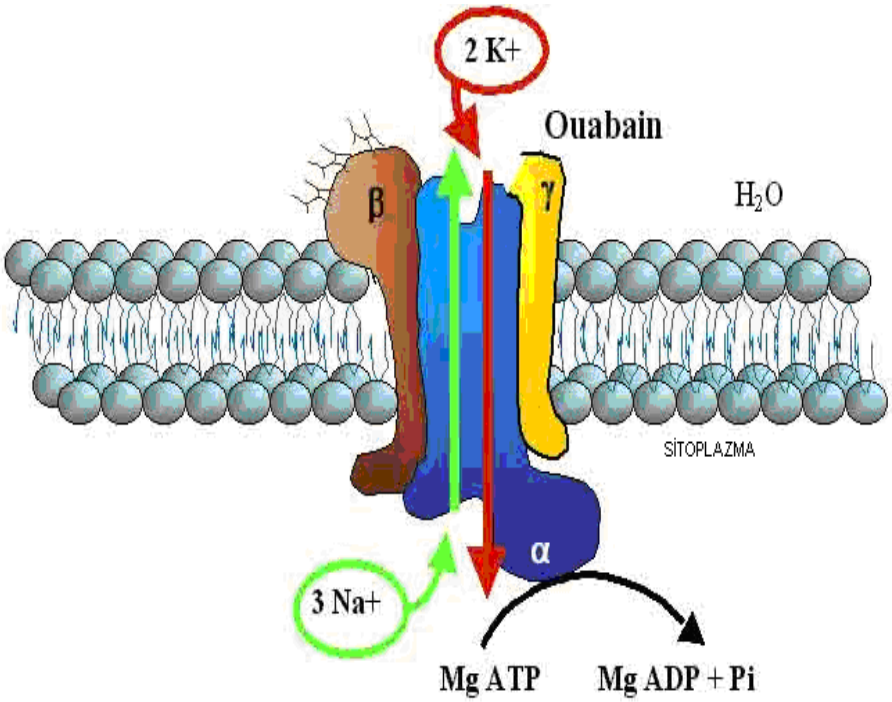
toplam oksidan (TOS) ve toplam antioksidan (TAS) düzeylerinin belirlenmesi de organizmanın yaşadığı oksidatif stres hakkında önemli bilgiler verebilmektedir.

1.4. Eritrosit Ozmoregülasyon Sistemi

Eritrositler, kanda sayıca en fazla bulunan hücreler olup, omurgalı hayvanlarda akciğer veya solungaçlardan vücut dokularına oksijen taşınmasında başlıca araçtır. Alyuvarlar büyük oranda hemoglobin içerirler. Oksijen molekülü hemoglobin moleküllerine akciğerler veya solungaçlarda bağlanır. Böylece oksihemoglobin oluşur. Eritrositlerdeki oksihemoglobinler vücuttaki dokulara oksijeni ulaştırarak metabolik reaksiyonlarda kullanılmalarını sağlarlar. Metabolizma sonucu açığa çıkan karbondioksitin de bir kısmı eritrositler tarafından karboksihemoglobin şeklinde taşınır. Örneğin memelilerde oksijenin çok az bir kısmı (%2) bu şekilde taşınırken, karbondioksitin çoğu kan plazmasında çözünmüş olarak taşınır. Memeli alyuvarları iki yanından da basık yuvarlak şeklinde hücrelerdir. Alyuvarların yapım yeri olan yassı kemiklerin iliklerinde üretilme aşamasındayken hemoglobin içermezler ve çekirdekli olmalarına karşın, kana karışacakları zaman eritrositler çekirdeklerini dışarı atarlar ve hemoglobin bakımından zenginleşirler. Gelişme sona erdiğinde eritrositler çekirdeğin yanı sıra tüm organellerini de yitirmişlerdir. İki yandan basık yassı şekilleri ve hiçbir organel içermemeleri onları en etkili şekilde oksijen taşımaya elverişli kılar ve aynı nedenlerden dolayı uzun bir süre yaşayabilirler. Ortalama ömürleri 120 gündür.

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan, membrana bağlı ve toksisitede duyarlı belirteç olan bir grup enzimdir. Na^+/K^+-ATPaz, 3 Na^+ iyonunu hücre dışına, 2 K^+ iyonunu ise hücre içine transfer etmek için ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır. Dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, zar geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimlerinin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine duyarlı olduğu belirtilmiştir (Atli ve Canli, 2011; 2013). Böylece hücre hacminin düzenlenmesi, iyon taşınımı, elektrokimyasal gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda

önemli görevlere sahiptir. Mg^{+2}-ATPaz enzimi, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü ve solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2}'nin taşınması ile oksidatif fosforilasyonda görev yapmaktadır. Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2}-ATPaz ise, hücre membranının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2}'nin nM düzeylerinde aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2}'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücresel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Atli ve Canli, 2011). Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. Ağır metallerin hayvanların hücre zarlarında Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonu ile bağlantılı osmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları gösterilmiştir (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004). Mg^{+2}-ATPaz enzimi Na^{+}/K^{+}-ATPaz kadar çevresel strese hassas değildir. Yapılan çalışmalar Mg^{+2}-ATPaz enziminin daha çok mitokondri içerisinde olması nedeniyle çevresel etmenlerden daha az etkilendiğini göstermiştir (Parvez ve ark., 2006; Atli ve Canli, 2011). Ca^{+2}-ATPaz'da diğer enzimler gibi çevresel stres elemanlarından özellikle ağır metal iyonları tarafından inhibe edilmekte veya stimüle edilebilmektedir. Genellikle, klorit hücrelerde bulunan Ca^{+2}-ATPaz'ın inhibisyon bölgesinin Ca^{+2} bağlayan bölge olduğu ve klorit hücrelerin metal toksisitesi için birincil hedef olduğu belirtilmiştir (Flik ve ark., 1985, Verbost ve ark., 1988).



Şekil.1.2. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapısı ve iyon transfer mekanizması özellikleri (http://www.bioscience.org/2001/v6/d/watson/figures.htm'den

1.5. Test Organizması Olarak Memeli Hayvanlar

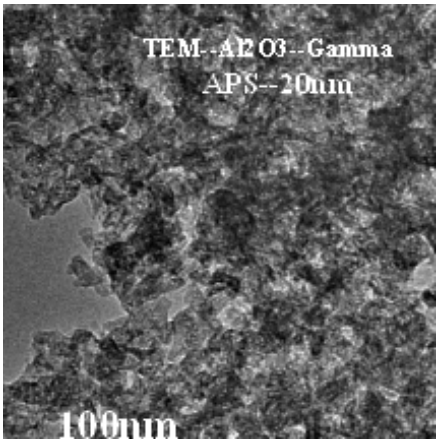
Hayvan çalışmalarında kemirgenlerin kullanımının çeşitli seçici avantajları vardır. Örneğin küçük bir alanda kolayca muhafaza edilebilir ve yeni çevreye adaptasyonu hızlıdır. Hızla çoğalarak 2-3 yıl gibi görece kısa bir ömür süresinde birkaç kuşak izlenebilir. Nispeten ucuz, yetiştirilmesi kolay ve deneysel çalışmalarda uysal nitelikler taşımaktadır. Bundan başka, test modelleri olarak kemiriciler; genetik, biyolojik ve davranış özellikleri bakımından insanlara yakından benzediğinden tercih edilirler. İnsanlardaki birçok biyolojik süreci sıçanlar da paylaştığından pek çok araştırma sorusunu cevaplamak için kullanılan uygun bir memelidir. Son olarak sıçanların anatomik, fizyolojik ve genetik özellikleri araştırmacılar tarafından iyi bilindiği için hayvan araştırmalarında uygun bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Test maddesinin sıçanlara uygulanmasında çeşitli yollar kullanılmaktadır. Bunlardan en popüler olanlarından birisi karın zarı içi diğeri ise mide içi sonda

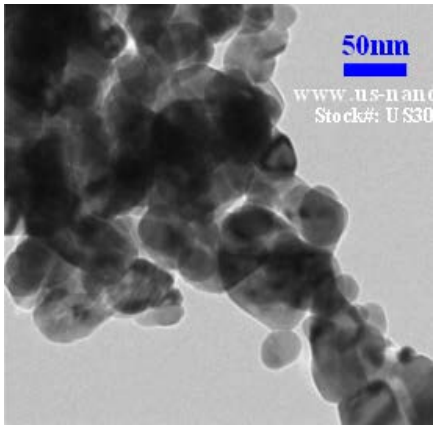
yoludur. Memeli hayvanlar bu nanopartiküllere çok farklı yollarla (hava, su, gıda, deri) maruz kalabilirler. Özellikle ağız ile alınan nanopartiküller mide asidi ile parçalanıp metal iyonları serbest hale gelebilir. Bu iki alınım yolunun kendine özgü üstün tarafı vardır. Karın zarı içi enjeksiyonu genellikle anestezi olmadan yapılmaktadır ve bu uygulamada test maddesinin uygulanacağı abdominal boşlukta büyük bir yüzey alanı vardır. Ayrıca bölgenin dolaşımı itibarı ile emilim hızı da yüksektir. Ancak uzun süreli tekrarlayan enjeksiyonlar doku reaksiyonu ve adezyonuna neden olabilir. Potansiyel olarak tahriş edici maddeler cömertçe seyreltilerek nispeten büyük miktarlarda intraperitonal (ip) yolla verilebilir. Bu yöntem kullanıldığında, periton boşluğu içine verilen maddelerin öncelikle portal dolaşım (kapı toplardamarı) içine emilerek genel dolaşıma ulaşmasından önce karaciğerde biyotransformasyona uğrayabilir. Mide içi sonda (og) yöntemi sayesinde ise test maddelerinin istenilen dozları belirlenen zamanda kayıpsız olarak doğrudan mideye verilmesi mümkündür. Test maddesi sonda ile verildiğinde önemli bir miktarı mide içinden hızlı bir şekilde ince bağırsağa geçer. Bu sayede verilen test maddesi dozu hem aç bırakılan hem de beslenen hayvanlarda çok hızlı bir şekilde emilmektedir. Bu yolla verilen maddelerin absorbsiyonu besin yoluyla verilenden daha hızlıdır ve test maddesi yavaş ve uzun bir gradyan ortaya çıkartır (Nebendahl, 2000).

1.6. Metal Nanopartiküllerinin Kullanım Alanları

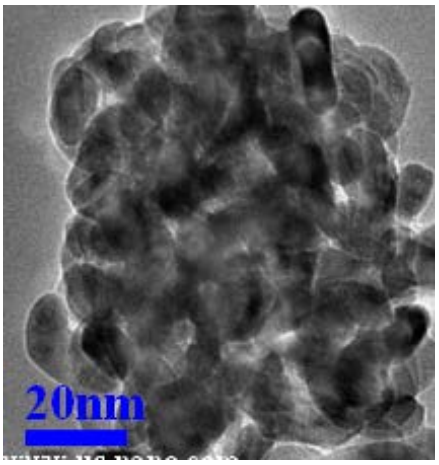
Metal NP'ler özgün yapıları nedeniyle modern teknolojinin birçok alanında kullanılmaktadır ve kullanım alanları giderek artmaktadır. Bu maddelerin kullanıldığı alanları şu şekilde özetlemek mümkündür. Elektronik; Yüksek performanslı elektronik aletler, düz panel TV'ler, yüksek geçirgen materyaller, çok katlı kapasitörler. Çevresel; Biodegradable polimerler, germinasyon yardımcısı, endüstriyel emisyonların ve kirliliğin temizlenmesi, daha iyi su temizlenmesi. Enerji; Hidrojen depolanması, yüksek etkinlikli enerji hücreleri için elektro katalitik, daha uzun kullanım ömürlü/kullanımlı piller, yüksek performanslı solar hücreler, otomotiv/endüstriyel motorlar için daha etkin katalizörler, çizilmeye dayanıklı



A



B



C

Şekil.1.3. Al_2O_3 (A) , CuO (B) ve TiO_2 (C) nanopartiküllerinin TEM (geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri. http://www.us-nano.com

kaplamalar, seramik. Kozmetik ve ilaç; Güneş kremleri, yüz yıkama solüsyonları, antimikrobiyal maddeler, ilaç uygulamaları, kanser tedavisi. Manyetik; Yüksek etkinlikli ve daha çok depolama kapasitesine sahip bellek ve depolama medyası, yüksek çözünürlüklü MRI görüntülemesi için nanomanyetik partikül içeren kontrast materyal. Mekanik; Yüksek güç, düşük ağırlıklı birleşik ve yapısal materyaller, eskimeye/sürtünmeye karsı yüksek dirençli materyaller, anti-korozyon/paslanmaya karşı dirençli materyaller. Optik; Yansımayı önleyici kaplamalar, tanı konusunda kullanılabilecek ışın/ışık duyarlılığı ile çalışan sensörler.

Bu kadar geniş kullanım alanına sahip olan bu maddelerin çevresel etkileri hakkında çok az bilgi vardır. Bu da, NP'lerin geri dönüşü olmayan hasarlar bırakmadan önce çevresel etkilerinin çok yönlü araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

1.7. Amaç:

Son yıllarda teknolojideki gelişmelerle, insan yaşamının farklı alanlarında kullanılan maddeler nano boyutlara kadar düşmüştür. Özellikle ağır metallerle oluşturulan ve büyüklükleri 100 nm den küçük olan metal oksitleri endüstri ve insan yaşamının farklı alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin kullanım alanları arasında ilaç endüstrisi, dokuma sanayi, filtreler, diş macunu, güneş kremi, çocuk oyuncakları, nemlendirici, paketleme ürünleri, beyaz eşya, elektronik cihazlar ve besin endüstrisi gibi çok farklı alanları saymak mümkündür. Daha da önemlisi bu kullanım alanlarına gün geçtikçe yeni alanlar eklenmektedir. Metal nanopartikülleri insan yaşamını kolaylaştıran yenilikler vaat ederken, çevreye ve insan sağlığına nasıl etkiler yaptıkları yeterince bilinmemektedir. Bu nedenle, metal nanopartiküller doğal ve insan yaşamı için tehdit oluşturmaktadır. Memeliler, hem karada hem de suda yaşayabildiklerinden, çevreye salınan kirleticilerden çok fazla etkilenen hayvan grubudur. Metal nanopartikülleri biyomalzeme, gıda katkı maddesi, kozmetik ürünler ve çeşitli sağlık alanlarında insan yaşamına girdiğinden insanların metal nanopartiküllerden etkilenme düzeyi diğer memeli hayvanlarla kıyaslandığında çok daha fazla olabilmektedir. Dolayısıyla metal nanopartiküllerin çevresel akıbetleri

ve organizmalar üzerine olan etkileri bütün dünyada önde gelen ülke bilim insanlarının temel araştırma konuları arasına girmiştir. Fakat, ülkemizde bu konular üzerine yapılmış olan çalışmalar çok yetersizdir. Özellikle bu tez konusuna benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez projesinin amacı, çevresel etkileri hakkında çok az bilgi bulunan metal nanopartiküllerinin model bir memeli türü olan sıçanda (*Rattus norvegicus* var. albinos) muhtemel etkilerinin belirlenmesi ve bu partiküllerin kullanımından kaynaklanan çevresel belirsizliklerin azaltılmasına katkı sağlanmasıdır. Bu araştırmada, nano-mühendislik ürünü olan ve çok fazla uygulama alanı olan Al_2O_3 (<50 nm), TiO_2 (<50 nm) ve CuO (<50 nm) nanopartikülleri sıçanlara oral gavaj (gıda ve ilaçları alınmayı temsilen) ile farklı dozlarda (0, 0.5, 5, 50 mg/kg v.a.) 14 gün süre ile verilmiştir. Ağız yoluyla alınan nanopartiküllerinin mide asidi ile parçalanması ve toksik ağır metallerin serbest hale gelmesi mümkündür. Bu nedenle, memelilerde oral yollarla alınan nanopartiküllerin metabolik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bütün deneylerde aynı yaş grubuna ait dişi sıçanlar kullanılarak, yaş ve cinsiyet farkı elimine edilmiş olabilir. Bu tez çalışmasında farklı metabolik sistemlere ait çok çeşitli biyo-belirteç seçilerek, muhtemel etkilerin farklı sistemlerde gözlemlenmesi planlanmıştır. Kan parametreleri vücutta meydana gelen değişimlerin en kolay ve hızlı bir şekilde öğrenilebildiği doku olması nedeniyle önemlidir. Bu nedenle, bu Yüksek Lisans Tez projesi ile ilgili çalışmalar sıçanların kan dokusu ile yapılmıştır. Bu proje ile, metal nanopartiküllerinin sıçan metabolizmasında yapabileceği etkiler belirlenmeye çalışılacak ve bu değişimden yola çıkarak metal nanopartikül kullanımı konusunda yorumlar yapılmıştır.

Sıçan metabolizmasının Al_2O_3, TiO_2 ve CuO nanopartiküllerine vereceği tepkiler farklı sistemlere özgün biyo-belirteçlerin kan dokusunda analizi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada ölçülen olan kan dokusu parametreleri memelilerde sıklıkla başvurulan sağlık göstergeleri olup, aynı zamanda toksisite çalışmalarında biyo-belirteç olarak kullanılmaktadır.

Hedeflenen amaçlara ulaşmak için kan (serum ve eritrosit) dokusunda;

1. Karaciğer enzim aktiviteleri (ALT, AST, ALP),
2. Endokrin sistem parametreleri (prolaktin, T3, T4, kortizol, östrojen),
3. İmmün sistem parametreleri (IgM, IgE, IgG)
4. Biyokimyasal parametre (protein, glikoz, kreatinin, bilirubin, üre, kolesterol, fosfolipit, trigliserit) düzeyleri
5. Toplam oksidan ve antioksidan düzeyleri,
6. Eritrosit ozmoregülasyon enzim (Toplam ATPaz, Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz, Ca-ATPaz) aktiviteleri, ölçüldü.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Jeng ve Swanson (2006), bu çalışmada, ticari olarak kullanılan metal oksit nanopartiküllerinin toksisitelerinin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Bu nanopartiküllerden, ZnO 50-100 µg/mL arasındaki dozlarda mitokondrinin fonksiyonları önemli ölçüde azalırken, Fe_3O_4, Al_2O_3, ve TiO_2 için 200 µg/mL dozlara ulaşıncaya kadar kayda değer etkiler görülmemiştir. Araştırıcılar ayrıca, ZnO nanopartiküllerine maruz kalan hücrelerde apoptoz görüldüğünün ve daha yüksek ZnO dozlarına maruz kalan hücrelerde ise nekrozların görüldüğünü belirtmişlerdir.

AshaRani ve ark. (2008), insan glioblastoma hücreleri ve akciğer fibroblast hücrelerinde Ag nanopartiküllerinin hücre morfolojisi, hücre ömrü, metabolik aktivitesi ve oksidatif stresindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Araştırıcılar, Ag nanopartiküllerinin hücrenin ATP miktarını azaltığını, mitokondiye zarar verdiğini ve doza bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, DNA hasarlarının kanser hücrelerinde daha belirgin olarak görüldüğünü ve bunun alınan doza bağlı olduğunu da açıklamışlardır.

Liu ve ark.(2010), sıçanlar ile yapmış oldukları çalışmada, intratrakeal olarak 0,5, 5 ve 50 mg/kg dozlarında verilen farklı boyutlardaki (5 nm ve 200 nm) titanyum nanopartiküllerinin etkilerini incelemişlerdir. Araştırmanın sonuçları NP-1 titanyum dioksit partiküllerinin solunmasıyla birlikte membranlarda hasarların geliştiğini göstermişlerdir. Bununla beraber, makrofajların fagositik yeteneği NP-1 titanyum dioksitin düşük dozuna maruz kalanlarda artmış ve yüksek dozuna maruz kalanlarda azalmıştır. Bu çalışmada, küçük boyutlu titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalan hayvanlarda spesifik ve spesifik olmayan immün cevabın her ikisinde de azalma ile birlikte, hücre yapısı ve akciğer alveolar makrofaj fonksiyonlarında önemli ölçüde aksamalar olduğu belirtilmiştir.

Gao ve ark. (2012), bu çalışmada dişi farelere 90 gün boyunca oral gavaj yöntemiyle titanyum nanopartikülü (10 mg/kg) vermişler ve bunu takiben gen ekspresyonunda ve yumurtalıklarda meydana gelebilecek yapısal hasarları incelemişlerdir. Araştırmanın sonuçları dişi farelerde progesteron seviyesinde

azalmalar olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar titanyum nanopartiküllerinin direk olarak yumurtalık fonksiyonlarını etkilediğini belirtmişlerdir.

