

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜNÜN BOYUT VE DOZ BAĞIMLI OLARAK  
KARACİĞERE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Dr. Mehmet Enes SÖZEN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
(TIP) ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. S. Serpil KALKAN

KONYA 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜNÜN BOYUT VE DOZ BAĞIMLI  
OLARAK KARACİĞERE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Dr. Mehmet Enes SÖZEN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
(TIP) ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. S. Serpil KALKAN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161418004 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2017

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Mehmet Enes SÖZEN**'in “**Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağımlı Olarak Karaciğere Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/02.10.2017

  
Tez Danışmanı

Prof. Dr. S. Serpil KALKAN

Necmettin Erbakan Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

Necmettin Erbakan Üniversitesi

  
Jüri Üyesi

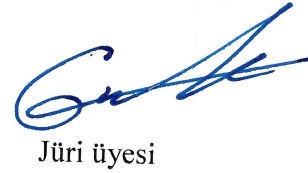
Prof. Dr. Hasan CÜCE

KTO Karatay Üniversitesi

  
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Selçuk Üniversitesi

  
Jüri üyesi

Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11/10/2017 Tarih ve 21/14 Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK


Enstitü Müdürü





## APPROVAL


We certify that we have read this dissertation entitled “*Investigation of The Size and Dose Dependent Effect of Silver Nanoparticle on Liver*” by “*Mehmet Enes SÖZEN*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Doctor of Philosophy* in the Department of **Histology and Embryology**, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.


Konya, TURKEY/02.10.2017

  
Principal Advisor  
Prof. Dr. S. Serpil KALKAN  
Necmettin Erbakan University

  
Examination Committee Member  
Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ  
Necmettin Erbakan University

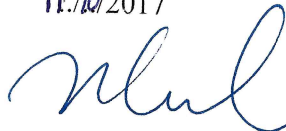
  
Examination Committee Member  
Prof. Dr. Hasan CÜCE  
KTO Karatay University

  
Examination Committee Member  
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN  
Selçuk University

  
Examination Committee Member  
Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE  
Necmettin Erbakan University

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Director of Institute of Health Sciences

11.10/2017  


## Tez Beyan Sayfası

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynak listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

02.10.2017

Mehmet Enes Sözen



10.10.2017

Tumtln

[Kütüphaneler](#)  
[Öğrenciler](#)  
[Not Defteri](#)  
[Kütüphaneler](#)  
[Takvim](#)  
[Tartışma](#)  
[Tercihler](#)

Bu sayfa hakkında



Bu sizin ödev gelen kutunuzdur. Bir ödevi görüntülemek için, ödev başlığına tıklayın. Orjinallik Raporu'nu görmek için, benzerlik kolonundaki orjinallik raporu ikonuna tıklayın. Bu ikon tıklanabilir durumda değilse, orjinallik raporu henüz oluşturulmamış demektir.

## Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağlı Olarak...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder GradeMark Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

[Sil](#) [İndir](#) [Şuraya taşı...](#)

| <input type="checkbox"/> | Yazar             | Başlık   | Benzerlik   | web | yayın | student papers | Puanla | cevap | Dosya      | Ödev Numarası | Tarih       |
|--------------------------|-------------------|--|---|-----|-------|----------------|--------|-------|------------|---------------|-------------|
| <input type="checkbox"/> | Mehmet Enes Sözen |  Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağlı... | %0<br> | 8%  | 3%    | 4%             | --     | --    | ödev indir | 880281726     | 10-Eki-2017 |

## **Önsöz ve Teşekkürler**

Doktora eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren danışman hocam ve aynı zamanda Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. S. Serpil KALKAN'a,

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ, Prof. Dr. Selçuk DUMAN, Prof. Dr. Murad AKTAN, Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE, Öğr. Gör. Dr. Burcu GÜLTEKİN ve KTO Karatay Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan CÜCE'ye,

Aynı zamanda birlikte çalıştığımız ve her konuda desteklerini hep yanımda hissettiğim asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Halime Tuba CANBAZ, Arş. Gör. Seda ÇETİNKAYA, Arş. Gör. Dr. Fatma ÖZ BAĞCI, Nihal CANBULAT'a

Hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen annem Zeliha SÖZEN, babam Bayram SÖZEN ve kardeşlerim Emre SÖZEN ve Kevser SÖZEN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| İç Kapak.....  | i    |
| Tez Onay Sayfası.....                                    | ii   |
| APPROVAL .....   | iii  |
| Tez Beyan Sayfası.....                                   | iv   |
| Önsöz ve Teşekkürler .....                               | vi   |
| İÇİNDEKİLER .....  | vii  |
| Kısaltmalar ve Simgeler .....                            | x    |
| Resimler .....   | xii  |
| Tablolar.....  | xiii |
| Özet.....  | xiv  |
| ABSTRACT.....  | xvii |
| 1. GİRİŞ .....   | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                   | 1    |
| 2.1. Karaciğer .....                                     | 1    |
| 2.1.1. Karaciğer Anatomisi.....                          | 1    |
| 2.1.2. Karaciğer Histolojisi.....                        | 2    |
| 2.1.2.1. Hepatositler.....                               | 3    |
| 2.1.2.2. Hepatik Stellat Hücreleri .....                 | 4    |
| 2.1.2.3. Kupffer Hücreleri.....                          | 4    |
| 2.1.2.4. Pit Hücreleri.....                              | 5    |
| 2.2. Nanopartiküller .....                               | 5    |
| 2.2.1. Tarihçe .....                                     | 6    |
| 2.2.2. Nanopartiküllerin Özellikleri .....               | 7    |
| 2.2.2.1. Boyut .....                                     | 8    |
| 2.2.2.2. Kaplama.....                                    | 10   |
| 2.2.2.3. Yüzey Alan.....                                 | 11   |
| 2.2.2.4. Şekil.....                                      | 11   |
| 2.2.2.5. Yük.....  | 12   |
| 2.2.2.6. Protein Korona .....                            | 12   |
| 2.2.2.7. Nanopartiküllerle İlgili Diğer Özellikler ..... | 13   |
| 2.2.3. Nanopartikül Maruziyeti .....                     | 14   |
| 2.2.4. Nanopartiküllerin Uygulamaları .....              | 15   |
| 2.2.5. Nanopartikülün Vücuttaki Dağılımı.....            | 17   |



|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.6. Nanopartikül Toksisitesi.....                                 | 18        |
| 2.3. Nanogümüş.....  | 19        |
| 2.3.1. Nanogümüşün Medikal Uygulamaları .....                        | 20        |
| 2.3.1.1. Antimikrobiyal Uygulamalar .....                            | 20        |
| 2.3.1.2. Antiviral Uygulamalar .....                                 | 21        |
| 2.3.1.3. Üriner Kateterler .....                                     | 22        |
| 2.3.1.4. Diő Materyalleri.....                                       | 22        |
| 2.3.1.5. Yara, Yanık Sargı Uygulaması.....                           | 22        |
| 2.3.1.6. Dermatoloji ve Kozmetik.....                                | 23        |
| 2.3.2. Dağılım.....  | 23        |
| 2.3.3. Etki Mekanizması .....  | 25        |
| 2.4. Apoptozis .....   | 27        |
| 2.4.1. Apoptozisin Tarihçesi.....                                    | 28        |
| 2.4.2. Apoptozisin Mekanizması.....                                  | 28        |
| 2.4.2.1. Mitokondri Yolağı ya da İntrinsik Yolak.....                | 29        |
| 2.4.2.2. Hücre Ölüm Reseptörü ya da Ekstrinsik Yolak.....            | 30        |
| 2.4.3. Apoptozisin Fizyolojik Rolü ve Hastalıklardaki Değıőimi ..... | 31        |
| 2.4.4. Apoptozisin Değerlendirilmesi.....                            | 31        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                       | <b>33</b> |
| 3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği.....             | 33        |
| 3.2. Deney Hayvanları .....  | 33        |
| 3.3. Çalışma Grupları .....  | 33        |
| 3.4 Nanogümüş.....   | 34        |
| 3.5. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi .....                            | 34        |
| 3.6. Dokuların ve Kan Örneklerinin Hazırlanması.....                 | 35        |
| 3.7.1 Oksidatif Stres Parametreleri .....                            | 35        |
| 3.8. Histolojik Uygulamalar.....                                     | 35        |
| 3.8.1. Nötral Formaldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı .....      | 35        |
| 3.8.3. Kesitlerin Alınması ve Boyanması .....                        | 36        |
| 3.9 İmmünohistokimya Boyama .....                                    | 38        |
| 3.9.2. TUNEL Metodu .....  | 39        |
| 3.10. Apoptotik İndeks.....  | 41        |
| 3.11. İstatistiksel Yöntemler .....                                  | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. BULGULAR</b> .....                        | <b>42</b> |
| 4.1. <i>Vücut Ağırlığı Farkı</i> .....          | 42        |
| 4.2. <i>Oksidatif Stres Parametreleri</i> ..... | 42        |
| 4.3. <i>Serum Biyokimya Parametreleri</i> ..... | 44        |
| 4.4. <i>TUNEL Boyama</i> .....                  | 46        |
| 4.5. <i>Histopatoloji Skoru</i> .....           | 50        |
| 4.6. <i>İmmünohistokimyasal Boyama</i> .....    | 54        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....               | <b>58</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR</b> .....                       | <b>69</b> |
| <b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....                        | <b>76</b> |
| <b>8. EKLER</b> .....                           | <b>77</b> |



## Kısaltmalar ve Simgeler

**$\alpha$**  = Alfa

**ABD** = Amerika Birleşik Devletleri

**Ag** = Gümüş

**AGER** = Agranüler Endoplazmik Retikulum

**ALT** = Alanin Aminotransferaz

**APAF-1** = Apoptotik-Proteaz Aktive Edici Faktör-1

**AST** = Aspartat Aminotransferaz

**Au** = Altın

**AuNP** = Altın Nanopartikülü

**DISC** = Ölüm Uyarıcı Sinyal Kompleksi

**DNA** = Deoksiribonükleik Asit

**GER** = Granüllü Endoplazmik Retikulum

**FADD** = Fas-Bağımlı Ölüm Bölgesi Proteini

**Fas L** = Fas Ligand

**GGT** = Gama-Glutamil Transferaz

**Gp 120** = Glikoprotein 120

**HBV** = Hepatit B Virüsü

**H&E** = Hematoksilen&Eozin Boyası

**HIV** = İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** = Hidrojen Peroksit

**IFN $\gamma$**  = Interferon Gama

**IL** = İnterlökin

**kg** = Kilogram

**mg** = Miligram

**MHC** = Major Doku Uygunluk Kompleksi

**MR** = Manyetik Rezonans Görüntüleme

**nm** = Nanometre

**O<sub>2</sub>** = Oksijen

**OSI** = Oksidatif Stres İndeksi

**RNA** = Ribonükleik Asit

**ROS** = Reaktif Oksijen Türevleri

**SiO<sub>2</sub>** = Silika Dioksit

**TAS** = Total Antioksidan Statü

**TEM** = Transmission Elektron Mikroskobu

**TiO<sub>2</sub>** = Titanyum Dioksit

**TNFR** = Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

**TOS** = Toktal Oksidan Statü

**TUNEL** = Terminal-Deoksi Nükleotidil Transferaz Nick End-Labeling

**µm** = Mikrometre

**UV** = Ultraviyole

**ZnO** = Çinko Oksit

## Resimler

|  |    |
|--|----|
| <b>Resim 4.1.</b> Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması.....             | 47 |
| <b>Resim 4.2.</b> 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması....       | 48 |
| <b>Resim 4.3.</b> 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması...48     |    |
| <b>Resim 4.4.</b> 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması.....  | 49 |
| <b>Resim 4.5.</b> 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması..... | 49 |
| <b>Resim 4.6.</b> Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....               | 50 |
| <b>Resim 4.7.</b> 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....        | 51 |
| <b>Resim 4.8.</b> 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....       | 51 |
| <b>Resim 4.9.</b> 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....       | 52 |
| <b>Resim 4.10.</b> 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....   | 52 |
| <b>Resim 4.11.</b> 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....   | 53 |
| <b>Resim 4.12.</b> 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....  | 53 |
| <b>Resim 4.13.</b> 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması.....  | 54 |
| <b>Resim 4.14.</b> Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması.....             | 55 |
| <b>Resim 4.15.</b> 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması.....      | 56 |
| <b>Resim 4.16.</b> 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması.....     | 56 |
| <b>Resim 4.17.</b> 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması.....  | 56 |
| <b>Resim 4.18.</b> 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması..... | 57 |

## Tablolar

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo:3.1.</b> Nötral formaldehit solüsyonu hazırlamak için kullanılan maddeler ve miktarları.....  | 35 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Doku takip yönteminde kullanılan uygulama süreleri.....  | 36 |
| <b>Tablo 3.3.</b> H&E boyama yönteminin basamaklarına ait uygulamalar ve süreleri.....   | 37 |
| <b>Tablo 3.4.</b> CD68 immünohistokimya boyama basamakları ve süreleri.....  | 38 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Kontrol grubu canlı ağırlık karşılaştırmaları, Paired Sample T Test.....   | 42 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Gruplar arası TOS ve TAS ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD <sup>a</sup> .....                                    | 44 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Gruplar arası AST, ALT ve ALP ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD <sup>a</sup> . Gruplar arasında fark yoktur..... | 45 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Gruplar arası histopatoloji skor ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD <sup>a</sup> .....                            | 47 |

## ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağımlı Olarak Karaciğere Etkisinin  
Araştırılması**

**Mehmet Enes SÖZEN**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ/ KONYA-2017**

Nanopartiküllerin benzersiz fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak kullanımları giderek artmaktadır. Gümüş nanopartikülü en geniş kullanım alanına sahip olan nanopartiküldür. Nanogümüşün antimikrobiyal özellikleri tüketici ürünlerinde ve sağlık ürünlerinde yoğun kullanım alanı bulmasıyla sonuçlanmıştır. Bu yoğun kullanıma bağlı olarak çevreye ve insan sağlığına olası etkileri ile ilgili şüpheler ortaya çıkarmıştır; bu yüzden nanogümüşün biyolojik etkileşimi ve potansiyel toksisitesinin mekanizmasının daha iyi anlaşılması ihtiyacı oluşmuştur.

35 Wistar Albino sıçan her grupta 5 sıçan olacak şekilde 7 gruba ayrılmıştır. Kontrol Grubu (Grup 1) çeşme suyu, Grup 2 20 nm 50 mg/kg, Grup 3 20 nm 300 mg/kg, Grup 4 80-100 nm 50 mg/kg, Grup 5 80-100 nm 300 mg/kg nanogümüş 10 gün boyunca 24 saat aralıklarla oral olarak uygulanmıştır.

Vücut ağırlıkları çalışmanın başlangıcında ve sonunda kaydedilmiştir. TAS, TOS, ALT, AST, ALP, GGT seviyeleri ölçülmüş ve OSI değeri hesaplanmıştır. Parafin kesitler hematoksilin&eoziin ile boyanmış ve alınmış olan diğer kesitler polylysin kaplı lamlara yerleştirilmiştir. CD68 ve TUNEL boyama gerçekleştirilip değerlendirilmiştir. Apoptotik indeks TUNEL boyama ile belirlenmiştir.

Grupların vucüt ağırlığında istatistik olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Her ne kadar bazıları istatistiki olarak anlamlı fark göstermese de TAS, TOS, OSI değerleri düşen boyut ve artan doz ile artış göstermişlerdir. Serum ALT seviyeleri farklılık göstermemiştir. Serum ALP ve AST seviyeleri azalan boyut ve artan doz ile artış göstermiştir. Sıçanların karaciğerinin H&E boyanması ile yapılan histopatolojik değerlendirmede konjesyon, lenfosit infiltrasyonu, nekroz, pleomorfik nükleus ve sinüzoidlerde dilatasyon gözlenmiştir. TUNEL boyama apoptozisin azalan boyut ve artan doz ile arttığını göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları gümüş nanopartikülünün vücutta oksidatif stresi ve karaciğerde toksisiteyi yüksek dozlarda ve küçük boyutlarda oluşturduğunu göstermiştir. Farklı boyutlarda ve yüksek dozlarda nanogümüş kullanırken dikkatli olunmalıdır.

**Anahtar Kelimeler,** Gümüş; histopatoloji; karaciğer; nanopartikülü; TUNEL.





## **ABSTRACT**

**UNIVERSITY OF NECMETTIN ERBAKAN**

**INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES**

**Investigation of The Size and Dose Dependent Effect of Silver Nanoparticle on Liver**

**Mehmet Enes SÖZEN**

**Department of Histology Embryology**

**THE DOCTOR OF PHILOSOPHY OF THESIS / KONYA-2017**

Nanoparticles are increasingly used because of their unique physicochemical and biological properties. Silver nanoparticle is one of the most commonly used nanoparticle. The antimicrobial properties of silver nanoparticles have resulted in their extensive application in consumer and health care products. This extensive application is leading to concerns about the potential environmental and human health impacts, so it is becoming necessary for a better understanding of the mechanisms of silver nanoparticles' biological interactions and their potential toxicity.

35 Wistar Albino rats were randomly divided into five groups of 7 rats each. In this experiment Control Group (Group 1) tap water; Group 2 20 nm 50 mg/kg; Group 3 20 nm 300 mg/kg; Group 4 80-100 nm 50 mg/kg; Group 5 80-100 nm 300 mg/kg anosilver received via gavage for 10 days at 24 hour interval.

The body weights recorded in the beginning and at the end of the experiment. Blood serum TAS, TOS, ALT, AST, ALP, GGT levels were determined and OSI parameters were calculated. Paraffin blocks were stained with hematoxylin&eosin. Staining with CD 68 and TUNEL was performed and evaluation was done. Apoptotic index was evaluated with TUNEL.

There were no statistically significant differences in the body weight of the groups. Even some of them did not show statistically significant difference, serum TAS, TOS and OSI values showed increase with the decreased size and increased dose. Serum ALT levels were not showed differences. Serum ALP and AST levels were increased with the decreased size and increased dose. Congestion, lymphocyte infiltration, necrosis, pleomorphic nucleus, dilation in sinusoids were visualized by

histopathologic examination of rats' liver by H&E staining. TUNEL staining showed that apoptosis increased with the decreased size and increased dose.

These results of present study showed silver nanoparticle may have oxidative stress in the body and toxicity in the liver at high doses and small sizes. Attention must be paid when using different sizes and high doses of nanosilver.

**Key Words,** Histopathology; Liver; Nanoparticle; Silver; TUNEL.



# 1. GİRİŞ

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KARACİĞER

#### 2.1.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer vücudumuzun en büyük iç organı olup yetişkindeki ağırlığı 1,5-2 kilogram (kg) kadardır ve toplam vücut ağırlığının %2-%3'ünü oluşturur; yenidoğanda ise vücut ağırlığının %10 kadarını oluşturur. Karın boşluğunun sağ üst kadranda diyaframın hemen altında bulunmaktadır (Yıldırım 2004). Karaciğer yarım elipsoid şekilli ve kırmızı-kahverengi renklidir. Karaciğer yumuşak yapıya sahip bir organdır ve bunun da etkisiyle vücutta dalaktan sonra en rüptürabl ikinci organ olarak değerlendirilmektedir. Karaciğerin üst yüzü diyaframın şekline uyar ve *facies diaphragmatica* ismini alır. Alt yüzü ise çeşitli karın içi yapılarla temas eder ve *facies visceralis* olarak adlandırılmaktadır. Karaciğer viseral yüzdeki yarık ve oluklara bağlı olarak anatomik olarak dört loba ayrılmıştır, bunlar sağda *lobus hepatis dexter*, solda *lobus hepatis sinister*, önde *lobus quadratus*, arkada *lobus caudatus* olarak yerleşmiştir. Karaciğer kanlanma ve safra drenajına göre ise sekiz segmente ayrılmaktadır ve cerrahi müdahalelerde bu sınıflandırma göz önünde tutulmaktadır (Yıldırım 2014).

Karaciğerin diyafragmatik yüzde diyafram ile temas ettiği alanlar (Yıldırım 2004) ve viseral yüzde safra kesesi, porta hepatis ve vena cava inferior ile temas ettiği alanlar dışındaki kısımları periton ile sarılmıştır ve dolayısıyla karaciğer intraperitoneal bir organdır (Sarsılmaz 2000). Peritonun altında karaciğeri çepeçevre saran bağ dokusundan kuvvetli fibröz kapsül bulunmaktadır ve buna Glisson kapsülü adı verilmektedir. Glisson kapsülü karaciğer parankimi içerisine tam olmayan uzantılar göndererek hem karaciğerin şeklini korur hem de karaciğeri lob ve lobüllere ayırır (Sancak ve Cumhuriyet 2008).

Karaciğerin alt yüzünde lobların arasında karaciğere giriş çıkış yapan yapıların geçtiği alan *porta hepatis* bulunur. *Porta hepatis* ön solda *arteria*

*hepatica propria*, ön sağda *ductus hepaticus communis*, arkada *vena porta* ve dağınık olarak *pleksus hepaticus* ve lenf damarları bulunmaktadır (Sarsılmaz 2000).

Karaciğer torasik kanal aracılığı ile lenf sıvısı üretiminin %25-50'sinden sorumludur. Karaciğerdeki lenf öncelikli olarak hepatik sinüzoidlerden ve daha az olarak da peribiliar pleksustan kaynaklanmaktadır. Sıvı buradan perilobüler Mall aralığına girmeden önce sinüzoidlerin dışına Disse aralığına ve sonra portal yolların interstisyel alanına, sublobüler venler ya da hepatik kapsüle geçer. Karaciğerden ekstrahepatik lenf nodlarına lenfatik drenaj kompleks ve öngörülemezdir ancak genellikle yüzeysel ve derin lenfatik yollar olarak gruplandırılabilirler (Yong ve ark. 2016).

### **2.1.2. Karaciğer Histolojisi**

Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimleri karaciğer lobülleridir ve üç farklı karaciğer lobülü vardır.

**Klasik Karaciğer Lobülü:** Köşelerinde portal alan, ortasında santral ven bulunan altıgen şeklindeki lobüldür. Santral venden başlayarak tek sıra halinde diziler oluşturan ve birbiri ile anastomozlaşan karaciğer kordonlarına hepatik kordonlar adı verilir. Portal triad adı da verilen portal alanlar bir hepatik arter, bir portal ven, bir safra kanalı, lenf damarlarını ve sinirleri içerir.

**Portal lobül:** Komşu üç santral venin birleşmesiyle oluşan ortasında portal alanın bulunduğu üçgen şekilli lobüldür. Aynı portal alana safra sentezleyen hepatositleri çevreleyen alandır.

**Karaciğer Asinusu:** İki portal alan ile iki santral venin birleşmesiyle oluşan lobüldür. Asinus üç zondan oluşmaktadır, iki portal alan arasındaki bölgeye yakın alan 1. zon, santral ven etrafındaki bölüm 3. zon ve arada kalan alan 2. zon olarak isimlendirilir. Farklı zondaki hücreler birbirinden farklı aktiviteye sahiptir ve birbirinden farklı etkilere maruz kalır ve dolayısıyla birbirinden farklı organel dağılımı vardır. Bunlara bağlı olarak zararlı etmenlerden de farklı oranda etkilenirler (Eşrefoğlu 2016).

Karaciğere gelen kanın dörtte üçü portal ven ile gelir ve bu kan besince zengin, oksijen (O<sub>2</sub>)'ce fakirdir, kanın dörtte biri ise hepatik arter ile gelir ve bu kan

O<sub>2</sub>'ce zengindir. Karaciğere gelen kan portal alandaki hepatik arter ve portal venden sinüzoidlere ve oradan da santral vene geçer, safra akımı ise bu akıma ters yöndedir. Sinüzoidler kesintili bazal laminaya sahip pencereci endotel hücreleri ile çevrelenmiştir ve buna bağı olarak plazma sinüzoidlerin dışına, Disse aralığına geçer ve bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları ile retiküler liflerden oluşmuş bağ dokusu bulunmaktadır. Hepatositlerin mikrovillusları hepatositlerle plazma arasında doğrudan madde alışverişine olanak sağlar. Sinüzoidlerde ayrıca Kupffer hücresi adı verilen yıldız biçimli makrofajlar da yer almaktadır. Disse aralığında İto hücreleri de denilen yağ ve yağda çözünen vitaminleri depolayan hepatik yıldız (stellat) hücreleri bulunur (Mescher 2015).

Safra kanalikülü komşu karaciğer hücre membranlarının kıvrılmasıyla oluşan safra akışının gerçekleştiği küçük kanalcıklardır. Safra kanalikülü safrayı safra kanallarına (Hering kanalları) iletir. Hering kanallarını alçak kübik kolanjiositler döşemektedir. Hering kanalları safrayı portal bölgedeki safra kanallarına iletir. Safra kanalları tek katlı kübik şekilli, çok sayıda mikrovillus içeren kolanjiositlerle çevrilidir. Safra kanalları birleşerek hepatik kanalları oluşturur. Hepatik kanallar yassı kolanjiositlerden oluşan bir epitel ile çevrilidir (Leslie P. Gartner 2016).

### **2.1.2.1. Hepatositler**

Hepatositler karaciğerin parankimal hücreleridir ve karaciğer fonksiyonlarının birçoğundan sorumludur ve toplam karaciğer hacminin %80'ini oluştururlar. Parankimal olmayan karaciğer hücreleri ise toplam karaciğer hacminin sadece %6,5'ünü oluşturmalarına rağmen toplam hücre sayısının %40'ını oluşturmaktadırlar (Kmiec 2001).

Hepatositler polihedral şekilli, merkezi büyük yuvarlak çekirdekli, mitokondriden zengin, eozinofilik sitoplazmalı, zaman zaman çift çekirdekli olabilen hücrelerdir (Mescher 2015). Hepatositlerde oldukça fazla miktarda granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve granülsüz endoplazmik retikulum (AGER) vardır, yine fazla sayıda lizozom, lipid damlacığı ve glikojen içerirler (Leslie P. Gartner 2016).

### **2.1.2.2. Hepatik Stellat Hücreleri**

Hepatik stellat hücreleri (vitamin A depolayan hücreler, lipositler, yağ depolayan hücreler, İto Hücreleri olarak da adlandırılır) hepatik lobüldeki sinüzoidal endotel hücreleri ile parankimal hücreleri arasındaki boşlukta bulunur ve sitoplazmasındaki lipid damlaları içerisinde retinil palmitat olarak tüm vücuttaki A vitamininin %80'ini depolar. Vitamin A depolaması periportal zonda başlar, orta zonda pik yapar ve santral zonda giderek azalır. Bu hücreler fizyolojik koşullarda vitamin A homeostazının düzenlenmesinde esas rolü üstlenmektedir. Bu hücreler ayrıca karaciğer yenilenmesinde de önemli rol oynamaktadırlar. Karaciğer fibrozu gibi patolojik koşullarda hepatik stellat hücreleri A vitaminini kaybeder ve kollajen, proteoglikan ve adeziv proteinler dahil ekstraselüler matriks bileşenlerini çok yüksek miktarlarda sentezlerler. Ekstraselüler matriks bileşiminin üç boyutlu yapısının geri dönüşlü olarak hepatik stellat hücrelerinin morfolojisini, proliferasyonunu ve fonksiyonlarını düzenlediği bulunmuştur (Senoo ve ark. 2017).

### **2.1.2.3. Kupffer Hücreleri**

Kupffer hücreleri sinüzoidlerin içine yerleşmiş, belirgin endositik ve fagositik kapasiteleri olan doku makrofajlarıdır. Kupffer hücreleri yaşlanmış ve hasarlanmış eritrositlerin temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca Kupffer hücreleri çok sayıda enzim ve sitokin salgılamasından da sorumludur (Kmiec 2001). Kupffer hücreleri toplam karaciğer hücre sayısının %10'unu oluşturmaktadır. Karaciğer sinüzoidlerindeki yerleşimine bağlı olarak Kupffer hücrelerinin popülasyon yoğunluğu, morfolojik karakteri ve fizyolojik fonksiyonları değişmektedir. Geniş Kupffer hücreleri periportal zonda bulunmaktadır ve santral zon ile orta zondaki küçük Kupffer hücrelerine göre daha fazla fagositoz, lizozomal proteaz aktivitesi ve biyolojik aktivite mediatörlerinin üretimini gerçekleştirmektedir (Baffy 2009). Kupffer hücreleri salgıladıkları proinflamatuar sitokin interlökin-6 (IL-6) ile hepatositlerden akut faz proteinlerinin üretimini de tetiklemektedir (Abdullah ve Knolle 2017). Kupffer hücrelerinin değişik çap ve uzunlukta sitoplazmik uzantıları vardır ve bu uzantılar lümeni geçmektedir ve endotel hücrelerine doğru ya da Disse aralığına uzanabilmektedir. Uzantılar kan akımı ile doğrudan teması sağlamaktadır. Her hücrede sadece bir tane çekirdek bulunmaktadır. Kupffer hücre sitoplazması çeşitli çap, yoğunluk ve şekilde vakuoller içermektedir (Wisse 1974).

#### 2.1.2.4. Pit Hücreleri

Pit hücreleri karaciğere özgü natural killer hücrelerdir ve sinüzoid lümeninde bulunmaktadır. Pit hücreleri majör doku uygunluk kompleksi (MHC) bağımsız olarak tümör hücrelerini kendi kendilerine öldürürler ve bu anti-tümör aktivitesi interferon gama (IFN $\gamma$ ) sekresyonu ile güçlendirilir (Kmiec 2001). Pit hücreleri çok sayıda küçük granül içermektedir. Bu granüller yuvarlak şekillidir ve içeriği elektron yoğundur, merkezi ise daha da yoğundur. Sitoplazmanın kalan kısmında ise endoplazmik retikulum, küçük bir Golgi aparatı, serbest ribozomlar ve küçük mitokondriler gibi birkaç organel vardır. Pit hücreleri de Kupffer hücreleri gibi çeşitli ve değişken şekillere sahiptir. Pit hücrelerinin yerleşimi Kupffer hücrelerinininkine benzerdir. Kupffer hücrelerinin zıddına Pit hücrelerinin fagositik ve endositik fonksiyonu yoktur (Peng ve ark. 2016).

#### 2.2. NANOPARTİKÜLLER

Nano ön eki bir şeyin  $10^9$ 'da biri anlamına gelmektedir ve doğası sonrasında gelen kelime ile belirlenir (International Organization for Standardization 2015). Nano ön eki Yunanca nanos (cüce) tanımından gelmektedir (Niska ve ark. 2017). Örnek olarak metreyi ele alırsak 1 nanometre (nm)= $10^{-9}$  metredir (Standardization 2017). Nanoskala yaklaşık olarak 1 nm ile 100 nm uzunluğu arasındaki ölçektir (International Organization for Standardization 2015). Bir Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) çift iplikçiği 2 nm (Kessler 2011), standart insan saçı 100  $\mu$ m kalınlığındadır bu 100 nm kalınlığından 1000 kat daha fazladır, su molekülünün büyüklüğü ise 0,1 nm'dir (Niska ve ark. 2017). Bakteriler yaklaşık 500 nm, kırmızı kan hücreleri 6000-8000 nm çapında, makrofajlar 15000-25000 nm, nötrofiller 12000-14000 nm çapındadır (Kim ve ark. 2011), tüm bunlar düşünüldüğünde bu büyüklük birimi daha iyi anlaşılmaktadır.

Nanobilim tek atomlar veya moleküller ya da aynı malzemelerin daha büyük boyutlu hallerinden farklı olarak boyuta ve yapıya bağlı özelliklerin nano ölçeğinde maddenin araştırılması, keşfi ve anlaşılmasıdır. Nanoteknoloji büyüklüğe ve yapıya bağlı özellikleri kullanmak için nano ölçekte maddeyi manipüle ve kontrol etmek için bilimsel bilginin kullanılmasıdır. Nano materyal herhangi dış boyutu nano

ölçekte olan ya da içyapısı veya yüzey yapısı nano ölçekte olan malzemelerdir (International Organization for Standardization 2017).

Nano ölçekte bir veya daha fazla dış boyuta sahip cisimlerin, onları geleneksel hallerinden farklı kılan kilit bileşenler haline getiren özellikleri vardır.

Ultrafine parçacıklar aerodinamik çapı 100 nm'den az olan parçacıklardır, fine parçacıklar aerodinamik çapı 2,5 µm'den küçük parçacıklar, coarse parçacıklar aerodinamik çapı 10 µm'den küçük parçacıkları tanımlamak için kullanılır.

Nanopartikül her üç dış boyutu da nano ölçekte olan parçacıklardır. Nanofiber iki boyutu nano ölçekte olan, kalan diğer boyutu ise daha büyük olan nano-nesnelere. Nanoplate bir boyutu nano ölçekte olan, diğer iki boyutu ise daha büyük olan nano-nesnelere. Nanotüpler içi boş nanofiberlerdir (International Organization for Standardization 2017).

### **2.2.1. Tarihçe**

Nanometre kavramı ilk olarak 1925'te Nobel ödülünü kazanan kimyacı Richard Zsigmondy tarafından ortaya konuldu. Parçacık boyutunu ifade etmek için nm kavramını açıkça ortaya koydu ayrıca mikroskop kullanarak altın kolloidi gibi parçacık boyutunu ölçen ilk kişiydi (Hulla ve ark. 2015).

Kaliforniya Teknoloji Enstitüsünde profesör olan Nobel ödüllü fizikçi Richard P. Feynman'ın Amerikan Fizik Derneğinin yıllık toplantısında 29 Aralık 1959 yılında 'Aşağıda Çok Yer Var Fiziğin Yeni Alanına Davet' konferansı nanoteknolojinin başlangıç noktası kabul edilmektedir. R. P. Feynman bu konuşmasında maddeleri atomik seviyede manipüle etme kavramını ortaya atmıştır.

Nanoteknoloji terim olarak ilk defa Japon bilim adamı Norio Taniguchi'nin 'Nanoteknolojinin Temel Konsepti Üzerine' adlı makalesinde 1974 yılında kullanılmıştır.

1981 yılında Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binning tarafından Tarama Tünel Mikroskobu keşfedilmiştir.



1986 yılında; G. Binnig, C. F. Quate ve Ch. Gerber Atomik Kuvvet Mikroskopunu keşfetmişlerdir ve bu keşif sebebi ile fizik alanında Nobel ödülü kazanmışlardır.

1990 yılında IBM’de çalışan Don Eigler ve Erhard Schweizer isimli bilim adamları, 35 Xenon atomunu işleyerek nikel bir yüzeye “IBM” logosunu yazmışlardır. Bu logonun cümle sonuna konulan nokta işaretinin kapladığı alana yaklaşık 350 milyon kez sığabileceği açıklanmıştır.

1991 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde National Scientific Fund ilk nanoteknoloji programını faaliyete geçirmiştir. 2000 yılında nanoteknoloji konusunda önemli bir adım olarak nitelendirilen Ulusal Nanoteknoloji İnisiyatifi, dönemin ABD Başkanı Bill Clinton’un direktifleriyle oluşturulmuştur. Bu tarihten itibaren dünyada birçok ülke kendi inisiyatiflerini oluşturmaya başlamışlardır (Fanfair ve ark. 2007, Tolochko 2009).

### **2.2.2. Nanopartiküllerin Özellikleri**

Nanomatyallerin bazı özellikleri (molekül yapısı, yüzey alanı, partikül boyutu ve morfolojisi, yüzey kimyası, aglomerasyon/agregasyon durumu, kristal yapısı) tüm nano materyallere uygulanabilirken, bazı özellikleri (yoğunluk ve gözeneklilik gibi) ise uygulanamaz, nano materyallerin özellikleri incelenirken tüm nanomatyallere uygulanabilenlerine bakılmaktadır (Stefaniak ve ark. 2013). Nanopartiküller büyük boyuttaki materyallere göre oldukça değişik özelliklere sahiptirler. Örneğin 5 nm altın nanopartikülleri (AuNP) ışığı güçlü bir şekilde absorbe ederken 520 nm altın yığını ışığı geri yansıtır. Titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) partikülü 50 nm altındaki boyutlarda beyaz rengini kaybeder. Bakır normalde ışığı geçirmezken nano boyutta saydam bir hal alır. Alüminyum normal boyutta yanıcı değilken nano boyuttaki alüminyum yanıcıdır (Klien ve Godnic-Cvar 2012). Şam çeliği 3. ve 7. yüzyıllarda Güney Asya ve Ortadoğu kılıç endüstrisinde; etkileyici gücü, kırılmaya karşı dayanıklılığı ve son derece keskin kenarları ile önemli yer edinmiştir. Bu çeliğin nanoteller ve karbon nanotüpler içeren yapısı ile güçlendirildiği bilinmektedir (Reibold ve ark. 2006). Lycurgus kupası 4. yüzyılda üretilmiş gümüş altın alaşım nanopartikülleri içeren ve bu nanopartiküllere bağlı olarak ışık içinden geçtiğinde yakut kırmızısı görünen, ışığı yansıttığında ise yeşil

görünen tarihi nanopartikül örneklerindedir (Barber ve Freestone 1990). Nanopartiküllerin dikkat çekici değişik davranışları bu nanomateryallerin canlı organizma ile temas edince sağlık üzerine yan etkiye sebep olabileceği şüphesini ortaya çıkardı (Klien ve Godnic-Cvar 2012). Yoğun maruziyete de bağlı olarak nanopartiküllerin toksisitesinin ve bu toksisitenin nanopartikül özelliklerinden nasıl etkilendiğinin araştırılması ihtiyacı ortaya çıktı.

### **2.2.2.1. Boyut**

Nanopartikülün boyutu küçüldükçe kütle başına düşen nanopartikül adedi artar. Yüzey alanındaki artış ayrıca partikülün yüzeyindeki atom sayısını da artırır, bu da biyolojik reaktivite artışına ve aynı materyali içeren daha büyük partiküllere göre aşırı derecede değişik davranışlara yol açar (Klien ve Godnic-Cvar 2012). Nanopartiküller küçük ebatları ve geniş reaktif yüzeyleri ile daha iyi doku penetrasyonuna sahiptirler (Abdelhalim ve ark. 2015). Nanopartikül boyutu nanopartikülün hücreye girişinde oldukça önemli rol oynar daha küçük nanopartiküller genel olarak daha büyüklere göre hücreye daha fazla girmekle birlikte bu girişte optimal bir nanopartikül boyutu vardır ancak bu boyutun ne olduğu ile ilgili literatürde farklı değerlendirmeler vardır (Beddoes ve ark. 2015).

Yapılan bir çalışmada 10, 20 ve 50 nm boyutundaki AuNP'leri, 3 ve 7 günlük süreler ile 50 ve 100 mikrolitre uygulanmıştır ve bunun sonucu olarak uygulama süresinin ve uygulanan miktar önemli olmakla birlikte asıl önemli olanın boyut olduğu bulunmuştur. AuNP'ünün uygulanması ile Kuppfer hücreleri daha belirginleşmiş ve sayıca artmıştır. Bu durum en küçük boyut olarak kullanılan 10 nm olan grupta daha fazladır. Bazı şişmiş hepatositlerde yağlı dejenerasyon gözlenmiştir ve bu da 10 nm boyutlu AuNP'ünde daha fazladır. İyi tanımlanmış sporadik benekli nekrozis 10 nm boyutlu AuNP'ü uygulananlarda 20 nm boyutlu AuNP uygulananlara göre daha fazla miktarda saptanmış ancak 50 nm boyutlu AuNP uygulananlarda nekroz görülmemiştir. Tüm bunlar küçük boyutlu nanopartiküllerin daha fazla hasara neden olduğunu göstermiştir (Abdelhalim ve Jarrar 2012).

Memeli tümörlerindeki anormal damarları vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-2'yi bloke ederek tamir etmek, 12 nm çapındaki gibi küçük nanopartiküllerin dağılımını arttırırken, 125 nm çapındaki gibi büyük

nanopartiküllerin dağılımına engel olmaktadır. Bu yüzden kanser terapisi için daha iyi tümör penetrasyonu ile küçük nanopartiküllerin kullanımının daha doğru olduğu düşünülmektedir (Chauhan ve ark. 2012).

AuNP'lerinin organ dağılımı, nanopartikülün boyutuna bağlı olarak değişmektedir; küçük boyutlu AuNP'lerinin (5-15 nm) büyük boyutlu olanlara (50-100 nm) göre daha geniş bir organ dağılımı vardır (Abdelhalim ve ark. 2015).

70-100 nm gibi daha geniş çaptaki nanotüpler, 30 nm çapındaki daha küçük nanotüplere göre sitoskeletal stres ve osteoblasta benzer hücrelere diferansiyasyonunu seçici şekilde destekler (Kshitiz ve ark. 2012).

15 nm çaptaki gümüş nanopartikülünün ex vivo rat derisinden 102 ve 198 nm'lik gümüş nanopartiküllerine oranla daha iyi penetre olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 6 nm boyutundaki daha küçük moleküllerin hayvanlardan renal ekskresyon ile temizlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca 30 nm'den daha büyük nanopartiküllerin karaciğerde tutulumunu göstermişlerdir (Kumar ve ark. 2010). Terapötik nanopartiküllerin tasarımı yapılırken çözünemeyen partiküllerin boyutunun renal temizlenme için 6 nm'den küçük olması gerektiği akılda tutulmalıdır (DeLouise 2012).

Nanopartiküllerin sıçan böbreğinden ekskrete edilebilmesi için nanopartiküllerin son hidrodinamik boyutunun 65,5 nm'den küçük olması gerekmektedir. Daha büyük AuNP'leri ise idrar ile atılamaz; kandan retiküloendotelial sistem aracılığı ile temizlenerek karaciğer ve dalakta birikir (Abdelhalim ve ark. 2015). Renal glomerüler bazal membranın çapı 43 nm, kapiller porlar 5,5 nm, nükleer porlar 9 nm civarındadır (Kim ve ark. 2011).

Yapılan bir çalışmada AuNP'ü 3 ve 7 günlük sürelerde 50 ile 100 mikrolitre uygulanmıştır. Glomerüler değişikliklerin 7 günlük süre ile uygulanan 10 ve 20 nm'lik partiküllerde görüldüğü ancak 50 nm'lik partikülde görülmediği bildirilmiştir. Renal hücrelerdeki vakuolar dejenerasyon 100 mikrolitre uygulanan 10 ve 20 nm'liklerde belirginken 50 nm'likte ya daha az belirgindir ya da belirgin değildir. Bu değişiklikler boyuta bağlıdır, küçük olan nanopartiküller daha fazla zarar verir ve bu zarar uygulama zamanı ile de ilişkilidir (Abdelhalim ve Jarrar 2011).

20 nm'den küçük demir oksit nanopartiküllerinin elektronları tek yönde dönerken, 20 nm'den büyükler her iki yönde de dönmektedir. Bu yüzden Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR) yönteminde aynı sinyali oluşturmak için 20 nm'den küçük partiküllerin çok daha az miktarı gerekmektedir, bu da daha az toksisite anlamına gelmektedir (Kim ve ark. 2011).

#### **2.2.2.2. Kaplama**

Boyuta ilave olarak nanopartiküllerin kaplaması da hücresel toksisite ve genotoksisite için çok önemlidir. Çeşitli kaplamalar yapılarak nanopartiküllere sıvılarda çözünürlük artışı, daha yüksek biyo-uyumluluk ve daha az toksisite kazandırılmaya çalışılır. Bu kaplamalar partikül yüzeyini modifiye ettiği için partikülün genotoksisite ve inflamatuvar etkileri de kaplamaya göre değişir. 25 nm polisakkarit kaplı nanogümüş fare hücrelerinde DNA tamir proteinlerinin miktarını artırır ve tümör supresör p53 proteinlerini upregüle ederken, aynı boyuttaki kaplanmamış nanogümüş ise protein ekspresyonunda değişimle sonuçlanmamıştır. Yazar nanopartikülleri polisakkarit ile kaplamanın aglomerasyona eğilimi engellediğini, bunun da yüzey alan artışı ile sonuçlandığını ve hücre membranı ile teması kolaylaştırdığını öne sürmüştür (Klien ve Godnic-Cvar 2012).

Slica ile kaplanmış ve kaplanmamış kobalt ferrit ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) nanopartikülü intravenöz olarak injekte edilince karaciğerde toplanmış, sadece kapsız olan  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  DNA hasar ve onarımının, karsinogenezisin, hücre ölümünün, büyüme durmasının, oksidatif stresin ve inflamasyon genlerinin ekspresyonunun artmasına neden olmuştur (Klien ve Godnic-Cvar 2012).

Serum medyumunu ile inkubasyonun nanopartiküllerin boyutunu serum proteinlerinin nanopartiküle bağlanması nedeniyle 15 nm'den daha fazla arttırdığı gözlenmiştir (Kumar ve ark. 2010).

Pratap C. Naha ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada test ettikleri AuNP'lerinin çoğunun yüksek oranda uyumlu olduğunu, sadece bir nanorod ve DNA kaplı nanokürenin uyumsuz olduğunu göstermişlerdir. İnductively Coupled Plasma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES), Bilgisayarlı Tomografi (BT), Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ile bazı AuNP'lerinin hızla hücrelere girdiğini ve lizozom/endozomlarda lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırılan AuNP'leri

içinde hücreye alınan miktarının partikül boyutundan ve uygulama dozundan ziyade yüzey kaplama materyaline bağlı olduğunu göstermişlerdir.

### 2.2.2.3. Yüzey Alan

Nanomateryaller aynı maddenin daha büyük haline göre çok daha fazla yüzey alanına sahiptir. Örneğin 1 miligram (mg) 10 µm çaplı karbon partikülü yaklaşık olarak 270 m<sup>2</sup> yüzey alanına sahipken; aynı kütledeki 10 nm çaplı partikül 270.000 m<sup>2</sup> yüzey alanına sahiptir (Maynard ve ark. 2011).

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), ABD'nin TiO<sub>2</sub>'e yaklaşımı toksisitenin kristal yapısından ya da partikül üzerindeki kaplamadan ciddi anlamda etkilenmediği bulgusuna dayanmaktadır, buna göre nano TiO<sub>2</sub>'in toksisitesinde asıl faktör partikülün yüzey alanıdır (van Broekhuizen ve ark. 2012).

Nanopartiküllerin genotoksik etkileri sadece boyuta değil, yüzey modifikasyonlarına, maruziyet şekline ve maruziyet süresine de bağlıdır (Klien ve Godnic-Cvar 2012).

### 2.2.2.4. Şekil

Şekillerine bağlı olarak nanopartiküller kendilerine özgü özelliklere sahip olduğu için günümüzde artan oranda üretilmektedirler. Nanopartiküllerin hücreye penetrasyonunda şekilleri önemlidir. Sferosilindir şeklindekiler, konik, kübik veya piramidal şeklindekilere göre daha efektif şekilde hücreye girer (Beddoes ve ark. 2015).

Kübik nanozeolit partikülleri küresel veya yarı kübik morfolojidekilere göre açıkça daha fazla toksisite gösterir. Keskin kenarlı nanozeolit partiküllerinden hücre membran bütünlüğüne zarar vererek hücre ölümüne yol açması beklenir (Kihara ve ark. 2011).

HEK293T ve HeLa hücre serileri ile yapılan bir çalışmada Au nanoküre ve nanorodların konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksisite gösterdiği gözlenmiştir. Au nanoçiçekler, nanoprizma, nanoyıldızların HeLa hücre serisine uygulanan nanopartikül dozlarında görece olarak zararsız olduğu gösterilmiştir.

Sadece en yüksek doz uygulanan nanoçiçeklerin en uzun maruziyet sonucunda ölümcül olduğu gösterilmiştir (Wozniak ve Malankowska 2017).

#### **2.2.2.5. Yük**

Yüzey yükündeki değişimler nanopartiküllerin biyodistribüsyonunu ciddi anlamda etkilemektedir (Kumar ve ark. 2010).

Pozitif yüklü nanopartiküller negatif yüklü ve yüksüz nanopartiküllere göre membranı geçmede daha etkilidirler (Beddoes ve ark. 2015).

Pozitif yüklü nanopartiküller negatif yüklü olanlara göre katyonik yüzeyin negatif yüklü hücre membranına güçlü afinitesine bağlı olarak daha toksiktirler. Buna rağmen yüzey yükü ile nanozeolit sitotoksik etkisi arasında korelasyon gözlenmemiştir. Bu nanozeolitlerin yüklerinin sitotoksikite için anahtar rol oynamadığını göstermektedir (Kihara ve ark. 2011).

#### **2.2.2.6. Protein Korona**

Nanopartiküller vücuda bir kez girdiklerinde biyolojik çevreyle etkileşime girerler ve protein korona ile çevrelenirler. Bu da immün yanıt oluşmasına neden olabilir ve nanopartikül toksisitesini etkileyebilir. Yani nanopartiküllerin tüm özellikleri, vücut sıvılarında kendilerini kaplayan protein koronadan etkilenir. Protein korona sıkı ve gevşek olmak üzere ikiye ayrılır. Sıkı protein korona nanopartikül yüzeyine sıkıca bağlanırken gevşek protein korona ise nanopartikül yüzeyine bağlanmış olan sıkı protein korona ile zayıf protein-protein etkileşimi ile bağlanır. Özellikle spesifik reseptörler ile etkileşmesi için nanopartikül yüzeyinde fonksiyonilize edilmiş moleküllerin protein korona ile kaplanması hücre hedeflemesi için önemli problem oluşturmaktadır. Yani sonuç olarak protein korona nanopartikül hücre ilişkisini etkilemektedir (Corbo ve ark. 2016).

Farklı boyutlarda ve farklı yüzey kaplamasına sahip AuNP'lerin hepatositlere alımı ve daha sonra burada oluşturacakları sitotoksikite, protein koronaya yüksek oranda bağlıdır. İnsan Serum Albümini ile oluşturulan protein koronanın hem hücrelere alımı hem de biyolojik etkileri düşürdüğü bulunmuştur (Choi ve ark. 2017).

Protein koronanın içeriğinin belirlenmesinde sadece partikül maddesi, boyutu ve yüzey özellikleri değil, ayrıca maruziyet süresi ve nanopartikül dağılımındaki fizyolojik sıvının görece oranı da rol oynamaktadır. Farklı fizyolojik sıvılarla etkileşmesine bağlı olarak farklı uygulama yolları da protein korona kompozisyonunu etkilemektedir. Henüz protein korona ile ilgili kesinleşmiş kurallar bulunmamaktadır (Westmeier ve ark. 2016).

### **2.2.2.7.Nanopartiküllerle İlgili Diğer Özellikler**

Agregasyon miktarının artması nanogümüşün emilim miktarını etkilemektedir çünkü agregasyon miktarı artınca nanogümüşün boyutu artmaktadır ve buna bağlı olarak da nanogümüşün emilimi değişmektedir (Loeschner ve ark. 2011).

Üretilmiş nanopartiküllerin artan şekilde kullanımı hükümet yetkililerini, endüstriyel organizasyonları ve sivil toplum örgütlerini risk yönetimi için tedbir prensiplerinin uygulamasının savunucusu yaptı, endüstriyel olarak üretilen nanomateryaller genellikle risk verisindeki eksikliklerle karakterizedir, bu yüzden güvenli maruziyet seviyeleri belirlenmemektedir (van Broekhuizen ve ark. 2012).

Nanopartikül boyut ve şeklinin birbirinden ayrı etkilerinin hücre tipi ile yakından bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Di Bucchianico ve ark. 2013).

Partikül boyutu nano boyuttaki materyallerin çevresel, sağlık ve güvenlik halinin değerlendirmesinde kritik bir parametredir. Aslında boyuttaki değişimlerin diğer özellikleri de değiştirmesine bağlı olarak bu ilişkinin matematiksel olarak tahmin edilebilir olmasına yol açmaktadır. Biyolojik sistemler genellikle su içerir, bu partikül boyutunda artışı destekler, ayrıca biyosümfaktanları da içerir ki bu da partikül topluluklarının dağılmadığını destekler. Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin biyolojik etkileri hakkında hala birçok çelişki mevcuttur (Di Bucchianico ve ark. 2013).

Woźniak ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlardan farklı boyut ve şekillerdeki AuNP'lerinin belirli konsantrasyon ve uygulama koşullarında biyo-uyumluluk gösterebileceğine dolayısıyla bu şartlarda tıbbi uygulamalarda kullanılabilmesi kanısına ulaşımlardır.

### 2.2.3. Nanopartikül Maruziyeti

İnsanlar her zaman küçük partiküllere kum fırtınaları, volkanik küller ve doğal süreçler yoluyla maruz kalmışlardır. Bunları her nefesimizle inhale edip, her yudumumuzla içmişizdir. Aslında Dünyadaki her organizma devamlı olarak nm boyutundaki parçacıklarla karşılaşır (Buzea ve ark. 2007).

Nanopartiküllerin laboratuvarlardan kliniklere başarılı bir şekilde taşınması nanopartiküllerin *in vivo* biyomedikal uygulamalardan biyo-distribüsyon, temizlenme ve biyo-uyumluluklarına uzanan çok yorucu ve özenli çalışma gerektirmektedir. Biyo-distribüsyon çalışmaları nanopartiküllerin karaciğer, dalak ve midede birikiminin böbrek, kalp ve akciğere göre daha fazla olduğunu göstermektedir (Kumar ve ark. 2010).

Birçok gıdada ve gıda ile temas eden ürünlerde nanomateryaller bulunmaktadır. Yüzlerce yıldır gıdalar doğal olarak oluşan nanogıda malzemeleri içermektedir. Buna örnek olarak mayonez verilebilir. Birçok nanogıda malzemeleri çok sayıda diyet takviyelerinde gıda ilavesi olarak üretilmiş nanogıdalar bulunmaktadır. Bu nanogıdalar yiyeceğin görünüşünü, rengini, lezzetini, tatlı/ekşi algısını, kokusunu değiştirmek, gıda koruyucusu olmak, absorpsiyonu azaltmak veya artırmak gibi çeşitli amaçlar için kullanılabilirler (Hobson ve ark. 2016).

Nanopartiküller ile biyolojik maddelerin, özellikle hücrenin arasındaki ilişkiyi anlamak, nanopartiküllerin tıpta ve diğer alanlarda kullanımının artmasına bağlı olarak giderek artan oranda önem kazanmaktadır (Beddoes ve ark. 2015).

Kozmetikte metal ve metal oksit nanopartikülleri kremlerde, deodorantlarda, sabunlarda ve şampuanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin güzellik endüstrisinin ve güncel anti-aging programlarının geleceği olduğu düşünülmektedir (Niska ve ark. 2017).

Üretilmiş nanomateryallere maruz kalan insanlar sadece nano ürünlerin kullanıcıları değildir, ayrıca bu materyalin sentez sürecinde, ileri işlemlerinde, taşınması sırasında ve uygulaması süresince bu materyale maruz kalan nanoteknoloji alanında çalışan insanlardır (Brouwer 2010).