Shrivastava ve ark. (2013), farelerle yaptıkları çalışmada, TiO_2, ZnO ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin etkisinde kalan hayvanların eritrosit, beyin ve karaciğerde meydana gelen toksik etkileri incelemişlerdir. Araştırıcılar bu nanopartiküllerin farelerde antioksidan enzim aktivitelerini değiştirdiğini ve ROS seviyelerini artırmasına neden olduğunu belirtirken, nanopartiküllerin beyin, karaciğer ve eritrositlerde önemli ölçüde oksidatif strese neden olduğunu vurgulamışlardır. Öte yandan bu nanopartiküllerin beyinde nörotoksik etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir. Nanopartiküller arasında toksit etki bakımından bir sıralama yapıldığında en fazla etkiyi çinko oksitin gösterdiğini ve bunu alüminyum oksit ve titanyum oksitin izlediğini belirtmişlerdir.

Gao ve ark. (2013), yapmış oldukları çalışmada titanyum nanopartikülü verilen erkek farelerde gen ekspresyon profillerindeki değişmeler ve testislerde oluşan yapısal hasarları incelemişlerdir. Araştırıcılar bunun için hayvanlara 90 gün boyunca 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozlarında Ti nanopartikülünü oral gavaj yöntemi ile vermişlerdir. Araştırmanın sonucunda genel olarak titanyum dioksit nanopartiküllerinin etkisinde kalan hayvanlarda serum cinsiyet hormon seviyelerindeki değişmeler, sperm kusurları ve testis hasarları gözlenmiştir. Araştırıcılar bu etkilerin testislere ulaşan nanopartiküllerin kan-testis bağlantılarını bozması sonucu oluşabileceği konusunda yorum yapmışlardır.

Ze ve ark (2014), Ti nanopartikülünün beyin üzerine olan toksik etkilerini araştırmışlardır. Doksan gün boyunca Ti nanopartikülü alan farelerin beyninde birçok reseptörün aktive edildiği ve tümör nekrozları oluştuğu gösterilmiştir. Araştırıcılar titanyumun özellikle gıda endüstrisindeki kullanımı nedeniyle insan merkezi sinir sistemi üzerinde oluşabilecek hasarlara dikkat çekmişlerdir.

Yu ve ark. (2014), gebe sıçanlara (6-19. gün) 0, 100, 300 ve 1000 mg/kg/gün konsantrasyonlarda Ag nanopartiküllerini oral gavaj ile vermişler ve gebeliğin 20. günü sezeryan ile alınan fetüslerde embriyotoksik ve teratojenik etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca hepatik oksidan/antioksidan dengesi ile serum biyokimyasal parametrelerindeki değişimleri de gözlemlemişlerdir. Ana sıçanlarda 100 mg/kg/gün

ve daha yukarı konsantrasyonlarda katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde artış olurken, 1000 mg/kg/gün dozunda glutatyonda azalma görülmüştür. Araştırıcılar gebelik sürecinde oral olarak verilen Ag nanopartiküllerinin 100 mg/kg/gün dozunun karaciğerde oksidatif strese neden olduğunu, fakat 1000 mg/kg/gün dozunun toksik etkilerinin görüldüğünü belirtmişlerdir. Genel bir değerlendirme ile fetüs için <= 1000 mg/kg/gün dozunun, ana sıçanlar için ise <= 100 mg/kg/gün dozunun olumsuz etkilerin görüldüğü derişimler olduğu belirtmişlerdir.

Liu ve ark. (2010) farelerle yapmış oldukları bu çalışmada, faklı dozlarda bakır nanopartiküllerinin nazal yolla verilmesi sonucu farelerin bazı metabolik olaylarını ve beyinde meydana gelen etkileri araştırılmıştır. Araştırıcılar, sinir hücrelerinin yapısı TEM ile gözlenmesi sonucu hücrelerde kromatin toplanması, olfaktör hücrelerinde mitokondri küçülmesi ve beyindeki beyaz çıkıntıda endoplazmik retikulumun ribozomlarının ayrılması ve endoplazmik retikulumda artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Buna karşın, beyin dokusunda antioksidatif enzim aktivitelerinde önemli bir değişim gözlenmezken, yüksek dozlarda MDA düzeyinde önemli artışlar olmuştur. Araştırıcılar, yüksek dozlarda alınan bakır nanopartiküllerinin fare beyninde doku harabiyetine neden olabileceğini, bunun da bu partiküllerin koklama lobu ve beynin derinliklerine kadar girmesi sonucu oluşabileceğini vurgulamışlardır.

Tassinari ve ark. (2014) sıçanlar ile yapmış oldukları bu çalışmada temel olarak titanyum dioksit nanopartikülü verilmesi sonucu endokrin sistemin (testesteron, 17-b-estradiol ve triodotronin, troid , adrenalin) tepkisini ve dokularda partikül dağılımının görüntülenmesini (SEM ve TEM) araştırmışlardır. Her gün (5 gün) oral olarak 0,2 mg/kg dozunda titanyum dioksit nanopartikülü verilen hayvanların dalak ve yumurtalıklarında nanopartikül düzeyinin arttığı görülmüştür. Cinsiyetle ilgili histolojik değimler genel toksisite hariç, her iki cinsiyette de yumurtalık granülünde, adrenal kortekste (dişi için) ve adrenal medulla da gözlendi. İlginç olarak testosteron seviyelerinin yüksek dozda nanopartikül verilen hayvanların hem dişi hem de erkek olanlarında artmış olduğu belirtilmiştir.

Mohammadipour ve ark. (2014), Wistar sıçanlara gebeliğin 2-21. günlerinde her gün 100 mg/kg dozunda titanyum dioksit nanopartikülünü oral gavaj yoluyla

vererek ortaya çıkabilecek etkileri gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar, çalışmanın esas amacının gebelik sırasında yavrunun hafızası ve öğrenmesi ve hippocampal hücredeki etkilerini belirlemek olduğunu belirtmişlerdir. Hem Morris su labirent testi, hem de pasif kaçınma testi titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalan yavru sıçanlarda önemli derecede hafıza ve öğrenmede azalma olduğunu göstermiştir. Araştırılar, bu çalışmanın sonuçlarının yetişkin ve yavruların beyninde titanyum dioksit nanopartiküllerinin nörotoksik etkilerinin neler olabileceğine ilişkin yorumlar yapmamıza ve nanopartikül kullanımı konusunda daha dikkatli olunması gerektiği yorumlarını yapmışlardır.

Sarhan ve Hussein (2014) Wistar albino sıçanlar ile yapmış oldukları çalışmada, intraperitonal olarak verilen yüksek dozda gümüş nanopartikülünün (2000 mg/kg) etkisinde kalan sıçanların kan parametrelerinde değişimi, karaciğer ve böbrekteki yapısal değişiklikleri belirlemişlerdir. Araştırmanın bulguları 48 saat sonra hayvanlarda organların yapı ve fonksiyonunda ciddi sitotoksik etkiler olduğunu göstermiştir. Serum değerlerinde de önemli değişimler gözlenmiştir. Özellikle çeşitli akyuvar hücre sayılarında ve hemoglobin düzeyinde artışlar gözlemlenirken, diğer serum parametrelerinin (kreatinin, üre, aspartat, ALP) değerleri de önemli düzeylerde artmıştır.

Vandebriel ve ark. (2014) sıçanlar ile yapmış oldukları çalışmada Ag nanopartikülü 0.40 mg/kg kg/gün dozunun damardan verilmesiyle hayvanlarda immün sistem tepkisini ölçmeyi amaçlamışlardır. Bunun için T-hücresi bağımlı antikor tepkisi (TDAR) ve anahtar limpet hemosiyanin (KLH) tepkileri 28 gün süren toplardamar enjeksiyonu yoluyla Ag nanopartikül verilmesini takiben yapılmıştır. Sonuçlar çeşitli immün parametrelerinin nanopartiküllerden etkilendiğini göstermiştir. Bunlar arasında, timus ağırlığında azalma, dalak ağırlığı ve dalak hücre sayısında artma, KLH-özgün IgG de azalma görülmüştür. Araştırıcılar, damardan verilen Ag nanopartikülünün immün sistemi baskıladığını belirtirken, immünotoksisitede TDAR değerlerinin önemli olduğunu ve sadece hücre sayımına odaklanılmaması gerektiğini vurgulamışlardır.

Geraets ve ark. (2014), nanopartiküllerin toksik etkilerinin kendi kimyasal ve fiziksel özellikleriyle beraber, uygulanan doz, alınım yolu ve etkilenen organ ve

sistemlere göre oldukça farklılık gösterdiğini belirtmiştir. Memeli hayvanlarla yapılan çalışmaların çoğu fare ve sıçan metabolizması üzerine metal-NP'lerin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan geldiğini ve bununla birlikte insan hücreleri üzerine NPlerin in vitro toksik etkilerinin de yaygın bir şekilde araştırılan konular arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Shim ve ark. (2014), bu çalışmada 4 farklı çinko nanopartiküllerinin sıçan beyni ve kanında bulunan proteinlere bağlanma potansiyellerini incelemişlerdir. Nanopartiküllerin proteinler ile ilişkilerinde boyutun önemi olmadığı görülmüştür. Korona adı verilen proteinlerin analizi ile çinko nanopartiküllerinin potansiyel toksik etki yollarını yorumlamışlardır. Araştırıcılar, çinko nanopartiküllerinin bu özel proteinlerle etkileşimi sonucu birçok biyolojik faaliyetin olumsuz etkilenebileceği hususunda yorum yapmışlardır.

Cardoso ve ark. (2014), bu çalışmada Wistar cinsi sıçanların erişkin bireylerinde altın nanopartiküllerinin akut (24 saat) ve kronik (28 gün) dozlarının etkilerini araştırmışlardır. Özel olarak ilgilendikleri konu, ortalama 10 ve 30 nm çaplarında olan altın nanopartiküllerinin kan ve karaciğerdeki DNA hasarları olmuştur. Bu çalışmanın bulguları DNA hasarlarında anlamlı artışlar olduğunu ve bu hasarların altın nanopartiküllerinin uygulama ve dozuna bağlı olmadığını göstermişlerdir. Araştırıcılar, oluşan bu DNA hasarlarının oksidatif stresle ilişkili olabileceği hakkında yorumlar yapmışlardır.

Yu ve ark. (2014), bu çalışmada farelere titanyum dioksit nanopartiküllerinin 1.25, 2.5 ve 5 mg/kg dozlarına 9 ay aralıksız şekilde nazal olarak uygulanmışlar ve sonuçta farelerin serum parametrelerindeki değişiklikleri incelenmişlerdir. Sonuçlar titanyum dioksit nanopartiküllerine kronik olarak maruz kalmanın ateroskleroz ile akciğer iltihaplanması ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Ayrıca, titanyum nanopartikülünün etkisinde kalan farelerin serum parametrelerinde (trigliserit, glikoz, kolesterol) önemli düzeylerde artışlar gözlemlemişlerdir. Araştırılar nanopartiküllerin ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu hipotezini de güçlü olduğu konusunda yorumlar yapmışlardır.

Park ve ark. (2015), bu çalışmada 1.5, 3, and 6 mg/kg dozlarda 13 hafta boyunda ağızdan verilen alüminyum nanopartikülünün su ve yem tüketimini ve

bunun sonucu olarak kilo değişimini gözlemlemişlerdir. Bunun yanında kan hücre sayısındaki değişimler ve patolojik hasar olup olmadığı gibi konularda da incelemeler yapmışlardır. Sonuçlar, alüminyum nanopartikülü verilen gruplarda akyuvar sayında artış, bununla ilişkili olarak, eozinofil hacminde azalma ve lenfosit hacminde artış gözlemlemişlerdir. Nanopartikül birikiminin en fazla karaciğer ve böbrekte olduğunu, kanda laktat dehidrojenaz seviyesinin arttığını ve dokularda patolojik lezyonlar olduğunu belirtmişlerdir.

Vinardell ve ark. (2015), farklı boyut ve şekillerdeki alüminyum nanopartiküllerinin insan, sıçan ve tavşanların kanında hemolitik (% 50 hemoliz) davranışlarını incelemişlerdir. Sonuçlar en fazla hemolitik davranış gösteren alüminyum nanopartikülünün 13 nm boyutlu tozlar olduğunu ve bunu 50 nm boyutlu olanların izlediğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar ortama albümin ilavesinin nanopartiküllerin etkisini azalttığını göstermişlerdir. Alüminyum oksit nanopartikülleri ile alüminyum oksit arasında da hemolitik etki bakımından ciddi farklar görülmüştür.

MacNicoll ve ark. (2015), bu çalışmada nano ve büyük boyutlu titanyum oksitlerin etkilerinin sıçanlarda (in vivo olarak) ve bağırsak epitelinde (in vitro olarak) incelemişlerdir. In vivo deneylerde, sıçanlara ağızdan 5 mg/kg dozda verilen titanyumların 96 saat sonra herhangi bir organda birikiminin önemli düzeyler olmadığını (titanyum miktarı olarak) görülmüştür. Dispersiyon yöntemleri de titanyum maddelerinin alınımını etkilememiştir. Ağızdan alınan TiO_2'in dışkı ile çıktığını da göstermişlerdir. Genel olarak bu çalışmanın sonuçları, hem in vitro hem de in vivo yöntemlerle uygulanan titanyumların çok ciddi etkiler oluşturmadığını ve özellikle besin ile alınan titanyumların çoğunun dışkı ile dışarı atıldığını göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

3.1.1.1. Nanopartiküller

Nanopartikül: Al_2O_3 (40 nm), TiO_2 (21 nm) ve CuO (40 nm) (Sigma)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Trizma-Base (Tris [hidroksimetil]aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
Sukroz (α-D-Glukopiranozil β-D-fruktofuranosid; $C_{12}H_{22}O_{11}$, Sigma)
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$, Merck)
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$, Merck)
Polioksietilen 10 Lauril eter (Sigma)
Amonyum molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck]
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Merck)
Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP, Sigma)
Ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Merck)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)
Bakır (II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)

Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)
Bovin Albumin (Sigma)

3.1.1.4. Serum Parametreleri Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Hormon ve diğer serum parametrelerinin ölçümü Beckman UniCel DXC 800 ve Beckman UniCel DXI 800 Synchron otoanalizörleri ile yapılmıştır. Bu cihazlarda, cihaz üretici firma olan Beckman şirketi tarafından üretilen şu kitler kullanılmıştır. Beckman UniCel DXC 800 için kullanılan kitler; (Ref: glikoz: 472500, kolesterol: 467825, protein: 465986, üre, kreatinin ALT: 476826, AST: 476831, ALP: 442670, trigliserit: 445850, Beckman Coulter Diagnostics, California, USA). Hormon ölçümlerinin yapıldığı Beckman UniCel DXI 800 Synchron atoanalizötörü için kullanılan kitler; (Ref: kortisol: 33600, TSH: 33820, T3: A13422, T4: 33880, Prolaktin: 33530, estradiol: 33540, Beckman Coulter Diagnostics, California, USA). İmmunoglobulin (IgM, IgE, IgG) ölçümleri Ç.Ü. Merkez laboratuvarında nephelometrik yöntemle ölçülmüştür. Bu ölçüm için kullanılan kitler; IgG (OSAS15), IgM (OSAT15), IgE (OQTG15).

Toplam oksidan ve antioksidan kitleri: TOS kiti RL0024, TAS kiti ise RL0017. Her iki ölçüm için kitler Rel Assay Diagnostic şirketinden temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

Spektrofotometre: Schimadzu UV-1800
Derin dondurucu (- 80 ^{o}C): Revco Ultima II
Hassas Terazi: Sartorius Analytic ATL-224-I
Santrifüj: Sigma 2-16 K
Homojenizatör: Janke & Kunkel Ultra Turrax T25
Su Banyosu: Wise Bath WSB-30
pH metre: Hana HI 8314 membran pH metre
Manyetik Karıştırıcı: Janke & Kunkel IKAMAG RH
Karıştırıcı: Vortex S0 200

Beckman UniCel DXC 800
Beckman UniCel DXI 800 Synchron Autoanalyzer
Siemens BN II Nephelometer
Ultrasonikatör: Bandelin HD2200
Otomatik mikro pipet: Çeşitli hacimlerde Gilson ve Eppendorf pipetler
Oral gavaj iğnesi
Sıçan Kafesi
Çeşitli ebatlarda cam tüpler
Şırıngalar

3.2. Yöntem

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan Wistar Albino Sprague-Dawley ırkı sıçanlar (*Rattus norvegicus* var. albinos) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÇÜTF-DETAUM) biriminden temin edilmiştir. Bütün deneyler bu birimin laboratuvarlarında yürütüldüğünden, sıçanlar laboratuvar dışına çıkartılmamış, sadece deney kafeslerine 6'şarlı gruplar şeklinde yerleştirilerek adaptasyonları için 2 hafta beklenmiştir. Sıçanların tutulduğu oda koşulları şu şeklidedir; 12 saat aydınlık: 12 saat karanlık periyodu, % 50 nem ve 22±1,0°C sıcaklık. Adaptasyon ve deney süresince hayvanlar standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Deneylerde 190-230 gram ağırlıktaki ergin dişi bireyler kullanılmıştır. Çizelge 3.1. de görüldüğü gibi farklı deneylerde kullanılan sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($P>0.05$).

Denemeler, kontrol gruplarıyla aynı laboratuvar koşullarında olmak üzere, her kafeste 6'şar sıçan olacak şekilde toplam 10 kafeste yürütülmüştür. Kafeslerden biri kontrol olarak seçilmiş, diğer 9 kafeste bulunan hayvanlar ise metal nanopartiküllerine maruz bırakılan hayvan deneyleri için kullanılmıştır. Deneyler esnasında NP solüsyonları taze olarak hazırlandı ve uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra, topaklanmayı önlemek için 20 dk. süre ile ultrasonikatörde (Bandelin, HD2200) ses titreşimine maruz bırakıldı. Bu işlem buz üzerinde yapılarak, NP solüsyonunun ısınması önlendi. Bu stoklardan uygun miktarlarda alınan NP

solüsyonları oral gavaj yoluyla sıçanlara verildi. Hayvanlara 14 gün boyunca, her gün sabah aynı saatte (10:^{00} dolayında) Al_2O_3 (40 nm), TiO_2 (21 nm) ve CuO (40 nm) nanopartikülleri 0 (kontrol), 0.5, 5, 50 mg/kg v.a./gün olacak şekilde ağılıklarına göre 200 veya 220 µl su ile verilmiştir. Kontrol hayvanlara sadece aynı miktar su verilmiştir. On dört günlük süre bitiminde test maddesi ve kontrolleri için kullanılan sıçanların tamamı aynı gün içinde yoğun anestezi (ketazol) verilerek öldürüldü ve derhal dissekte edildi. Sıçanların kanı kalpten şırınga yardımıyla alınarak cam tüplere aktarıldı.

Kan dokusu sıçanlardan alındıktan hemen sonra analiz edilecekleri laboratuvara soğuk zincir ile taşınmıştır. Kanlar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra hücreler ve serum ayrımı yapılmış ve serum başka tüplere aktarılarak ölçülecek olan serum parametrelerinin analizlerini yapmak üzere Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarına götürüldü. Nanopartiküllerin metabolik etkilerini belirlemek amacıyla serumda 17 parametrenin (ALP, AST, ALT, protein, glikoz, kolesterol, üre, kreatinin, trigliserid, prolaktin, T3, T4, kortizol ve östrojen (estradiol) düzeyleri Beckman UniCel DXC 800 ve Beckman UniCel DXI 800 Synchron (Beckman Coulter Inc., CA, USA) otoanalizatörleri ile yapıldı. Bu ölçümlerde kullanılan materyal ve yöntemler çok detaylı bir şeklide Beckman Coulter 2008 cihazın kimya bilgisi katalogunda yer almaktadır. Analizlere ait metot bilgileri literatürde verilmiştir (Tietz, 1987; 1994; Newman ve ark., 1992; Burtis ve ark., 1994).

Serumda immunoglobulin (IgM, IgE, IgG) düzeylerinin ölçümleri ise yine aynı laboratuvarda, fakat nephelometrik yöntemle ölçüldü. Bu ölçümler, Siemens BN II Nephelometer cihazı ile gerçekleştirildi (Thomas, 1998; Winter ve ark., 2000). Analizlerin yapıldığı Ç.Ü. Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarının "uluslararası komisyon" tarafından akreditasyonu 3 yıl artarda yapılmış olup, halen 2017 yılına kadar akreditasyonu mevcuttur. Ölçümler esnasında, kalite kontrol amacıyla ve ayrıca ölçümlerin kabul edilebilir sınırlar aralıklarında olduğunu kontrol etmek amacıyla kontrol materyalleri de kullanılmıştır. Buna ilave olarak Bio-Rad (Program, California USA) kalite kontrol programı uygulanmıştır.

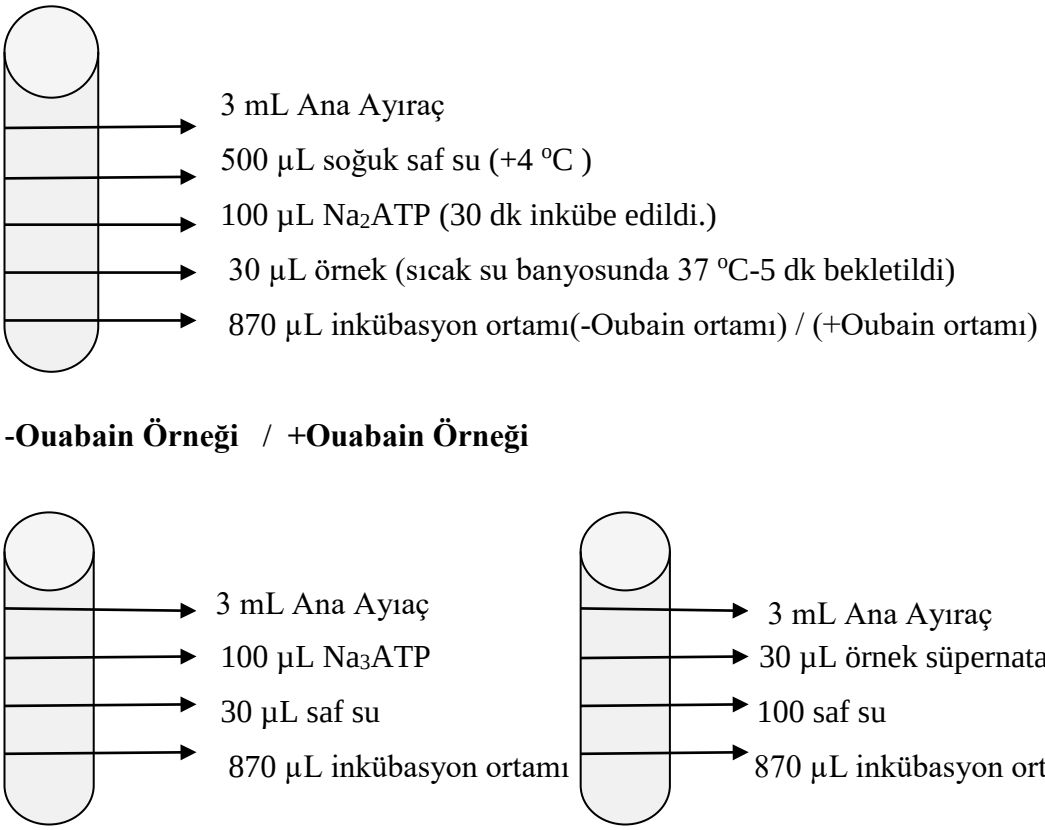
Serumda toplam oksidan ve toplam antioksidan düzeyleri Rel Assay Diagnostic kitleri kullanılarak spektrofotometre aracılığı (Schimadzu UV-1800) ile ölçüldü ve böylece nanopartiküllerin oksidatif etkileri belirlendi. Bu ölçümlerde Erel, (2004; 2005) tarafından belirtilen yöntemler kullanılmıştır.

Serumu alınan kan hücreleri % 0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra kullanılacakları zamana kadar –85 ^{o}C'de (Revco Ultima II) saklandı. Kan hücrelerinde ATPaz aktiviteleri (Toplam ATPaz, Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz, Ca-ATPaz) ölçülerek nanopartiküllerin eritrosit ozmoregülasyon sistemi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

3.2.1. ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

ATPaz aktivitesinin ölçümü için gerekli olabilecek optimum koşullar daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Atlı, 2009). Bunlar Tablo 2 de verilmiştir. Na^{+}–K^{+} ATPaz aktivitesi, ouabain içermeyen tüplerin aktivitesinden (Toplam-ATPaz), ouabain içeren tüplerin aktivitesinin (Mg^{+2}-ATPaz) çıkarılması ile hesaplandı. ATPaz aktiviteleri, μmol Pi/mg prot./sa. olarak verildi.

	(- Ouabain)	(+ Ouabain)
Ouabain (mM)	-	1
NaCl (mM)	100	100
KCl (mM)	20	20
$MgCl_2$ (mM)	4	4
Tris (mM)	40	40
pH	7,7	7,7
ATP (mM)	3	3
Sıcaklık (^{o}C)	37	37



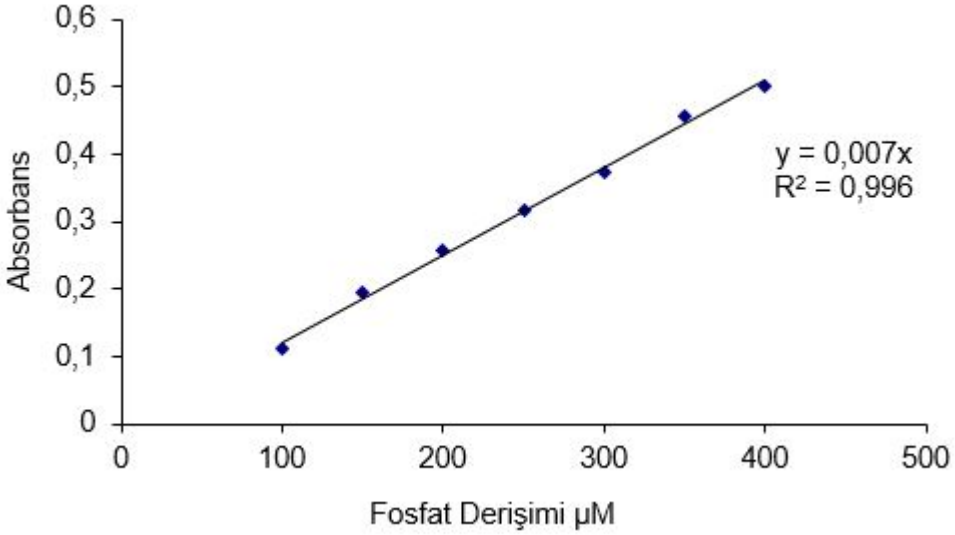
Şekil 3.1. ATPaz aktivitelerinin ölçümünün şematik görünümü.

3.2.2. İnorganik Fosfat Tayini

Bu çalışmada Atkinson ve ark. (1973) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre inorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi) Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İnorganik fosfat tayini için kullanılacak olan ayıraçların hazırlanması aşağıda verilmiştir (Atli, 2009).

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartıldı ve saf su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ºC'de 30-40 dk bekletildi.

2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözüldü.
3. Ana ayraç: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.



Şekil 3.2. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Deney tüplerinde açığa çıkan inorganik fosfat miktarının belirlenmesi için inkübasyon tüplerine 3 mL ana ayraç (polioksietilen 10-lauril eter, amonyum molibdat karışımı) konulmasını takiben oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra yapıldı. Hem deney, hem de standart tüplerinde oluşan sarı rengin absorbansı 390 nm'de okundu. Sonuçların kantitatif değerlendirilebilmesi için seri Pi standartları hazırlandı. Bunun için 25, 50, 100, 150, 200, 250 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden (Şekil 3.2) değerlendirildi. Bu standartlara ait lineer regresyon analizi sonuçlarına göre bulunan formül ($y=0.007x$, $R^2=0.996$) kantitatif fosfat hesaplamalarında kullanıldı.

Enzim aktivitesini normalize etmek amacıyla eritrositlerin toplam protein düzeyleri de belirlendi. Bunun için eritrosit supernatantlarında Lowry metodu (Lowry ve ark, 1951) ile protein analizi yapıldı. Bu metodun esası, proteinlerin alkali

bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturma esasına dayanmaktadır. Meydana gelen mavi rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülerek kantitatif olarak protein miktarları belirlenmiştir.

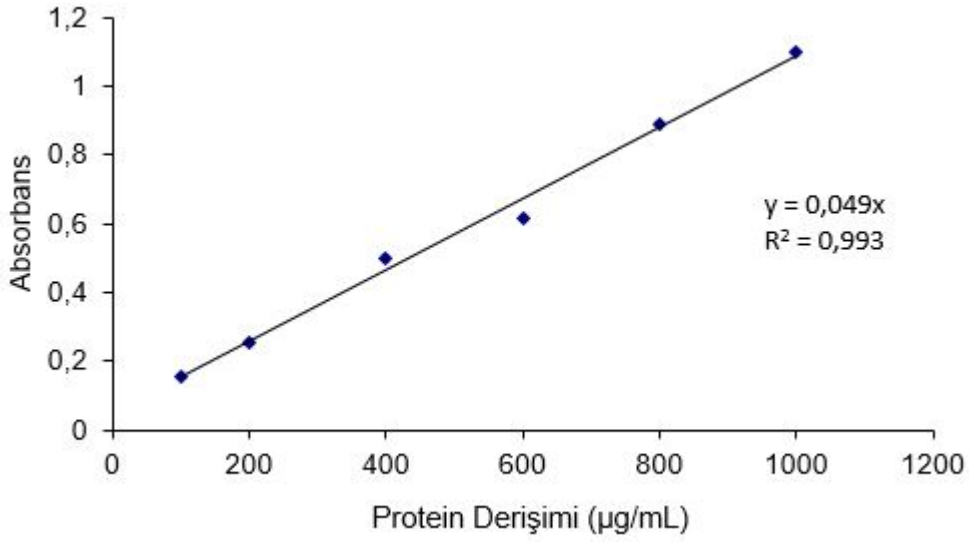
Bu metod ile proteinler önce alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini oluşturur, daha sonra ortama Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiğinde bakır-protein kompleksi, tirozin ve triptofan kökleriyle birleşir. Bu analizlerde kullanılan ayraçlar şunlardır (Atli, 2009).

Ayraçlar:

1. Ayraç A: % 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde). 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0.1 N NaOH içinde çözünmesi sağlandı.
2. Ayraç B1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. Ayraç B2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
4. Ayraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B1 ve B2.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1.5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mg/mL bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlandı.

Proteinlerin kantitatif değerlerinin belirlenmesi için bir seri standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu amaç için bovin serum albümini kullanılmıştır. Hazırlanan standartlar 100, 200, 400, 600, 800 µg/mL olacak şekilde planlanmıştır. Daha sonra uygun seyreltmeler yapılarak son derişimlerin 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL olması sağlandı. Hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0.3 mL alınarak örnek tüplerine konuldu ve bunun üzerine 3 mL ayraç C eklenerek çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilen tüplerin üzerine 0.3 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi konularak iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk daha

bekletildi. Oluşan mavi renkli kompleks, 750 nm dalga boyunda su körüne karşı okundu. Total protein düzeyini belirlemek için stok serum bovin albumin çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak elde edilen standart derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri aracılığıyla çizilen regresyon eğrisinden elde edilen (Şekil 3.3) lineer regresyon eşitliği y =0,049x olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. Protein derişimi **(s**ığır albümini) ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması şu şekilde yapıldı;

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0{,}007 \times 4{,}5\ (\text{mL})}{1000 \times 0{,}03\ (\text{mL}) \times 0{,}5\ (\text{sa.}) \times \text{mg prot./mL}}$$

ATPaz aktivitesi µmol Pi/mg prot./sa. olarak belirtildi.

3.2.3. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS 20 paket programı kullanılarak yapıldı. Analizlerde "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" testleri kullanıldı. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde ($P<0.05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlendi. Şekiller Microsoft Excel programı kullanılarak çizildi.

Çizelge 3.1. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların deneyin başlangıcı ve sonunda ölçülen ağırlık ortalamaları ve ilgili standart hataları.

Nanopartiküller ve Dozlar (mg/kg/gün)	İlk Ağırlık (gram)	Son Ağırlık (gram)
Kontrol	211±20.4	218±22.7
Al_2O_3 0.5	218±11.3	209±13.3
Al_2O_3 5	222±14.5	211±31.9
Al_2O_3 50	208±17.9	198±15.2
CuO 0.5	203±9.74	206±10.8
CuO 5	198±7.07	198±10.2
CuO 50	204±13.6	195±15.9
TiO_2 0.5	213±12.0	213±11.5
TiO_2 5	198±10.1	197±11.6
TiO_2 50	212±18.4	219±22.9

***** Gruplar arasında anlamlı bir fark ($P>0.05$) görülmemiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

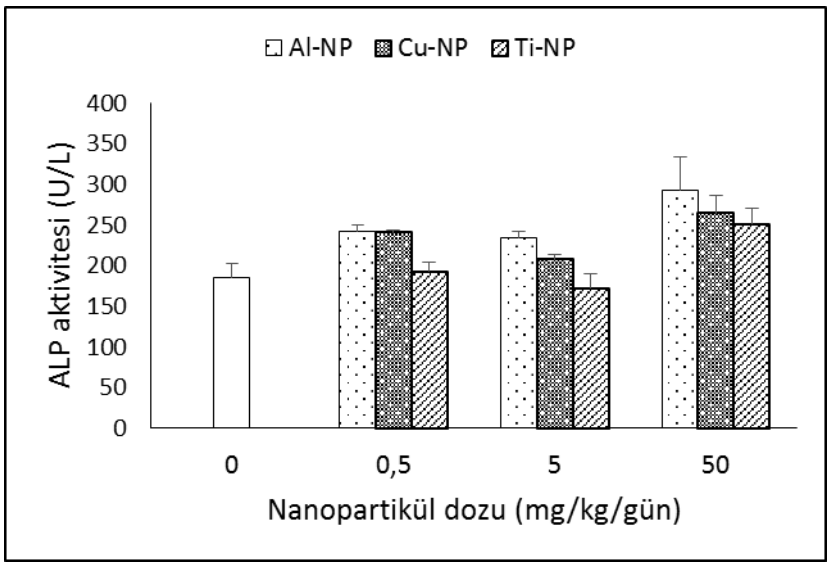
Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 14 gün oral olarak nanopartikül verilen veya sadece su verilen (kontrol) dişi sıçanlarda anlamlı bir ölüm (mortalite) durumu gözlenmemiştir. Deneylerde kullanılan toplam 60 hayvandan sadece 3 tanesi (% 5) en düşük nanopartikül uygulanan gruplarda ölmüştür. Bu ölümlerin nanopartikül etkisiyle değil, doğal nedenlerden olduğunu düşünülerek, uygulanan dozların 14 süre içerisinde dişi sıçanlar için letal toksisitesinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Çizelge 3.1. de sıçanların deneylerin başladığı gün ve 14. gündeki ortalama ağırlıklarını ve standart sapmaları görülmektedir. Buna göre gruplar arasında, hem deney başlangıcında hem de deney bitiminde hayvan ağırlıkları arasında anlamlı ($P>0.05$) farklar görülmemiştir.

Bu çalışmada, 14 gün süre ile oral olarak Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanların serumunda ve eritrositlerinde incelenen parametreleri özgün gruplara ayrılarak ayrı ayrı açıklanmıştır. Ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanan veriler grafik olarak gösterilmiştir. Bu grafiklerde ayrıca istatistiksel analizlerin sonuçları da gösterilmiştir.

4.1.1. Karaciğer Enzim (ALP, ALT, AST) Aktiviteleri

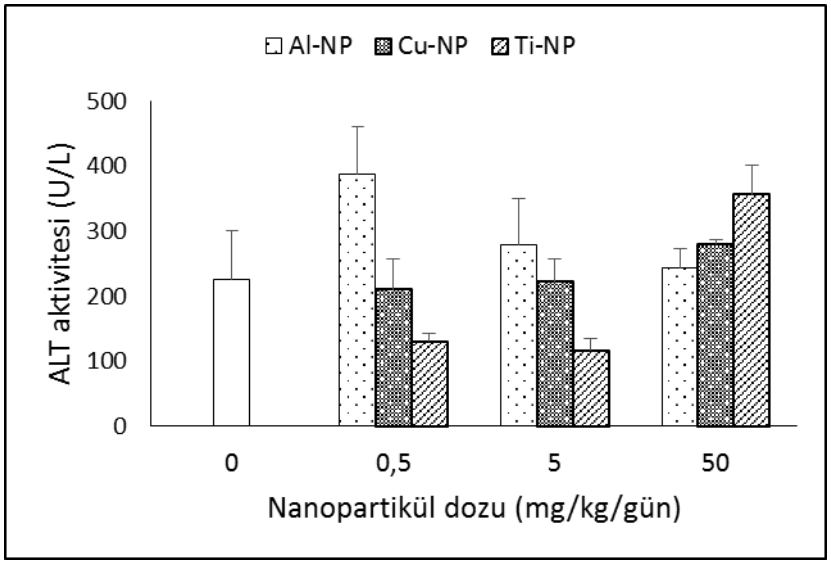
Şekil 4.1 de, 14 gün süre ile ağızdan nanopartikül verilen dişi sıçanların serumlarında ALP aktivitesindeki değişimler görülmektedir (ortalama ± standart hata). Kontrol sıçanlarda ortalama ALP aktivitesi 185±17 U/L olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda bu değerlerde artış görülmekle beraber, kontrol değeri ile istatistiksel olarak anlamlı artışlar ($P<0.05$) en yüksek dozda (50 mg/kg/gün) nanopartikül alan sıçanlarda görülmüştür. Buna göre, Al, Cu ve Ti nanopartikülleri verilen sıçanlarda ALP aktivitesi sırasıyla 293±24, 265±23, 251±12 U/L olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.2 de, aynı sıçanların serumlarında ALT aktivitesindeki değişimler görülmektedir. Kontrol sıçanlarda ortalama ALT aktivitesi 193±44 U/L olarak ölçülmüştür. Buna göre, ALT aktivitesindeki anlamlı değişimler sadece en yüksek dozda Ti nanopartikülü alan sıçanlarda anlamlı artışlar ($P<0.05$) olurken, ortalama değer 357±72 olarak ölçülmüştür. Diğer gruplarda hiçbir derişimde anlamlı farklar gözlenmemiştir. ($P>0.05$).

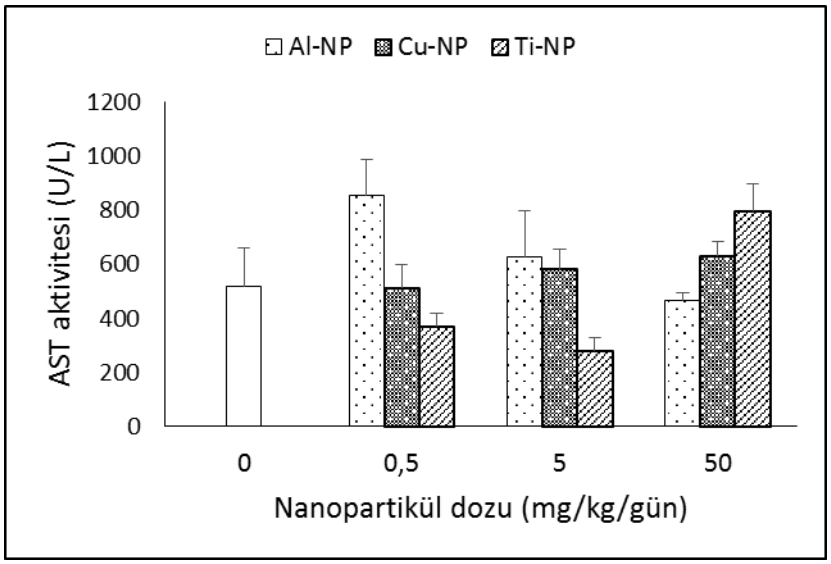


Şekil 4.1. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında ALP aktiviteleri. Al-NP = Al_2O_3, Cu-NP = CuO, Ti-NP = TiO_2. Çizelge 4.1 de serum parametrelerinde yapılan istatistiksel karşılaştırmaların sonuçları ve % değişimler verilmiştir. * = $P<0.05$.

Serum AST aktivitesindeki değişimler ALT değerlerine benzerlik göstermiştir (Şekil 4.3). Buna göre, kontrol sıçanlarda ortalama AST aktivitesi 516±143 U/L olarak ölçülmüştür. Kontrol değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) tek fark Ti nanopartikülü alan sıçanlarda görülmüştür. En yüksek dozda Ti nanopartikülü alan sıçanların AST aktivitesi 796±103 U/L olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.2. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında ALT aktiviteleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.3. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında AST aktiviteleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.