#### 2.2.4. Nanopartiküllerin Uygulamaları

Nanotıp tanı, tedavi ve hastalıkların engellenmesi için nano yapılı malzemelerin uygulamalarının araştırılmasıdır (Singh ve ark. 2017). Nanopartiküller ilaç taşımak için, görüntüleme ajanı olarak, hastalıkların tanı ve tedavisi için terapötik olarak üretilmektedirler (DeLouise 2012).

Nanopartiküllerin medikal uygulamalarında hücelere alınan ve bağlanan medikal olarak etkili nanopartiküller uygulamanın etkinliğinin belirlenmesinde ve nanopartikülün toksisitesinde de önemlidir (Ivask ve ark. 2017).

TiO<sub>2</sub> nanopartikülü güneş kremlerinin önemli bileşenlerinden biridir ve ultraviyole (UV) ışınları absorbe ederek deriyi zararlı UV ışın maruziyetinden korur. Ayrıca birçok kozmetik ürününde de kullanılmaktadır.

Silika dioksit (SiO<sub>2</sub>) viskoziteyi düşürmek ve asitliği düzenlemek için gıdalara ilave olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Düşük ağırlığına bağlı olarak karbon nanotüpler spor malzemelerinde kendisine geniş kullanım alanı bulmaktadırlar (Shin ve ark. 2015).

Birçok hasta ölümcül beyin tümörü hastalığına yakalanmış durumdadır ve ilaçların beyine geçişi kan-beyin bariyeri yüzünden istenilen seviyede olamamaktadır. Bu da beyin tümörlerinin etkin tedavisi için en önemli sorunların başında gelmektedir. Nanopartiküller beyin kapiller endotelindeki spesifik reseptörleri hedefleyen sistemler olarak üretilerek bu sorun aşılmaya çalışılmaktadır, böylece nanopartiküller beyin tümörlerinde çeşitli ilaçların taşıyıcıları olarak beyin tümörlerinin tedavisinde gelecek vadetmektedirler (Sun ve ark. 2017).

Manyetik hipertermi tedavisi (manyetik ısıtma tedavisi): Alternatif manyetik alan tedavisi ile hedeflenebilir manyetik nanopartiküller kullanarak tümör hücrelerinin ısıtılmasıyla oluşan bir kanser tedavi yöntemidir. Mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da artmış ısı ile irreversibl protein denaturasyonu, DNA hasarı ve sonuçta da apoptozisin tetiklenmesi şeklinde olduğu düşünülmektedir. Manyetik nanopartiküller ilaçları hedef bölgeye götürmek için bir taşıyıcı görevi görebilmektedirler. Özellikle kök hücre tedavilerinin uygulamasının artması ile birlikte kök hücreleri takip etmek için manyetik nanopartiküller

kullanılabilmektedirler. Ayrıca manyetik nanopartiküller tanı amaçlı kullanılan MR görüntüleme yönteminde kontrast ajan olarak da kullanılmaktadırlar. AuNP X-ray görüntüleme yönteminde kontrast ajanı olarak kullanılabilmektedir (Kim ve Jeong 2017).

Aterosklerotik plağın erken belirlenmesi hastalığın ilerleyişi açısından önemlidir ve bu amaçla MR sık kullanılan bir yöntemdir. Demiroksit nanopartikülü bu amaçla yapılan MR da kontrast ajanı olarak kullanılmaktadır (Montiel Schneider ve Lassalle 2017).

Nanopartiküllerin akut koroner sendrom ve inme vakalarında tanı süresini kısaltma ve riskli aterosklerotik plakların tanınmasında doğruluk oranlarını artırmak amacıyla kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca iskeminin erken işaretlerinin belirlenmesi ve hücre hasarını engellemek için nanomateryal geliştirmek amacı da yine önceliklerdendir. İnfarkt gerçekleşmişse bile nanopartiküller iskemi debrisinin temizlenmesinde görevlendirilmek üzere üretilebilirler (Kim ve ark. 2011).

Lipid kaynaklı nanopartiküllerin herhangi terapötik etkisi yoktur ve kurkumin ile kuersetin gibi ilaçları taşıma kapasitelerinden dolayı yoğun olarak kullanılmaktadırlar (Berthet ve ark. 2017).

Seramik nanopartiküller intrinsik iyileştirme sürecine katılırlar ve kurkumin gibi antioksidan, antiinflamatuvar, antiinfektif özellikleri olan ilaçları taşıyabilirler (Berthet ve ark. 2017).

Nanoaşılardan geleneksel aşılara göre birçok avantaj sunmaktadır çünkü geleneksel aşılardan kısıtlamalarının (zayıf immünojenite, *in vivo* kararsızlık, toksisite ve multipl uygulama ihtiyacı) üstünden gelmektedir. Fagositik hücrelerce alınımına bağlı olarak humoral ve hücreli immün yanıt daha fazla ortaya çıkar. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları çeşitli immün hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörleri hedefleyerek spesifik ve seçici immün yanıt ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca nanopartiküller, antijenlerin ve adjuvanların yavaş ve sürekli salınımına olanak sağlamaktadır. Ayrıca nanoaşılardan soğuk transfer zinciri ve depolama ihtiyacını ortadan kaldırabilir (Singh ve ark. 2017).

Metal ve metal oksit nanopartikülleri dermatoloji ve kozmetikte özellikle de bakteriyel ve fungal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde, güneşin zararlı etkilerinden korunmada ve deri hücrelerinin onarım sürecini hızlandırarak skarların görünürlüğünü azaltmada giderek artan oranda kullanılmaktadır (Niska ve ark. 2017).

### **2.2.5. Nanopartikülün Vücuttaki Dağılımı**

Nanoskalada partiküllerin inhalasyonu, gastrointestinal absorpsiyonu, kan ve lenf damarlarıyla dağılımı, hücrelere alınımı, hücre içinde hareketi, hücre çekirdeğine girişi büyük partiküllere göre çok daha kolaydır (Hobson ve ark. 2016).

Nanopartiküllerin diğer materyallere ve daha büyük partiküllere göre organizmada çok daha fazla dağılıma potansiyeli bulunmaktadır. Nanopartiküllerin sıvılarla, hücrelerle ve doku ile çeşitli etkileşimleri, giriş yoluna ve sonrasında da dağılım yolu göz önüne alınarak düşünülmelidir (Maynard ve ark. 2011).

Nanopartiküller vücuda dermal, inhalasyon ve oral yolla girebilmektedirler. Gastrointestinal yolla alınan nanopartiküller çevrelerinde nanopartikül özelliklerini etkileyebilecek birçok değişiklikle karşılaşır. pH, gastrointestinal sıvıların kompozisyonu, mikroflora ve alınmış besinlerin içeriği gibi etmenler bu değişimlere sebep olan farklılıklara örnek olarak gösterilebilirler. Nanopartiküllerin gastrointestinal yoldan alınımı pasif ya da aktif olarak gerçekleşebilir (Hobson ve ark. 2016).

Nanopartiküller vücuda girip organlara dağıldıktan sonra hücrelerle etkileşime gireceklerdir. Bu etkileşim nanopartikülün çeşitli endositoz formlarıyla hücre içine alınmasıyla oluşabileceği gibi nanopartikülün doğrudan hücre yüzeyi ile etkileşmesi şeklinde de gerçekleşebilmektedir. Her ne kadar bu nanopartiküllerin biyolojik bariyerleri geçmesi terapötik uygulamalar açısından faydalı olsa da potansiyel yan etkileri düşünüldüğünde endişeye sebep olmaktadır (Ivask ve ark. 2017).

20 nm'ye kadar nanopartiküllerin potansiyel olarak hem sağlam hem de hasarlı deriden geçebildiği, 21-45 nm arası nanopartiküllerin sadece hasarlı deriden

geçebildiği, 45 nm'den büyük nanopartiküllerin ise deriyi geçemediği bildirilmiştir (Niska ve ark. 2017).

### 2.2.6. Nanopartikül Toksisitesi

Nanopartiküllerin insan sağlığı üzerine olan yan etkileri; genetik, kişinin mevcut hastalıkları gibi kişisel faktörlerin yanı sıra nanopartikül maruziyetine, nanopartikülün kimyasına, boyutuna, şekline, aglomerasyon durumuna ve elektromanyetik özelliklerine bağlı olarak değişir. Yapılan hayvan ve insan çalışmaları, inhale edilen nanopartiküllerin daha büyük partiküllere göre makrofajlarca akciğerlerde daha zor temizlendiği ve akciğer hasarına yol açtığı ve nanopartiküllerin sirkülasyonla lenfatik ve sinir sistemi ile beyin de dahil birçok doku ve organa gittiğini göstermiştir. Nanopartiküllerin toksisitesini anlamak için anahtar nokta, onların küçük boyutunun hücreye ve hücre organellerine penetre olmasına ve onların normal fonksiyonlarını bozmasına olanak vermesidir (Buzea ve ark. 2007).

Toksik etkilerinin örneği olarak doku inflamasyonu, hücrel redoks balansının oksidasyon yönünde değişmesi, anormal foksiyon ve hücre ölümü gösterilebilir (Buzea ve ark. 2007). Nanopartiküller alışılmışın dışındaki fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak yan etkilerini organ, doku, hücre, subselüler ve protein düzeyinde oluşturabilirler (Abdelhalim ve Jarrar 2012).

Yapılan *in vivo* çalışmalar tüm nanopartiküller için yüksek dozlarda sitotoksik etkilerin, doz ve zaman bağımlı olarak ortaya çıktığını göstermektedir (Kihara ve ark. 2011).

AuNP uygulamasından sonra yapılan incelemede hücreye alınan AuNP'ünün miktarının doğrudan toksisiteyle uyumlu olmadığı gösterilmiştir (Naha ve ark. 2015).

Bu materyallerin neredeyse sınırsız çeşitliliğine bağlı olarak bir kısmı toksik, bir kısmı görece olarak iyi, diğerleri ise sağlığa yardımcıdır. Örneğin fonksiyonize fulleren kimyasalları antioksidan gibi davranır (Buzea ve ark. 2007).

Vücuda alınan nanopartiküller genellikle daha ileri eliminasyon için endozom ve lizozomlara alınırlar ve bu süreçte bu nanopartiküllerin endozomlardan kaçışı

gerçekleşebilir, bu da radikal oksidan türevlerinin (ROS) üretimi ve mitokondriyal hasar yoluyla sitotoksiteye neden olur (Shin ve ark. 2015).

ROS üretiminin üç ana yolu olduğu düşünülmektedir. Bunlar: 1. Özellikle metal temelli nanopartiküllerde nanopartikül yüzeyinde aktif redoks döngüsü, 2. nanopartikül üzerinde fonksiyonilize olan oksidatif gruplar ve 3. Nanopartikül hücre etkileşimidir. ROS'un fazla üretimi oksidatif strese karşı proinflamatuvar sinyal sürecinin göstergesi olan tümör nekrosis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin (IL) upregulasyonu ve sitokinlerin aktivasyonu ile sonuçlanır (Aydın ve ark. 2012).

Nanopartiküllerin toksik profillerini hücreler tarafından alınan ve hücrenin eksternal yüzeyine bağlanan nanopartikül miktarı belirlemektedir (Ivask ve ark. 2017).

### **2.3. NANOGÜMÜŞ**

Gümüş uzun yıllardır yiyecek ve içecek depolamak için antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Eski zamanlarda su ve şarap gümüş kaplarda depolanırdı, gezginler için gümüş kaşık ya da bozuk para, su ya da süt gibi içecekleri korumak için şişenin dibine yerleştirilirdi (Bumbudsanpharoke ve ark. 2015).

Gümüş çok uzun yıllardır antimikrobiyal özelliklerine bağlı olarak çok geniş kullanım alanlarına sahip olmuştur. Bunlardan bazıları su arıtma, yara bakımı, kemik protezleri, kardiyak aletler, ameliyat malzemeleri, kateterler ve de antibiyotik olarak kullanımdır. Bakterilerin ve mantarların gümüşe karşı hassas olmalarının sebebi onların önemli proteinleri ile gümüşün yoğun etkileşime geçmesidir (Lansdown 2006).

Nanogümüş doğada kendiliğinden oluşumunun yanı sıra endüstride de üretilebildiği gibi birçok endüstriyel üretim sürecinde de yan ürün olarak oluşabilmektedir. Bu üretim süreçleri arasında mürekkep hazırlama, boyama, reaktör temizleme ve zımparalama gibi örnekler vardır (Debia ve ark. 2016).

Woodrow Wilson International Center for Scholars ve Project on Emerging Nanotechnology, Nanotechnology Consumer Product Inventory'yi 2005 yılında 54 ürün ile kurdu. Listedeki ürün sayısı yıldan yıla giderek artmaya devam etmektedir.

Günümüzde bu listede toplam 1827 ürün bulunmaktadır ve bu ürünlerden 442 adedi nanogümüş içermektedir (Woodrow Wilson Database 2017).

Nanogümüşler,  $TiO_2$  ve çinko oksit (ZnO) nanomateryalleri ile birlikte en fazla oral yolla alınan nanomateryallerdir çünkü sağlık ürünlerinin içinde yer aldıkları gibi yiyeceklerde ve içeceklerde ilave katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar. Nanogümüş ayrıca yiyecek paketlemede kullanılmakta ve sığırtine antimikrobiyal olarak ilave edilmektedir. Plastik çantalardan ve tekrar kullanılabilir yiyecek konteynerlerinden geçebilmektedir. Atık sularda biriken gümüş yine balıklar yoluyla da insanlara ulaşabilmektedir (Frohlich ve Frohlich 2016).

Nanogümüş bakteri gelişimini önlediği, yiyeceği daha uzun süre güvende, taze ve lezzetli tuttuğu için konteynerlerde kullanılmaktadır. Ayrıca nanogümüşün yiyeceklerin ambalaj filmlerinde de yoğun kullanımı vardır ve bunlara bağlı olarak alınan besinlerle bu ambalajın temasına bağlı olarak yiyeceklere geçmekte ve sonuçta insanlara sindirim yoluyla ulaşmaktadır. Ayrıca bu yiyeceklerdeki oranı yiyecek ile temas süresi ve sıcaklıkla birlikte artış göstermektedir (Bumbudsanpharoke ve ark. 2015).

Organik boyalar yerine nanogümüş kullanımı pamuk kumaşlarını çok çeşitli renklerde güvenle boyamanın yanı sıra boyanmış pamuk kumaşlara salınan gümüş iyonlarına bağlı antibakteriyel özellik de kazandırmaktadır (Wu ve ark. 2016).

### **2.3.1. Nanogümüşün Medikal Uygulamaları**

Nanogümüşün farklı şekilleri kendilerine birçok biyomedikal uygulama alanı bulmaktadır. Bunlardan başlıcaları; kozmetik topikal ürünleri, aşı antijenleri için taşıyıcı, hücresel ve humoral immün yanıtı güçlendirme, kanser tedavisinde seçici işaretleyiciler olarak kullanılma, fototerapi tedavilerinde seçici hedefleyici, gen taşıyıcı, ilaç taşıyıcı, kanser için işaretleyici, nükleik asit taşıyıcı, kanser tanısında, tümör görüntülemeye, şeker ölçme cihazlarında kullanımlarıdır (Aziz ve ark. 2017).

#### **2.3.1.1. Antimikrobiyal Uygulamalar**

Gümüş antimikrobiyal olarak çok uzun zamandır kullanılıyor olsa da ilk olarak bu etkinliğin tanımlanması 19. yüzyılda gerçekleşmiştir. Penisilinin 1940 yılında keşfiyle birlikte gümüş antimikrobiyal olarak kullanım alanını kaybetmiştir,

ancak 1960 yılından itibaren yanık tedavisine geri dönmüş ve 1968 yılından itibaren de geniş spektrumlu antibiyotik olarak sülfanamid antibiyotiği ile kombine hali olan gümüş sülfadiazin ismiyle yanık tedavisindeki yerini almıştır. Antibiyotiklere direnç gelişiminin bulunmasıyla birlikte değişik oranlarda nanogümüş içeren pansuman yöntemleri klinisyenlerce yoğun olarak kullanılmaktadır (Chopra 2007). Gümüşün bu kullanımdaki en büyük avantajı bakterilerin 4 milyar yıldır gümüşe karşı direnç geliştirememiş olmasıdır, oysa antibiyotiklere karşı sadece 70 yılda çok yüksek oranlarda direnç gelişmiştir, bu da gümüşün gelecekte daha da çok oranlarda antibiyotik içeriği olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Percival ve ark. 2005).

Gümüş iyonu gram negatif bakterileri gram pozitiflere göre daha çok etkilemektedir. Bunun sebebi gram pozitif bakterilerin duvarının, gram negatif bakterilerin duvarından daha kalın olmasıdır (Feng ve ark. 2000).

Gümüş nanopartikülü uygulanan *Escherichia coli* üzerine yapılan incelemede, gümüşün bir kısmının hücre içine girdiği, bir kısmının ise doğrudan hücre duvarı ile etkileştiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada gümüş iyonu negatif yükle yüklenmiş ve buna rağmen negatif yüklü membranla etkileşim sürmüştür bu da nanogümüşün oluşturduğu etkinin gümüşün pozitif yükünden bağımsız olduğunu göstermektedir (Sondi ve Salopek-Sondi 2004).

Gümüş iyonunun hücre içine giren kısmı; DNA kondensasyonuna ve dolayısıyla replikasyon özelliğinin kaybına yol açtığı gibi proteinlerin de tiyol gruplarına bağlanıp aktivasyonlarını sonlandırmaktadır (Feng ve ark. 2000).

Nanogümüşün mikroorganizmalarda çok geniş moleküler süreçlerle etkileşimi sonucunda çoğalmanın durmasından, enfektifliğin kaybedilmesine, ve ölüme kadar çok çeşitli sonuçlar oluşturabileceği bilinmektedir; tüm bunlar ise nanogümüşün şekline, konsantrasyonuna, boyutuna ve mikroorganizmanın duyarlılığına bağlı olarak değişmektedir (Lara ve ark. 2011).

### **2.3.1.2. Antiviral Uygulamalar**

1-10 nm arasındaki boyutlara sahip nanogümüşün İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (HIV)-1 virüsü ile bağlandığı mesafeler ve nanogümüşün disülfit bağlarıyla etkilendiği gerçeği göz önüne alınınca, nanogümüşün HIV-1 virüsünün glikoprotein

120 (gp 120)'si ile etkileştiği anlaşılmaktadır. Gp 120'nin virüsün konak hücrelerine tutunmasından sorumlu kısım olduğu düşünöldüğünde, nanogümüşün HIV-1 virüsünün konak hücrelerle etkileşimini engellediği dolayısıyla hastalık oluşumunu engelleyebileceği düşünölmektedir (Elechiguerra ve ark. 2005).

HepAD38 insan hepatoma hücre költürü ile yapılan çalışmada nanogümüşün hepatitis B virüsü (HBV) üzerindeki antiviral etkisi gösterilmiştir. Bu etki 10 nm boyutundaki nanogümüşün HBV viral parçalarıyla etkileşmesi sonucunda olmaktadır. Nanogümüş HBV Ribo Nökleik Asit (RNA) ve ekstraselöler virionların üretimini inhibe etmiştir (Lu ve ark. 2008).

### **2.3.1.3. Üriner Kateterler**

Nanogümüş ile kaplı üriner kateterin *Staphylococcus epidermidis* gibi koagölaz negatif stafilokoklar üzerine etkisi incelendiğinde nanogümüşün bakterilerin hücre membran organizasyonlarını bozarak bakteriyel kolonizasyon ve tutunmayı engellediği görölmüştür (Thomas ve ark. 2015).

### **2.3.1.4. Diş Materyalleri**

Nanogümüş içeren materyallerle birleştirilmiş reçine karışımının hem *Streptococcus mutansa* karşı uzun süreli inhibitör etkisinin olduğu hem de diğer olumlu özelliklerine bağlı olarak kullanımının uygun olabileceği bildirilmiştir (Yoshida ve ark. 1999).

Nanogümüş içeren karışımlar, geleneksel karışımlara göre daha sert yüzey sağlar, bakteri kolonizasyonunu yavaşlatır ve bakteri adezyonunu azaltırken ayrıca nanogümüş içeren karışım geleneksel karışımın fiziksel özelliklerinden taviz vermeden enamel demineralizasyonunu da engeller (Ahn ve ark. 2009).

### **2.3.1.5. Yara, Yanık Sargı Uygulaması**

Gümüş nitrat ilk kez topikal olarak kronik yara tedavisinde kullanılmıştır. Derin yanıklarda yaranın yüzeyinde yaşayan epitelyal doku bulunmadığı için iyileşme yara kenarından epitelizasyon ve kontraksiyonla gerçekteşmektedir, buna bağlı olarak da geniş yaralar ve elverişsiz yerlerde bulunan ve mikroorganizmaların kolonize olduğu yaralar daha geç iyileşmektedirler. Gümüş sülfadiazin krem



kendisine karşı bakteriyel direnç gelişmediği için yanık tedavisinde topikal antibakteriyel olarak kullanılmaktadır (Klasen 2000).

Nanogümüş içeren sargıların kolay değişim ve daha uzun süreli kullanım gibi avantajlarına bağlı olarak gümüş sülfadiazine göre daha az ağrılı bir tedavi yöntemi olduğu belirlenmiştir (Muangman ve ark. 2006). Ayrıca nanogümüş içeren sargı infekte yaralardan bakteriyel temizlenmeyi artırmış ve ortalama iyileşme süresini de 3,35 gün düşürmüştür (Huang ve ark. 2007). Ama bu iyileşme artışının sadece yüzeysel yanıklarda işe yaradığı, derin yanıklarda işe yaramadığı bulunmuştur (Chen ve ark. 2006).

Nanogümüş anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra kollejen salınımını kontrol ederek kollejen fibrillerinin doğru düzenlenmesi ile yara iyileşmesini hızlandırır, klinik çalışmalar standart sargıya göre nanogümüş sargısının yüzeysel ve derin yanıkların tedavisinde diğer iyileşme süreçlerini etkilemeden re-epitelizasyon sürecini hızlandırdığını göstermiştir (Berthet ve ark. 2017).

Nanogümüş sargısının yaradaki bakterileri ve nötrofilik inflamasyonu azaltarak kronik venöz bacak ülser tedavisinde iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (Sibbald ve ark. 2007).

#### **2.3.1.6. Dermatoloji ve Kozmetik**

Nanogümüş biyolojik etkinlikleri ve görece olarak düşük fiyatı nedeniyle çeşitli dermatolojik ürünlerde ve kozmetikte, fungal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Niska ve ark. 2017).

Nanogümüşün kan glukoz seviyelerini düşürdüğü, insülin seviyelerini ve ekspresyonunu artırdığı, glukokinaz aktivitesini ve ekspresyonunu artırdığı ve GLUT-2 seviyelerini de artırdığı gösterilmiştir (Alkaladi ve ark. 2014).

#### **2.3.2. Dağılım**

Klinik uygulamadaki en önemli sorunların başında nanogümüşün emilim, birikim, metabolizma ve atılımı ile ilgili olanları gelir (Kumar ve ark. 2010).

Nanogümüşün birikimi oral uygulamalarından sonra en çok gastrointestinal kanalın ince bağırsak ve mide kısımlarında olmaktadır; gastrointestinal kanal dışında en çok birikim sırasıyla karaciğer ve dalakta olmaktadır, onu da testis, böbrek, beyin ve akciğerler takip etmektedir (van der Zande ve ark. 2012). Ancak dişi sıçanlarda yapılan bir çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak organlar ve plazmadaki gümüş dağılımında farklılık bulunmamıştır, yazar farklılık olmamasının nedeninin nanogümüşün dağılımının hormonal etkileşime bağlı değişim göstermesi olarak değerlendirmiştir (Qin ve ark. 2017).

Etkili bir antibakteriyel aktivite için iyi nanopartikül dağılımı gerekmektedir. Muhtemelen okside nanogümüş agregasyonu nanopartikülün etkili yüzeyini ya da hücre ile etkileşebilecekleri alanın azalmasına öncülük etmektedir. Her ne kadar nanogümüşler su ya da 50 mM sodyum HEPES gibi çözünmüş solüsyonlarda antimikrobiyal aktivite göstermiş olsalar da, parçacıklar yüksek tuz içeren, yoğunlukla kullanılan kültür medyumlarında ve biyolojik tamponlarda agregolurlar. Gümüş nanopartiküllerinin yüksek elektrolit içeren medyumlarda agregolması antibakteriyel özelliklerinde kayba sebep olur ancak albumin ile kompleks oluşturmak nanopartikülleri agregasyona karşı stabilize eder. Nanogümüşün antibakteriyel aktivitesi ciddi olarak yüzey oksidasyonuna ve ideal partikül dağılımına bağlıdır (Lok ve ark. 2007).

Nanogümüşün emiliminde her ne kadar kilogram (kg) başına dozları, boyutları, şekilleri ve diğer özellikleri aynı olsa da, intestinal flora ve boşaltım zamanı gibi çeşitli faktörler ne kadar nanogümüşün emildiğinde asıl önemli etken olabilmektedir (Loeschner ve ark. 2011).

Küçük boyutlu nanopartiküller gastrointestinal kanaldan daha kolay absorbe olurlar ve diğer organlara dağılırlar. Küçük nanopartiküller kan beyin bariyerinden penetre olurlar ve bu bariyere hasar verirler. 100 nm'den küçük nanogümüşe karşı immün yanıt gelişmesine rağmen, daha büyük boyutlu nanogümüşe (323) karşı immün yanıt gelişmemektedir (Park ve ark. 2010).

Biyokimyasal parametrelerde göreceli olarak düşük toksisiteye rağmen, sitokin üretim artışı, B hücre dağılımında artış ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi inflamatuvar yanıt 14 günlük oral uygulamadan sonra önemli artış göstermiştir.

Yazarlar, bunun sebebinin küçük nanogümüşün hücreye daha fazla alınması olabileceği yönünde görüş belirtmişlerdir (Park ve ark. 2010).

Nanogümüşün HepG2 hücrelerine girdikten sonra sitoplazma içindeki endozom ve lizozomlarda ve nükleus içinde bulunduğu gösterilmiştir (Kim ve ark. 2009).

Uygulanan nanopartiküllerin çoğu 15 gün içinde böbreklerden ya da hepatobilier sistemden atılmaktadır (Kumar ve ark. 2010). Değişen yüklerle birlikte nanogümüşün proteinlerle etkileşimi değişmektedir, buna bağlı olarak da hepatobilier boşaltımı değişmektedir bu da nanogümüşün yükünü ayarlayarak vücutta kalma süresinin değiştirilebilmesine olanak sağlamaktadır (Souris ve ark. 2010).

### **2.3.3. Etki Mekanizması**

Son yıllarda nanometallerin bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidoglikan tabakasındaki tiol grupları (-SH) ile birleşerek bakterinin inaktivasyonuna sebep olduğu anlaşılmıştır. İşte buna bağlı olarak da hücre duvarının yıkımı ve lizisi, mikrobiyal DNA replikasyonunun engellenmesi ve bakteriyel fonksiyonların engellenmesi gibi faydalara sebep olmaktadır (Niska ve ark. 2017).

Nanogümüşün güçlü anti-inflamatuar etkinliği vardır; buna bağlı olarak interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10) ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) gibi inflamatuvar mediatörleri azaltarak yara iyileşmesini hızlandırır (Wong ve ark. 2009).