4.1.2. Diğer Biyokimyasal Belirteçler

Şekil 4.4 de, 14 gün süre ile ağızdan nanopartikül verilen dişi sıçanların serumlarında glikoz düzeylerindeki değişimler görülmektedir (ortalama ± standart hata). Kontrol sıçanlarda ortalama glikoz düzeyi 184±24 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda glikoz değerlerinde bir

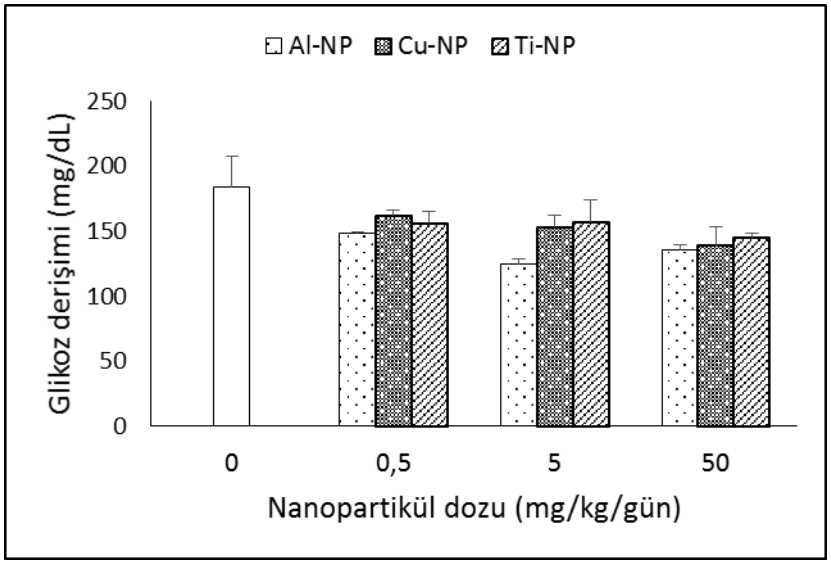
azalma olmasına karşın, kontrol değeri ile istatistiksel olarak anlamlı azalış ($P<0.05$) sadece 5 mg/kg/gün dozda Al nanopartikülü alan sıçanlarda (124±3.3) görülmüştür.

Serum üre değerleri ile ilgili veriler Şekil 4.5 te görülmektedir. Kontrol sıçanlarda ortalama üre düzeyi 19.0±1.10 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda üre değerlerinde anlamlı değişim ($P<0.05$) olmamıştır.

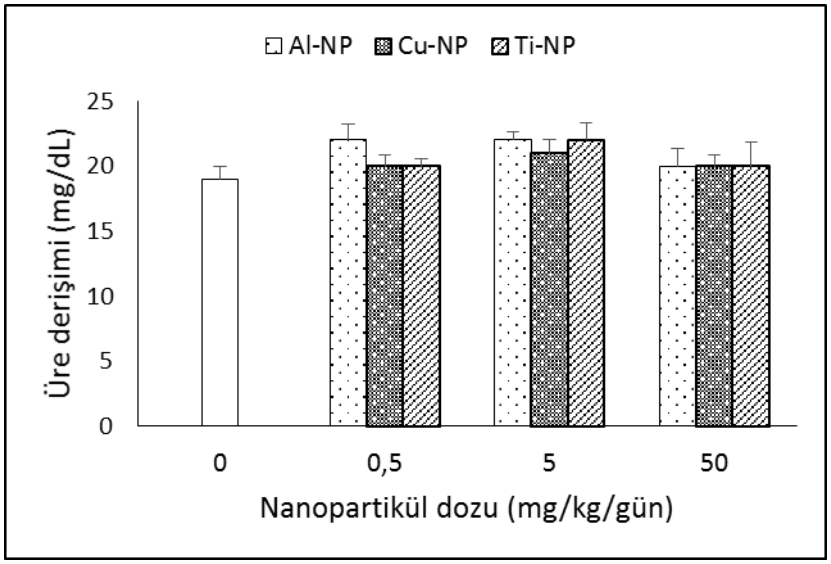
Benzer şekilde kreatinin düzeylerinde de nanopartikül etkisiyle herhangi bir anlamlı değişim ($P>0.05$) görülmemiştir (Şekil 4.6). Kontrol sıçanlarda ortalama kreatinin düzeyi 0.29±0.05 mg/dL olarak ölçülmüştür.

Toplam protein düzeyleri ile ilgili veriler Şekil 4.7 de verilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama toplam protein düzeyi 6.73±0.64 g/dL olarak ölçülmüştür. Nanopartikül etkisinde kalan sıçanlarda protein değerlerinde anlamlı bir değişim ($P>0.05$) görülmemiştir.

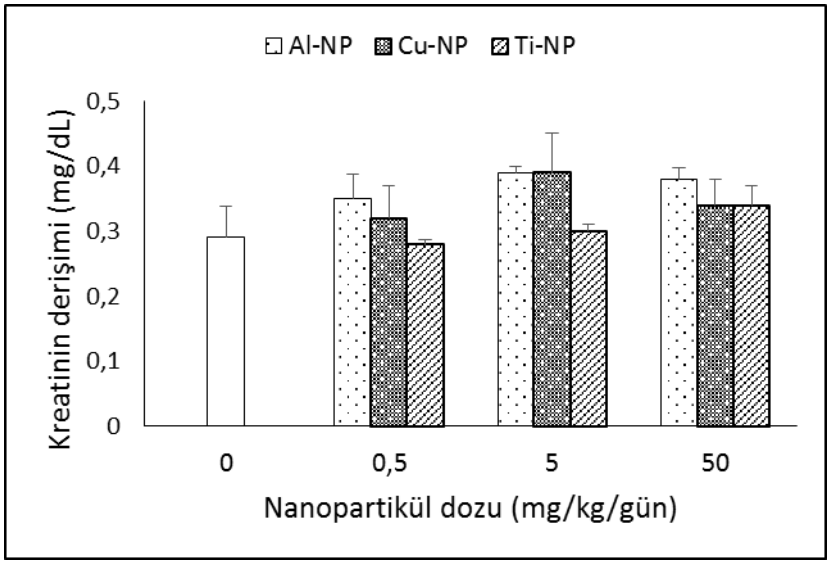
Şekil 4.8 de, serum toplam biluribin düzeylerinde görülen değişimler verilmiştir. Buna göre kontrol sıçanların serumlarında ortalama biluribin düzeyi 0.16±0.06 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda toplam biluribin değerlerinde bir artış olmasına karşın, kontrol değeri ile istatistiksel olarak anlamlı artışlar ($P<0.05$) sadece bütün nanopartiküllerin en yüksek dozlarda görülmüştür. Bu değerler Al, Cu ve Ti nanopartikülleri için sırasıyla 0.41±0.02, 0.34±0.06 ve 0.29±0.07 mg/dL olarak ölçülmüştür. Diğer gruplardan sadece 0.5 mg/kg Cu nanopartikülü alan sıçanlarda (0.37±0.01 mg/dL) anlamlı bir artış ($P<0.05$) görülmüştür. Bütün nanopartiküllerin 5 mg/kg dozlarında da biluribin düzeylerinde artışlar olmasına karşın, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) olmamıştır.



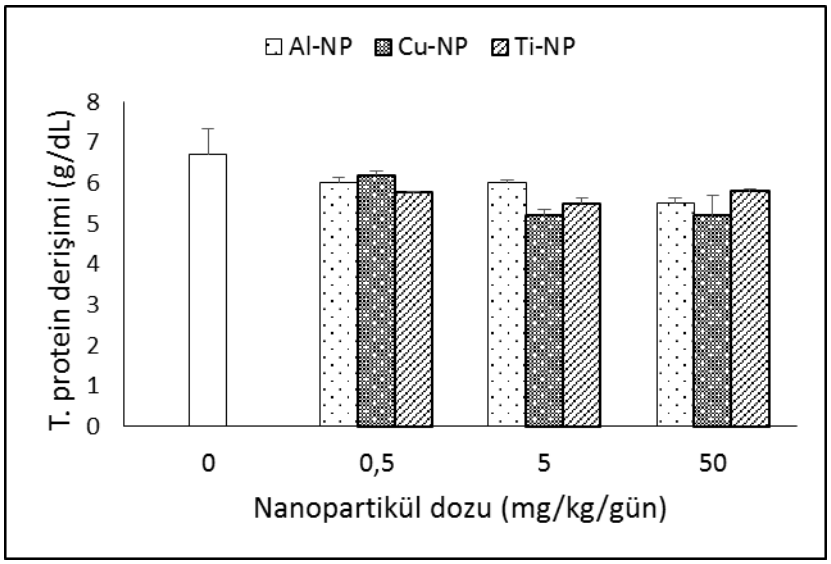
Şekil 4.4. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında glikoz düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



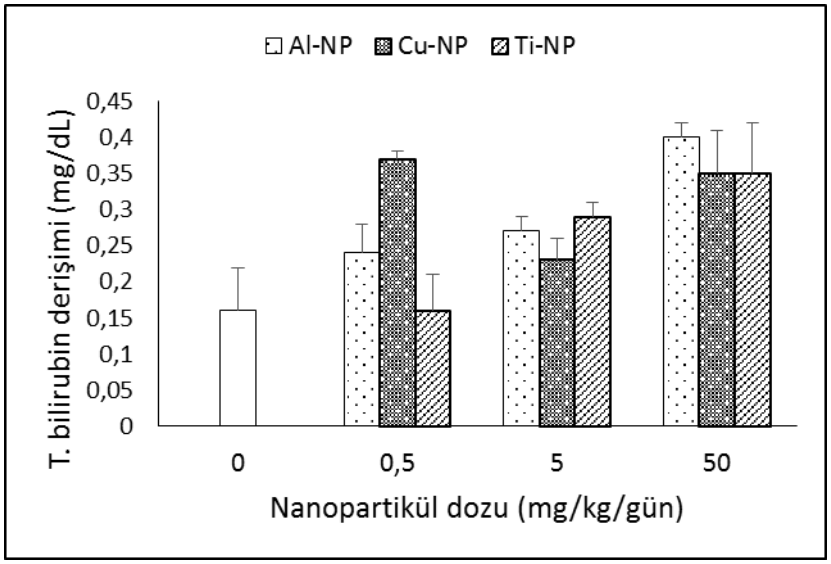
Şekil 4.5. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında üre düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



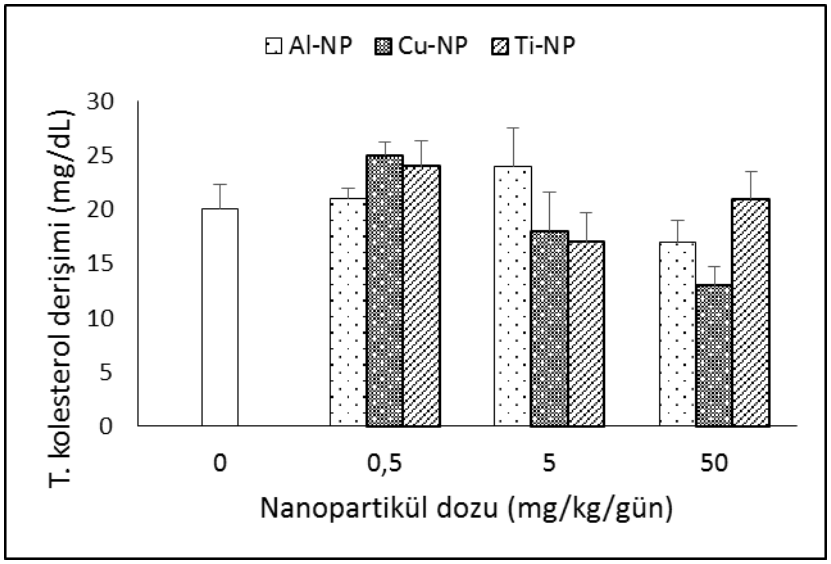
Şekil 4.6. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında kreatinin düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



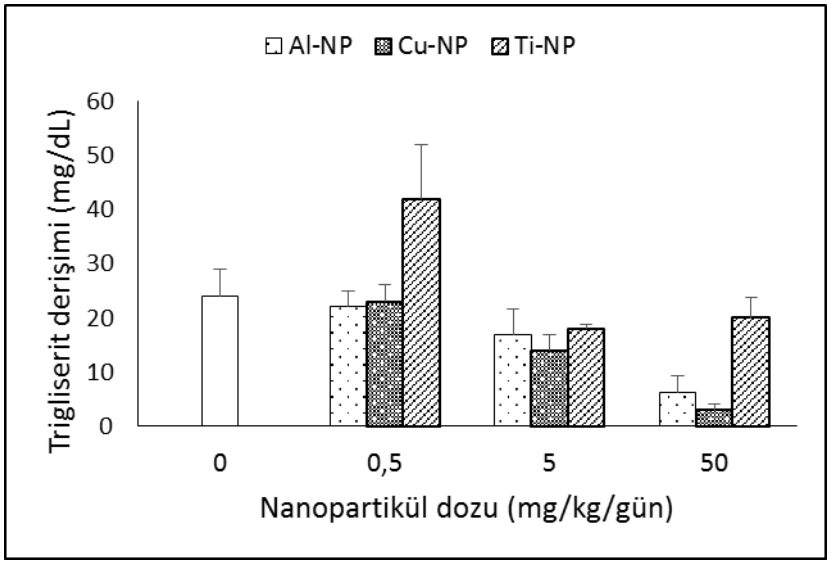
Şekil 4.7. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplan protein düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.8. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplam bilirubin düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.9. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında toplam kolesterol düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi



Şekil 4.10. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında trigliserit düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.

Toplam kolesterol düzeyleri ile ilgili veriler Şekil 4.9 da verilmiştir. Kontrol sıçanların serumunda ortalama toplam kolesterol düzeyi 20.0±2.31 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda toplam kolesterol hem artış hem de azalış görülmesine karşın, kontrol değeri ile istatistiksel olarak anlamlı değişim ($P<0.05$) sadece 5 mg/kg/gün doza Cu nanopartikülü alan sıçanlarda bir azalma (13.0±1.00 mg/dL) şeklinde olmuştur.

Şekil 4.10 serum trigliserit düzeylerini göstermektedir. Kontrol sıçanlarda ortalama trigliserit düzeyi 24.0±4.93 olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda trigliserit değerlerinde bir azalma görülmesine karşın (0.5 mg/kg dozlar hariç), kontrol değeri ile istatistiksel olarak anlamlı azalmalar ($P<0.05$) sadede 50 mg/kg dozda Al ve Cu nanopartiküllerinin etkilerinde kalan sıçanlarda görülmüştür. Buna göre ortalama trigliserit düzeyleri sırasıyla 6.33±0.02 ve 3.00±1.01 mg/dL olarak ölçülmüştür.

4.1.3. Hormon Düzeyleri

Şekil 4.11-4.15'te 14 gün süre ile oral yoldan nanopartikül verilen dişi sıçanların serumlarında farklı hormonların değişimleri (ortalama ± standart hata) görülmektedir. Dişi sıçanlarda ortalama serbest T3 düzeyleri Şekil 4.11 de

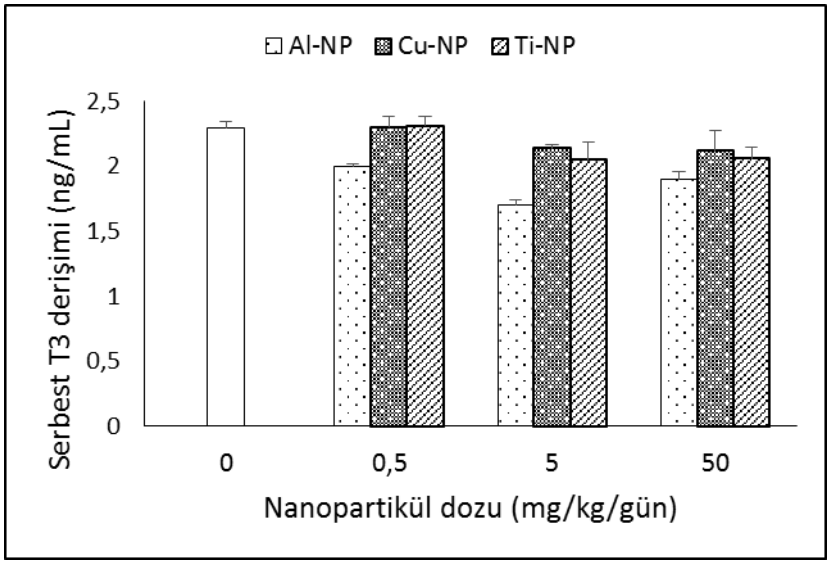
verilmiştir. Buna göre kontrol hayvanlarda ortalama serbest T3 düzeyi 2.29±0.055 ng/mL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda serbest T3 düzeyleri anlamlı (P>0.05) bir değişim gözlenmezken, sadece 5 mg/kg dozunda Al nanopartikülü alanlarda düzeyi (2.14±0.034 ng/mL) azalmıştır (P<0.05).

Şekil 4.12'de, serbest T4 düzeylerinin farklı gruplardaki değerleri verilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama T4 düzeyi 0.73±0.022 µg/dLolarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda serbest T4 düzeylerinde anlamlı (P>0.05) bir değişim görülmemiştir.

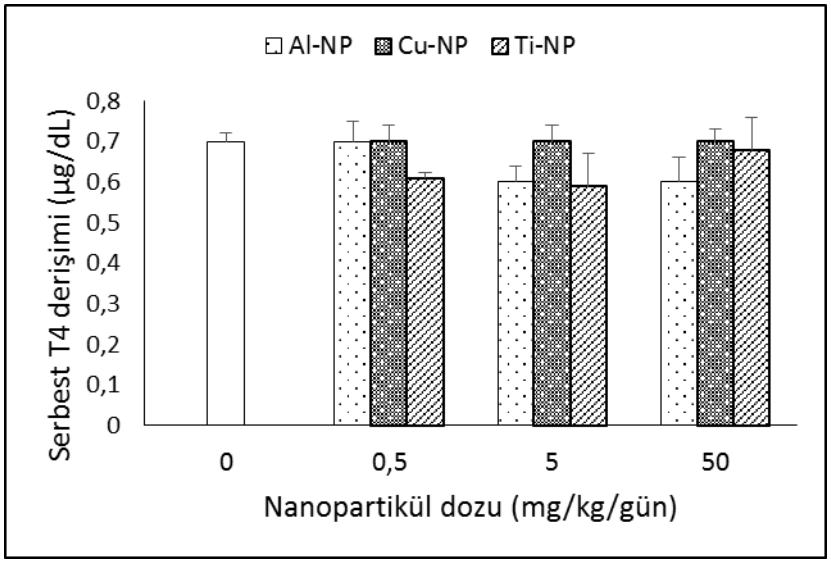
Şekil 4.13'de, kortizol düzeylerinin farklı gruplar arasındaki değerleri verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama kortizol düzeyi 0.55±0.08 µg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda kortizol düzeylerinde anlamlı (P>0.05) bir değişim görülmemiştir.

Şekil 4.14'te, estradiol düzeylerinin farklı gruplar arasındaki düzeyleri verilmiştir. Buna göre kontrol hayvanlarda ortalama estradiol düzeyi 25.3±5.15 pg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda estradiol düzeylerinde çoğunlukla anlamlı (P>0.05) bir değişim görülmemiştir. Sadece 50 mg/kg dozda Al nanopartikülü etkisinde kalan sıçanların estradiol düzeylerinde (4.33±1.45 pg/dL) anlamlı (P<0.05) bir azalma görülmüştür.

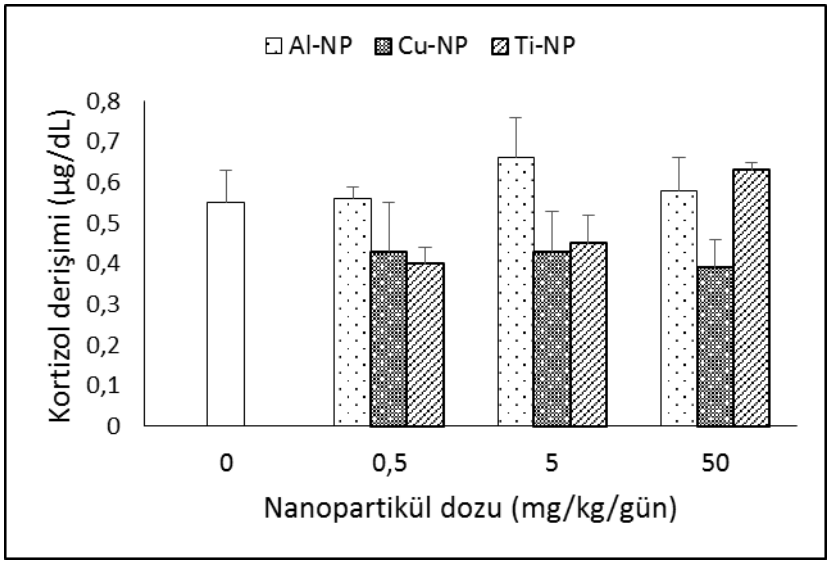
Şekil 4.15, prolaktin düzeylerinin kontrol ve nanopartikül ile muamele edilmiş gruplar arasındaki düzeyleri verilmiştir. Buna göre, kontrol grubunda ortalama prolaktin düzeyi 0.073±0.018 ng/mL olarak ölçülmüştür. Al ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda prolaktin düzeylerinde anlamlı (P>0.05) bir değişim görülmemiştir. Buna karşın Cu nanopartikülü etkisinde kalan sıçanlarda 5 ve 50 mg/kg dozlarda prolaktin düzeyinde anlamlı (P<0.05) artışlar görülmüştür. Bu gruplarda prolaktin düzeyleri sırasıyla 0.27±0.015 ve 0.31±0.094 ng/mL olarak ölçülmüştür.



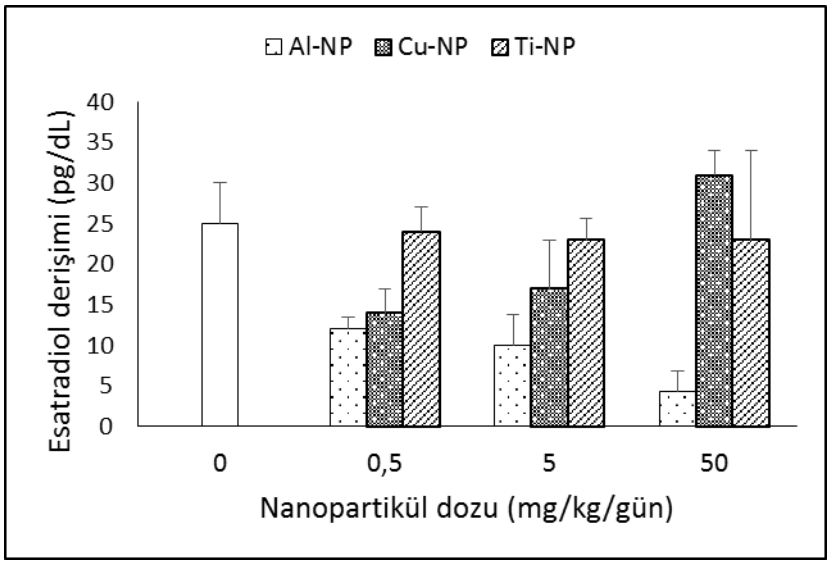
Şekil 4.11. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında serbest T3 düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



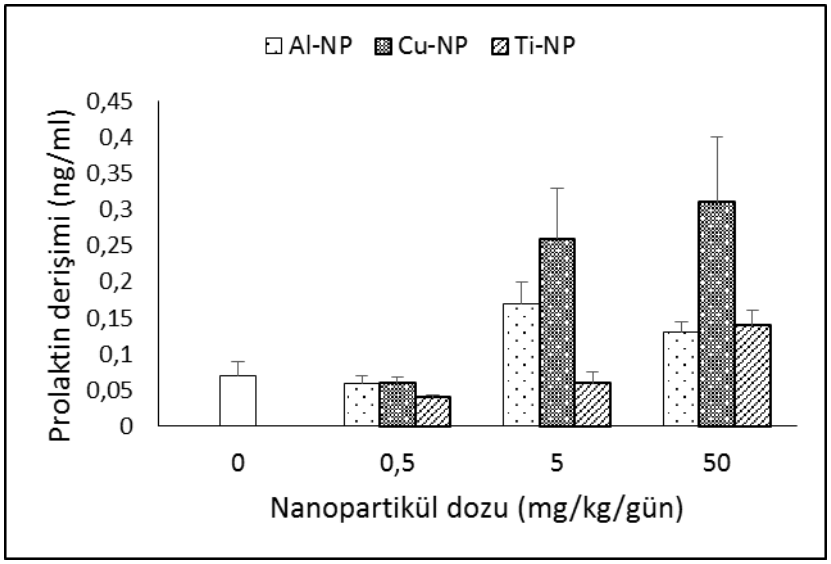
Şekil 4.12. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında serbest T4 düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.13. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında kortizol düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.14. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında eatradiol düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



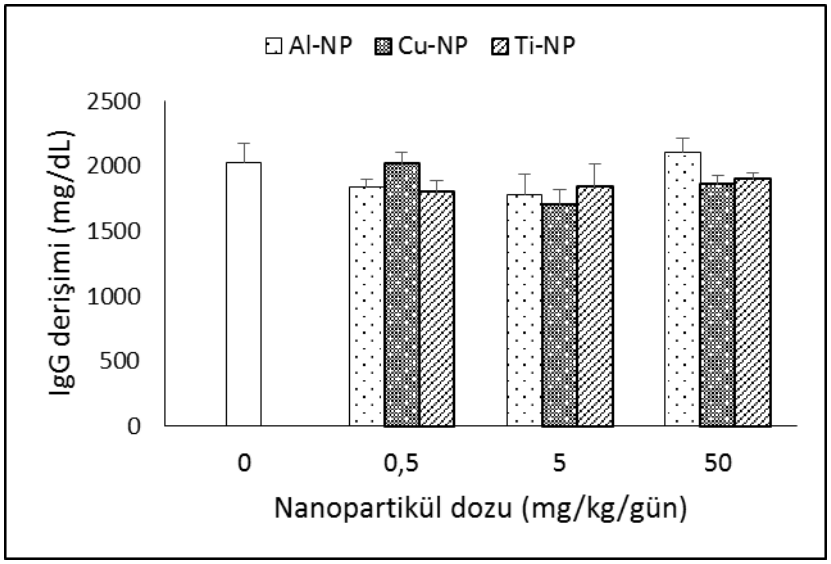
Şekil 4.15. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında prolaktin düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.

4.1.4. İmmünoglobulin (IgG, IgM, IgE) Düzeyleri

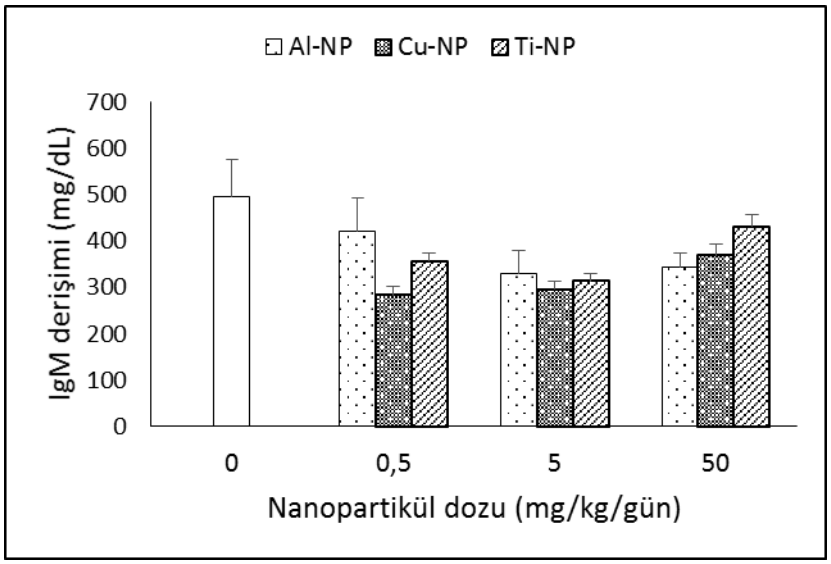
Şekil 4.16'da, serumda IgG düzeylerinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama IgG düzeyi 2030±149 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda IgG düzeylerinde anlamlı ($P>0.05$) bir değişim görülmemiştir.

Şekil 4.17'de serumda IgM düzeylerinin farklı gruplar arasındaki değerleri görülmektedir. IgM düzeyleri kontrol grubunda ortalama 496±81 mg/dL olarak ölçülmüştür. Al ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda IgM düzeylerinde anlamlı ($P>0.05$) bir değişim görülmemiştir. Buna karşın Cu nanopartikülü etkisinde kalan sıçanlarda 0.5 ve 5 mg/kg dozlarda IGM düzeyinde anlamlı ($P<0.05$) azalmalar görülmüştür. Bu gruplarda IgM düzeyleri sırasıyla 284±16.6 ve 368±24.7 mg/dL olarak ölçülmüştür.

Total IgE düzeyleri için herhangi bir şekil çizilememiştir. Bunun nedeni, 14 gün süre ile farklı dozlarda nanopartikül alan dişi sıçanların ve kontrol sıçanların hiç birinde ölçülebilir düzeyde IgE'nin olmamasıdır. Bütün değerler cihazın ölçüm limiti olan 17 IU/ml değerinden aşağıda ölçülmüştür.



Şekil 4.16. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında IgG düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



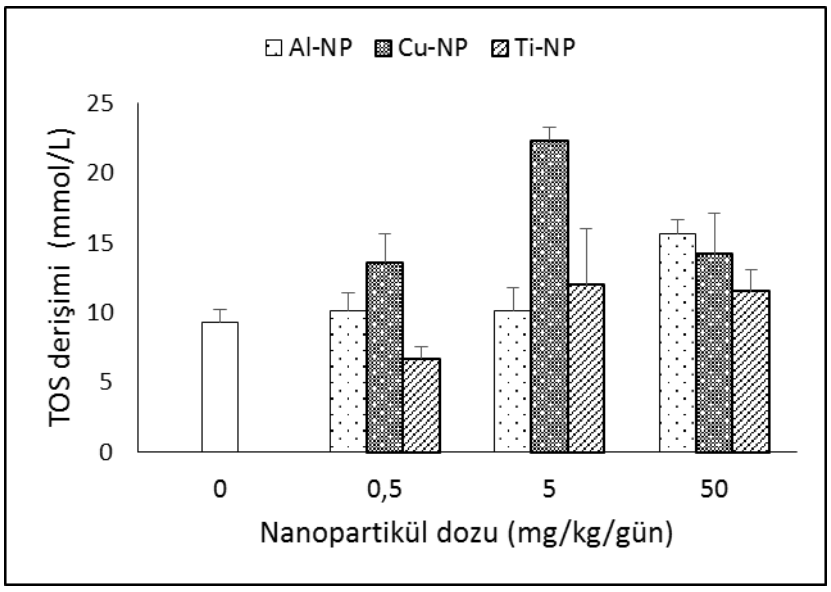
Şekil 4.17. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında IgM düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.

4.1.5. Toplam Oksidan ve Toplam Antioksidan Düzeyleri

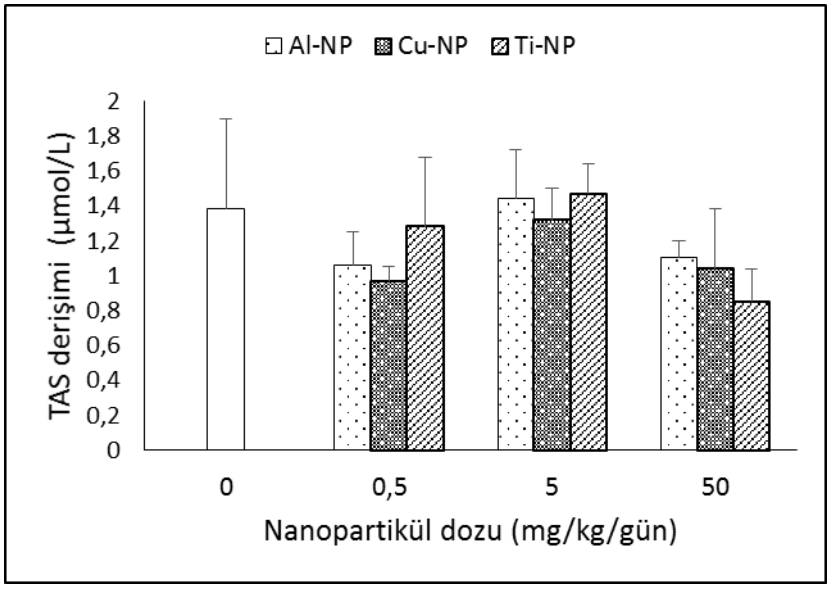
Şekil 4.18'de, serumda toplam oksidan (TOS) düzeylerinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama TOS düzeyi 9.29 mmol/L olarak ölçülmüştür. Ti nanopartikülleri

etkisinde kalan sıçanlar hariç, Al ve Cu nanopartikülü etkisinde kalanlarda TOS düzeylerinde anlamlı ($P<0.05$) artışlar görülmüştür.

Şekil 4.19'da, serumda toplam antioksidan (TAS) düzeylerinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama TAS düzeyi 9.29 µmol/L olarak ölçülmüştür. Serum TAS düzeyleri Al, CU ve Ti nanopartikülleri verilen hiçbir grupta anlamlı bir şekilde değişmemiştir ($P>0.05$).



Şekil 4.18. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında TOS düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.



Şekil 4.19. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların serumlarında TAS düzeyleri. Detaylar Şekil 4.1 de verildi.

4.1.6. Eritrosit ATPaz Aktiviteleri

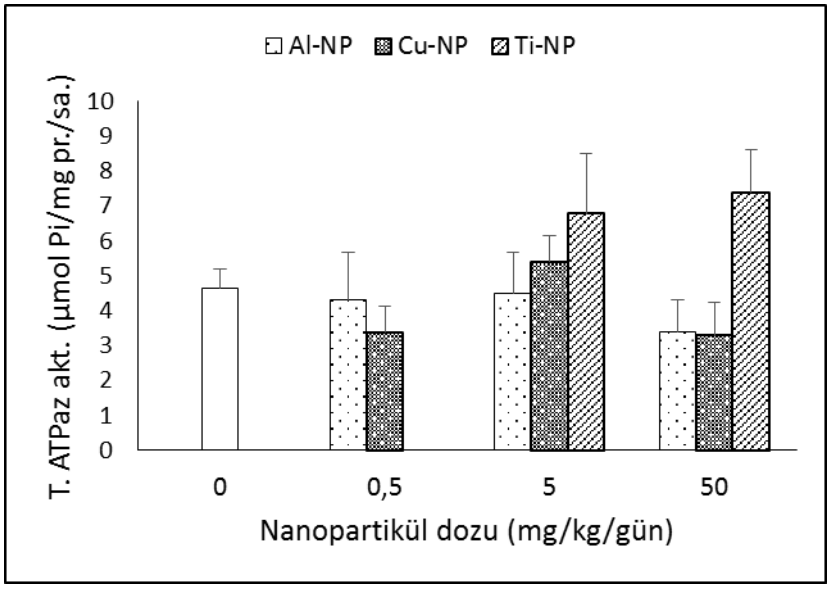
Şekil 4.20'de, eritrositlerde toplam ATPaz aktivitesinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama toplam ATPaz aktivitesi 4.66 µmol/mg protein/saat olarak ölçülmüştür. Al, Cu ve Ti nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanlarda toplam ATPaz aktivitesinde bir miktar artış olsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) olmamıştır.

Şekil 4.21'de eritrositlerde Mg-ATPaz aktivitesinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama Mg-ATPaz aktivitesi 3.10 µmol/mg protein/saat olarak ölçülmüştür. Sadece Ti nanopartikülü alan sıçanlarda Mg-ATPaz aktivitesinde önemli düzeylerde ($P<0.05$) artışlar olmuştur. Diğer nanopartiküllerin etkisinde kalan hayvanlarda Mg-ATPaz aktivitesinde bir miktar artış olsa da bu artışlar önemli ($P>0.05$) olmamıştır.

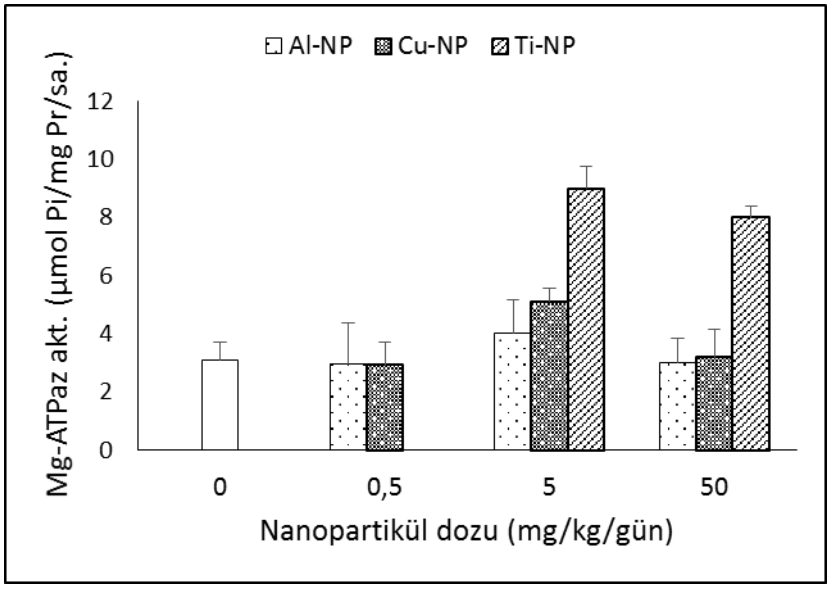
Şekil 4.22'de eritrositlerde Na,K-ATPaz aktivitesinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda ortalama Na,K-ATPaz aktivitesi 1.56 µmol/mg protein/saat olarak ölçülmüştür. Bütün

nanopartiküller eritrositlerdeki Na,K-ATPaz aktivitesini önemli düzeylerde ($P<0.05$) azaltmışlardır.

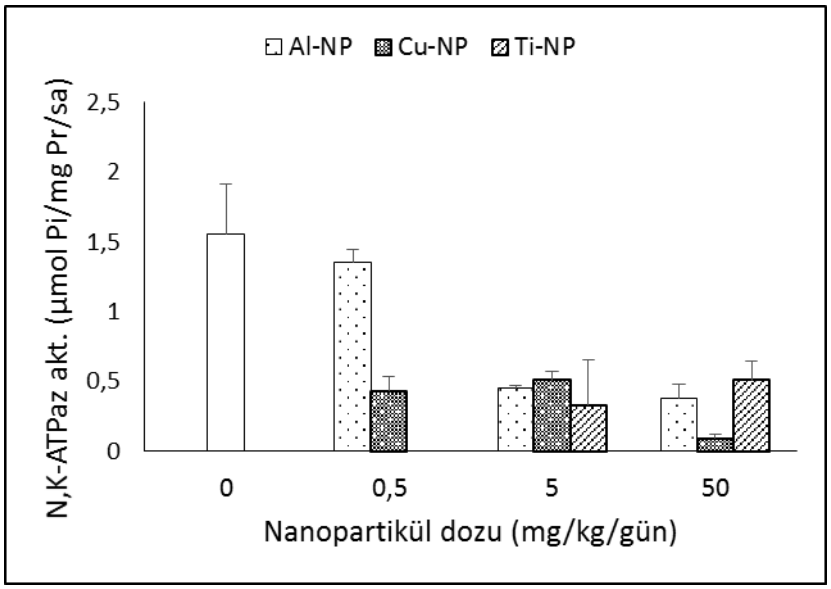
Şekil 4.23'de eritrositlerde Ca-ATPaz aktivitesinin kontrol ve nanopartikül alan sıçanlardaki değişimleri gösterilmiştir. Buna göre kontrol sıçanlarda Ca-ATPaz aktivitesi 1.26 µmol/mg protein/saat olarak ölçülmüştür. Ti nanopartikülü (mg dozda) eritrositlerdeki Ca-ATPaz aktivitesi önemli düzeylerde ($P<0.05$) artırmıştır. Ca-ATPaz aktivitesinde alüminyum ve bakır nanopartikülleri etkisiyle ciddi azalmalar görülse de, bu azalmalar istatiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) olmamıştır.