Nanogümüşe karşı farklı hücre türleri farklı yanıt vermektedir yani hücre türü değişince nanogümüşe karşı olan dayanıklılık da değişmektedir (Huo ve ark. 2015).

Nanogümüşün toksisitesinin sadece  $Ag^+$  iyonuna bağlı olarak mı yoksa hem gümüş hem de nanogümüşün kendisinin mi etkili olduğu konusunda uzun süren farklı yaklaşımlar sonucunda bu toksisitenin hem nanogümüşe bağlı hem de  $Ag^+$  iyonuna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Kawata ve ark. 2009).

Song ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada nanogümüşün partikül formunda tekil olarak ve aglomere olmuş durumda sitoplazma bulunduğunu ve dahası nanopartiküllerin partikül halinin HL-7702 hücrelerinin nükleusunda da

bulduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak mitokondri gibi organların içinde nanogümüş gözlenmemiştir.

*In vitro* yapılan çalışmada HL-7702 hücrelerinin nanogümüş maruziyetinde doz bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir.

Nanogümüşün mitokondriyal fonksiyona hasar verdiği gösterilmiştir. Ayrıca nanogümüşün hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu gösterilmiştir (Song ve ark 2012.).

Nanogümüşün hücelere yaygın alımının ROS üretimi ile başlatılan proinflamatuvar ve toksik aktivitelerini indüklediği ile ilgili güçlü kanıtlar vardır (Avalos ve ark 2014). ROS ile indüklenen oksidatif stresin hücrede apoptozun yanı sıra DNA hasarı, hücre döngüsünün durması ve mitokondriyal disfonksiyonu tetiklediğine inanılmaktadır (Ahamed ve ark. 2008).

Nanogümüş Caspaz-12'yi Caspaz-3'ten daha fazla arttırmaktadır bu da nanogümüşün apoptozisi mitokondriyal yoldan daha çok endoplazmik retikulum yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir (Huo ve ark. 2015).

Gümüş nanopartikülünün antimikrobiyal özelliği boyutu ile doğrudan ilişkilidir. Totalde aynı kütle oluşturacak kadar farklı boyutlarda nanogümüş uygulamasından sonra nanogümüşün daha küçük boyutlarda daha büyük boyutlarda olanlara göre daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. 62 nm nanogümüşten, 9,2 nm nanogümüşün 9 katı kadar toplam nanogümüş uygulanırsa ancak aynı etkiyi oluşturabilmiştir. Farklı boyutlardaki nanogümüşün antibakteriyel aktivitesindeki farklılıklar kimyasal olarak çözünmüş  $Ag^+$  iyonlarının miktarının farklılığına bağlı olduğu yolunda yorumlanabilir. Partiküller küçüldükçe yüzey alanı kütle oranı artar ve kimyasal olarak çözünmüş  $Ag^+$  iyon konsantrasyonunu artırır (Lok ve ark. 2007). Boyut bağımlı antibakteriyel aktivite nanogümüşün bakteriye bağlanma seviyelerindeki farklılıklarla da açıklanabilir. Nanogümüş yaklaşık 1-10 nm çapında olduğu zaman bakteriyle tercihen direkt bağlanır (Morones ve ark. 2005).

Küçük boyutlu nanopartiküllerin toksikolojik ve biyolojik yanıt oluşturmada daha aktif olduğu ve tekrarlayan oral uygulamalardan sonra organ toksisitesi ve inflamatuvar yanıt oluşturduğu düşünülmektedir (Park ve ark. 2010).

PVP kaplı nanogümüşün sitrat kaplı nanogümüşe göre daha yüksek oksidatif strese ve daha fazla inflamatuvar yanıtı sebep olduğu gösterilmiştir, bu da kaplamanın nanogümüşün ve diğer nanopartiküllerin etkileri üzerinde belirleyici faktörlerden olduğunu göstermektedir (Prasad ve ark. 2013).

Nanogümüşün oluşturacağı toksisitede hücrenin türünün de önemli olduğu bulunmuştur örneğin *in vitro* koşullarda nanogümüşe maruz kalan farklı hücre türleri içinde en fazla pulmoner fibroblastların, en az HepG2 hücrelerinin etkilendiği gösterilmiştir (Avalos ve ark. 2015).

Nanogümüşün *in vitro* koşullarda toksisite oluşturduğu, DNA'da kırıklara sebep olduğu ve bunların sebebinin de oksidatif stres olduğu gösterilmiştir (Avalos ve ark. 2015).

Nanogümüşün toksisitesinin gümüş iyonlarından kaynaklanmadığı, nanogümüşün kendisinden oluştuğu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Nanogümüş toksisitesinin *in vitro* HepG2 hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2009).

Nanogümüşün insan hepatoblastoma hücre serisi C3A'ya toksik etkisinin bulunduğu gösterilmiştir, ancak ışık mikroskopik inceleme sonucunda herhangi bir partikül görülmemiştir; fakat elektron mikroskobu ile inceleme yapıldığında sitoplazmada ve nükleusda küçük partikül birikintileri gözlenmiştir (Gaiser ve ark. 2013).

## 2.4. APOPTOZİS

Çoğu hayvan hücresi programlı hücre ölümünün morfolojik şekillerinden biri olan apoptozise giderek kendi kendini yok etme yeteneğine sahiptir. Apoptozisin doğru bir şekilde düzenlenmesi hem gelişim hem de doku homeostazisi açısından kritik öneme sahiptir. Apoptozis organizmadan istenmeyen hücreleri, işlevsiz hücreleri, potansiyel olarak tehlikeli hücreleri yok etmede görevli bir kalite kontrol yöntemi olarak düşünülebilir (Bergmann ve Steller 2010). Apoptozis genetik olarak

kontrol edilen, hücrenin büzüşmesi, kromatinin kondensasyonu, DNA'nın fragmentasyonu, hücrenin büzüşmesi ve membranın tomurcuklanması gibi morfolojik özellikleri ve inflamasyonun olmamasıyla nekrozdan ayrılmaktadır. İnflamasyon olmamasının sebebi de apoptotik cisimciklerin hücre membranıyla çevrili olmasına bağlı olarak çevredeki hücrelerce fagosite edilmeleridir (Renehan ve ark. 2001). Apoptozis fizyolojik koşullarda olduğu gibi patolojik koşullarda da oluşabilmektedir (Dasgupta ve ark. 2016).

#### **2.4.1. Apoptozisin Tarihçesi**

Apoptozis terimi Yunanca ayrışma anlamına gelen 'apo' ve düşme anlamına gelen 'ptosis' den oluşmaktadır, bu düşme genellikle yaprakların ağaçlardan düşmesi olarak bilinmektedir. Apoptozis terimi genellikle programlı hücre ölümü olarak adlandırılan süreci ifade etmek için kullanılmaktadır. 1965 yılında Lockshin böcek metamorfozu sürecinde gözlediği hücre ölümünün hücrenin kontrolü altında gerçekleştiğini tespit ederek 'programlı hücre ölümü' tanımını kazandırmıştır (Duque-Parra 2005). John Kerr (2002) karaciğer üzerine yaptığı çalışmalarda normal hücre ölümünden daha farklı histolojide hücre ölümünü görüntülemiştir ve histolojik farklılıklarına bakarak buna büzüşme nekrozisi tanımını koymuştur. John Kerr, Andrew Wyllie ve A.R. Currie hücrelerin ölümden sonra bazı özel paternler gösterdiğini bunların hücrenin büzüşmesi ve küçülmesi, kromatinin birleşmesi ve marjinalleşmesi ile hücre ve çekirdeğin fragmentasyonu olduğunu bulup apoptozis terimini kullanmışlardır (Lockshin ve Zakeri 2001). Daha sonra apoptozisin internükleozomal DNA degradasyonu ile izlenen özel bir paterni olduğu gözlemi yapılmıştır. 1976'da John Sulston ve H. Robert Horvitz embriyodaki somatik hücrelerin %13'ünün gözlenmelerinin ardından öldüğünü göstermişlerdir (Lockshin ve Zakeri 2001), apoptozis o zamandan beri hücrelerin genetik olarak belirlenmiş yok edilmesini içeren programlı hücre ölümünün tanımlanmış ve kabul edilmiş önemli bir biçimini oluşturmaktadır (Elmore 2007).

#### **2.4.2. Apoptozisin Mekanizması**

Apoptozisin uygulanmasında en önemli aşamalardan biri sistein proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonudur. Uygulayıcı kaspazlar aktive oldukları zaman kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi cellat kaspazların aktivasyonuna yol açarlar (Bergmann ve

Steller 2010). Kaspaz ailesi üyeleri inaktif olarak üretilirler ve bir uyararla aktifleşinceye kadar inaktif şekilde kalırlar (Dasgupta ve ark. 2016).

Memelilerde kaspaz 8 ve kaspaz 9 genellikle birçok önemli sitoplazmik ve nükleer proteini sindirecek olan efektör kaspazların aktivasyonuna yol açan basamaklar dizisini başlatır yani bunlar başlatıcı kaspazlardır. Ayrıca bu ölüm dizisinin yapısı kaspaz 9 aktivasyonu için yerinden oynatılması gereken bir adaptör protein apoptotik-proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve erken ya da uygun olmayan kaspaz kaskadının durdurulmasını sağlayan bir inhibitör protein Bcl-2 içerir (Lockshin ve Zakeri 2001).

Apoptozisin iki ana yolağı mitokondri ya da intrinsik yolak ile hücre yüzey reseptörü ya da ekstrinsik yolaktır.

#### **2.4.2.1. Mitokondri Yolağı ya da İntersik Yolak**

Bcl-2 ailesi proteinler mitokondriyal ya da intrinsik apoptotik yolağı kontrol ederler ve düzenlerler. Bu yolak mitokondriyal dış membran permeabilitesini artırır ve böylece sitokrom c gibi proapoptotik faktörler mitokondriden sitozole geçer (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2017). Sitokrom c sitozolik protein olan Apaf-1'e ve prokaspaz-9'a ve ATP'ye bağlanıp birlikte apoptozomu oluştururlar. Prokaspaz-9 kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar ve prokaspaz-9'da sitokrom-c bağımlı kaspaz kaskadını aktive eder sonra da kaspaz-3 aktive olur (Broughton ve ark 2009). Mitokondriyal dış membran permeabilite artışı genellikle apoptozisin geri dönüşsüz noktası olarak düşünülmektedir, bu aşamadan sonra hücre ölümüne yol açacak olan kaspaz aktivasyonu dakikalar içinde gerçekleşir (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2017).

Bcl-2 ailesi en az 18 üye içerir ve üç grupta incelenir:

1. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w gibi proteinleri içeren ve proapoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanıp onları inaktive ederek antiapoptotik özellik gösteren Bcl-2 ailesi;
2. Doğrudan mitokondriyal dış membran permeabilitesini destekleyen proapoptotik efektör proteinler olan Bax ve Bak;

3. Hücredeki stresi algılayıp apoptozisi başlatan heterojen bir grup protein. Bunlar eğer doğrudan Bax ve Bak ile etkileşip onları aktive ederlerse ‘direkt aktivatörler’ olarak adlandırılırlar; eğer antiapoptotik proteinlere bağlanıp onları apoptotik proteinlerden ayırıp aktifleşmelerine yardımcı olurlarsa ‘duyarlılaştırıcılar’ olarak adlandırılırlar. Yani Bcl-2 protein ailesi apoptozisi kontrol etmek için birbiri ile etkileşirler ve kompleks iletişim ağı oluşturup, etkileşimleriyle hücrenin yaşayıp ölmesine karar verirler.

Bcl-2 ailesi etkisini mitokondride göstermektedir. Normal koşullarda Bax, Bcl-xl aracılığı ile mitokondriden sitozole taşınır ve miktarının çoğu da sitozolde bulunmaktadır. Sitotoksik şartlar gelişince Bax mitokondride birikir ve mitokondri dış membranında kanal oluşumuna sebep olur ve proapoptotik faktörlerin sitozole geçmesine sebep olur (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2017).

#### **2.4.2.2. Hücre Ölüm Reseptörü ya da Ekstrinsik Yolak**

Ekstrinsik yolak sitokin hücre yüzey ölüm reseptörüne bağlanması ile başlar, hücre yüzey ölüm reseptörü tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süperailisine aittir ve TNFR-1, Fas’ı içerir. Fas Ligand (Fas L) Fas reseptörüne bağlanır, Fas-bağımlı ölüm bölgesi proteini (FADD) N-terminal ucunda ‘ölüm efektör bölgesi’ içerir ve bu da prokaspaz-8 ile etkileşerek ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılan kompleksi oluşturur. Bu kompleks prokaspaz-8’in aktivasyonu ile kaspaz-8’in oluşumunu sağlar ve aktif kaspaz-8 de DISC kompleksinden ayrılır ve sitoplazmaya geçerek kaspaz kaskadını başlatarak direkt yada mitokondri-bağımlı mekanizmayla kaspaz-3’ü oluşturur. Bu da apoptoziste cellat olarak görev yapar (Broughton ve ark. 2009).

Apoptoziste gerçekleşen hücredeki değişiklikler hücre şeklinde değişim ve hücre boyutunda azalma, küçük apoptotik cisimciklerin oluşumu ve serbestleşmesi, kromatinin kondensasyonu ve piknozis ile hücre gövdesinde vakuollerin görünür olmasını içermektedir (Duque-Parra 2005). Kromatin nükleer zarfın altında kümelenmektedir, ayrıca apoptotik cisimcikler adı verilen içinde sağlam şekilde organellerin bulunduğu ve zaman zaman da nükleer parçacıkların olduğu sitoplazmadan kaynaklanan tomurcuklanmalar gözlenmektedir. Bunlar çevredeki hücrelerce fagosite edilmektedirler (Kerr 2002).



### **2.4.3. Apoptozisin Fizyolojik Rolü ve Hastalıklardaki Değişimi**

Apoptozis normal gelişimde organların boşluklarının ve şekillerinin oluşması, ayak ve ellerde parmaklar arası boşlukların oluşması, immün sistemde ve sinir sisteminde yeterli sinaptik fonksiyon göremeyen ve özgül antijenleri sentezleyemeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında (Renehan ve ark. 2001) görev almaktadır. Yetişkin canlılarda hücre döngüsünde ve endokrin bağımlı dokularda hormonal kontrol altındadır, dokuların hem normal atrofisi hem de patolojik atrofisi durumlarında, önemli rol oynamaktadır (Kerr 2002).

AİDS'te; Alzheimer, Parkinson ve amiyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda; miyokard infarktüsü sonrası iskemide, inmede ve reperfüzyonda; hepatit ve graft versus host hastalığı gibi otoimmün hastalıklarda apoptozis artmıştır. Malign tümörlerde, sistemik lupus eritematozus ve bazı viral hastalıklarda azalmış ya da tamamen ortadan kalkmış apoptozis sorumludur. Ayrıca tüm sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozisi indüklemeye çalışmaktadır ve direnç gelişimi de apoptozisin gerçekleştirilememesi ile ilgilidir ve ayrıca bu ilaçların yan etkileri de normal hücrelerde apoptozisin indüklenmesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Renehan ve ark. 2001). Huntington hastalığı mutasyon sonucu gerçekleşen bir hastalıktır ve mutasyon hastaların nöronlarında apoptozisi indüklemektedir. Tüm bunlara ilave olarak iskemik dokularda hücre ölümü nekroz ile gerçekleşirken nekroze alanı çevreleyen ve görece olarak daha iyi kanlanan bölgede ise apoptozis ile hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Bu bağlamda tüm bu hastalıkların tedavisinde apoptozisin düzenlenmesini hedefleyen yöntemler geliştirilmesi düşünülmelidir (Gibson 2001). Apoptozisin tetiklenmesi ile tedavide kemoterapi, radyoterapi ve iskemi oluşturmak için anti-anjiyogenez faktörleri de apoptotik moleküllere eşlik ederek kullanılması faydalıdır, unutulmamalıdır ki bu faktörler de apoptozisi tetiklemektedirler (Sjöström ve Bergh 2001).

### **2.4.4. Apoptozisin Değerlendirilmesi**

Morfolojik değerlendirme apoptozisin tanınmasında ve ölçülmesinde standart yöntemdir. Diğer yöntemler kondanse nükleusu ya da hücre yüzeyine geçmiş olan fosfotidilserini boyamak için floresan boyama ve terminal transferaz mediated

dUDP-biotin nick end labeling (TUNEL) ile fragmente DNA'nın belirlenmesidir. Dokudaki hücre ölümü genellikle apoptotik indeks olarak değerlendirilmektedir (Renehan ve ark. 2001).

Işık mikroskopuyla incelendiğinde erken dönem apoptotik hücrelerin küçülmüş olduğu, dolayısıyla sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organelerin sıkıca paketlenildiği, sitoplazmanın yoğun olarak boyandığı bir ya da birkaç hücreden oluşan hücre topluluğu şeklinde görüntü elde edilmektedir. Apoptotik hücre yuvarlak ya da oval koyu eozinofilik sitoplazma ve koyu mor kromatin fragmentasyonu şeklinde gözlenmektedir. Elektron mikroskopuyla incelendiğindeyse nükleer materyalin karakteristik olarak nükleer membranın altında periferik olarak yerleştiği gözlenmektedir (Elmore 2007).

Hücredeki DNA'nın kırık uçlarının tanınmasında işe yarayan TUNEL yöntemi aynı zamanda nekrozda da fragmente olabilen DNA'dan dolayı pozitif boyanma gösterebilir (Gibson 2001).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında incelenmiştir.

#### 3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna 26.02.2016 tarihli ve 2016-005 no'lu karar ile onay verilmiştir. Proje Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce 161418004 no'lu karar ile desteklenmiştir.

#### 3.2. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinde ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 4 aylık 35 adet dişi Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar standart diyet ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışmada,  $22 \pm 2$  °C oda sıcaklığı, % 60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritmi olan ortam kullanıldı.

#### 3.3. Çalışma Grupları

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden elde edilen sıçanlar; I. Grup ( n=7) Kontrol, II. Grup (n=7) 20 nm 50 mg/kg nanogümüş uygulanan, III. Grup (n=7) 20 nm 300 mg/kg nanogümüş uygulanan, IV. Grup (n=7) 80-100 nm 50 mg/kg nanogümüş uygulanan, V. Grup (n=7) 80-100 nm 300 mg/kg nanogümüş uygulanan grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

**I) Kontrol grubuna;** 10 gün boyunca günde bir kez çeşme suyu vücut ağırlıklarına göre hacmi hesaplanarak oral olarak verildi.

**II) 20 nm 50 mg/kg nanogümüş grubuna;** 10 gün boyunca günde bir kez nanogümüş 20 nm, 50 mg/kg olacak şekilde çeşme suyu içinde karıştırılıp oral olarak verildi.

**III: 20 nm 300 mg/kg nanogümüş grubuna;** 10 gün boyunca günde bir kez nanogümüş 20 nm, 300 mg/kg olacak şekilde çeşme suyu içinde karıştırılıp oral olarak verildi.

**IV: 80-100 nm 50 mg/kg nanogümüş grubuna;** 10 gün boyunca günde bir kez nanogümüş 80-100 nm, 50 mg/kg olacak şekilde çeşme suyu içinde karıştırılıp oral olarak verildi.

**V: 80-100 nm 300 mg/kg nanogümüş grubuna;** 10 gün boyunca günde bir kez nanogümüş 80-100 nm, 300mg/kg olacak şekilde çeşme suyu içinde karıştırılıp oral olarak verildi.

İşlemler on gün boyunca her gün aynı saatte uygulandı ve hiçbir grupta deney hayvanı kaybı yaşanmadı. Deney sonunda sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altındayken servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler.

### **3.4 Nanogümüş**

Nanogümüş Nanografi isimli firmanın NG04EO0101 (Ag 99.99%, 80-100 nm) ve NG04EO0107 (Ag 99.99%, 20 nm) kodlu ürünleri kullanılmıştır. Nanogümüş 50 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında verilmek üzere çeşme suyu ile hazırlanmıştır. Hazırlama işlemi her gün her bir uygulama grubu için uygulamadan hemen önce ayrı ayrı hazırlanmıştır. Uygulamadan hemen önce 20 dakika boyunca Bandelin Sonopuls HD 2070 markalı ultrasonik sonikatör ile karıştırılarak hayvanlara hesaplanan dozlarda verilmiştir.

### **3.5. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi**

Deneye başlamadan önce ve deney sonunda, sıçanların vücut ağırlıkları tartılarak kaydedildi ve gözlenen değişimler deney sonu vücut ağırlığı farkı olarak adlandırıldı.

### 3.6. Dokuların ve Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan tüm deney hayvanları, çalışma sonunda ağırlıkları kaydedildikten sonra derin anestezi (Ketamin-Ksilazin) altındayken servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve hayvanların kalplerinden alınan kan örnekleri, antikoagülanlı steril tüplere aktararak etiketlendi. Örnekler daha sonra 3500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek serumların ayrılması sağlandı. Ayrılmış olan serumlar ependorf tüplere alınarak çalışma zamanına kadar -80 °C'de saklandı. Daha sonra hayvanların karın bölgeleri açılarak karaciğerleri çıkarıldı ve tespit edilmek üzere nötral formaldehit solüsyonuna yerleştirildi, 48 saat fiksasyondan sonra dokular takip işlemine alındı.

#### 3.7.1 Oksidatif Stres Parametreleri

Serumlar total oksidan statü ve total antioksidan statü ELİSA kitleri ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında üreticinin talimatlarına uygun olarak ölçüldü. Bu ölçümden sonra TOS ile TAS'ın oranını gösteren ve oksidatif stres indeksi (OSI) adı verilen değer hesaplandı. Elde edilen serumlardan ALT, AST, ALP, GGT seviyeleri incelendi.

$$OSI=TOS/TAS \times 100$$

### 3.8. Histolojik Uygulamalar

#### 3.8.1. Nötral Formaldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Doku tespitinde kullanılan %10 nötral formaldehit solüsyonu Tablo 3.1. deki maddeler ve miktarlar baz alınarak hazırlandı;

| Maddeler  | Miktar |
|---|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | 6,5 g  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O | 3,5 g  |
| Formalin  | 100 ml |
| Distile su  | 900 ml |

**Tablo 3.1.** Nötral formaldehit solüsyonu hazırlamak için kullanılan maddeler ve miktarları

### 3.8.2. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Karaciğer dokuları 48 saat %10 nötral formaldehit içinde tespit edildikten sonra uygun büyüklükteki doku parçaları kesildi, daha sonra etiketlenerek kodlandı ve kasetlere yerleştirildi ve olağan doku takibi süreci ile her hayvana ait parafin doku blokları hazırlandı. Parafin doku bloklarını hazırlamak için kullanılan doku takip yönteminin basamakları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Doku takip yöntemine ait süreler Tablo 3.2. de saat cinsinden verilmiştir.

| Kimyasal                 | Uygulama süresi (saat) |
|--------------------------|------------------------|
| %70 Alkol                | 1                      |
| %80 Alkol                | 1                      |
| %95 Alkol                | 1                      |
| %95 Alkol II             | 1                      |
| %100 Alkol I             | 1                      |
| %100 Alkol II            | 1                      |
| Ksilol I                 | 1                      |
| Ksilol II                | 1                      |
| %50 Parafin - %50 Ksilol | 1                      |
| Parafin I                | 1                      |
| Parafin II               | 1                      |
| Parafin III              | 1                      |
| Bloklama                 |                        |

**Tablo 3.2.** Doku takip yönteminde kullanılan uygulama süreleri

### 3.8.3. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Takibin ardından her bloktan Microm HM325 rotari mikrotom ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve her lam üzerine 3 kesit gelecek şekilde dokular lamaların üzerine alınarak lamalar isimlendirildi. Karaciğer dokusunda meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek için her bir hayvanın karaciğer kesitleri ayrı ayrı Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyandı.

H&E boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri Tablo 3.3. de verilmiştir.

| Kimyasal Madde       | Uygulama Süresi (dk)           |
|----------------------|--------------------------------|
| 58 C etüvde          | 60                             |
| Ksilol I             | 15                             |
| Ksilol II            | 15                             |
| %96 Alkol I          | 5                              |
| %96 Alkol II         | 5                              |
| %90 Alkol            | 5                              |
| %80 Alkol            | 5                              |
| %70 Alkol            | 5                              |
| Distile Su           | 5                              |
| Hematoksilen         | 1                              |
| Çeşme suyunda yıkama | Suyun rengi şeffaflaşana kadar |
| Eozin                | 2                              |
| %70 Alkol            | 2                              |
| %80 Alkol            | 2                              |
| %90 Alkol            | 2                              |
| %96 Alkol I          | 2                              |
| %96 Alkol II         | 2                              |
| Ksilol I             | 5                              |
| Ksilol II            | 5                              |
| Lamların kapatılması |                                |

**Tablo 3.3.** H&E boyama yönteminin basamaklarına ait uygulamalar ve süreleri

H&E boyamasıyla hazırlanan preparatlar mikroskopta lenfosit infiltrasyonu, dilatasyon, konjesyon, nekroz ve pleomorfizm açısından değerlendirildi. Histopatolojik değişikliklerin derecesine göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Maksimum skor: 15 olarak belirlendi.

### 3.9 İmmünohistokimya Boyama

Hazırlanmış olan parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler poly-Llysne kaplı lamlar üzerine alındı. CD68 makrofajlarda eksprese edilmektedir ve sitoplazmik boyama paternine sahiptir. Çalışmada immünohistokimyasal boyama yöntemiyle Thermo Scientific firmasının #MS-397-P0 katalog numaralı CD68/Makrofaj Markerı Ab-3 kullanılarak boyamalar yapıldı.

CD68 immünohistokimya boyama yöntemi basamakları ve bunlara ait uygulama süreleri Tablo 3.4. de verilmiştir.

| İşlem  | Süresi     |
|--|------------|
| Deparafinizasyon                               | 16 sa      |
| Ksilen I                                       | 15 dk      |
| Ksilen II                                      | 15 dk      |
| %100 Alkol                                     | 15 dk      |
| %96 Alkol                                      | 15 dk      |
| Distile su                                     | 5 dakika   |
| %10'lük sitrat solüsyonu<br>mikrodalga fırında | 5 dakikaX3 |
| Sitrat solüsyonunda                            | 30 dakika  |
| Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS),<br>(pH: 7,6)   | 5 dakika   |
| %3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>           | 20 dakika  |
| Distile su                                     | 10 sn      |
| PBS'de yıkama ve tekrar<br>temiz PBS           | 5 dakikaX2 |
| Süper Blok (V-Blok)                            | 10 dakika  |
| Distile su, PBS                                | Bekletme!  |
| Primer antikor                                 | 1 saat     |
| PBS'de yıkama ve tekrar<br>temiz PBS           | 5 dakikaX2 |



|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| Sekonder antikor                     | 20 dakika  |
| PBS'de yıkama                        | 5 dakika   |
| Streptavidin Peroksidase             | 20 dakika  |
| PBS'de yıkama ve tekrar temiz PBS    | 5 dakika   |
| ABC kromojen                         | 15 dakika  |
| Distile su                           | 5 dakika   |
| Zıt boya olarak Mayer's Hematoksilen | 8 dakika   |
| Akarsuda akıtma                      | 1 dakika   |
| Amonyaklı su                         | 1-2 saniye |
| Distile su                           | 1-2 saniye |
| Kurulama                             |            |
| Özel kapatma maddesi ile kapatma     |            |

**Tablo 3.4.** CD68 immünohistokimya boyama basamakları ve süreleri

### 3.9.2. TUNEL Metodu

Hücrelerde DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi amacıyla in situ apoptozis belirleme kiti (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, S7101-KIT, Chemicon) kullanılarak boyandı.