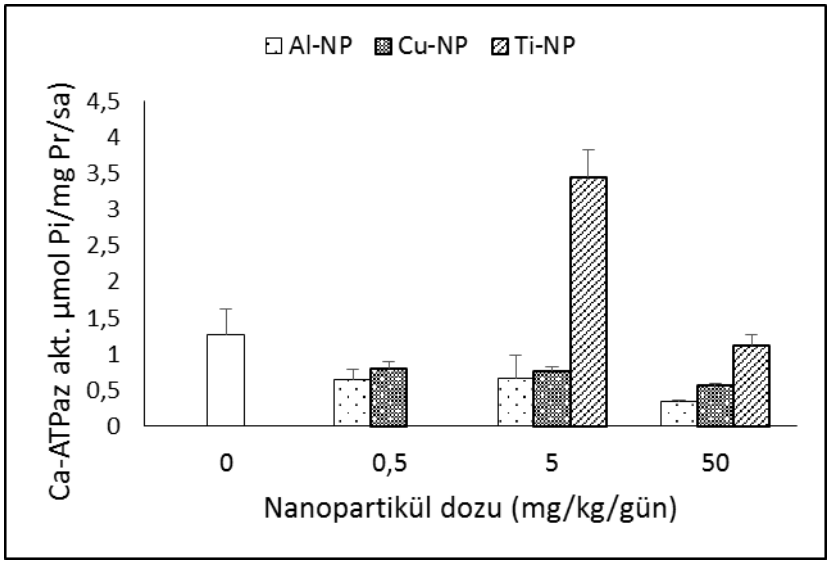
Şekil 4.20. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam ATPaz aktiviteleri. Al-NP = Al_2O_3, Cu-NP = CuO, Ti-NP = TiO_2. Çizelge 4.2 de eritrosit ATPaz aktiviteleri üzerinde yapılan istatistiksel karşılaştırmaların sonuçları ve % değişimler verilmiştir. * = $P<0.05$.



Şekil 4.21. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam Mg-ATPaz aktiviteleri. Detaylar Şekil 20 de verildi.



Şekil 4.22. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde toplam Na,K-ATPaz aktiviteleri. Detaylar Şekil 20 de verildi.



Şekil 4.23. Oral olarak 14 gün alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri alan sıçanların eritrositlerinde Ca-ATPaz aktiviteleri. Detaylar Şekil 20 de verildi.

Çizelge 4.1. Serum parametrelerinde gözlemlenen ve istatistiksel olarak anlamlı olan değişimlerin % oranları. % hesaplamalarda kontrol değerleri ile olan farklar hesaplanmıştır. Yukarı oklar anlamlı ($P<0.05$) artışları, aşağı oklar ise anlamlı ($P<0.05$) azalışları göstermektedir.

PARAMETRELER	Al nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)			Cu nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)			Ti nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)		
	0,5	**5**	**50**	**0,5**	**5**	**50**	**0,5**	**5**	**50**
ALP			↑58			↑43			↑35
ALT									↑84
AST									↑54
Glikoz		↓32							
Üre									
Kreatinin									
T. Protein									
T. Biluribin			↑156	↑131		↑112			↑81
T. Kolesterol						↓35			
Trigliserit			↓74			↓88			
Serbest T3		↓24							
Serbest T4									
Kortizol									
Estradiol			↓84						
Prolaktin					↑270	↑325			
IgG									
IgM				↓43		↓26			
IgE									
T. Oksidan			↑167		↑240				
T. Antioksidan									

Çizelge 4.2. Eritrosit ATPaz aktivitelerinde gözlemlenen ve istatiksel olarak anlamlı olan değişimlerin % oranları. % hesaplamalarda kontrol değerleri ile olan farklar hesaplanmıştır. Yukarı oklar anlamlı ($P<0.05$) artışları, aşağı oklar ise azalışları göstermektedir.

PARAMETRELER	Al nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)			Cu nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)			Ti nanopartikülü dozlar (mg/kg/gün)		
	0,5	**5**	**50**	**0,5**	**5**	**50**	**0,5**	**5**	**50**
T. ATPaz									
Mg-ATPaz								↑290	↑264
Na,K-ATPaz		↓71	↓76	↓63	↓67	↓94		↓80	↓68
Ca-ATPaz								↑274	

4.2. Tartışma

Bu çalışmada yetişkin dişi sıçanlara 14 gün süre ile ağızdan farklı dozlarda alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri verilmesini takiben, hayvanların genel sağlığında, iştahında veya ağırlıklarında önemli değişimler görülmemesi, uygulanan dozların sıçanlar için toksik olmadığını göstermektedir. Nitekim 14 günlük süre sonunda toplamda sadece 3 sıçan (% 5) ölmüştür. Bu ölümlerin en düşük nanopartikül dozlarında olması, hayvanların doğal nedenlerden öldüğü fikrini güçlendirmektedir. Literatür çalışmaları, nanopartiküllerin sıçanlara uygulanmasını takiben kayda değer bir mortalitenin olamadığını göstermiştir (Tang ve ark., 2011; Lee ve ark., 2014; Ze ve ark., 2014; Geraets ve ark., 2014). Halbuki, nanopartiküllere bağlı olan metallerin memelilere çözünmüş halde verilmesi sonucu çok daha ciddi mortalite durumları rapor edilmiştir (Goyer, 1991). Bunun yanında, nanopartikül uygulanan memelilerde farklı metabolik sistemlere özgün çok çeşitli sistemlerde toksik etkiler gözlenmiştir. Mohammadipour ve ark. (2014), Wistar sıçanlara gebeliğin 2-21. günlerinde hergün 100 mg/kg dozunda titanyum dioksit nanopartikülü oral gavaj yoluyla vererek ortaya çıkabilecek etkileri gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar, çalışmanın esas amacının gebelik sırasında yavrunun hafızası ve öğrenmesi ve hippocampal hücredeki etkilerini belirlemek olduğunu belirtmişlerdir. Hem Morris su labirent testi, hem de pasif kaçınma testi titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalan yavru sıçanlarda önemli derecede hafıza ve öğrenmede azalma olduğunu göstermiştir. Araştırılar, bu çalışmanın sonuçlarının yetişkin ve yavruların beyninde titanyum dioksit nanopartiküllerinin nörotoksik etkilerinin neler olabileceğine ilişkin yorumlar yapmamıza ve nanopartikül kullanımı konusunda daha dikkatli olunması gerektiği yorumlarını yapmışlardır. Geraets ve ark. (2014), nanopartiküllerin toksik etkilerinin kendi kimyasal ve fiziksel özellikleriyle beraber, uygulanan doz, alınım yolu ve etkilenen organ ve sistemlere göre oldukça farklılık gösterdiğini belirtmiştir. Memeli hayvanlarla yapılan çalışmaların çoğu fare ve sıçan metabolizması üzerine metal-NP'lerin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan geldiğini ve bununla birlikte insan hücreleri üzerine NP'lerin in vitro toksik etkilerinin de yaygın bir şekilde

araştırılan konular arasında olduğunu belirtmişlerdir. Dört farklı çinko nanopartiküllerinin sıçan beyni ve kanında bulunan proteinlere bağlanma potansiyellerinde partikül boyutun önemi olmadığı görülmüştür (Shim ve ark., 2014). Araştırıcılar, çinko nanopartiküllerinin korona denen özel proteinlerle etkileşimi sonucu birçok biyolojik faaliyetin olumsuz etkilenebileceği hususunda yorum yapmışlardır. Diğer bir çalışmada, Cardoso ve ark. (2014) yetişkin Wistar sıçanlarda altın nanopartiküllerinin akut (24 saat) ve kronik (28 gün) dozlarının etkilerini araştırmışlardır. Araştırıcılar, hayvanlarda DNA hasarlarında anlamlı artışlar olduğunu ve bu hasarların altın nanopartiküllerinin uygulama ve dozuna bağlı olmadığını, oluşan bu DNA hasarlarının oksidatif stresle ilişkili olabileceği hakkında yorumlar yapmışlardır. Vinardell ve ark. (2015), farklı boyut ve şekillerdeki alüminyum nanopartiküllerinin insan, sıçan ve tavşanların kanında hemolitik (% 50 hemoliz) davranışlarını incelemişlerdir. Sonuçlar, en fazla hemolitik davranış gösteren alüminyum nanopartikülünün 13 nm boyutlu tozlar olduğunu ve bunu 50 nm boyutlu olanların izlediğini belirtmişlerdir.

Kronik süreçlerde metal nanopartikülleri memeli hayvanlarda akut süreçlere göre farklı toksik etkileri olabileceği vurgulanmıştır. Yu ve ark. (2014), farelere nazal yoldan 9 ay boyunca 1.25, 2.5 ve 5 mg/kg dozlarda TiO_2 nanopartikülü vermişlerdir. Sonuçlar titanyum dioksit nanopartiküllerine kronik olarak maruz kalmanın ateroskleroz ile akciğer iltihaplanması ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, titanyum nanopartikülünün etkisinde kalan farelerin serum parametrelerinde önemli düzeylerde artışlar gözlemlenmiştir. Araştırıcılar nanopartiküllerinin ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu hipotezini de güçlü olduğu konusunda yorumlar yapmışlardır. Park ve ark. (2015), 1.5, 3 ve 6 mg/kg dozlarda 13 hafta boyunda ağızdan verilen alüminyum nanopartikülünün su ve yem tüketimini ve bunun sonucu olarak kilo değişimi, kan hücre sayısı ve patolojik hasarları incelemişlerdir. Sonuçlar, alüminyum nanopartikülü verilen gruplarda akyuvar sayında artış, bununla ilişkili olarak, eozinofil hacminde azalma ve lenfosit hacminde artış gözlemlemişlerdir. Akut süreçlerde etkinin daha az olmasını MacNicoll ve ark. (2015), ağızdan alınan nanopartiküllerinin bir kısmının dışkı ile dışarı atılmasına bağlamışlardır. Araştırıcılar yapmış oldukları çalışmada, nano boyutlu titanyum

oksitlerin etkilerinin sıçanlarda (in vivo olarak) ve bağırsak epitelinde (in vitro olarak) incelmişlerdir. In vivo deneylerde, sıçanlara ağızdan 5 mg/kg dozda verilen titanyumların 96 saat sonra herhangi bir organda birikiminin önemli düzeyler olmadığı görülmüştür. Dispersiyon yöntemleri de titanyum maddelerinin alınımını etkilememiştir. Ağızdan alınan TiO_2'in dışkı ile çıktığını da göstermişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, literatür verileri hem benzerlik hem de bazı farklılıklar göstermektedir. Öncelikli olarak, nanopartiküllerin memelilerde letal etkilerinin düşük olduğu, buna karşın toksik etkilerinin olabileceği konusunda çalışmalar uygunluk göstermektedir. Bu çalışmada, nanopartiküller arasında serum parametrelerinde en fazla değişime neden olma durumuna göre sıralama yapıldığında bunun; Cu>Al>Ti şeklinde olduğu görülmüştür.

Deney hayvanlarına (sıçan, fare) 50 mg/kg dozda verilen bir madde, bu hayvanlarının en az % 50'sini 48 saat içerisinde öldürüyorsa bu madde için kimyasal olarak "zehir" etiketi konmaktadır. Bu çalışmada en yüksek dozun 50 mg/kg olarak seçilmesindeki temel neden, kullanılan metal nanopartiküller için "zehir" tanımlaması yapılıp yapılmayacağının belirlenmek istenmesidir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri için zehir tanımlaması yapmak doğru olmayabilir. Ancak, zehir unvanını almaması, toksik olmadığı anlamına da gelmez. Nitekim yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, gerek serum değerlerinde, gerekse eritrosit verilerinde, kontrole göre önemli oranlarda değişimler görülmüştür. Aşağıda bunlar gruplar halinde ele alınarak tartışılmıştır.

4.2.1. Karaciğer Enzimleri

Karaciğer omurgalıların yaşamı için gerekli olan hayati bir organ olup, detoksifikasyon, protein sentezi, glikojen depolanması, eritrosit üretimi, hormon ve enzim üretimi vb. çok fazla görevleri vardır. Karaciğerin sağlık göstergeleri olan enzimler serumda bulunmaktadır. Bunlar ALP, ALT ve AST enzimleridir. ALP, pH'nın alkali olduğu ortamlarda transfosforilaz gibi çalışan ve hayvanlarda iskelet mineralizasyonunda ve membran transport aktivitelerinde önemli rol oynayan bir enzimdir (Lan ve ark.., 1995). ALP aktivitesindeki azalış membran transport

sisteminin zarar görmesinden kaynaklanabilirken, aktivitede görülen artış doku hasarından kaynaklanabilmektedir (Bernet ve ark., 2001). ALP aktivitesindeki değişiklikler metal etkisindeki fizyolojik ve fonksiyonel değişimlerin sonucu olarak gözlenebilmektedir (Jiraungkoorskul ve ark., 2003). ALT ve AST, protein ve aminoasit metabolizmasında görevli önemli iki enzimdir. AST ve ALT aktivitesindeki artışlar metal etkisinde kalan hayvanların karaciğer, böbrek ve kalp gibi dokularında meydana gelen hasar ve hayvan metabolizmasında oluşan bozulma sonucu ortaya çıkmaktadır (Zikic ve ark., 2001). Bu nedenle, başta karaciğer olmak üzere doku hasar ve fonksiyonunun tanısında kullanılan önemli göstergelerdendir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre en fazla etkilenen serum parametreleri arasında, karaciğer enzimleri olan ALP, ALT ve AST enzimleri gelmektedir. Özellikle, Ti nanopartikülü alan sıçanlarda bu enzimlerin düzeyleri önemli oranlarda artmıştır. ALP bütün nanopartikül etkilerinde önemli oranlarda artmıştır. Bu da nanopartikül verilen sıçanların karaciğerinde bazı hasarların meydana geldiğini veya karaciğerin strese girdiğinin bir göstergesi olabilir. Karaciğer nanopartiküller için hedef organ olup, zamana ve doza bağlı olarak nanopartikül birikimi artabilmektedir (Li ve ark., 2013). Araştırıcılar, yapmış oldukları çalışmada Wistar sıçanlarına deri altından 60 gün boyunca alüminyum nanopartikülü (50 mg/kg) vermişler ve karaciğer enzimlerinin tepkilerini ölçmüşlerdir. Sonuçlar, alüminyum nanopartikülü alan sıçanların karaciğerinde ALP ve AST düzeyinde bir artış olduğunu göstermiştir. Araştırıcılar, alüminyumun karaciğer için potensiyel bir toksik madde olabileceği hususunda yorum yapmışlardır. Zhang ve ark. (2011) farklı boyutlarda altın nanopartikülü (4000 μg/kg) etkisine 28 gün bırakılan farelerde ağırlık değişimi, hematoloji, organ indeksi ve bazı biyokimyasal parametreleri incelemişlerdir. Sonuçlar, altın nanopartikülü etkisine bırakılan hayvanlarda ALT ve AST düzeylerinde artışlar olduğunu gösterirken, araştırıcılar bu artışı karaciğerde bir miktar hasar olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Sharma ve ark. (2012) oral olarak 14 gün süre ile çinko nanopartikülü (300 mg/kg) etkisine bırakılan farelerin karaciğerinde çeşitli parametreleri incelemişlerdir. Sonuçlar hayvanların serumlarında ALP ve ALT aktivitelerinde önemli düzeylerde artışlar olduğunu gösterirken, karaciğerde patalojik lezyonların varlığı da gösterilmiştir. Patlolla ve

ark. (2015) gümüş nanopartiküllerinin (5-100 mg/kg) sıçanlarda oluşturduğu oksidatif stresi araştırmışlardır. Sonuçlar yüksek dozlarda gümüş nanopartiküllerinin reaktif oksijen elemanlarında artışa neden olduğunu ve daha da önemlisi karaciğer enzim (ALT, ALP, AST) aktivitelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Tang ve ark. (2011) sıçanların trakesine damlalar halinde verilen sıçan titanyum nanopartiküllerinin (0.8-20 mg/kg) oluşturduğu biyokimyasal değişimleri incelemişlerdir. Sonuçlar titanyum nanopartikülünün sıçan serumunda ALP, AST aktivitelerini artırdığını ve bunun da karaciğer hasarı nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir.

Literatür incelendiğinde, bu çalışmanın bulguları ile literatür verileri uygunluk göstermektedir. Metal nanopartikülü alan memelilerde, bu partiküllerin karaciğerde biriktiği ve buna bağlı olarak bir miktar karaciğer hasarı meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu durumda toksik etkilenme, serumda karaciğer enzim aktivitelerinde belirli bir oranda artış ile kendini göstermektedir.

4.2.2. Endokrin Sistem

Hayvanlar dış ortamda meydana gelen değişimlere uyum sağlamak ve iç ortamlarındaki dengeyi korumak zorundadır. İç ortamın değişmez tutulması olayına homeostasis denir. Sinir sistemi ve endokrin sistem homeostasisin sağlanmasıyla beraber ve koordineli çalışan sistemlerdir. Endokrin sistem, özelleşmiş salgı kanalları olmayan ve oluşturdukları salgıları (hormon) kan veya lenf ile hedef organlara ileten bezler sistemidir. Salgı miktarları çok az olmakla beraber hayati öneme sahip moleküllerdir ve düzeylerindeki en küçük değişimler ciddi sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Endokrin sistemin birçok hayati görevi vardır. Bunlar arasında; üreme, büyüme ve gelişme, beslenme, maddelerin hücreler tarafından kullanımı, tuz ve sıvı dengesini ayarlama, metabolik aktiviteyi düzenleme sayılabilir. Endokrin sistemin birçok çevresel maddeden etkilendiği, özellikle antropojenik aktivitelerin artışıyla son yıllarda endokrin sistem hasarlarında kayda değer artışların olduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada, üç nanopartikülün etkisinde 14 gün kalan dişi sıçanların hormon değerlerinde bazı önemli değişimler olmuştur. Titanyum

nanopartikülü herhangi bir değişime neden olmazken, bakır nanopartikülü prolaktin düzeyinde ciddi bir artışa, alüminyum nanopartikülü ise serbest T3 ve estradiol (östrojen) düzeylerinde azalmalara neden olmuşlardır.

Benzer çalışmalar literatürde de farklı yöntemler ve nanopartikül dozları kullanılarak yapılmıştır. Gao ve ark. (2012), dişi farelere 90 gün boyunca oral gavaj yöntemiyle titanyum nanopartikülü (10 mg/kg) vermişler ve bunu takiben gen ekspresyonunda ve yumurtalıklarda meydana gelebilecek yapısal hasarları incelemişlerdir. Araştırmanın sonuçları dişi farelerde progesteron seviyesinde azalmalar olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar titanyum nanopartiküllerinin direk olarak yumurtalık fonksiyonlarını etkilediğini belirtmişlerdir. Tassinari ve ark. (2014) sıçanlar ile yapmış oldukları, titanyum dioksit nanopartikülü verilmesi sonucu endokrin sistemin (testesteron, 17-b-estradiol ve triodotronin, troid, adrenalin) tepkisini ve dokularda partikül dağılımını görüntülenmesini (SEM ve TEM) araştırmışlardır. Her gün (5 gün) oral olarak 0,2 mg/kg dozunda titanyum dioksit nanopartikülü verilen hayvanların dalak ve yumurtalıklarında nanopartikül düzeyinin arttığı görülmüştür. Cinsiyetle ilgili histolojik değimlerde, her iki cinsiyette de yumurtalık granülünde, adrenal kortekste (dişi için), adrenal medulla ve tiroide gözlenmiştir. İlginç olarak, testosteron seviyelerinin yüksek dozda nanopartikül verilen hayvanların hem dişi, hem de erkek olanlarında artmış olduğu belirtilmiştir. Gao ve ark. (2013), titanyum nanopartikülü verilen erkek farelerde gen ekspresyon profillerindeki değişmeler ve testislerde oluşan yapısal hasarları incelemişlerdir. Araştırıcılar bunun için hayvanlara 90 gün boyunca 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozlarında Ti nanopartikülünü oral gavaj yöntemi ile vermişlerdir. Araştırmanın sonucunda genel olarak titanyum dioksit nanopartiküllerinin etkisinde kalan hayvanlarda serum cinsiyet hormon seviyelerindeki değişmeler, sperm kusurları ve testis hasarları gözlenmiştir. Araştırıcılar, bu etkilerin testislere ulaşan nanopartiküllerin kan-testis bağlantılarını bozması sonucu oluşabileceği konusunda yorum yapmışlardır. Garcia ve ark. (2014) 12 gün süre ile gümüş nanopartikülü etkisinde kalan erkek farelerde testesteron düzeylerini incelemişlerdir. Araştırıcılar gümüş nanopartiküllerinin testis ağırlığına ve sperm derişimine etkisinin olmaması nedeniyle spermatogonal kök hücrelerini etkilemediğini, ancak leydig hücrelerinin

fonksiyonlarını etkileyerek serumda testosteron düzeylerini artırdığını belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmayı Orazizadeh ve ark. (2014) yapmışlardır. Araştırıcılar, titanyum nanopartikülü (10 ve 300 mg/kg) etkisinde 35 gün süre ile kalan farelerde testiküler toksisiteyi incelemişler. Sonuçlar serum testosteron düzeyinin azaldığını, sperm sayısında, hareketliliğinde azalmalar olduğunu ve anormal sperm hücre sayısında önemli değişimler olduğunu göstermiştir. Hong ve ark. (2015) benzer şekilde titanyum nanopartikülünün erkek farelerde testis ve epididimis lezyonlarına neden olduğunu ve bunun da sperm sayısında ve hareketliliğinde azalmaya neden olurken, anormal hücre sayısında artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Tassinari ve ark. (2014) beş gün süre ile oral olarak verilen titanyum nanopartikülünün (2 mg/kg/gün) sıçanlardaki üreme ve endokrin sistem üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar, triod bezi fonksiyonunda değişimler olduğunu ve bunun T3 düzeyine bir azalma şeklinde yansıdığını belirtmişlerdir. Buna karşın testosteron düzeyinde erkeklerde bir artış, dişilerde ise bir azalamaya neden olduğunu vurgulamışlardır. Sleiman ve ark. (2013) yetişkin erkek sıçanlarda gümüş nanopartikülünün ergenleşmeye etkisini ve cinsiyet hormonlarının düzeylerini incelemişlerdir. Sonuçlar, 50 mg/kg gümüş nanopartikülü verilen sıçanlarda vücut ağırlığının değişmediğini, buna karşın ergenliğe geçişin geciktiğini, yani büyümenin azaldığını göstermiştir. Bununla beraber, cinsiyet hormonları (testosteron, estradiol) düzeyinde de önemli değişimler olduğu belirtilmiştir. Krom nanopartikülünün sıçanlarda endokrin sistem üzerine olan etkileri Zha ve ark. (2009) tarafından araştırılmıştır. Sekiz hafta süre ile oral olarak 150-450 µg/kg dozlarında krom nanopartikülü alan sıçanlarda büyüme ve besin tüketiminde herhangi bir değişim gözlenmezken, insülin ve kortizol düzeylerinde bir azalma görülmüştür. Farklı yollarla ve dozlarda nanopartikül alan memelilerde endokrin sistemde ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu durum, üretilecek olan nanopartiküllerin kullanımı konusunda iyi bir düzenlemenin yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

4.2.3. İmmün Sistem

Doğadaki bütün canlılarda yabancı madde, hücre ve moleküllere karşı savunma sistemleri bulunmaktadır. Buna genel olarak bağışıklık sistemi denir. Bu sistem bir canlıdaki hastalıklara karşı koruma yapan, vücuda giren yabancı maddeleri, patojenleri ve tümör hücrelerini tanıyıp onları yok etmek üzere antikor adı verilen özel proteinler sentezleyen bir sistemdir. Bağışıklık sistemi, yabancı olmasa bile vücudun kendisinin ürettiği yanlış üretim olan maddeleri (örnek, amino asit dizilimi farklı olan bir protein) bile tanıyıp, onları yok edebilir. Bu mücadelede hayatta kalmak için patojenleri tanıyan ve onları etkisizleştiren bazı mekanizmalar gelişmiştir. Bu çalışmada, test maddesi olarak kullanılan metal nanopartiküller sıçan metabolizması için yabancı bir maddedir ve sıçanların bağışıklık (immün) sisteminin bu etkilenemeye verecekleri tepkiyi belirlenmek amacıyla IgG, IgM ve IgE düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, IgG düzeyleri hiçbir nanopartikül etkisiyle bir değişim görülmezken, bakır nanopartikülü alan sıçanlarda IgM düzeylerinde önemli oranda azalmalar görülmüştür. Buna karşın, IgE düzeyi okuma düzeyinin altında kalmıştır. IgE alerjik reaksiyonlar sonucu üretildiğinden nanopartiküllerin her hangi bir alerjik reaksiyona neden olmadıkları sonucu çıkabilir. IgM en büyük antikor olup, hastalık anında ilk sentezlenen proteindir. Bakır nanopartikülü verilen sıçanlarda önemli oranda azalması immün sistemin etkilendiği anlamına gelebilir. IgG düzeyleri hiçbir değişimin olmaması da hayvanlarda herhangi bir enfeksiyon veya antijene karşı reaksiyon olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bu çalışmanın aksine Zha ve ark. (2009), 8 hafta süre ile oral olarak 150-450 µg/kg dozlarında krom nanopartikülü alan sıçanlarda IgG düzeyinde bir artışın olduğu gösterilmiştir. Fakat bunda, hayvanlara ısı stresi uygulamanın da önemli bir katkısı olabilir. Liu ve ark. (2010) sıçanlar ile yapmış oldukları bu çalışmada, intratrakeal olarak 0,5, 5 ve 50 mg/kg dozlarında verilen farklı boyutlardaki titanyum nanopartiküllerinin etkilerinin incelemişlerdir. Araştırmanın sonuçları, NP-1 titanyum dioksit partiküllerinin solunmasıyla birlikte membranlarda hasarların geliştiğini göstermişlerdir. Bununla beraber, makrofajların fagositik yeteneği NP-1 titanyum dioksitin düşük dozuna maruz kalanlarda artmış ve yüksek

dozuna maruz kalanlarda azalmıştır. Bu çalışmada, küçük boyutlu titanyum dioksit nanopartiküllerine maruz kalan hayvanlarda spesifik ve spesifik olmayan immün cevabın her ikisinde de azalma ile birlikte, hücre yapısı ve akciğer alveolar makrofaj fonksiyonlarında önemli ölçüde aksamalar olduğu belirtilmiştir. Vandebriel ve ark. (2014) sıçanlar ile yapmış oldukları bu çalışmada Ag nanopartikülünün (0.40 mg/kg kg/gün) damardan verilmesini takiben immün sistem tepkisini ölçmüşlerdir. Bunun için T-hücresi bağımlı antikor tepkisi (TDAR) ve anahtar limpet hemosiyanin (KLH) tepkileri 28 gün süren toplardamar enjeksiyonu yoluyla Ag nanopartikül verilmesini takiben yapılmıştır. Sonuçlar çeşitli immün parametrelerinin nanopartiküllerden etkilendiğini göstermiştir. Bunlar arasında, timus ağırlığında azalma, dalak ağırlığı ve dalak hücre sayısında artma, KLH-özgün IgG de azalma görülmüştür. Araştırıcılar, damardan verilen Ag nanopartikülünün immün sistemi baskıladığını belirtirken, immünotoksisitede TDAR değerlerinin önemli olduğunu ve sadece hücre sayımına odaklanılmaması gerektiğini vurgulamışlardır.

Nanopartiküller sterilizasyon amaçları için kullanılmalarına karşın, bazı immün sistem yetersizlikleri yapabilmektedirler. Özellikle önemli bir antibakteriyel madde olan gümüş nanopartiküllerinin immünotoksik etkileri gösterilmiştir. De Jong ve ark. (2013) sıçanlara 28 gün toplardamardan gümüş nanopartikülü (0-6 mg/kg/gün) vermişler ve immünotoksik etkilerini incelemişlerdir. Hayvanlarda ölüm gözlenmemekle birlikte, T ve B hücre sayılarında artış sonucu dalak ağırlığında ve büyüklüğünde artma görülmüştür. Daha da önemlisi, yüksek dozlarda doğal öldürücü hücrelerin (lenfosit tipi, NM) hareketinin çok azalması görülmüştür. Bunun yanında serumda IgM ve IgE düzeylerinde artış görülmüştür. Benzer sonuçlar, sterilizasyon ürünleri olarak kullanılan gümüş, çinko ve titanyum nanopartikülleri etkisinde solunum yolu aracılığı ile kalan sıçanlarda Liu ark. (2010) tarafından gösterilmiştir. Sonuç olarak, bakterilerden veya diğer mikroplardan korunmak üzere geliştirilen antimikrobiyal özellikleri ile kullanılan çeşitli metal nanopartiküller, aslında immün sistemi baskılayan veya durduran özellikleri ile göze çarpmaktadır. Bu da kullanımları konusunda ciddi bir düzenlemenin yapılması gerektiğini göstermektedir.

4.2.4. Diğer Biyokimyasal Belirteçler

İnsan dahil omurgalılarda serum, organizmanın sağlığı ile ilgili çok önemli bilgiler verdiğinden sıklıkla başvurulan ilk ölçüm materyalidir. Serum farklı organlara özgün biyobelirteçlerin düzeylerinde görülen değişimler sonucu, o organ veya dokularda daha ileri analizler yapılması düşünülebilir. Bu çalışmada, biyokimya olarak adlandırılan gruptaki biyobelirteçlerde çok fazla değişim gözlenmemekle birlikte, bazı biyobelirteçlerde önemli değişimler görülmüştür. En fazla değişim bakır nanopartikülü etkisinde kalan sıçanlarda olurken, bunu alüminyum ve titanyum takip etmiştir. Bütün nanopartiküllerin etkilediği ve düzeyini artırdığı tek biyobelirteç toplam biluribin olmuştur. Literatürde de nanopartikül cinsi, boyutu, dozu ve etkilenme süresine bağlı olarak çok çeşitli toksik etkiler gösterilmiştir. Sarhan ve Hussein (2014) Wistar albino sıçanlara intraperitonal olarak verilen yüksek dozda gümüş nanopartikülü (2000 mg/kg) vermişler ve akabinde kan parametrelerinde değişimi, karaciğer ve böbrekteki yapısal değişiklikleri incelemişlerdir. Araştırmanın bulguları göre hayvanlarda organların yapı ve fonksiyonunda 48 saat sonra ciddi sitotoksik etkiler ortaya çıkmıştır. Ayrıca, serum değerlerinde de önemli değişimler gözlenmiştir. Özellikle farklı akyuvar hücre sayılarında ve hemoglobin düzeyinde artışlar gözlemlenirken, diğer serum parametrelerinin (kreatinin, üre, aspartat, ALP) değerleri de önemli düzeylerde artmıştır. Yamagishi ve ark. (2013) farelere 55 gün süre ile farklı boyutlarda platin nanopartikülü verdikten sonra hayvanların serumunda üre, toplam protein, hemoglobin düzeylerinin değiştiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Yu ve ark. (2014), nazal yolla 9 ay boyunca titanyum nanopartikülü verilen farelerde (1.25-5 mg/kg) serumda trigliserid, glikoz, toplam kolesterol ve ROS düzeylerinin arttığını göstermiştir. Araştırıcılar, titanyum nanopartikülünün damarda aterogenez oluşumu için bir risk faktörü olabileceği konusunda yorum yapmışlardır. Hassankhani ve ark. (2015) yetişkin sıçanlarda oral olarak alınan silikon nanopartikülünün toksik etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar 10-15 nm boyutlarında silikon nanopartikülü verilen farelerin serumunda albümin, kolesterol, trigliserit, toplam protein, HDL-C, LDL-C düzeylerinde önemli değişimler olduğunu belirmişlerdir. Hu ve ark. (2015) 14 hafta süre ile ağızdan titanyum nanopartikülü

verilen (0-320 mg/kg/gün) farelerde titanyumun dokulardaki birikimini göstermişler ve serumda glikoz düzeyinin artmasına karşın insülin salgısının değişmediğini gözlemlemişlerdir. Gümüş nanopartikülünün biyokimyasal toksikolojisi Heydrnejad ve ark. (2015) tarafından gösterilmiştir. Araştırıcılar, erkek ve dişi farelere 14 gün süre ile 20 ve 50 ppm derişimindeki nanopartikülleri ağızdan vermişler ve elde ettikleri serumu otoanalizatörde incelemişlerdir. Hayvanların eritrosit, hemoglobin, hematokrit, düzeyleri değişmezken, ALT ve AST aktiviteleri önemli oranlarda artmıştır. Dişi ve erkek hayvanlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Bakır nanopartikülü ile yapılan nadir çalışmalardan bir tanesi Lei ve ark. (2015) tarafından yapılmıştır. Araştırıcılar, farklı dozlarda (100 ve 200 mg/kg/gün) 5 gün süre ile oral olarak verilen bakır nanopartiküllerinin sıçan karaciğeri ve böbreğinde oluşturduğu etkileri incelemişlerdir. Sıçan dokularında bakır nanopartikülü birikiminin olduğunu ve oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeyinde artışlar görülürken, solunum, enerji metabolizması, antioksidan savunma, lipit metabolizması üre döngüsü, kreatinin sentezi gibi birçok metabolizmada aksamalar olmuştur. Araştırıcılar, mitokondriyal ve oksidatif hasarların bakır nanopartikülü etkisi ile ortaya çıkan hepatik ve nefrotik toksisitenin öne belirtileri olabileceğini vurgulamışlardır.

4.2.5. Toplam Oksidan ve Toplam Antioksidan Düzeyleri

Organizmalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir. Bu çalışmada, alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülü verilen dişi sıçanların serumunda toplam oksidan ve toplam antioksidan düzeyleri de belirlenerek hayvanların yaşadığı oksidatif stres hakkında veri alınmıştır. Sonuçlar, serumda toplam oksidan düzeyinin önemli oranlarda arttığını, buna karşın toplam antioksidan düzeylerinde herhangi bir değişimin olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde, Yu ve ark. (2014), nazal yolla 9 ay boyunca titanyum nanopartikülü verilen farelerde (1.25-5 mg/kg) serumda ROS düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Hu ve ark. (2015) 14 hafta süre ile ağızdan titanyum nanopartikülü verilen (0-320 mg/kg/gün) farelerin serumunda ROS miktarının

arttığını belirtmişlerdir. Yu ve ark. (2014) gebe sıçanlara (6-19. gün) 0, 100, 300 ve 1000 mg/kg/gün dozlarında Ag nanopartiküllerinin oral gavaj ile vermişler ve gebeliğin 20. günü sezeryan ile alınan fetüslerde hepatik oksidan/antioksidan dengesi ile serum biyokimyasal parametrelerindeki değişimleri de gözlemlemişlerdir. Ana sıçanlarda 100 mg/kg/gün ve daha yukarı dozlarda katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde artış olurken, 1000 mg/kg/gün konsantrasyonunda glutatyonda azalma görülmüştür. Araştırıcılar gebelik sürecinde Ag nanopartiküllerinin 100 mg/kg/gün dozlarında oral olarak verilmesi sonucu, karaciğerde oksidatif strese oluştuğu, fakat 1000 mg/kg/gün dozda toksik etkilerinin görüldüğünü belirtmişlerdir. Shrivastava ve ark.(2013) farelerle yaptıkları çalışmada, TiO_2, ZnO ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin etkisinde kalan hayvanların eritrosit, beyin ve karaciğerde meydana gelen toksik etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar bu nanopartiküllerin farelerde antioksidan enzim aktivitelerini değiştirdiği ve ROS seviyelerini artırmasına neden olduğunu belirtirken, nanopartiküllerin beyin, karaciğer ve eritrositlerde önemli ölçüde oksidatif strese neden olduğunu vurgulamışlardır. Hong ve ark. (2015) oral olarak 2.5-10 mg/kg dozlarında 60 gün süre ile titanyum nanopartikülü etkisinde kalan erkek farelerde ROS artışına neden olduğunu ve ayrıca MDA düzeylerinde de artışlar gözlemlemişlerdir. Nanopartiküller arasında toksik etki bakımından bir sıralama yapıldığında en fazla etkiyi çinko oksitin gösterdiğini ve bunu alüminyum oksit ve titanyum oksitin izlediğini belirtmişlerdir. Antioksidan sisteminde enzimler (CAT, SOD, GPx, GST vb.) ve vitaminler gibi enzim olmayan moleküller antioksidan savunma sisteminde görev alarak toksik ROS'ları düşük düzeyde tutularak oksidatif hasarın önlenmesinde aktif rol oynamaktadırlar. Böylece oksidanlara karşı savunmada yardımcı olarak hücreyi zarar görmekten veya ölümden korumaktadır. Bu çalışmada, oksidan düzeyinin artması buna uygun olarak antioksidan elemanların düzeylerinin artmamış olması oksidatif stresin bir belirtisi olarak kabul edilebilir.

4.2.6. Eritrosit ATPaz Aktiviteleri

ATPaz grubu enzimler çevresel strese oldukça duyarlı enzim grubudur. Hücre veya daha geniş anlamda organizmanın ozmoregülasyonunda önemli rolleri olan ve

ozmatik gradientin aksi yönde iyonları iletebilen ve bu iş için gerekli olan enerjiyi ATP'den sağlayan enzimlerdir (Atli ve Canli, 2011). Bu nedenle, organizma ve hücre sağlığında önemli yerleri olması nedeniyle, çevre toksikolojisi çalışmalarında önemli veriler sağlama potansiyelleri bulunmaktadır. Eritrositler kan sıvısı içerisinde serbest halde dolaştığından, bütün hücre zarı ile kan sıvısındaki maddelerle temas halindedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre bütün nanopartiküller Na,K-ATPaz aktivitiesini önemli düzeylerde azaltmıştır. Bunun aksine Mg-ATPaz aktivitesi özellikle titanyum nanopartikülü verilen sıçanlarda aktivitede artışlar olmuştur. Bazı Mg-ATPaz'lar mitenkondride enerji metabolizmasında görev aldığından, aktivitedeki artışlar nanopartikül stresi nedeniyle oluşan enerji açığını kapatmak için olabilir. Fakat, Na,K-ATPaz aktivitesindeki azalmaların nedeni nanopartiküllerin zara yapışarak veya enzimin aktif bölgelerini etkileyerek enzimin direkt olarak inhibisyonu sayesinde olmuş olabilir. Benzer sonuçlar Hu ve ark. (2015) tarafından gösterilmiştir. Araştırıcılar yer solucanlarında (*Eisenia fetida*) Na,K-ATPaz aktivitesinin gümüş nanopartiküllerine verdikleri tepkileri incelemişlerdir. 20-500 mg/kg dozunda 10 nm gümüş nanopartikülü etkisinde kalan hayvanlarda Na,K-ATPaz aktivitesinde doza bağlı olarak önemli oranlarda azalmalar gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar bu enzimin gümüş nanopartikülü için iyi bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir. Hong ve ark. (2015) oral olarak 2.5-10 mg/kg dozlarında 60 gün süre ile titanyum nanopartikülü etkisinde kalan erkek farelerde Na,K-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinde önemli düzeylerde azalmalar gözlemlemişlerdir. Guo ve ark. (2013) çinko nanopartikülü etkisinde kalan sıçanların retinal hücrelerinde Ca-ATPaz akvitesinde ve gen ekspresyonunda da azalmalar olduğunu belirtmişlerdir. Katuli ve ark. (2014) gümüş nanopartikülü (2-4 mg/L) etkisinde kalan zebra balıklarının (*Danio rerio*) solungaçlarında Na,K-ATPaz aktivitesinin ve eritrositlerde asetil kolin esteraz aktivitesinin değişimlerini incelemiştir. Araştırıcılar Na,K-ATPaz aktivitesinde azalmalar olmakla birlikte sadece uzun süreli etkilenmede etkili olduğunu belirtmişlerdir. Gümüş nanopartikülü uygulamasıyla, eritrosit asetil kolin esteraz aktivitesi için net bir şekilde inhibe olmuştur. Ionoregulasyon ve nöroregülasyonun gümüş nanopartikülü etkisiyle bozulmuş olabileceği konusunda yorumlar yapılmıştır. Mg-ATPaz'ların bir kısmı mitokondri için önemli olan bir

enzimdir ve ATP sentezinde ATP sentetazlarla birlikte görev almaktadır. Bu enzimlerin gümüş nanopartikülü etkisinde kalan sıçanların karaciğerinde inhibisyona uğradığı Chichova ve ark. (2014) tarafından gösterilmiştir. ATPaz grubu enzimler çevre kirleticilerinden etkilenmekle beraber, telafi mekanizmaları nedeniyle gerçek etkilenme düzeyleri her zaman ortaya çıkmayabilir. Bu nedenle, literatürde ATPaz çalışmaları konusunda çok farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküller son yıllarda üretilen sentetik maddeler olduklarından, üzerinde bütün dünya bilim insanlarının yoğun bir şekilde hala çalışmalar yapılmaktadır ve toksisiteleri hakkında farklı yorumlar yapılmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma, alüminyum, bakır ve titanyum nanopartikülleri etkisinde kalan sıçanların metabolizmasında, özellikle eritrositlerde ozmoregülasyon enzimlerinin aktivitelerinde önemli değişimler olduğunu görülmüştür. Bununla birlikte, nanopartiküllerin toksik etkileri konusunda araştırılması gereken daha çok bilinmeyen olduğundan bu çalışmalara devam edilmesi gerekir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Deney süresince 60 sıçandan sadece 3 tanesi (%5) ölmüştür. Bununda en düşük nanopartikül dozlarında olması, bu ölümlerin doğal nedenlerden olduğunu vurgulamaktadır.
2. Serumda incelenen 20 parametreden en fazla etkilenenler karaciğer enzimleri olup, bunu hormonlar ve diğer biyokimyasal parametreler izlemiştir.
3. Nanopartikül toksisitesi doza bağlı olup, en çok etkilenme en yüksek dozda olmuştur. Sıralama yapıldığında en toksik nanopartikül bakır olup, bunu alüminyum ve titanyum izlemiştir.
4. Eritrosit ozmoregülasyon enzimleri (ATPaz'lar) nanopartiküllerden etkilenmiş olup, Na,K-ATPaz aktivitesinde azalma, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinde ise artmalar olmuştur.
5. Metal nanopartikülleri arasında bir sıralama yapıldığında incelenen parametreler üzerinde en etkili olan CuO olup, bunu Al_2O_3 ve TiO_2 izlemiştir.