- Doku kesitlerinin deparafinizasyonu: Doku kesitleri, 3x5 dk ksilen, 2x5 dk absolü alkol, 3 dk %95 alkol, 3 dk %70 alkol'de bekletildi ve 5 dk PBS ile yıkandı.
- Proteinlerin sindirilmesi: Kesitler Proteinaz K (20 µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- 2x2 dk distile su ile çalkalandı.
- Endojen peroksidazın maskelenmesi: Kesitler PBS ile hazırlanmış %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk oda ısısında muamele edildi.
- PBS ile 2x5 dk yıkandı.

• Dengeleme tamponu: Lamların etrafı dikkatlice kurulanıp, kesitlerin üzerine 75 µl/ 5 cm<sup>2</sup> dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatıldı. 10 dk oda ısısında inkübe edildi.

• Tdt enziminin uygulanması: Plastik lameller kaldırılıp etrafı kurulandı ve hemen her lam üzerine 55 µl/ 5 cm<sup>2</sup> Tdt enzimi konuldu ve plastik lameller ile kapatıldı. Nemli ortamda 37 °C etüvde 1 saat inkübe edildi.

• Durdurma/ Yıkama: Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkandı. Kullanılacak kadar anti-digoksinen-peroksidaz stoktan alınıp oda sıcaklığında ısıtıldı.

• PBS ile 3x5 dk yıkandı.

• Anti-Digoksinen-Peroksidaz: Kesitlerin üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve her kesit üzerine 65 µl/ 5 cm<sup>2</sup> Anti-Digoksinen-Peroksidaz konuldu ve üzerlerine plastik lameller tekrar kapatılarak oda ısısında 30 dk bekletildi.

• Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler PBS ile 4x2 dk yıkandı.

• Renk reaksiyonu: Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 75µl/ 5 cm<sup>2</sup> DAB (diaminobenzidine) substrat solusyonu damlatıldı. 3-6 dk arasında oda sıcaklığında boyandı ve pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tespit edildi.

• Renk reaksiyonu oluşmasından sonra kesitler distile su ile 3x1 dk yıkandı.

• Kesitler distile su ile 5 dk tekrar yıkandı.

• Zıt Boya Uygulaması: Kesitler metil yeşili ile 10 dk boyandı ve distile suda boyamanın durdurulması için her defada distile suya 10 kez daldırılıp çıkarılarak 2 kez yıkandı ve sonra 30 sn distile suda bekletildi.

• Fazla boyanın giderilmesi amacıyla kesitler 2x10 sn %100 alkole 10'ar kez daldırılıp çıkarıldı ve ardından 30 sn tekrar %100 alkol ile yıkandı.

• Kapatma: Kesitler 3x2 dk ksilende inkübe edildi. Ksilenden teker teker çıkarıldıktan sonra kurumasına izin verilmeden entellan yapıştırıcı maddesi kullanarak kapatıldı.

### **Uygulama esnasında hazırlanması gerekli solüsyonlar:**

% 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 27 ml PBS= 30 ml

Tdt: 77 µl Reaksiyon Tamponu + 33 µl Tdt Enzimi =110 µl

DAB Substrat: 147 µl DAB Dilüsyon solüsyonu + 3 µl DAB Substratı= 150µl

Durdurma/Yıkama tamponu: 1 ml durdurma/yıkama solüsyonu + 34 ml distile su = 35 ml

### **Boyama Özgüllüğü Kontrolleri:**

Pozitif kontrol olarak, 5 mg/kg dozunda Deksmetazon uygulanmış erişkin sıçana ait timüs dokusu ve kit içinden çıkan doku kesiti kullanıldı.

### **3.10. Apoptotik İndeks**

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının karaciğer doku kesitlerinde apoptozisin tayini için TUNEL boyaması gerçekleştirildi. Apoptozisin kapsamını sayısal hale getirmek için dokular ışık mikroskobunda pozitif boyanan apoptotik çekirdekler ve sağlam hücre çekirdekleri sayılarak aşağıdaki formüle göre değerlendirildi.

Apoptotik İndeks (APOİ)= Apoptotik çekirdek sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100 (Tunçdemir ve Öztürk 2008).

### **3.11. İstatistiksel Yöntemler**

Vücut ağırlıklarının deney başlangıcı ile deney sonucundaki değişimlerini incelemek için Paired Sample T Test uygulandı. TAS, TOS, OSI, ALT, AST ve ALP değerlerine One Way Anova, Tukey HSD testi uygulandı. CD68 verileri için istatistiksel analiz yapılmadı gözlemlere göre değerlendirme yapıldı. Histopatolojik veriler ve TUNEL uygulamasının verilerine ise One Way Anova testi uygulandı ve ikili gruplar tekrar Independent T Testi ile değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut Ağırlığı Farkı

Araştırmamızın başında ve sonunda kontrol grubu, 20 nm 50 mg/kg grubu, 20 nm 300 mg/kg grubu, 80-100 nm 50 mg/kg grubu, 80-100 nm 300 mg/kg grubu olmak üzere tüm sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Bu vücut ağırlığı tartı sonuçlarına göre deney grupları arasında çalışma başlangıcı ile çalışma sonunda vücut ağırlığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

| Gruplar              | Deney Başlangıcı Ortalama±SH | Deney Sonu Ortalama±SH | P     |
|----------------------|------------------------------|------------------------|-------|
| Kontrol              | 236,85±7,17                  | 237,35±9,25            | 0,00  |
| 20 nm-50 mg          | 218,14±7,12                  | 214,78±5,04            | 0,418 |
| 20 nm-300 mg         | 247,14±7,3                   | 246,85±8,52            | 0,94  |
| 80-100 nm 50 mg/kg   | 255,28±11,67                 | 212±33,14              | 0,191 |
| 80-100 nm- 300 mg/kg | 246,42±8,36                  | 243,28±8,48            | 0,174 |

**Tablo 4.1.** Kontrol grubu canlı ağırlık karşılaştırmaları, Paired Sample T Test.

### 4.2. Oksidatif Stres Parametreleri

Deney sonunda kan serumları oksidatif stres markerları olan TAS ve TOS analizi için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına gönderildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiş olup, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ( $p<0,05$ ).

Serum TOS seviyesi kontrol grubunda 20 nm 300 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olarak bulunmuştur, diğer gruplarla karşılaştırıldığında ise diğer gruplardan daha düşük olduğu bulunmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TOS seviyelerinde 20 nm 50 mg/kg grubu 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre düşük, diğer gruplara göre ise yüksek bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TOS seviyelerinde 20 nm 300 mg/kg grubu diğer tüm gruplara göre yüksek bulunmuş olsa da kontrol grubu dışındakilere göre istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TOS seviyelerinde 80-100 nm 300 mg/kg grubu 20 nm 300 mg/kg grubuna göre düşük diğer tüm gruplara göre ise yüksek bulunmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TAS seviyelerinde kontrol grubu diğer tüm gruplara göre yüksek olmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TAS seviyelerinde 20 nm 50 mg/kg grubu, 20 nm 300 mg/kg grubuna göre yüksek, diğer tüm gruplara göre düşük olarak bulunmasına rağmen istatistiki olarak fark bulunmamıştır.

Serum TAS seviyelerinde 20 nm 300 mg/kg grubu diğer tüm gruplara göre düşük olarak bulunmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum TAS seviyelerinde 80-100 nm 50 mg/kg grubu kontrol ile 80 nm 300 mg/kg grubuna göre düşük, diğer tüm gruplara göre yüksek olarak bulunmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

OSI oranları kontrol grubunda 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre düşük olsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmadı, kontrol grubu diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı düşük olarak bulundu.

OSI oranları 20 nm 50 mg/kg grubu, 80-100 nm 50 mg/kg grubu ve 80-100 nm 300 mg/kg grubuna göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı, 20 nm 300 mg/kg grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düşük olarak bulundu.

OSI oranları 20 nm 300 mg/kg grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

OSI oranları 80-100 nm 50 mg/kg grubunda, kontrol grubuna göre yüksek, 20 nm 50 mg/kg grubu ile 80-100 nm 300 mg/kg grubuna göre düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

OSI oranları 80-100 nm 300 mg/kg grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek, 20 nm 300 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. 20 nm 50 mg/kg grubuna göre düşük, 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre yüksek bulunsa da istatistiki olarak anlamlı fark yoktur.

|            | Kontrol                | 20 nm<br>50 mg/kg        | 20 nm<br>300 mg/kg      | 80-100 nm<br>50 mg/kg    | 80-100 nm<br>300 mg/kg   |
|------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>TOS</b> | 6,14±1,06 <sup>a</sup> | 8,92±0,96 <sup>a,b</sup> | 10,03±0,59 <sup>b</sup> | 7,69±1,14 <sup>a,b</sup> | 9,23±0,79 <sup>a,b</sup> |
| <b>TAS</b> | 9,6±0,97               | 8,23±0,84                | 6,48±0,85               | 9,06±0,94                | 9,368±1,42               |
| <b>OSI</b> | 0,62±0,08 <sup>a</sup> | 1,12±0,1 <sup>b</sup>    | 1,64±0,13 <sup>c</sup>  | 0,83±0,04 <sup>a,b</sup> | 1,08±0,13 <sup>b</sup>   |

**Tablo 4.2.** Gruplar arası TOS ve TAS ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD<sup>a</sup>.

### 4.3. Serum Biyokimya Parametreleri

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarından elde edilen serum sonuçları aşağıda gösterilen tabloda verilmiştir. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Serum AST seviyeleri kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre düşük bulunmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum AST seviyeleri 20 nm 50 mg/kg grubunda kontrol ve 80 nm 50 mg/kg grubuna göre yüksek, diğer gruplara göre düşük olarak bulunsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum AST seviyeleri 20 nm 300 mg/kg grubunda diğer tüm gruplardan yüksek bulunmuştur ancak istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum AST seviyeleri 80-100 nm 50 mg/kg grubunda kontrol grubuna göre yüksek, diğer gruplara göre ise düşük olarak bulundu ancak istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum AST seviyeleri 80-100 nm 300 mg/kg grubunda 20 nm 300 mg/kg grubuna göre düşük diğer gruplara göre yüksek bulunsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak beklenildiği gibi serum AST seviyelerinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum ALT seviyeleri kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre düşük bulunsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Beklenildiği gibi serum ALT seviyeleri bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum ALP seviyeleri kontrol grubunda diğer gruplara göre düşük çıkmış olsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum ALP seviyeleri 20 nm 50 mg/kg grubunda kontrol ve 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre yüksek diğer gruplara göre ise düşük bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Serum ALP seviyeleri 20 nm 300 mg/kg grubunda kontrol grubu, 20 nm 50 mg/kg grubu ve 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre yüksek bulunsa da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. 80-100 nm 300 mg/kg grubuyla değerlendirilebilir fark bulunmamıştır.

Beklenildiği gibi serum ALP seviyeleri bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Serum GGT seviyesi ölçülemedi.

|            | Kontrol      | 20 nm<br>50 mg/kg | 20 nm<br>300 mg/kg | 80-100 nm<br>50 mg/kg | 80-100 nm<br>300 mg/kg |
|------------|--------------|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>AST</b> | 132,57±19,75 | 236,42±43,56      | 277,85±57,18       | 187,28±26,13          | 258,28±46,66           |
| <b>ALT</b> | 46±3,04      | 68,42±5,04        | 61,42±5,77         | 62,85±7,02            | 61,14±6                |
| <b>ALP</b> | 118,14±22,83 | 209,71±30,35      | 218,71±29,73       | 165,85±28,68          | 216,28±34,85           |

**Tablo 4.3.** Gruplar arası AST, ALT ve ALP ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD<sup>a</sup>. Gruplar arasında fark yoktur.

#### 4.4. TUNEL Boyama

TUNEL yöntemi ile boyama sonucu, nükleusu boyanmış olan hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirildi. TUNEL boyama gruplar arasında One Way Anova ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.4.). Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0,05$ ). TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır.

TUNEL pozitif hücre sayısı 20 nm 50 mg/kg grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek, 20 nm 300 mg/kg grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Ancak 80-100 nm 50mg/kg grubuna göre yüksek olsa da istatistiki olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. 80-100 nm 300 mg/kg grubuna göre düşük olarak bulunmuş olsa da aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir.

TUNEL pozitif hücre sayısı 20 nm 300 mg/kg grubunda, diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir.

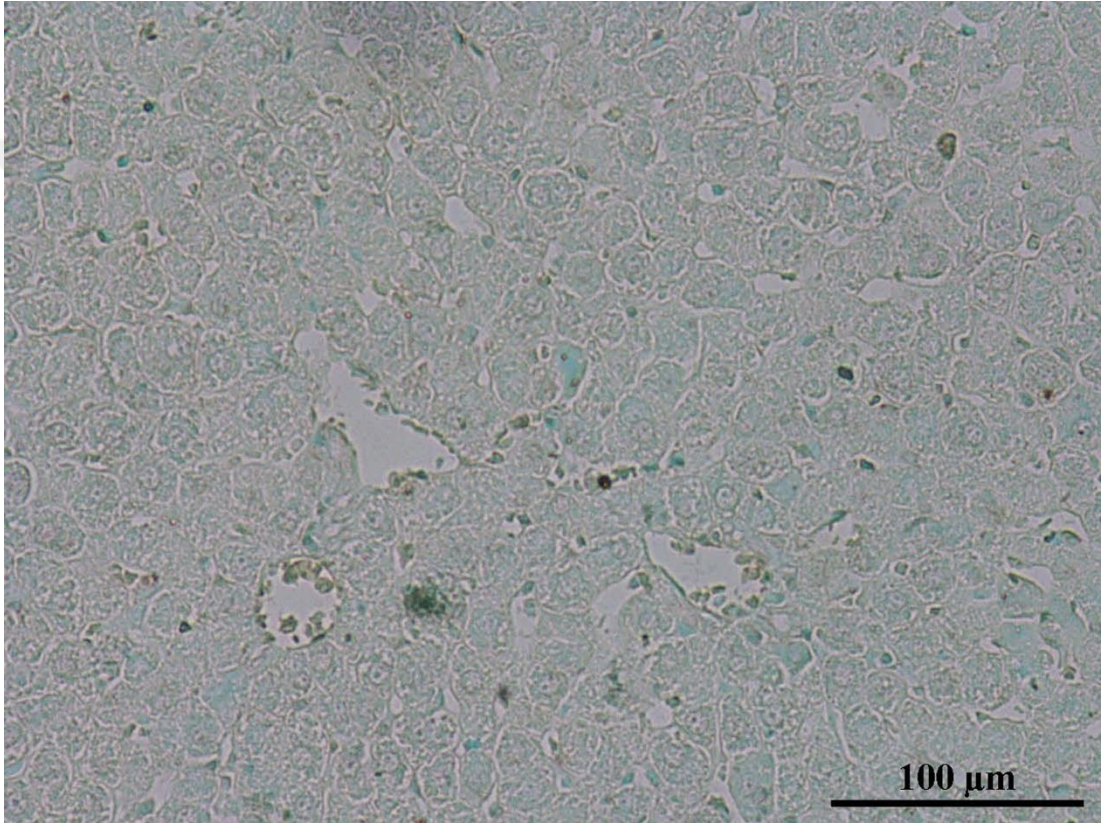
TUNEL pozitif hücre sayısı 80-100 nm 50 mg/kg grubunda 20 nm 50 mg/kg grubuna göre düşük olsa da istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu, 20 nm 300 mg/kg grubuna ve 80-100 nm 300 mg/kg gruplarına göre ise istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir.

TUNEL pozitif hücre sayısı 80-100 nm 300 mg/kg grubunda, kontrol grubu ve 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur. 20nm 50 mg/kg grubuna göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı bulunmuştur. 20 nm 300 mg/kg grubuna göre anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir.

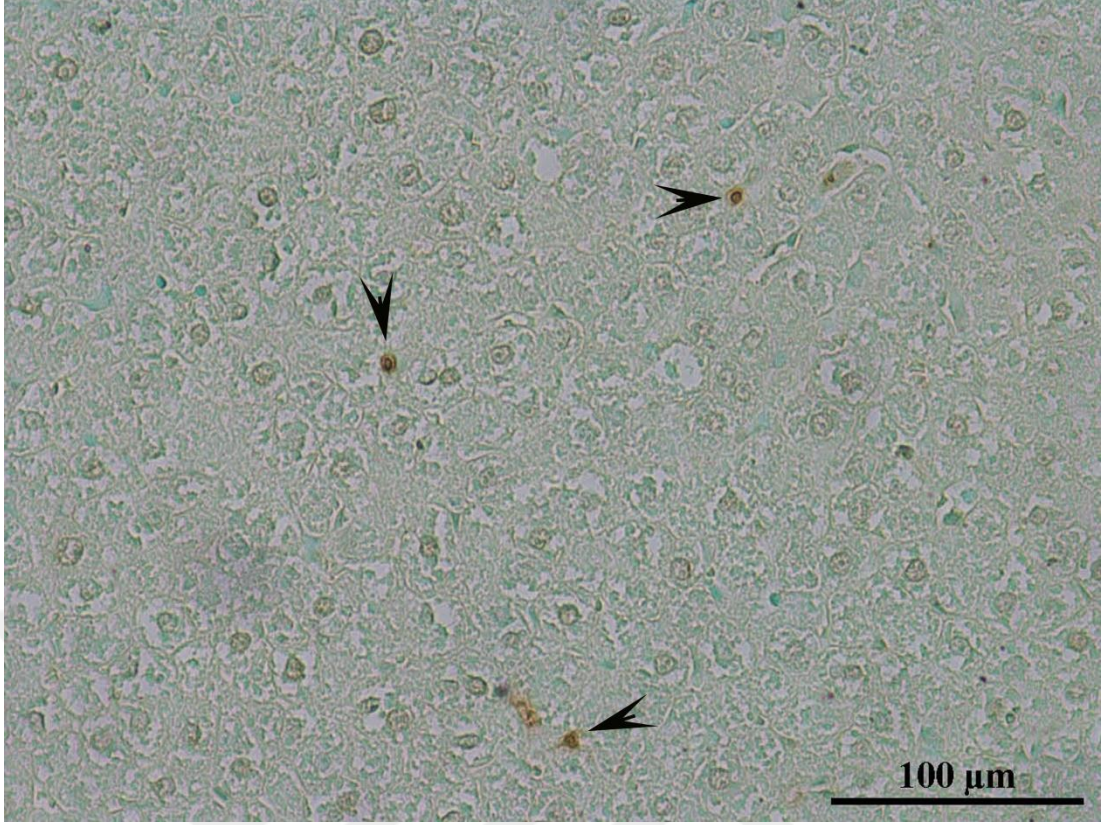


|                                 | Kontrol                | 20 nm<br>50 mg/kg        | 20 nm<br>300 mg/kg      | 80-100 nm<br>50 mg/kg  | 80-100 nm<br>300 mg/kg  |
|---------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>TUNEL</b>                    | 4,28±0,28 <sup>a</sup> | 11,85±0,4 <sup>b,d</sup> | 20,85±1,14 <sup>c</sup> | 9,42±0,64 <sup>b</sup> | 14,42±0,52 <sup>d</sup> |
| <b>Histopathology<br/>score</b> | 0,42±0,2 <sup>a</sup>  | 4,71±0,28 <sup>b</sup>   | 10,85±0,85 <sup>c</sup> | 2,71±0,28 <sup>d</sup> | 8,00±0,43 <sup>e</sup>  |

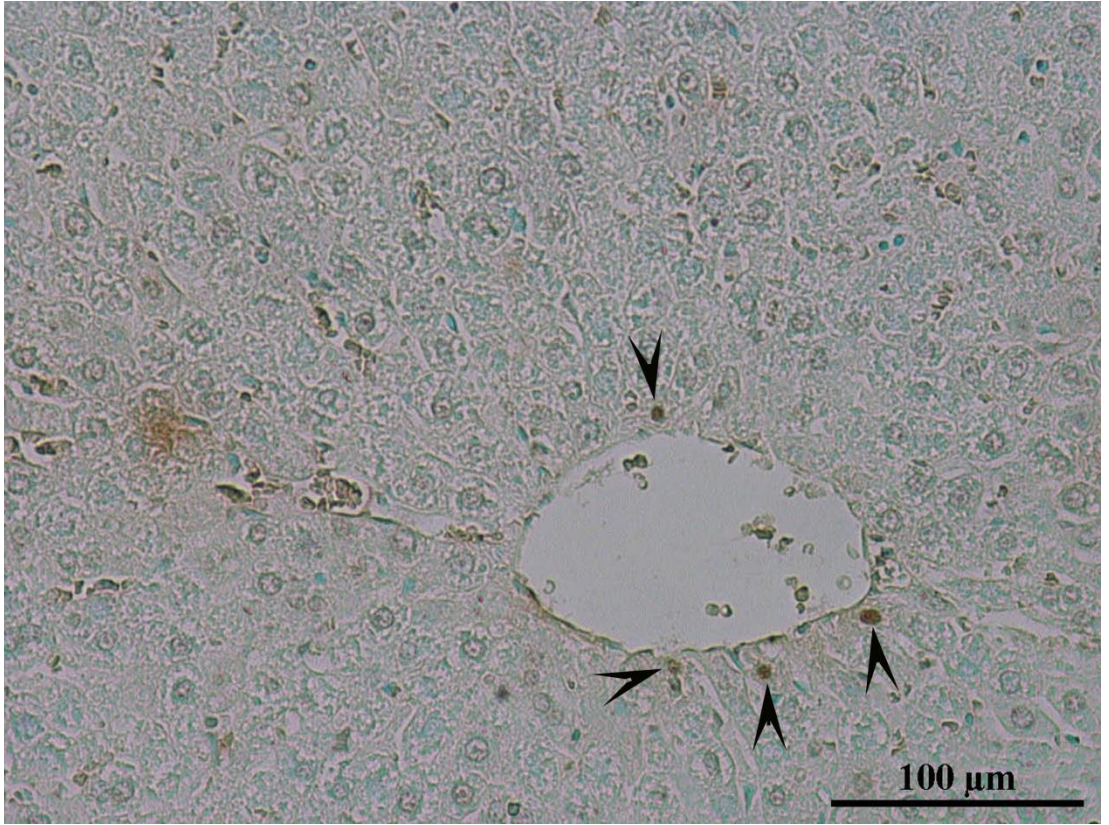
**Tablo 4.4.** Gruplar arası histopatoloji skor ortalamaları ve standart hata değerleri, One Way Anova, TUKEY HSD<sup>a</sup>.



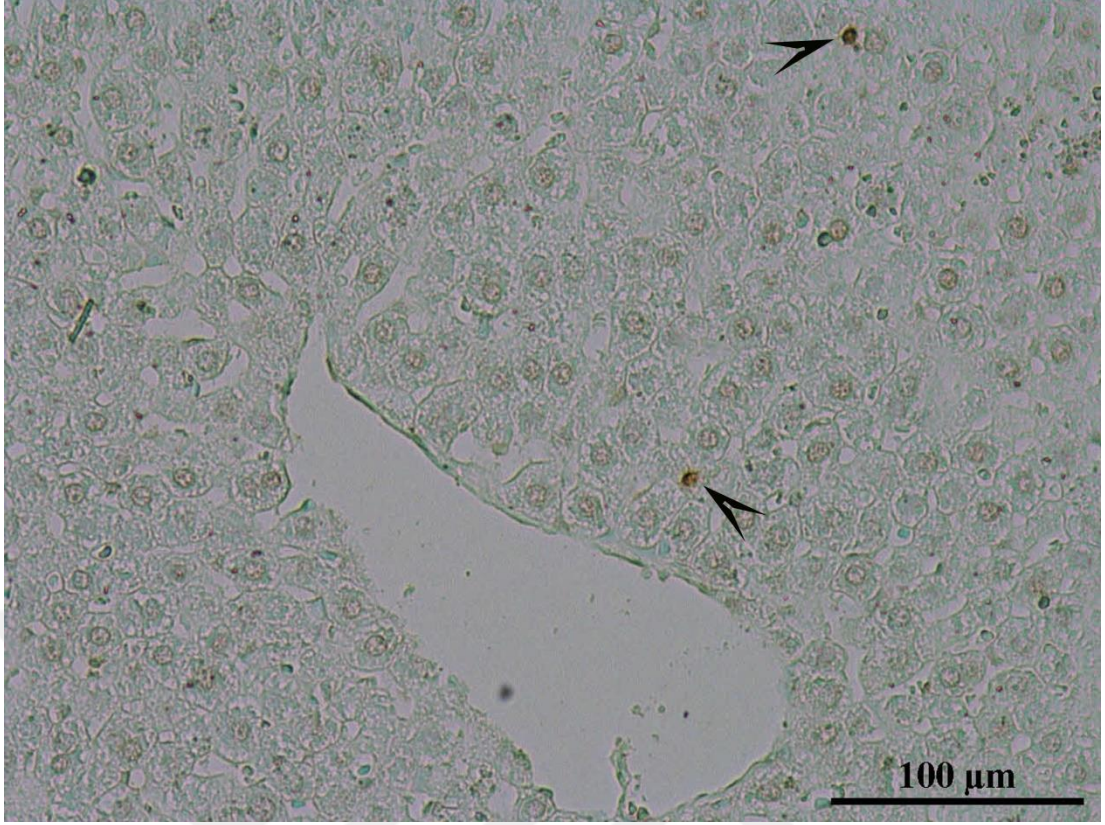
**Resim 4.1.** Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması.



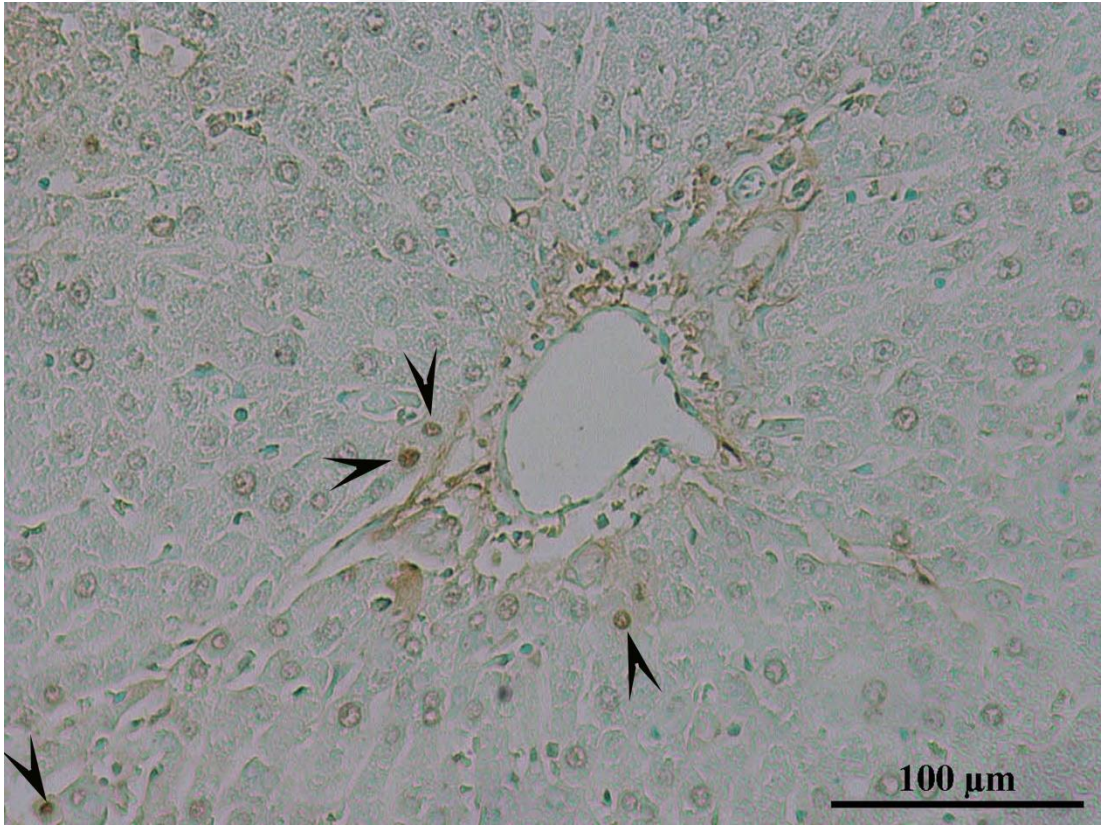
**Resim 4.2.** 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması.



**Resim 4.3.** 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması



**Resim 4.4.** 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması



**Resim 4.5.** 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin TUNEL boyanması

#### 4.5. Histopatoloji Skoru

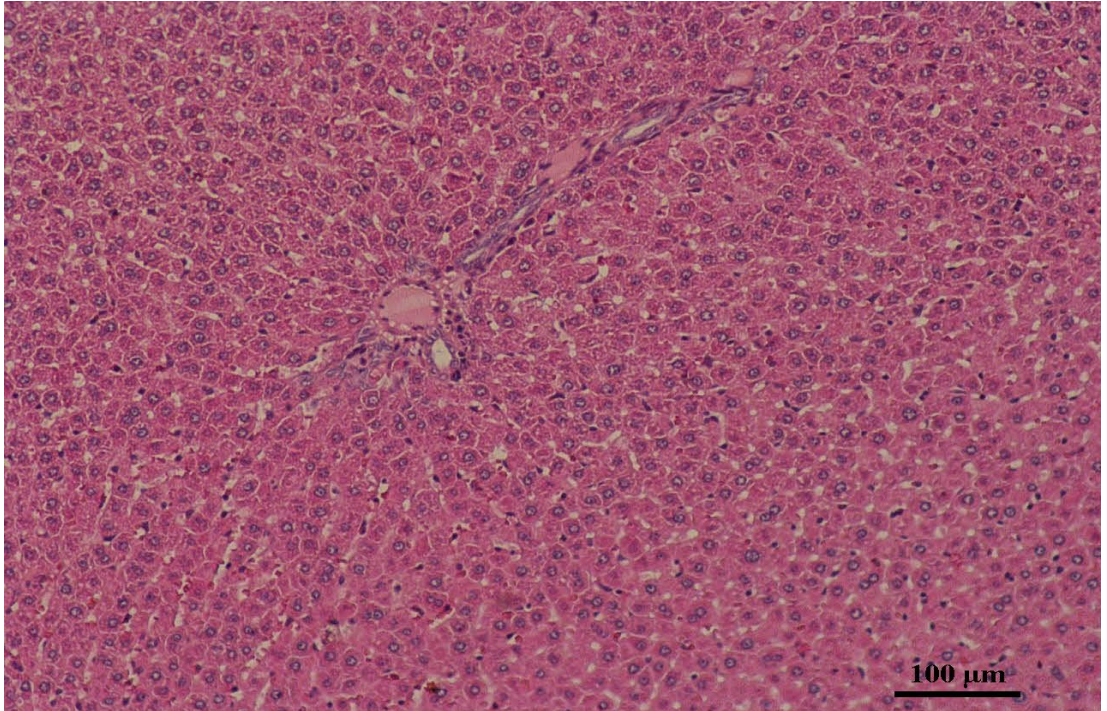
Histopatoloji skoru kontrol grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır.

Histopatoloji skoru 20 nm 50 mg/kg grubunda kontrol grubuna ve 80-100 nm 50 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek, 20 nm 300 mg/kg ve 80-100 nm 300 mg/kg grubuna göre ise anlamlı düşük olarak tespit edilmiştir.

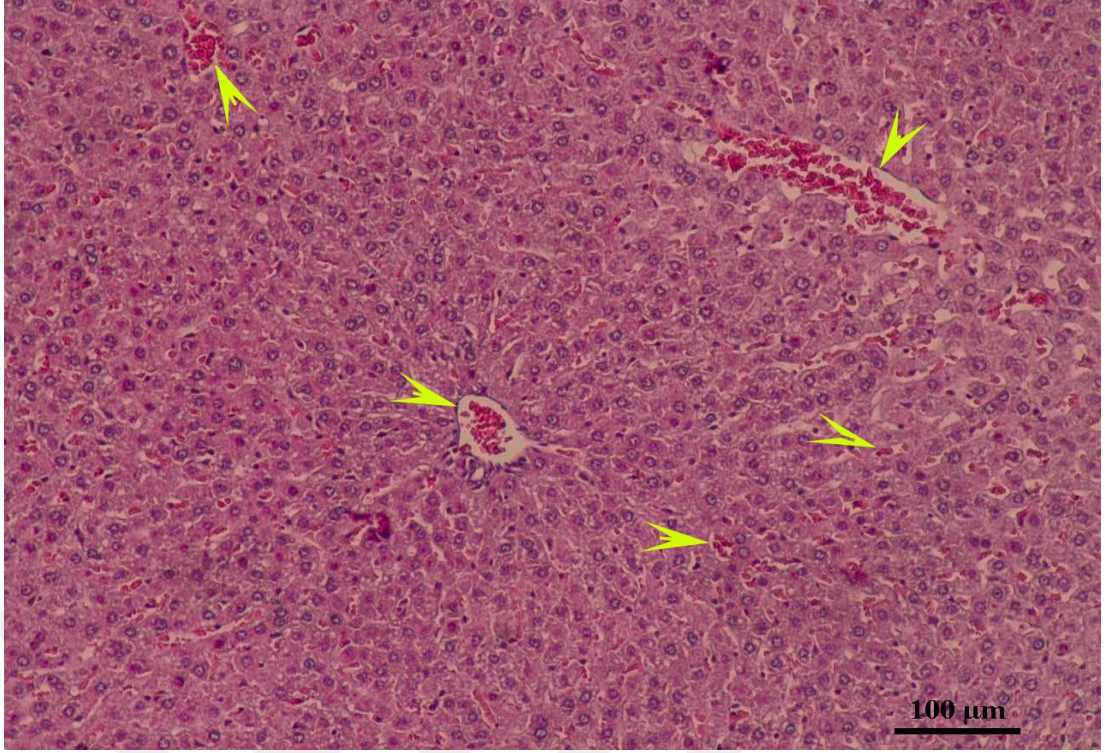
Histopatoloji skoru 20 nm 300 mg/kg grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır.

Histopatoloji skoru 80-100 nm 50 mg/kg grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek, diğer tüm gruplara göre ise anlamlı düşük olarak bulunmuştur.

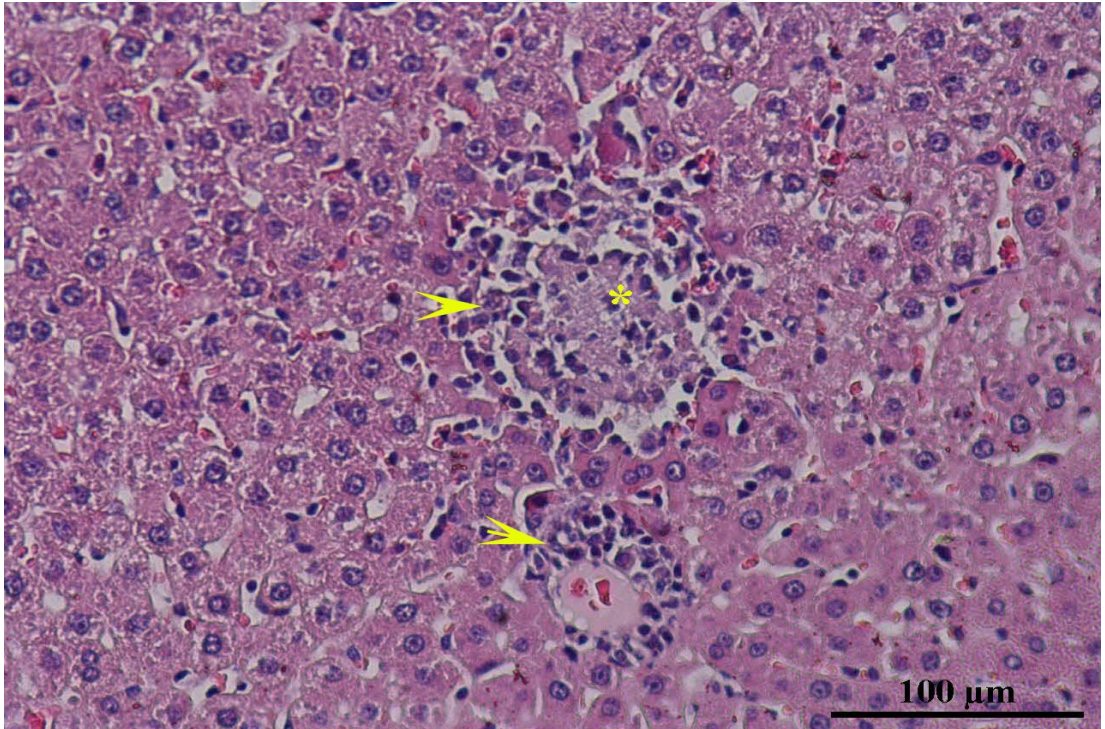
Histopatoloji skoru 80-100 nm 300 mg/kg grubunda 20 nm 300 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük, diğer tüm gruplara göre ise istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.



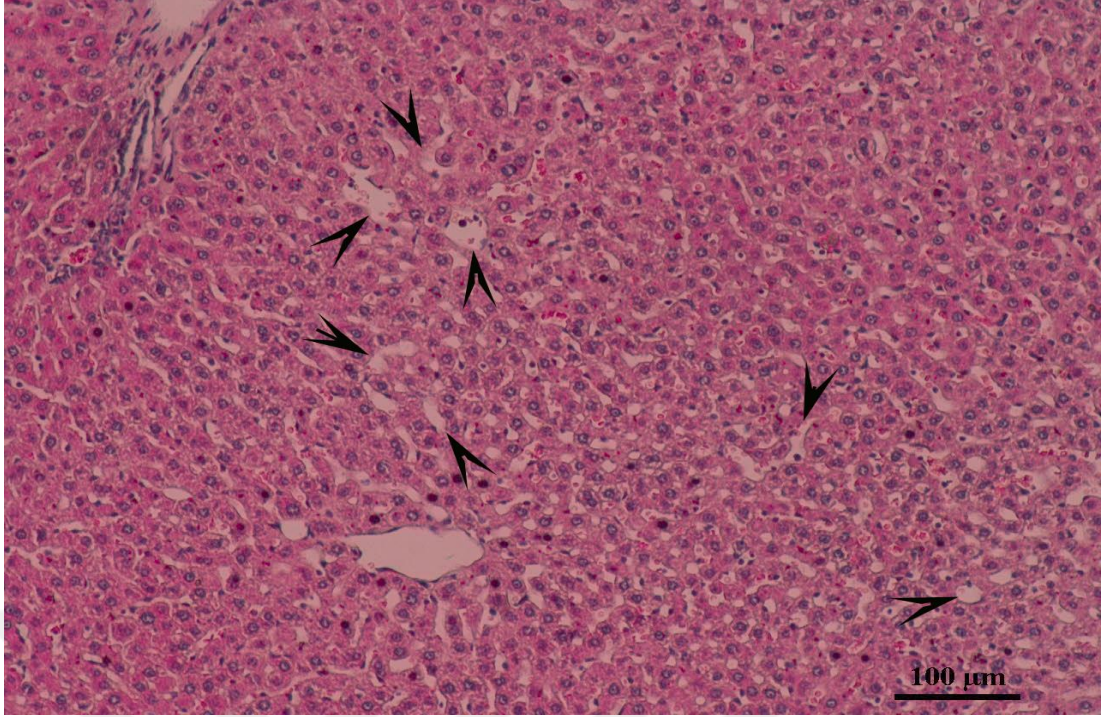
**Resim 4.6.** Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması



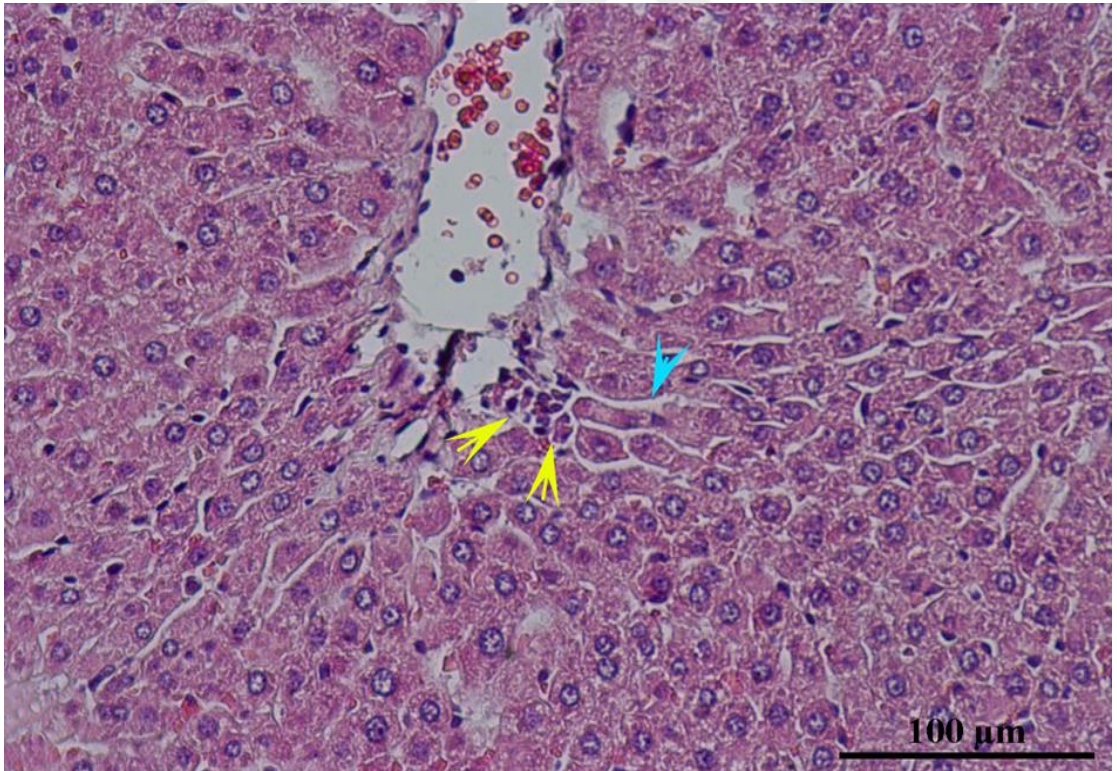
**Resim 4.7.** 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Konjesyon gözlenmektedir.



**Resim 4.8.** 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Lenfosit infiltrasyonu ve nekroz gözlenmektedir.



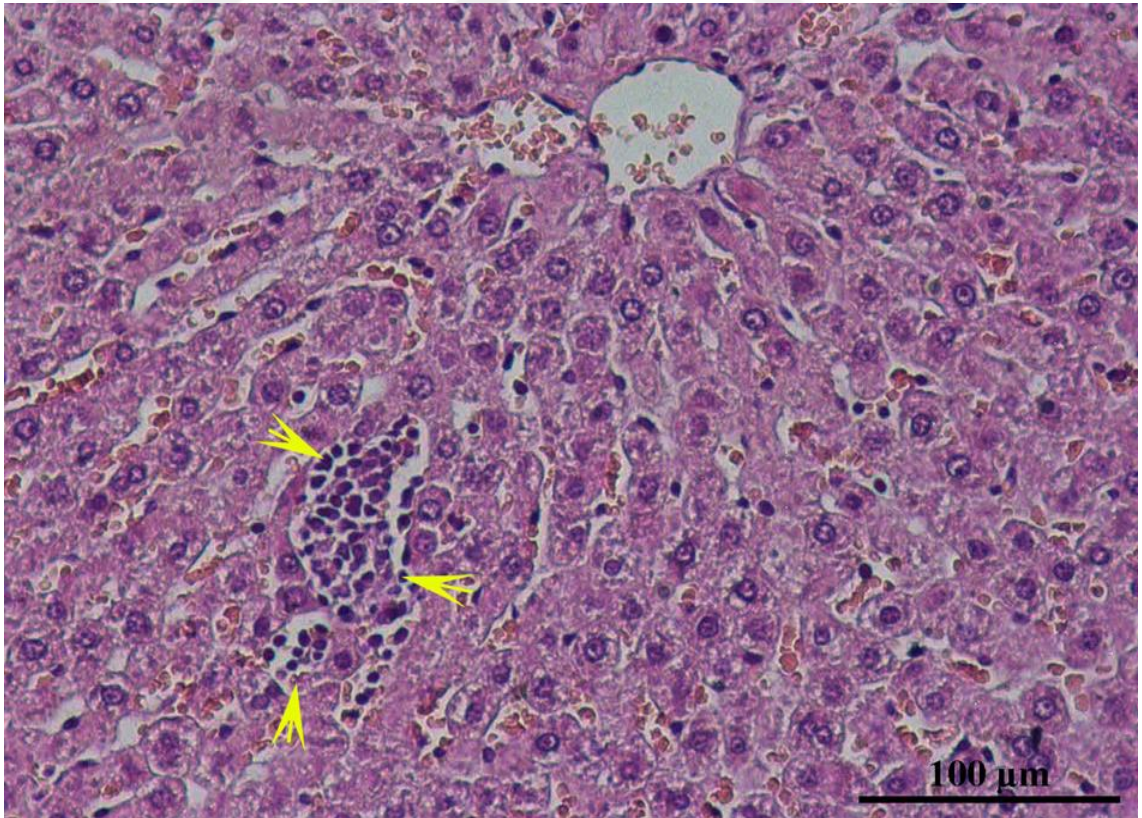
**Resim 4.9.** 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Sinüzoidlerde dilatasyon gözlenmektedir.



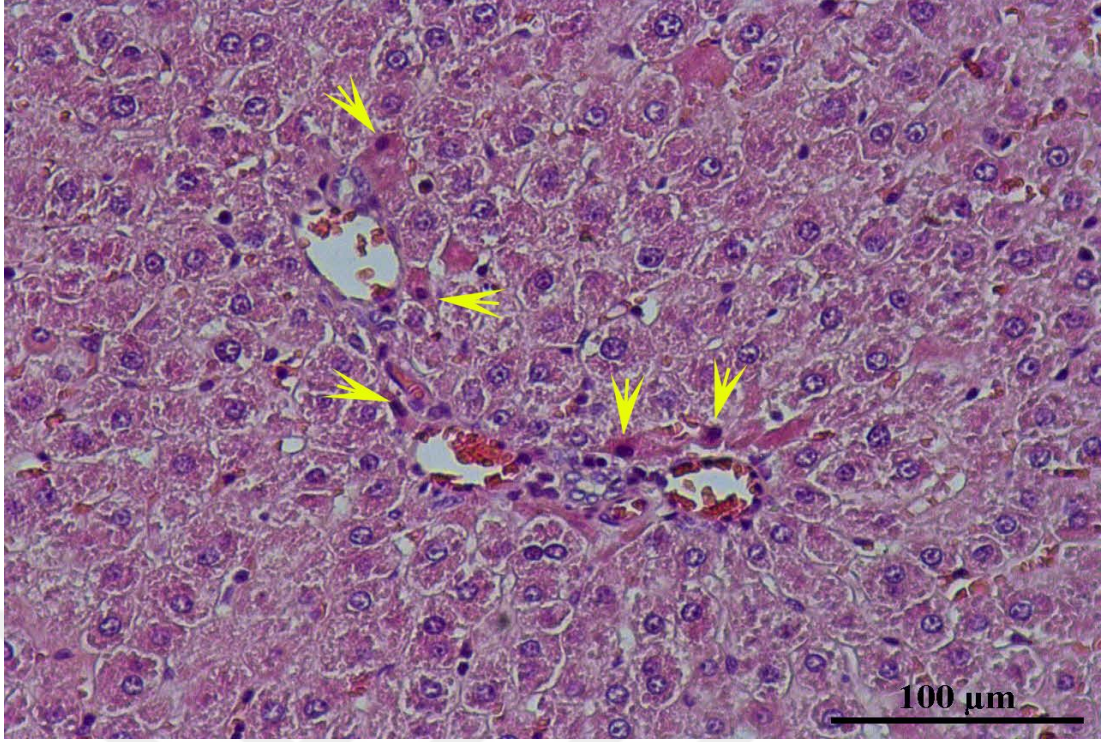
**Resim 4.10.** 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Sarı oklar lenfosit infiltrasyonunu, mavi ok sinüzoid dilatasyonunu işaret etmektedir.



**Resim 4.11.** 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Konjesyon gözlenmektedir.



**Resim 4.12.** 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Lenfosit infiltrasyonu gözlenmektedir.

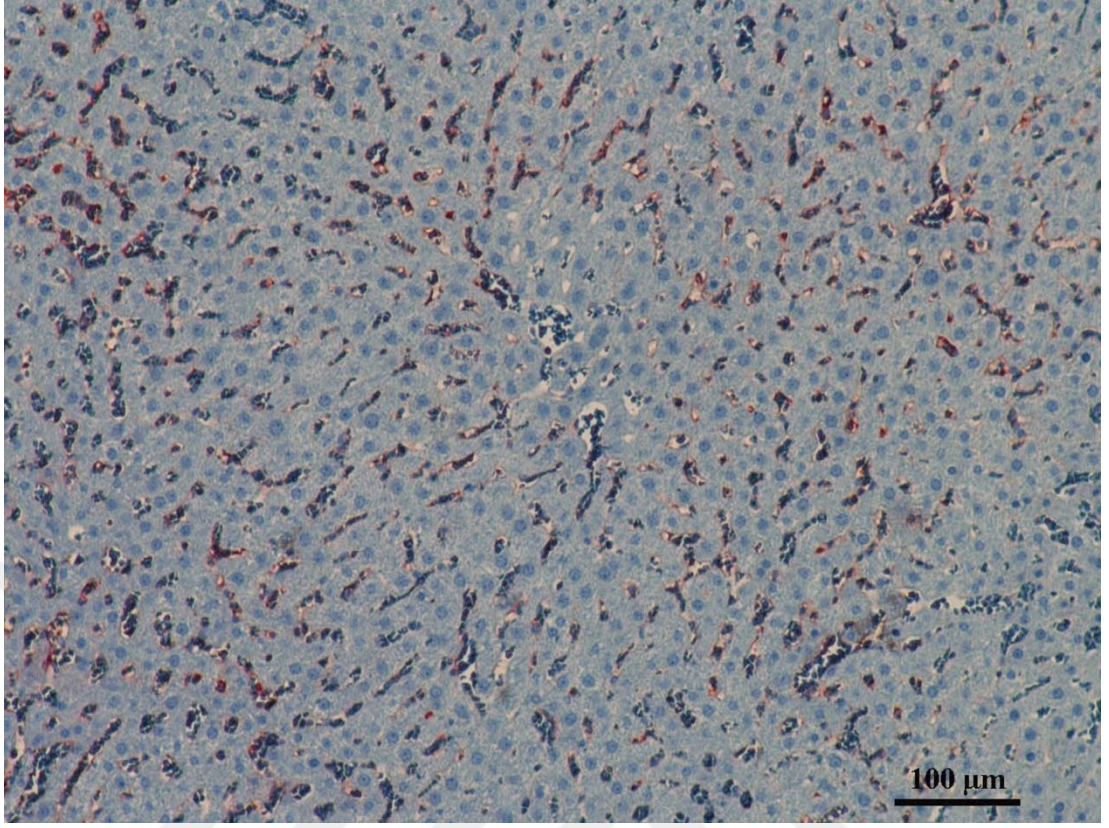


**Resim 4.13.** 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin H&E boyanması. Pleomorfik nükleuslar gözlenmektedir.

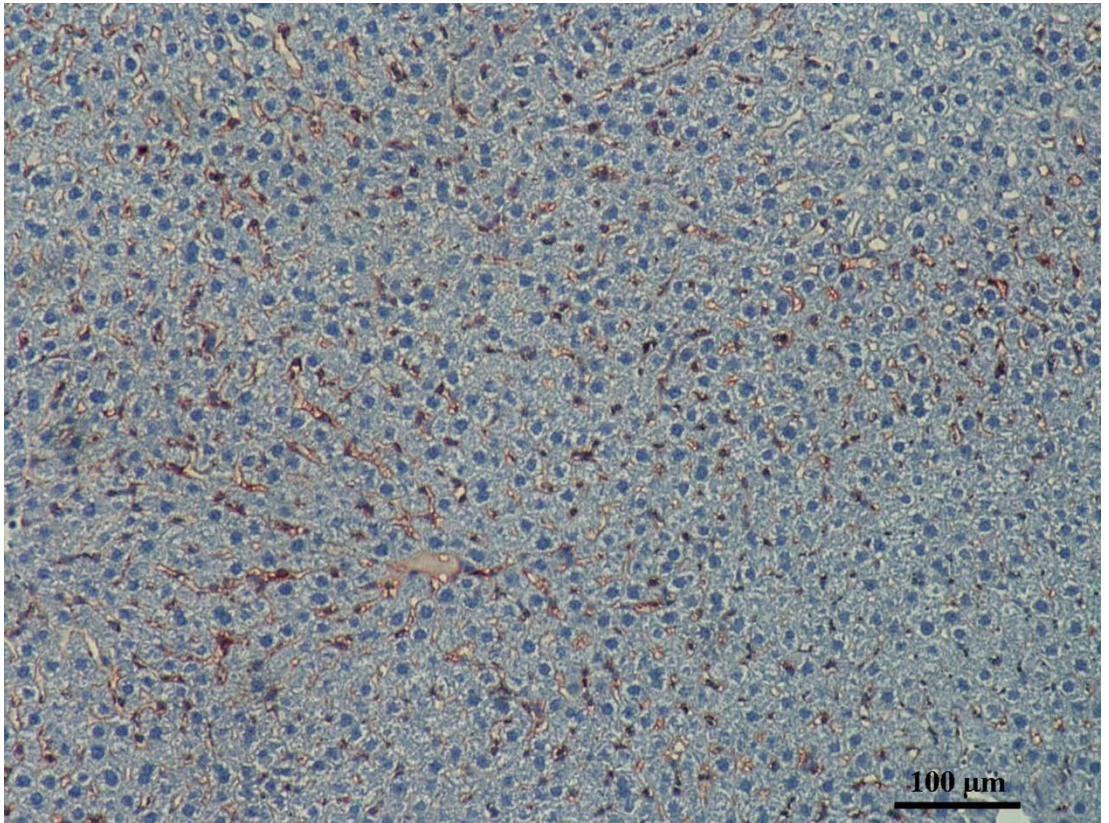
#### 4.6. İmmünohistokimyasal Boyama

İstatistik yapılmadı, 20 nm 300 mg/kg ve 80 nm 300 mg/kg uygulanan hayvanlarda belirgin immün reaktivite artışı gözlemlendi. Diğer gruplarda ise gözlenebilir immün reaktivite artışı bulunmadı.