5.2. Öneriler

1. Nanopartiküller son yılların teknoloji ürünleri olduğundan, sürekli yenileri üretilmektedir. Bu nedenle, diğer nanopartiküllerin de toksik etkileri incelenmelidir.
2. Bu çalışmada sadece kan dokusunda biyobelirteçler incelenmiştir. Bu analizlerin özellikle karaciğer, böbrek ve beyin gibi hayati organlarda da farklı biyobelirteçler kullanılarak incelenmesi gerekir.

3. Metal içeren nanopartiküllerin alınımı, atılımı ve birikimi farklı çevresel koşullarla olan ilişkisinin belirlenmesi, onların metabolizmasını anlamamıza yardımcı olabilir.
4. Nanoapartiküllerin dokularda birikimi TEM ile belirlenebilir ve dokulardaki histolojik hasarları SEM ile görüntülenebilir.
5. Çevreye salınan bütün kirleticilerin çoğunun son duraklarının sucul ortamlar olması nedeniyle, metal nanopartiküllerinin metabolik etkilerinin balıklarda ve diğer sucul organizmalarda da belirlenmesi, organizma ve çevre sağlığı açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

AHAMED, M., ALSALHİ, M. S., SIDDIQUI, M. K. J. 2010. Silver nanoparticle applications and human health. Clinica. Chimica. Acta. 411 (23): 1841-1848.

AMARA, S., BEN-SLAMA, I., MRAD, I., RIHANE, N., JELJELI, M., EL-MIR, L., SAKLY, M. 2014. Acute exposure to zinc oxide nanoparticles does not affect the cognitive capacity and neurotransmitters levels in adult rats. Nanotoxicology, 8(sup1): 208-215.

ASHARANI, P.V., MUN, G.L.K., HANDE, M.P., VALIYAVEETTIL, S., 2008. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS nano 3: 279-290.

ATKINSON, A., GATEMBY, A.O., LOWE, A.G., 1973. The Determination of Inorganic Ortophosphate in Biological Systems. Biochimica Et Biophysica Acta, 320: 195–204.

ATLI, G., 2009. Bakır,Çinko,Kadminyum,Krom ve Gümüşün *Oreochromis niloticus*'un Solungaç ve Böbrek Dokusundaki Na+/K+-ATPaz,Ca+2-ATPaz ve Mg+2-ATPaz ile Kas Dokusundaki Ca+2ATPaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri,Ç.Ü. Doktora Tezi,Adana,206

ATLI, G., CANLI, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicol. 20: 1861-1869.

ATLI, G., CANLI, M., 2013. Metals (Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}) Affect ATPase activity in the gill, kidney and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. Environ. Toxicol. 28(12): 707-717.

AY, O., CANLI, M. 1997. Distribution of subcutaneously injected cadmium and lead among tissues and fetuses of pregnant mice: Their effect on iron and zinc levels. Tr. J. of Zoology, 21: 107-112.

BARAŃSKI, B., 1987. Effect of cadmium on prenatal development and on tissue cadmium, copper, and zinc concentrations in rats. Environmental Research, 42: 54-62.

BERNET, D., SCHMIDT, H., WAHLI, T., BURKHARDT-HOLM, P. 2001. Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.), Ecotoxicology and Environmental Safety, 48,140–147.

BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2004. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189– 194.

BIANCHINI, A., PLAYLE, R.C., WOOD, C.M., and WALSH, P.J., 2005. Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertebrates. Aquatic Toxicology, 72: 67–82

BONDARENKO, K.J., IVASK, A., KASEMETS, K., MORTIMER, M., KAHRU, A., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. Archives of Toxicology 87: 1181-1200.

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R., TIETZ, N. W., 1994. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co, 58-69.

CARDOSO, E., REZIN, G. T., ZANONI, E. T., DE SOUZA NOTOYA, F., LEFFA, D. D., DAMIANI, A. P., DA SILVA PAULA, M. M., 2014. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 766: 25-30.

CHAN, H.M., and M. G. CHERIAN., 1993. Mobilization of hepatic cadmium in pregnant rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 120: 308-314.

CHICHOVA, M., SHKODROVA, M., VASILEVA, P., KIRILOVA, K., DONCHEVA-STOIMENOVA, D., 2014. Influence of silver nanoparticles on the activity of rat liver mitochondrial ATPase. J. Nano. Res. 16(2): 1-14.

DE JONG, W. H., VAN DER VEN, L. T., SLEIJFFERS, A., PARK, M. V., JANSEN, E. H., VAN LOVEREN, H., VANDEBRIEL, R. J., 2013. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. Biomaterials, 34(33): 8333-8343.

EREL, O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response

against potent free radical reactions. Clinical Biochem. 37(2): 112-119.

EREL, O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status Clinical Biochem. 38: 1103–1111.

EWERS, U., H. W. SCHLIPKÖTER., 1991. Chronic toxicity of metals and metal compounds. Metals and their compounds in the environment. VCH Publishers, Inc., NY , 591-603.

FINE, B. P., GAUSE A.D., LYONS M., 1979. The effects of body burdens of lead on the growing rat kidney. Environmental research, 19: 215-220.

FLIK, G., VAN RIJS, J. H., BONGA, S. E. W., 1985. Evidence for high-affinity Ca^{2+}-ATPase activity and ATP-driven Ca^{2+}- transport in membrane preparations of the gill epithelium of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Experimental Biology, 119(1): 335-347.

GAO, G., ZE, Y., LI, B., ZHAO, X., ZHANG, T., SHENG, L., HONG, F., 2012. Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. Journal of Hazardous Materials, 243, 19-27.

GAO, G., ZE, Y., ZHAO, X., SANG, X., ZHENG, L., ZE, X., ZHANG, X., 2013. Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. Journal of Hazardous Materials, 258, 133-143.

GARCIA, T.X., GUILHERME, M.J., COSTA, L.R., FRANÇA, M.C.H., 2014. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters leydig cell function and testosterone levels. Reproductive Toxicology 45: 59-70.

GERAETS, L., OOMEN, A.G., KRYSTEK, P., JACOBSEN,N.R., WALLIN, H., HENNY, M.L., ESTHER, W.V., BRANDON, F.A., DE JONG, W.H., 2014.Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. Particle and fibre toxicology 11: 30-37.

GOYER, R.A., 1991. Toxic Effects of Metals. In: Amdur, M.O., Doull, J. And Klaassen, C.D. (eds) Cassarett and Doulls Toxicology, The Basic Science of Poisons. Pergamon Press., s.623-680.

GUO, D., BI, H., WANG, D., WU, Q., 2013. Zinc oxide nanoparticles decrease the expression and activity of plasma membrane calcium ATPase, disrupt the intracellular calcium homeostasis in rat retinal ganglion cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45(8): 1849-1859.

GUPTA, G.S., SINGH, J., PARKASH, P. 1995. Renal toxicity after oral administration of lead acetate during pre- and post-implantation periods: Effects on trace tetal composition, metallo-enzymes and glutathione. Pharmacology & Toxicology, 76: 206–211.

HANDY, R.D., and BENJAMIN J. S., 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. Health, Risk and Society 9: 125-144.

HASSANKHANI, R., ESMAEILLOU, M., TEHRANI, A. A., NASIRZADEH, K., KHADIR, F., MAADI, H., 2015. In vivo toxicity of orally administrated silicon dioxide nanoparticles in healthy adult mice. Environmental Science and Pollution Research, 22(2): 1127-1132.

HEYDRNEJAD, M. S., SAMANI, R. J., AGHAEIVANDA, S., 2015. Toxic effects of silver nanoparticles on liver and some hematological parameters in male and female mice (*Mus musculus*). *Biological trace element research*, *165*(2), 153-158.

HONG, F., SI, W., ZHAO, X., WANG, L., ZHOU, Y., CHEN, M., ZHANG, J., 2015. TiO_2 Nanoparticle Exposure Decreases Spermatogenesis via Biochemical Dysfunctions in the Testis of Male Mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(31): 7084-7092.

HU, H., GUO, Q., WANG, C., MA, X., HE, H., OH, Y., GU, N., 2015. Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. J. Applied Toxicol. 35(10): 1122-1132.

HUSSAIN, S.M. HESS, K.L., J.M. GEARHART, J.M., GEISS, K.T. SCHLAGER, J.J., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro 19: 975-983.

JANG, M. H., KIM, W. K., LEE, S. K., HENRY, T. B., PARK, J. W. 2014. Uptake, tissue distribution, and depuration of total silver in common carp (*Cyprinus carpio*) after aqueous exposure to silver nanoparticles. Environmental science and technology, 48: 11568-11574.

JENG, H.A., SWANSON, J., 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. J. Environ. Sci. Health Part A., 41: 2699–2711.

JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E. S., KRUATRACHUE, M., SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S., POKETHITIYOOK, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology, 18(4): 260-267.

JORGENSEN, S.W., 2010. A derivative of encyclopedia of ecology. Ecotoxicology, London, Academic Press, pp 390.

KAEWAMATAWONG, T. WIJIT B. PATTWAT M. CHUCHAAT T. SANONG E., 2013. Acute pulmonary toxicity caused by single intratracheal instillation of various doses of colloidal silver nanoparticles in mice: Pathological Changes, Particle Bioaccumulation and Metallothionien Protein Expression. The Thai Journal of Veterinary Medicine 43: 383-390.

KASEMETS, K., IVASK, A., DUBOURGUİER, H.C., KAHRU, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO_2 to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicology in Vitro 23: 1116-1122.

KATULI, K. K., MASSARSKY, A., HADADI, A., POURMEHRAN, Z. 2014. Silver nanoparticles inhibit the gill Na^+/K^+-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 106: 173-180.

LAN, W.G., WONG, M.K., CHEN, N., SİN, Y.M., 1995. Effect of combined copper, zinc, chromium, and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*, Aquaculture, 131, 219–230.

LEE, J. W., KIM, J. E., SHIN, Y. J., RYU, J. S., EOM, I. C., LEE, J. S., LEE, B. C. 2014. Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to zinc oxide nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 104: 9-17.

LEI, R., YANG, B., WU, C., LIAO, M., DING, R., WANG, Q. 2015. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the liver and kidney of rats following exposure to copper nanoparticles for five consecutive days. Toxicol. Res. 4(2): 351-364.

LEVIN, A.A., KILPPER, R.W. and MILLER, R.K.,1987. Fetal toxicity of cadmium chloride: the pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat. Teratology, 36: 163-170.

LI, X. B., LIU, R., LIANG, G. Y., YIN, L. H., & ZHENG, H. 2013. Aluminum Oxide Nanoparticles Upregulate ED1 Expression in Rat *Olfactory Bulbs* by Repeated Intranasal Instillation. In Advanced Materials Research 716: 3-9.

LIU, R., ZHANG, X., PU, Y., YIN, L., LI, Y., ZHANG, X., ZHANG, J., 2010. Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 10(8): 5161-5169.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARRA, N.J., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

MANCE, G., 1987. Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment. Elsevier, London, 363s.

MACNICOLL, A., KELLY, M., AKSOY, H., KRAMER, E., BOUWMEESTER, H., CHAUDHRY, Q., 2015. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using in vitro and in vivo models of oral intake. Journal of Nanoparticle Research, 17(2): 1-20.

MERCAN, U., 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, *15*(1): 91-96.

MOHAMMADIPOUR, A., FAZEL, A., HAGHIR, H., MOTEJADED,

F., RAFATPANAH, H., ZABIHI, H., HOSSEINI, H., BIDESKAN, A.E., 2014. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy: impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat ffspring. Environmental Toxicology and Pharmacology 37: 617-625.

NEBENDAHL, K., 2000. Routes of administration. The laboratory rat. San Diego (CA): Academic Press. p, 463-483.

NEWMAN, D. J., HENNEBERRY, H., PRICE, C. P., 1992. Particle enhanced light scattering immunoassay. Annals of Clinical Biochemistry: An international Journal of Biochemistry in Medicine, 29(1): 22-42.

ORAZIZADEH, M., KHORSANDI, L., ABSALAN, F., HASHEMITABAR, M., DANESHI, E., 2014. Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. Journal of Assisted Reproduction and enetics 31: 561-568.

PARK, E. J., SIM, J., KIM, Y., HAN, B. S., YOON, C., LEE, S., KIM, J. H., 2015. A 13-week repeated-dose oral toxicity and bioaccumulation of aluminum oxide nanoparticles in mice. Archives of Toxicology, 89(3): 371-379.

PARVEZ, S., SAYEED, I., RAISUDDIN, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. Ecotox. Environ. Saf. 65: 62–66.

PATLOLLA, A. K., HACKETT, D., TCHOUNWOU, P. B., 2015. Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats. Molecular and Cellular Biochemistry, 399(1-2): 257-268.

SANDHIR, R. and GILL, K. D., 1994. Alterations in calcium homeostasis on lead exposure in rat synaptosomes. Molecular and Cellular Biochemistry, 131: 25-33.

SARHAN, O.M., HUSSEIN R.M., 2014. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. International journal of nanomedicine 9: 1505-1511.

SCHRAND, A.M., RAHMAN, M.F., HUSSAIN, S.M., SCHLAGER, J.J. SMITH,

D.A., SYED, A.F., 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2: 544-568.

SERAFINI, M., DEL RIO, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. Redox report, 9(3): 145-152.

SHARMA, V., ANDERSON, D., DHAWAN, A., 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). Apoptosis, 17(8): 852-870.

SHIM, K. H., HULME, J., MAENG, E. H., KIM, M. K., AN, S. S. A., 2014. Analysis of zinc oxide nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate. International Journal of Nanomedicine, 9(2): 217.

SHRIVASTAVA, R., RAZA, S., YADAV, A., KUSHWAHA, P., FLORA, S. J., 2013. Effects of sub-acute exposure to TiO_2, ZnO and Al_2O_3 nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. Drug Chem. Toxicol. 37(3): 336-347.

SHOULTS-WILSON, W. A., REINSCH, B. C., TSYUSKO, O. V., BERTSCH, P. M., LOWRY, G. V., UNRINE, J. M. 2011. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). Nanotoxicology, 5(3): 432-444.

SLEIMAN, H. K., ROMANO, R. M., OLIVEIRA, C. A. D., ROMANO, M. A., 2013. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 76(17): 1023-1032.

SONG, L., CONNOLLY, M., FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L., VIJVER, M. G., FERNÁNDEZ, M., CONDE, E., NAVAS, J. M. 2014. Species-specific toxicity of copper nanoparticles among mammalian and piscine cell lines. Nanotoxicology, 8: 383-393.

SUSZKIW, J.G. MURAWSKY, T.M., COOPER, G.P., 1984. Effects of Pb^{2+} and

Cd^{2+} on acetylcholine release and Ca^{2+} movements in synaptosomes and subcellular fractions from rat brain and *Torpedo* electric organ. Brain Research, 323: 31-46.

SYAMA S, SREEKANTH, P. J. VARMA, H. K., MOHANAN P. V.. 2013. Effect of Zinc Oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver. Toxicological & Environmental Chemistry 95: 495-503.

TANG, M. ZHANG, T. XUE, Y. WANG, S. HUANG, M. YANG, Y. LU, M. LEI, H. KONG, L. WANG, Y. PU, Y., 2011 Metabonomic studies of biochemical changes in the serum of rats by intratracheally instilled TiO_2 nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 11: 3065-3074.

TASSINARI, R., CUBADDA, F., MORACCI, G., AURELI, F., D'AMATO, M., VALERI, M., MARANGHI, F., 2014. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. Nanotoxicology, 8(6): 654-662.

THOMAS, L., 1998. Immunoglobulins (Ig). In: Thomas, L. (Ed.). Clinical Laboratory Diagnostics, TH-Books, Frankfurt/Main, 667-78.

TIETZ, N. W., ed., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, PA (1987).

TIETZ, N. W., 1994. Specimen collection and processing; sources of biological variation. Textbook of Clinical Chemistry, 478.

XIA T., LI, N., NEL A.E., 2009. Potential health impact of nanoparticles. Annu. Rev. Public Health 30: 137-150.

VANDEBRIEL, R.J., TONK, E.C.M., DE LA FONTEYNE-BLANKESTIJN, L.J., GREMMER, H.E.C., VERHAREN, W., VAN DER VEN, L.T. VAN LOVEREN, H., DE JONG, W.H., 2014. Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats. Particle and Fibre Toxicology 11: 21-27.

VERBOST, P. M., FLİK, G., LOCK, R. A. C., BONGA, S. W., 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. The Journal of Membrane Biology, 102(2), 97-104.

VEVERS, W. F., JHA, A. N. 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles on fish cells in vitro. Ecotoxicology, 17; 410-420.

VILLARREAL, F. D., DAS, G. K., ABID, A., KENNEDY, I. M., KÜLTZ, D. 2014. Sublethal effects of CuO nanoparticles on Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity. *PloS one*, *9*: e88723.

VİNARDELL, M. P., SORDÉ, A., DÍAZ, J., BACCARİN, T., MİTJANS, M., 2015. Comparative effects of macro-sized aluminum oxide and aluminum oxide nanoparticles on erythrocyte hemolysis: influence of cell source, temperature, and size. Journal of Nanoparticle Research, 17(2): 1-10.

WANG, T., LONG, X., CHENG, Y., LİU, Z.,YAN, S. 2014. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*. Aquatic Toxicology, 152: 96-104.

WINTER, W.E., HARDT, N.S., FUHRMAN, S., 2000. Immunoglobulin E: Importance in parasitic infections and hypersensitivity responses. Clin. Chem. Lab. Med. 124: 1382-5.

WONG, S.W.Y., LEUNG, K.M., 2014. Temperature-dependent toxicities of nano zinc oxide to marine diatom, amphipod and fish in relation to its aggregation size and ion dissolution. Nanotoxicology 8: 24-35.

YAMAGISHI, Y., WATARI, A., HAYATA, Y., LI, X., KONDOH, M., YOSHIOKA, Y., YAGI, K., 2013. Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. Nanoscale Research Letters, 8(1): 1-7.

YONG-WOOK, B., YOUN-JOO, N., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb_2O_3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus.* Science of the total environment, 409: 1603-1608.

YU, W.J., SON, J.M., LEE, J., KIM, S.H., LEE, I.C., BAEK, H.S., SHIN, I.S., MOON, C., KIM, S.H., KIM, J.C., 2014. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. Nanotoxicology 8: 85-92.

ZE, Y., SHENG, L., ZHAO, X., HONG, J., ZE, X., YU, X., PAN, X., LIN, A.,

ZHAO,Y., ZHANG, C., ZHOU, Q., WANG, L., HONG, F., 2014. TiO_2 Nanoparticles induced hippocampal neuroinflammation in mice. PloS one 9: 92230.

ZHA, L., ZENG, J., SUN, S., DENG, H., LUO, H., LI, W., 2009. Chromium (III) nanoparticles affect hormone and immune responses in heat-stressed rats. Biological Trace Element Research, 129(1-3): 157-169.

ZHANG, X. D., WU, D., SHEN, X., LIU, P. X., YANG, N., ZHAO, B., FAN, F. Y. 2011. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. Int. J. Nanomed. 6: 2071.

ZHU, X., ZHU, L., DUAN, Z., QI, R., LI, Y., LANG, Y., 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 43: 278-284.

ZIKIC, R.V., STAJN, S., PAVLOVIC, Z., OGNJANOVIC, B.I., SAICIC, Z.S. 2001. "Activities of superoxide dismutase and catalase in erytrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium", Physiological Research 50: 105–111.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1988 yılında Tarsus'ta doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini (Abdülkerim Bengi Anadolu Lisesi) Tarsus'ta tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve bu Bölümden 3.06/4 diploma notu ile mezun oldu. 2014 yılının Şubat ayında, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.