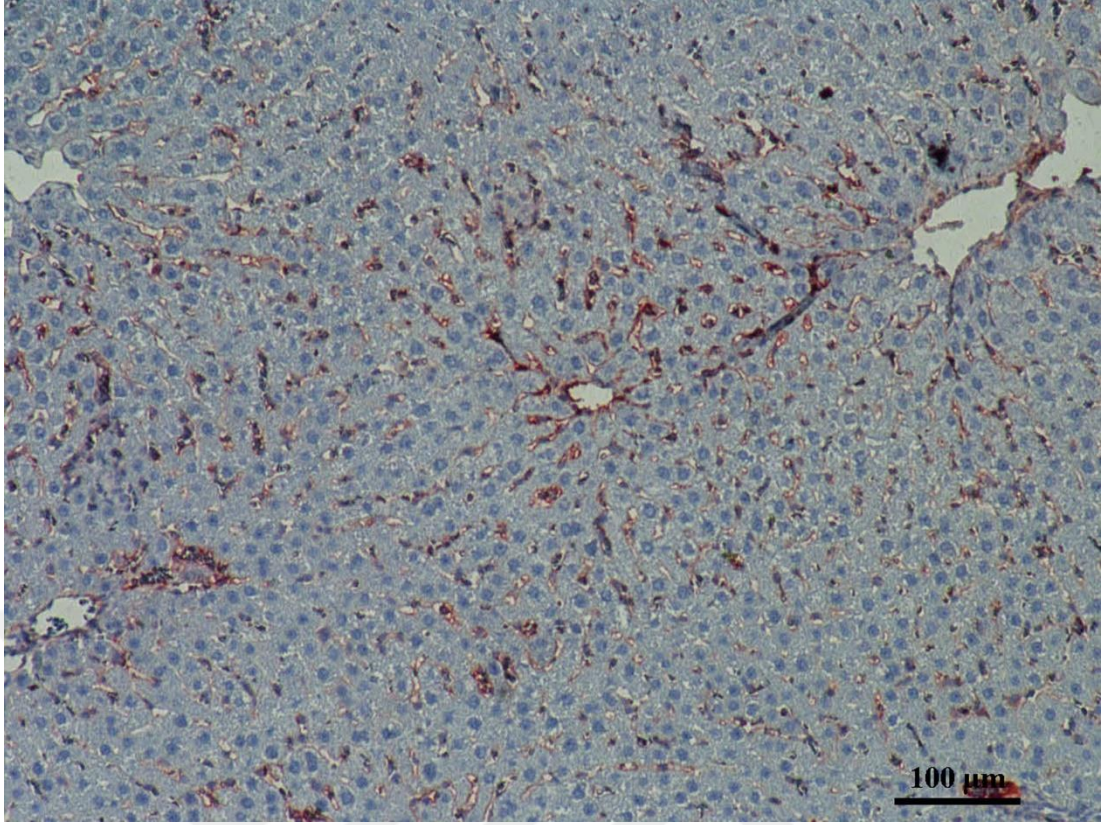




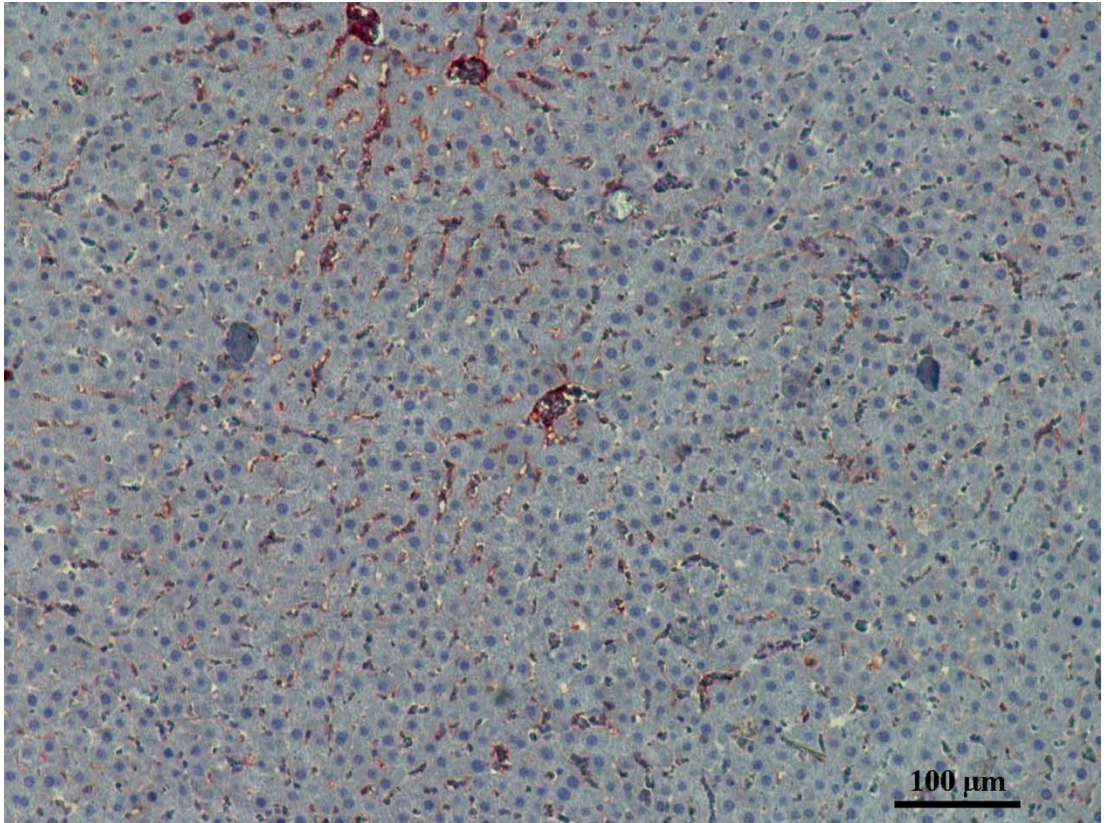
**Resim 4.14.** Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması



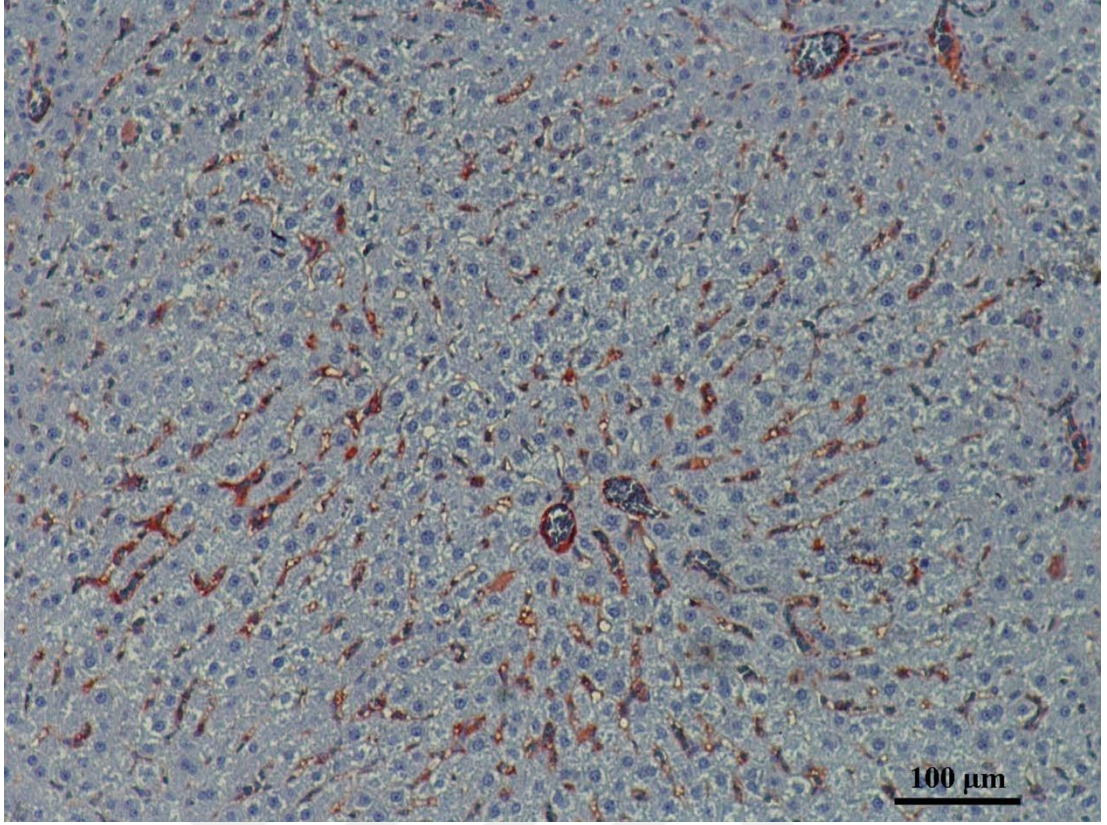
**Resim 4.15.** 20 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması.



**Resim 4.16.** 20 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması



**Resim 4.17** 80-100 nm 50 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması



**Resim 4.18.** 80-100 nm 300 mg/kg grubuna ait karaciğer kesitinin CD68 boyanması

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Woodrow Wilson listesinde en fazla kullanılan nanomateryal nanogümüştür. Bu listede bulunan ürünlerin yaklaşık olarak dörtte biri nanogümüş içermektedir. Nanogümüşün geniş kullanım alanları arasında birçok ürün bulunmaktadır bunlardan bazıları; oda spreyi, duvar boyası, kozmetik ürünleri, güneş kremi (Woodrow Wilson, Project on Emerging Nanotechnologies 2017), biyolojik görüntüleme yöntemleri (Lee ve El-Sayed 2006) ve medikal tedavi amaçlı (Sibbald ve ark. 2007) kullanımlardır. En fazla üründe bulunan nanopartikül, nanogümüş olduğu için ve nanogümüşe maruziyet giderek arttığı için çalışmamızda nanogümüş kullanmayı tercih ettik.

Nanogümüşe maruziyet yolları arasında solunum yolu, dermal temas, kan ve sindirim yolu bulunmaktadır (van der Zande ve ark. 2012). Oral yolla nanogümüş alımının, tavuklara antibiyotik olarak nanogümüş uygulanması (Ahmadi 2009), yiyecek paketleri, yiyecek konteyneri, yiyecek katkı maddesi olarak kullanımı (Woodrow Wilson, Project on Emerging Nanotechnologies 2017), içme suyunun dezenfekte edilmesi (Fewtrell ve ark. 2017) ve nanogümüşün sığır etine ilave edilmesi ile suya karışan nanogümüşün balıklara ve balıklardan da insanlara ulaşması gibi birçok sebebi vardır ve bunlara bağlı olarak maruziyet yolları içinde en çok gerçekleşen oral yoldur (Frohlich ve Frohlich 2016). Bu yüzden çalışmamızda oral uygulama yolunu tercih ettik.

*In vitro* birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen hala *in vivo* çalışmalar yetersizdir. Nanogümüşün memeli sistemler ile etkileşimi tam olarak anlayamamıştır ve hala olası toksik mekanizmalar ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Sıçan modeli seçilmesinin sebebi insanlara genetik benzerliği, kısa üretim zamanı ve büyük hayvanlara göre düşük maliyetidir (Frost ve Jee 1992).

Nanogümüşün uygulama dozları çok geniş bir aralıkta dağılmaktadır, kullanılan nanogümüş dozları 0,2 mg/kg'dan (Skalska ve ark. 2016) başlayıp 5000 mg/kg'a (Ansari ve ark. 2016) kadar geniş bir aralıkta seyretmektedir. Biz de çalışmamızda 50 mg/kg ile 300 mg/kg dozlarını kullandık. Her ne kadar bu rutinde günlük kullanım dozlarının üzerinde de olsa, özellikle yiyeceklere katkı maddesi, su

arıtma, diş macunu ve ilave besin desteği olarak kullanım bu dozları da olası hale getirmektedir.

Süre açısından bakıldığında çalışmalar tek doz uygulamadan (Kermanizadeh ve ark. 2014), 90 gün (Garcia ve ark. 2016) süren uygulamalara kadar değişmektedir. Biz alışmamızda 10 günlük uygulama süresini tercih ettik.

Oral yolla uygulanan nanogümüş birçok organa dağılmaktadır. En çok dağılım mide ve ince bağırsaklardan emilime bağlı olarak bu bölgelerde olmaktadır. Ancak nanogümüş kan dolaşımına geçtikten sonra en çok karaciğerde bulunmaktadır, onu da dalak ve böbrek izlemektedir (van der Zande ve ark. 2012). Bu yüzden de çalışmamızı nanogümüşün boyut ve doz bağımlı olarak karaciğerde oluşturacağı etki üzerine kurduk.

Çalışmamızın başında ve sonunda yaptığımız ölümlerde sıçanlarda vücut ağırlığı bakımından anlamlı herhangi değişim gözlenmemiştir. Birçok alışma, bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar göstermektedir. Qin ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 28 gün boyunca oral gavaj yoluyla 0,5 mg/kg ve 1 mg/kg dozlarında nanogümüş ve kontrol grubu olarak da deiyonize su uygulamışlardır. Sonuç olarak kiloyu ve kilo alımını, uygulama gruplarında kontrol grubuyla benzer olarak bulmuşlardır. Sıçanlara 90 gün boyunca PVP (polivinil pirolidon) kaplı nanogümüş 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg dozlarında oral olarak uygulanmış ve kontrol grubuyla aralarında kilo açısından anlamlı fark bulunmamıştır (Garcia ve ark. 2016). 1 mg/kg, 2 mg/kg ve 4 mg/kg 8,7 nm nanogümüş intraperitoneal olarak 28 gün boyunca uygulanmış ve sonuçta hayvanların kilolarında anlamlı fark bulunmamıştır (El Mahdy ve ark. 2015). Park ve ark. (2010) yaptıkları 14 günlük çalışmada farklı nanopartikül boyutlarının hayvanların kilolarında değişikliğe yol açmadığını bulmuşlardır. Tiwari ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada nanogmş 4, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarında uygulamışlar 15 gün sonunda hayvanların kilolarında anlamlı düşüş olmadığını gözlemişlerdir. 15. günden sonra 20 ve 40 mg/kg dozu uygulanan hayvanlarda anlamlı kilo kaybı bulunmuş, ancak 4 ve 10 mg/kg dozu uygulanan hayvanlarda herhangi değişiklik gözlenmemiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak 15. güne kadar hayvan kilolarında değişim bulunmamış ancak 15. günden sonra değişim olabileceğini göstermiştir bu da daha uzun maruziyetin hayvanların kilolarını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Shahare ve ark. (2013) farelerde yaptıkları çalışmada 3 nm'den 20 nm'ye kadar nanogümüşü 5, 10, 15 ve 20 mg/kg dozlarında 21 gün boyunca uygulamışlardır. Nanogümüşün uygulandığı gruplarda ilk 7 günde anlamlı kilo değişimi yoktur. Ancak 7. günden sonra 14. ve 21. günlerde anlamlı kilo düşüşü gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının bizim çalışmamızla uyumlu olmamasının sebebi uygulanan hayvanın farklılığı olabileceği düşünülmektedir çünkü hem farklı hayvanın metabolizması farklıdır, hem de nanogümüşün sindirim sistemi boyunca etkileneceği sıvılar farklıdır ve bu farklılık nanogümüşün boyutunda ve dolayısıyla emilimi ve hayvanda oluşturacağı etkisinde değişime yol açacağını düşündürmüştür. 4 haftalık intravenöz 6 mg/kg 20 nm'lik nanogümüş uygulamasından sonra hem erkek hem de dişi sıçanlarda anlamlı kilo kaybı olduğu bulunmuştur (De Jong ve ark. 2013). Bu çalışmadaki değişimin bizim çalışmamızın sonuçlarından farklı olmasının sebeplerinin uygulama yolunun farklılığı olabileceği düşünülmektedir; çünkü daha önce de bahsedildiği gibi nanogümüşün ince bağırsaklardan emilimi çok düşük oranlarda gerçekleşmektedir ve diğer sebep de uygulama süresinin bizim çalışmamıza göre uzun olmasıdır.

ALT, AST ve ALP karaciğer hasarında artar. ALT en duyarlı karaciğer belirteçidir ve karaciğer hasarı durumlarında bu enzim kana geçer (Ansari ve ark. 2016). Çalışmamızda serum AST ve ALP seviyeleri doz arttıkça ve boyut azaldıkça artmıştır ancak gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Serum ALT seviyelerinde ise gruplar arasında belirgin fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlar uygulama süresi göz önüne alındığında beklentilerimizle uyumludur. Çalışmamızla uyumlu olarak sıçanlara 90 gün boyunca PVP kaplı nanogümüşün 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg dozları oral olarak uygulanmış ve ALT, AST, ALP ölçümlerinde anlamlı herhangi değişim gözlenmemiştir (Garcia ve ark. 2016). Erkek sıçanlarda nanogümüş hem 0,5 hem de 1 mg/kg dozlarında AST'yi anlamlı olarak artırmıştır. Her ne kadar histopatolojik olarak toksisite gözlenmemiş olsa da yazar bu AST artışını tekrarlayan nanogümüşün biyokimyasal seviyede hepatotoksisiteyi göstermesi olarak yorumlamıştır. Ancak aynı çalışmada dişi sıçanlarda AST seviyesinde anlamlı fark bulunamamıştır. Yazar cinsiyete bağlı sonuç farklılığının sebebini erkek ve dişi sıçanların kanındaki hormon konsantrasyonları gibi farklı serum içeriğinin olmasına bağlamıştır (Qin ve ark. 2017). Bizim de çalışmamızda

dişi hayvanlar kullandığımız düşünöldüğünde sonuçların çalışmamızla uyumlu olduğu anlaşılacaktır.

Farelerle yapılan çalışmada 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarında nanogümüş uygulamasından sonra ALT ve AST artışı olduğu bulunmuştur ancak bu artış istatistiki olarak anlamlı seviyede gerçekleşmemiştir, oysa 3000 mg/kg ve 5000 mg/kg dozları uygulandığında istatistiki olarak anlamlı artış gerçekleşmiştir. Tüm deney gruplarında nanogümüş uygulamasından sonra ALP artışı gerçekleşmiştir, ancak bu artış hiçbir grupta istatistiki olarak anlamlı seviyede gerçekleşmemiştir (Ansari ve ark. 2016). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda uyguladığımız doza yakın dozlarda uygulama sonucu bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar vermiştir. Ancak bizim çalışmamızdaki dozların on katı gibi çok yüksek dozlarda nanogümüş uygulandığında ALT ve AST istatistiki olarak anlamlı artış göstermektedir bu da çok yüksek dozlarda nanogümüşün karaciğer hasarı işaretleyicilerini artırabileceğini düşündürmektedir.

ALT ve AST 40 ve 20 mg/kg dozunda nanogümüş uygulanmasından sonra kontrole göre anlamlı artış gösterirken; 4 ve 10 mg/kg dozunda nanogümüş uygulananlarda anlamlı değişim gözlenmemiştir. Yüksek dozlarda ALP ve GGT'nin de arttığı bulunmuştur (Tiwari ve ark. 2011). Bu çalışmanın karaciğer hasarının biyokimyasal parametreleri açısından pozitif sonuçlar vermesinin sebebi intravenöz injeksiyon uygulamasıyla nanopartikülün herhangi kayba uğramadan doğrudan kana geçmesidir ve buna bağlı olarak feçesle kayıp ve ince bağırsakta birikim oluşmamaktadır, ayrıca çalışmanın süresi de 32 gündür ve bu bizim çalışmamızdan daha uzundur. Tüm bu sebepler ALT, AST, ALP ve GGT artışının nedeni olarak düşünölmektedir. Nanogümüşün 48 saat arayla iki defa intraperitonyal 2000 mg/kg dozunda uygulanmasından sonra serum ALT ve AST değerleri kontrole göre önemli artış göstermiştir (Sarhan ve Hussein 2014). Buradaki değerlerin önemli artış göstermesinin sebebinin nanogümüşün çok yüksek dozda ve farklı uygulama yolu kullanımına bağlı olduğu düşünölmektedir. Nanogümüşün 20 nm ve 100 nm boyutlarında 6 mg/kg dozunda intavenöz olarak 28 gün uygulamasından sonra ALT, AST ve ALP artışı gözlenmiştir (De Jong ve ark. 2013). Bu çalışmada da, bizim çalışmamızdan farklı yoldan uygulamaya bağlı olarak daha fazla nanogümüş hedef

dokuya ulaşmış olması muhtemeldir ve bu da karaciğer hasarının göstergesi olan biyokimyasal parametrelerde artışa sebep olmaktadır.

42 nm 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg ve 1 mg/kg dozlarında nanogümüş 28 gün uygulandıktan sonra AST ve ALP hem erkek hem dişi sıçanlarda artmıştır ancak ALT sadece dişi sıçanlarda artarken erkeklerde artmamıştır bu kaplamasız olan nanogümüşün hepatotoksisiteye sebep olabileceğini düşündürmektedir (Park ve ark. 2010).

Tüm bu bulgular beklenildiği gibi ALT, AST ve ALP'nin artışının bizim çalışmamızdan çok daha yüksek değerlerde ya da çok daha uzun sürelerle nanogümüş uygulaması sonucu gerçekleşebileceğini göstermektedir. Bu artışın yüksek doz ve uzun süre uygulama sonucu gerçekleşebilmesinin sebebi de *in vitro* çalışmalarda gösterildiği şekliyle çeşitli diğer hücre gruplarına göre hepatositlerin nanogümüşe yüksek dayanıklılığı ve bu parametrelerin hepatositlerdeki yüksek hasar sonucu artmasıdır.

Serumdaki farklı oksidan türevleri laboratuvarlarda ayrı ayrı ölçülebilir, ancak bu ölçümler fazla miktarda zaman, para ve emek kaybına sebep olmaktadır ve de karmaşık tekniklerin uygulanmasını gerektirmektedir (Tarpey ve ark. 2004). Bunlardan kaçınmak için TOS ve TAS ölçümü yapıldıktan sonra TOS ile TAS'ın oranlanması ile ortaya çıkan ve oksidasyon ile antioksidasyon arasındaki redoks dengesini yansıtan, oksidatif stres göstergesi olan OSI hesaplaması yapılabilir (Aslan ve ark. 2011). OSI oksidatif statüyü TOS ve TAS'tan daha iyi yansıtmaktadır (Harma ve ark. 2003). Çalışmamızda da bu yüzden oksidatif stresin asıl göstergesi olarak OSI değerlendirilmiştir.

Serum TOS seviyesi kontrol grubunda 20 nm 300 mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olarak bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da boyutun azalması ve dozun artmasıyla sayısal artış olduğu gözlenmiştir. Serum TAS seviyelerinde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Serum OSI değerleri incelendiğinde oksidatif stresin boyut azalması ve doz artışı ile arttığı bulunmuştur. Bunlar da bize küçük boyutlu ve yüksek doz nanogümüş uygulamasının serumda oksidatif stresi artırdığını göstermektedir.



Nanomateriyaller toksik etkilerini oksidatif hasar üzerinden gösterebilmektedirler ve dolayısıyla artan aktif yüzey oksidatif hasar artışına yol açmaktadır (Nel ve ark. 2006). Bu da boyut küçüldükçe oksidatif stres artışının nedenini açıklamaktadır.

Nanogümüşün 4,7 nm ve 42 nm boyutlarıyla uygulandığı çalışmada oksidatif hasarın boyut bağımlı olmadığı gözlemlendi (Avalos ve ark. 2015).

ROS oluşumunun nanogümüş toksisitesinin önemli bir mekanizması olduğu geniş kabul görmektedir. ROS oluşumu hücrede apoptozis ve hücre döngüsünün durması gibi çok çeşitli hücresel olaylara neden olmaktadır. Nanopartiküllerce üretilen ROS'un mitokondriyal membran permeabilitesini artırabildiği ve apoptozisi tetiklemek için respiratuar zinciri bozabileceği gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinin nanogümüş uygulamasından sonra oksidatif stresin indüklendiğinin göstergesi olan ROS üretiminde doz bağımlı anlamlı artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Xue ve ark. 2016). Nanogümüşe 10-50 µg/ml dozlarında 24 saat 100 nm ve 15 nm boyutlarında maruziyet sonucunda 100 nm olan partiküller 25 ve 50 µg/ml dozlarında daha yüksek toksisite göstermiştir. Hücredeki ROS seviyeleri 10 µg/ml'den itibaren anlamlı olmak üzere konsantrasyon bağımlı olarak artmıştır. 15 nm ve 100 nm Ag maruziyeti 25 ve 50 µg/ml dozlarında kontrole göre ROS üretimi 10 kat artış göstermiştir. 15 nm ve 100 nm gümüş maruziyeti ROS üretimi ile uyumlu olarak GSH düşüşüne sebep olmaktadır. Nanogümüş mitokondriyal membran potansiyelini de düşürmektedir (Hussain ve ark. 2005). Yüksek doz nanogümüş uygulamasının SOD ve GPx'in yüksek konsantrasyonlarda ciddi düşüşüne sebep olduğu ancak düşük konsantrasyonlarda düşüşün görece az kaldığı gözlemlenmiştir, bundan dolayı nanogümüşün yüksek konsantrasyonlarda HL-7702 hücrelerinde oksidatif hasara yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır (Song ve ark. 2012). Zebra balıklarıyla yapılan çalışma da AgNP uygulamasının oksidatif hasara yol açtığını doğrulamıştır (Choi ve ark. 2010). 4, 10, 20 ve 40 mg/kg dozları uygulandığında, artan nanogümüş dozlarıyla ROS üretimi de artmaktadır (Tiwari ve ark. 2011). Ayrıca nanogümüş uygulaması oksidatif stresle ilgili genlerde artışa yol açmıştır (Cha ve ark. 2008). Bunlar da hücresel oksidatif stresin nanogümüş toksisitesine doğrudan katıldığını işaret etmektedir.

Prasad ve ark. (2013) in vitro HepG2 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada 10 ve 75 nm boyutunda PVP ve sitrat kaplı nanogümüş uygulamasından sonra oluşturdukları oksidatif stresi değerlendirmişler ve nanogümüşün küçük boyutlarda daha fazla oksidatif strese sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu da bizim çalışmamızdaki boyut küçüldükçe oksidatif stresin arttığı sonucuyla uyumludur.

Sitrat kaplı nanogümüşün oral yolla uygulanarak yapılan çalışmada 10 nm boyutundaki nanogümüş 14 gün boyunca 0,2 mg/kg dozunda uygulanmış ve çalışmanın sonucunda nanogümüşün bu şartlar altında karaciğerde oksidatif strese yol açmadığı bulunmuştur (Skalska ve ark. 2016). Bu çalışmada oksidatif hasar olmadığının bulunmasının sebebi uygulanan dozun yazarlarının da değindiği gibi bu güne kadar uygulanan dozların çok altındaki değerde olmasıdır.

Histopatolojik olarak kontrol grubu normal bulunmuştur ve diğer gruplar incelendiğinde en çok patolojik bulgu olan grubun 20 nm 300 mg/kg grubu olduğu, bunu 80-100 nm 300 mg/kg grubunun izlediği ve 20 nm 50 mg/kg ile 80-100 nm 50 mg/kg grupları arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize nanogümüşün histopatolojik olarak oluşturduğu hasarın boyut düşüşü ile ve doz artışı ile arttığını göstermektedir. Nanogümüşün karaciğerde oluşturduğu histopatolojik değişiklikler konjesyon, lenfosit infiltrasyonu, nekrosis, pleomorfik nükleus ve sinüzoidlerde dilatasyon olarak gözlenmiştir.

Fareye 28 gün boyunca 500 mg/kg ve 1000 mg/kg uygulama sonucunda hepatositlerde orta seviye değişiklikler olmuştur ve sinüzoid lümeninde daralma gözlenmiştir ve hepatik lobülde hepatik hücrelerden birkaçında değişim gözlenmiştir. Ancak 1000 mg/kg ve 3000 mg/kg uygulanma sonucunda hepatik hücreler ve inflamatuvar hücrelerde şişme gözlenmiştir. Ayrıca portal venede konjesyon ve hepatositlerde piknotik nükleus gözlenmiştir (Ansari ve ark. 2016).

Karaciğerde 28 gün AgNO<sub>3</sub> AgNP'ü ve kontrol grubu olarak da deiyonize su 0,5 ve 1 mg/kg dozlarında uygulanmış ve sonuçta karaciğerin histolojik incelenmesinde hepatositlerin hafif spotty nekrozu ve santral ven etrafında inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu gözlenmiştir. AgNP'ün uygulandığı karaciğerdeki minör patolojik değişiklikler kontrol grubu ve AgNO<sub>3</sub> gruplarına göre

farklılık göstermemiştir, bu yüzden de spontan lezyonlar olarak düşünülebilirler (Qin ve ark. 2017).

Karaciğerin histolojik incelemesinde nanogümüş uygulamasından sonra lenfosit infiltrasyonu gözlenmiştir ve bu da nanogümüşe bağlı inflamasyon oluştuğunun göstergesidir (Cha ve ark. 2008).

HepG2 hücrelerinin şekil ve boyutları nanogümüş uygulaması sonucunda değişmiş iken kontrolde değişmemiştir (Xue ve ark. 2016). TEM ile yapılan incelemede 20 ve 40 mg/kg dozu uygulanan sıçanların anormal yapıda hücreler içerdiği görülmüş ancak tedavi uygulanmamış grup ve düşük dozlarda ise herhangi anormallik bulunmamıştır. Nanopartikül birikiminin sadece 40 mg/kg yüksek doz uygulamada gerçekleştiği; nanopartiküllerin sitoplazma ve nükleer membran boyunca bulunduğu gösterilmiştir (Tiwari ve ark. 2011).

Çalışmanın sonuçları 1 mg/kg a kadar nanogümüşün histopatolojik muayene açısından anlamlı toksik etkileri olmadığını göstermiştir (Qin ve ark. 2017).

1 mg/kg, 2mg/kg ve 4 mg/kg 8,7 nm nanogümüşün 28 gün intraperitoneal olarak uygulanması sonucunda karaciğerde portal kan damarlarında konjesyon, sinüzoidlerde dilatasyon ve lökositöz tüm gruplarda gözlenmiştir (El Mahdy ve ark. 2015).

Zebra balıklarıyla yapılan çalışmada çeşitli değişikliklerle birlikte hepatik kordonlarda bozulma gözlenmiştir (Choi ve ark. 2010).

Sıçanlara 90 gün boyunca PVP kaplı AgNP 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg dozların oral olarak uygulanmış hepatositler incelendiğinde atrofi, nekroz, inflamasyon, fibroz gözlenmemiştir ancak binükleotidli hepatosit sayısının arttığı gözlenmiştir (Garcia ve ark. 2016).

Yapılan histopatolojik incelemede karaciğerde herhangi değişiklik oluşmamıştır ama bu muhtemelen uygulamada kullanılan dozun düşük olmasına bağlıdır ve bu yüzden daha ileri araştırmalar gerekmektedir (Park ve ark. 2010).

TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubunda diğer gruplara göre düşük çıkmıştır. TUNEL pozitif hücre sayısı 20 nm 300 mg/kg grubunda diğer tüm gruplara

göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. TUNEL pozitif hücre sayısı 80-100 nm 50 mg/kg grubunda 20 nm 50 mg/kg grubu ile istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir. TUNEL pozitif hücre sayısı 80-100 nm 300 mg/kg grubunda 20 nm 50 mg/kg grubuna göre anlamlı değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, nanogümüşün boyutu azaldıkça ve dozu arttıkça karaciğerde apoptotik indekste artışa sebep olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde bazı çalışmalar nanogümüşün toksisitesinin doz bağımlı olduğunu göstermiştir. Nanogümüşe HepG2 hücrelerinde 24 saat boyunca maruziyet sonucunda apoptozis oranı kontrole göre 3,1 ile 14,2 kat artmış bulunmuştur. Ayrıca HepG2 hücrelerindeki apoptozisin doz bağımlı olduğu da gösterilmiştir (Xue ve ark. 2016). Ayrıca karaciğerde nanogümüşün apoptozisin belirteci olduğu düşünülen genlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Cha ve ark. 2008). Erişkin zebra balıklarıyla yapılan çalışmada da kromatin kondensasyonu, piknozis gibi apoptotik değişiklikler gözlenmiştir ve TUNEL çalışmasıyla DNA fragmentasyonu tespit edilerek nanogümüşün apoptozise yol açtığı doğrulanmıştır (Choi ve ark. 2010). Farelerde 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozunda 28 günlük uygulama karaciğerde ultrastruktural değişikliğe sebep olmamışken, 3000 mg/kg ve 5000 mg/kg dozlarında uygulama karaciğerde nükleer membranda düzensizlik, kromatin kondensasyonu, küçülmüş ve atrofik nükleus, şişmiş mitokondri ve kristalarda kayıp, endoplazmik retikulumda düzensizlik ve şişme gözlenmiştir. Bu gözlemler hepatositlerde apoptozisin göstergesidir (Ansari ve ark. 2016). Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak 1000 mg/kg doza kadar apoptoziste artış olmamasının sebebi farklı metabolizmaya sahip farklı deney hayvanı kullanılmış olmasıdır.

Souza ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada 10 nm boyutundaki nanogümüşün 100 nm boyutundaki nanogümüşten daha fazla apoptozise sebep olduğunu bulmuşlar ve bunun sebebinin aynı dozda uygulanan 10 nm nanogümüşte 100 nm nanogümüşe göre daha fazla aktif atom olmasına bağlamışlardır.

HepG2 hücreleri test edilen diğer hücrelere göre 4.7 nm kaplı nanogümüşe daha dayanıklı çıkmıştır. Düşük konsantrasyonlarda DNA kırığı oluşmamıştır oysa diğer tüm hücrelerin tüm konsantrasyonlarda DNA kırığı istatistiki olarak anlamlı seviyede olduğu bulunmuştur. 42 nm kapsız nanogümüşe de en dayanıklı HepG2

hücrelerinin olduğu bulunmuştur ancak bunlarda sadece en yüksek dozda DNA kırığı gerçekleşmiştir. Yazarlar bunu küçük nanogümüşün büyüğe göre daha toksik olmasına bağlamıştır ayrıca doz bağımlı olarak da toksisitenin değiştiğini gözlemişlerdir (Avalos ve ark. 2015). Bu çalışmanın sonuçları da bizim sonuçlarımızla hem boyut hem de doz açısından benzer bulgular vermiştir.

Huo ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada nanogümüş maruziyetinin farelerde hem yüksek hem de düşük dozda akciğer ve karaciğerde önemli ER stresi oluşturduğunu gözlemişlerdir. Akciğer ER yanıtı akut pulmoner toksisiteyi gösteren önemli miktarda apoptozise yol açarken; karaciğerde ise apoptozis izlenmemiştir. Bu da çalışmada kullanılan dozların karaciğerde apoptozise yol açacak kadar yüksek olmadığını ancak akciğerde apoptozise yol açacak kadar yüksek olduğunu göstermektedir bu da farklı hücrelerin nanomateryallerden farklı düzeylerde etkilendiklerini unutmamamız gerektiğini bize hatırlatmaktadır.

Nanogümüşün 20 nm 300 mg/kg grubu ile 80-100 nm 300 mg/kg grubunda immün reaktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir.

Sinüzoidal lümenin daraldığı ve hepatositlerin hasarlandığı gözlenmiştir; ultra ince kesitlerde hepatik hücrelerde şişme, sinüzoidal lümende daralma ve hipertrofiye Kupffer hücreleri gözlenmiştir. Hepatositlerde yoğun sitoplazmik vakuolizasyon, çok sayıda çeşitli boyutlarda intrasitoplazmik ve intranükleer yağ globülleri gözlenmiştir (Sarhan ve Hussein 2014).

De jong ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada intravenöz olarak nanogümüş uygulamışlar ve dalak, lenf nodu, adrenal bezler, böbrek, karaciğer gibi çeşitli dokularda kahverengimsi pigment birikimi olduğunu gözlemişler ve bu pigmentlerin biriken nanogümüş olduğunu düşünmüşlerdir. Karaciğerde pigment yani nanogümüşün venöz sinüzoidal duvarda yerleşmiş olan Kupffer hücrelerinde biriktiğini gözlemişlerdir. Ancak buna rağmen önemli histopatolojik değişiklikler izlenmemiştir.

Altın nanopartikülünün uygulanması Kupffer hücrelerinin belirginleşmesine ve sayıca artmasına sebep olmaktadır (Abdelhalim ve Jarrar 2012).

Yine yapılan başka bir çalışmada Kupffer hücrelerinde ince kahverengi pigmentler gözlenmiştir (El Mahdy ve ark. 2015).

Bazı Kupffer hücrelerinde çok sayıda membranöz vakuoller, fragmente endoplazmik retikulum sisternaları, endozomlar, elektron-yoğun materyal olarak görünen farklı boylarda nanogümüş ile dolu çok sayıda lizozom gözlenmiştir (Sarhan ve Hussein 2014).

Sonuç olarak doz, boyut, kaplama, uygulama yolu, etkilenecek hücre, uygulamanın yapılacağı cinsiyet ve dahi her bir bireyin florasının ve genetiğinin farklılığı gibi birçok faktör nanogümüşe bağlı tehlikeyi etkilemektedir. Ayrıca bireylerin bağırsaklarındaki besinler ve bağırsaklarda boşalım zamanı da farklıdır dolayısıyla bu değişkenlere bağlı olarak emilen miktar ve dolayısıyla toksisitenin de değişebileceği akılda tutulmalıdır. Tüm bu gözlemler nanogümüşün kendisine yer edindiği geniş uygulama alanlarında dikkatle kullanılması gerektiğini göstermektedir. Her bir uygulama yolu için ayrı ayrı değerlendirmeler ile doz ve boyutun insan sağlığı açısından doğru değerlerinin bulunması için çalışmalar yapılmaya devam edilmelidir.

## 6. KAYNAKLAR

<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>, Erişim tarihi 11.08.2017.

- Abdelhalim MA, Al-Ayed MS, Moussa SA. The effects of intraperitoneal administration of gold nanoparticles size and exposure duration on oxidative and antioxidants levels in various rat organs. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 28, 2 Suppl, 705-12.
- Abdelhalim MA, Jarrar BM. Renal tissue alterations were size-dependent with smaller ones induced more effects and related with time exposure of gold nanoparticles. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10: 163.
- Abdelhalim MA, Jarrar BM. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012; 10: 5.
- Abdullah Z, Knolle PA. Liver macrophages in healthy and diseased liver. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*. 2017; 469(3-4): 553-60.
- Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y, 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008; 233(3): 404-10.
- Ahmadi J. Application of different levels of silver nanoparticles in food on the performance and some blood parameters of broiler chickens. *World Applied Sciences Journal*. 2009; 7(1): 24-7.
- Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*. 2009; 25(2): 206-13.
- Alkaladi A, Abdelazim AM, Afifi M. Antidiabetic activity of zinc oxide and silver nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(2): 2015-23.
- Ansari MA, Shukla AK, Oves M, Khan HM. Electron microscopic ultrastructural study on the toxicological effects of AgNPs on the liver, kidney and spleen tissues of albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016; 44: 30-43.
- Aslan M, Cosar N, Celik H, Aksoy N, Dulger AC, Begenik H, Soyoral YU, Kucukoglu ME, Selek S. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism. *Endocrine*. 2011; 40(2): 285-9.
- Avalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *Journal of Applied Toxicology : JAT*. 2014; 34(4): 413-23.
- Avalos A, Haza AI, Morales P. Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. *Folia Biologica*. 2015; 61(1): 33-42.
- Aydın A, Sipahi H, Charehsaz M. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. In: *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. Eds: InTech, p. 2012
- Aziz SG, Aziz SG, Akbarzadeh A. *Advances in Silver Nanotechnology: An Update on Biomedical Applications and Future Perspectives*. *Drug Research*. 2017; 67(4): 198-203.
- Baffy G, 2009. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of Hepatology*. 2009; 51(1): 212-23.
- Barber D, Freestone IC. An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*. 1990; 32(1): 33-45.
- Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015; 218: 48-68.
- Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Science Signaling*. 2010; 3(145): re8.
- Berthet M, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends in Biotechnology*. 2015; 35(8): 770-84.

- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40(5): e331-e9.
- Brouwer D. Exposure to manufactured nanoparticles in different workplaces. *Toxicology*. 2010; 269(2-3): 120-7.
- Bumbudsanpharoke N, Choi J, Ko S. Applications of nanomaterials in food packaging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015; 15(9): 6357-72.
- Buzea C, Pacheco, II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007; 2(4): Mr17-71.
- Cha K, Hong H-W, Choi Y-G, Lee MJ, Park JH, Chae H-K, Ryu G, Myung H, 2008. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnology Letters*. 2008; 30(11): 1893-9.
- Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Popovic Z, Chen O, Kamoun WS, Bawendi MG, Fukumura D, Jain RK. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nature Nanotechnology*. 2012; 7(6): 383-8.
- Chen J, Han CM, Lin XW, Tang ZJ, Su SJ. [Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese Journal of Surgery]*. 2006; 44(1): 50-2.
- Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, Yi J, Ryu DY. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*. 2010; 100(2): 151-9.
- Choi K, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*. 2017; 11(1): 64-75.
- Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 59(4): 587-90.
- Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine (London, England)*. 2016; 11(1): 81-100.
- Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 18(1): 23.
- De Jong WH, Van Der Ven LT, Sleijffers A, Park MV, Jansen EH, Van Loveren H, Vandebriel RJ. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials*. 2013; 34(33): 8333-43.
- Debia M, Bakhiyi B, Ostiguy C, Verbeek JH, Brouwer DH, Murashov V. A Systematic Review of Reported Exposure to Engineered Nanomaterials. *The Annals of Occupational Hygiene*. 2016; 60(8): 916-35.
- DeLouise LA. Applications of nanotechnology in dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012; 132(3): 964-75.
- Di Bucchianico S, Fabbrizi MR, Misra SK, Valsami-Jones E, Berhanu D, Reip P, Bergamaschi E, Migliore L. Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis*. 2013; 28(3): 287-99.
- Duque-Parra JE, 2005. Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anatomical record. Part B, New Anatomist*. 2005; 283(1): 2-4.
- El Mahdy MM, Eldin TA, Aly HS, Mohammed FF, Shaalan MI, 2015. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2015; 67(1): 21-9.
- Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*. 2005; 3: 6.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007; 35(4): 495-516.
- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, İstanbul Tıp Kitabevi. 2016.



- Fanfair D, Desai S, Kelty C. The early history of nanotechnology. *Nanotechnology: Content and Context*. 2007.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000; 52(4): 662-8.
- Fewtrell L, Majuru B, Hunter PR. A re-assessment of the safety of silver in household water treatment: rapid systematic review of mammalian in vivo genotoxicity studies. *Environmental Health : a Global Access Science Source*. 2017; 16(1): 66.
- Frohlich EE, Frohlich E. Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(4): 509.
- Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone and Mineral*. 1992; 18(3): 227-36.
- Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, Haberl N, Brunelli A, Kreyling WG, Stone V. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*. 2013; 131(2): 537-47.
- Garcia T, Lafuente D, Blanco J, Sanchez DJ, Sirvent JJ, Domingo JL, Gomez M. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2016; 92: 177-87.
- Gibson RM. Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *BMJ (Clinical research ed.)*. 2001; 322(7301): 1539-40.
- Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Medical Weekly*. 2003; 133(41-42): 563-6.
- Hobson DW, Roberts SM, Shvedova AA, Warheit DB, Hinkley GK, Guy RC, 2016. Applied Nanotoxicology. *International Journal of Toxicology*. 2016; 35(1): 5-16.
- Huang Y, Li X, Liao Z, Zhang G, Liu Q, Tang J, Peng Y, Liu X, Luo Q. A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*. 2007; 33(2): 161-6.
- Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology. *Human & Experimental Toxicology*. 2015; 34(12): 1318-21.
- Huo L, Chen R, Zhao L, Shi X, Bai R, Long D, Chen F, Zhao Y, Chang YZ, Chen C. Silver nanoparticles activate endoplasmic reticulum stress signaling pathway in cell and mouse models: The role in toxicity evaluation. *Biomaterials*. 2015; 61: 307-15.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 2005; 19(7): 975-83.
- Ivask A, Mitchell AJ, Malysheva A, Voelcker NH, Lombi E. Methodologies and approaches for the analysis of cell-nanoparticle interactions. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017.
- Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science & Technology*. 2009; 43(15): 6046-51.
- Kermanizadeh A, Chauché C, Balharry D, Brown DM, Kanase N, Boczkowski J, Lanone S, Stone V. The role of Kupffer cells in the hepatic response to silver nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014; 1:149-54
- Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002; 181-182: 471-4.
- Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environmental Health Perspectives*. 2011; 119(3): a120-5.

- Kihara T, Zhang Y, Hu Y, Mao Q, Tang Y, Miyake J. Effect of composition, morphology and size of nanozeolite on its in vitro cytotoxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011; 111(6): 725-30.
- Kim EM, Jeong HJ. Current Status and Future Direction of Nanomedicine: Focus on Advanced Biological and Medical Applications. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017; 51(2): 106-17.
- Kim KS, Khang G, Lee D. Application of nanomedicine in cardiovascular diseases and stroke. *Current Pharmaceutical Design*. 2011; 17(18): 1825-33.
- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 2009; 23(6): 1076-84.
- Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*. 2000; 26(2): 117-30.
- Klasen HJ, 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*. 2000; 26(2): 131-8.
- Klien K, Godnic-Cvar J. Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 2012; 63(2): 133-45.
- Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*. 2001; 161: Iii-xiii: 1-151.
- Kshitiz, Park J, Kim P, Helen W, Engler AJ, Levchenko A, Kim DH. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*. 2012; 4(9): 1008-18.
- Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, Vathy LA, Bergey EJ, Sajjad M, Prasad PN. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano*. 2010; 4(2): 699-708.
- Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems in Dermatology*. 2006; 33: 17-34.
- Lara HH, Garza-Trevino EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011; 9: 30.
- Lee KS, El-Sayed MA. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *The Journal of Physical Chemistry*. 2006; B, 110(39): 19220-5.
- Leslie P. Gartner JLH. *Hücre Biyolojisi ve Histoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık*. 2016; p. 299-304.
- Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2001; 2(7): 545-50.
- Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR, Larsen EH. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and Fibre Toxicology*. 2011; 8: 18.
- Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 2007; 12(4): 527-34.
- Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Therapy*. 2008; 13(2): 253-62.
- Maynard AD, Warheit DB, Philbert MA. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*. 2011; 120 Suppl 1, S109-29.
- Mescher AL. *Junqueira's Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevi*. 2015

- Montiel Schneider MG, Lassalle VL. Magnetic iron oxide nanoparticles as novel and efficient tools for atherosclerosis diagnosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2017; 93: 1098-115.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacamán MJ, 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346-53.
- Muangman P, Chuntrasakul C, Silthram S, Suvanchote S, Benjathanung R, Kittidacha S, Rueksomtawin S. Comparison of efficacy of 1% silver sulfadiazine and Acticoat for treatment of partial-thickness burn wounds. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*. 2006; 89(7): 953-8.
- Naha PC, Chhour P, Cormode DP. Systematic in vitro toxicological screening of gold nanoparticles designed for nanomedicine applications. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 2015; 29(7): 1445-53.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N, 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)*. 2006; 311(5761): 622-7.
- Niska K, Zielinska E, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2017; S0009-2797(16):30629-9.
- Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K, 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010; 30(2): 162-8.
- Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*. 2017.
- Peng H, Wisse E, Tian Z, 2016. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016; 13(3): 328-36.
- Percival SL, Bowler PG, Russell D, 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. *The Journal of Hospital Infection*. 2005; 60(1): 1-7.
- Prasad RY, McGee JK, Killius MG, Suarez DA, Blackman CF, DeMarini DM, Simmons SO. Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: effect of size, surface coating, and intracellular uptake. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 2013; 27(6): 2013-21.
- Qin G, Tang S, Li S, Lu H, Wang Y, Zhao P, Li B, Zhang J, Peng L, 2017. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environmental Toxicology*. 2017; 32(2): 609-18.
- Reibold M, Paufler P, Levin A, Kochmann W, Pätzke N, Meyer D, 2006. Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature*. 2006; 444(7117): 286-.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS, 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ: British Medical Journal*. 2001; 322(7301): 1536.
- Sancak B, Cumhuri M. *Fonksiyonel Anatomi : Baş-Boyun ve İç Organlar*. 2008
- Sarhan OM, Hussein RM. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *International Journal of Nanomedicine*. 2014; 9: 1505-17.
- Sarsılmaz M. *Anatomi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*
- Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anatomical Science International*. 2017; 92(4): 387-455.
- Shahare B, Yashpal M. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2013; 23(3): 161-7.
- Shin SW, Song IH, Um SH. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2015; 5(3): 1351-65.

- Sibbald RG, Contreras-Ruiz J, Coutts P, Fierheller M, Rothman A, Woo K. Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Advances in Skin & Wound Care*. 2007; 20(10): 549-58.
- Singh L, Kruger HG, Maguire GEM, Govender T, Parboosing R. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2017; 4(4): 105-31.
- Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ: British Medical Journal*. 2001; 322(7301):1538.
- Skalska J, Dabrowska-Bouta B, Struzynska L. Oxidative stress in rat brain but not in liver following oral administration of a low dose of nanoparticulate silver. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2016; 97: 307-15.
- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004; 275(1): 177-82.
- Song XL, Li B, Xu K, Liu J, Ju W, Wang J, Liu XD, Li J, Qi YF, 2012. Cytotoxicity of water-soluble mPEG-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. *Cell Biology and Toxicology*. 2012; 28(4): 225-37.
- Souris JS, Lee CH, Cheng SH, Chen CT, Yang CS, Ho JA, Mou CY, Lo LW, 2010. Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31(21): 5564-74.
- Souza TA, Franchi LP, Rosa LR, da Veiga MA, Takahashi CS. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016; 795: 70-83.
- ISO/TS 80004-2:2015(en) Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects, 2017. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en:sec:2.1>, 08.08. 2017.
- ISO/TS 80004-1:2015(en) Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms. 08.08.2017. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en>
- Stefaniak AB, Hackley VA, Roebben G, Ehara K, Hankin S, Postek MT, Lynch I, Fu WE, Linsinger TP, Thunemann AF. Nanoscale reference materials for environmental, health and safety measurements: needs, gaps and opportunities. *Nanotoxicology*. 2013; 7(8): 1325-37.
- Sun C, Ding Y, Zhou L, Shi D, Sun L, Webster TJ, Shen Y. Noninvasive nanoparticle strategies for brain tumor targeting. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2017; 1549-9634(17)30139-9.
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004; 286(3): R431-44.
- Thomas R, Soumya KR, Mathew J, Radhakrishnan EK. Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of Coagulase Negative Staphylococci. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 2015; 149, 68-77.
- Tiwari DK, Jin T, Behari J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011; 21(1): 13-24.
- Tolochko N. History of nanotechnology. *Nanoscience and nanotechnology. Encyclopaedia of life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the auspices of the UNESCO, SEOlss Published. 2009, Oxford.
- Tunçdemir M, Öztürk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Molecular Histology*. 2008; 39(6): 605-616
- van Broekhuizen P, van Veelen W, Streekstra WH, Schulte P, Reijnders L. Exposure limits for nanoparticles: report of an international workshop on nano reference values. *The Annals of Occupational Hygiene*. 2012; 56(5): 515-24.

- van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, Gremmer ER, Mast J, Peters RJ, Hollman PC, Hendriksen PJ, Marvin HJ, Peijnenburg AA, Bouwmeester H, 2012. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 2012; 6(8): 7427-42.
- Westmeier D, Stauber RH, Docter D. The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicology and applied pharmacology*. 2016; 299: 53-7.
- Wisse E, 1974. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *Journal of Ultrastructure Research*. 1974; 46(3): 393-426.
- Wong KK, Cheung SO, Huang L, Niu J, Tao C, Ho CM, Che CM, Tam PK. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*. 2009; 4(7): 1129-35.
- Woodrow Wilson, Project on Emerging Nanotechnologies. Erişim tarihi 12.06.2017.  
<http://www.nanotechproject.org/cpi/>.
- Wozniak A, Malankowska A. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28(6): 92.
- Wu M, Ma B, Pan T, Chen S, Sun J. Silver-nanoparticle-colored cotton fabrics with tunable colors and durable antibacterial and self-healing superhydrophobic properties. *Advanced Functional Materials*. 2016; 26( 4): 569-76.
- Xue Y, Zhang T, Zhang B, Gong F, Huang Y, Tang M. Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media. *Journal of Applied Toxicology* : JAT. 2016; 36(3): 352-60.
- Yıldırım M., Topografik Anatomi : Topografik Düzende Temel Bilgiler, Disseksiyona Yönelik Açıklamalar, Çalışma Soruları ve Yanıtları, Önemli İpuçarı, Seçilmiş Şekiller. Nobel Tıp Kitabevleri. 2014; 2. Baskı, İstanbul
- Yıldırım M. İnsan Anatomisi : Sistemik Genel Bilgiler, Klinik Özellikler, TUS Çalışma Soruları ve Yanıtları, Kısa Sözlük. Nobel Tıp Kitabevleri. 2012; 8. Baskı, İstanbul
- Yong TL, Houli N, Christophi C. Anatomy of hepatic lymphatics and its implications in hepatic malignancies. *ANZ Journal of Surgery*. 2016; 86 (11): 868-73.
- Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *European Journal of Oral Sciences*. 1999; 107(4): 290-6.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Enes Sözen 1984 yılında Antalya’da doğdu. İlköğrenimini Mecdude Başakıncı ilköğretim okulunda, ortaöğrenimini Emel Sevgi Taner ilköğretim okulunda, lise eğitimini Antalya Anadolu Lisesinde tamamladı. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesini kazandı ve 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında Sağlık Bakanlığı Eyüp Toplum Sağlığı Merkezinde çalışmaya başladı ve 2013 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ile araştırma görevlisi olarak başladı. 2017 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimini tamamladı.

## 8. EKLER



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2016 – 005

Karar Tarihi: 26.02.2016


Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'den Prof.Dr.Serpil KALKAN, Arş.Gör.M.Enes SÖZEN ve Tıbbi Biyokimya A.D.'den Prof.Dr.Mehmet AKÖZ tarafından sunulan "**Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağımlı Olarak Karaciğere Etkisinin Araştırılması**" başlıklı tez projesi 10 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

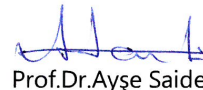
Projede 5 grupta toplam 35 adet sıçan kullanılacağı ve sıçanların anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.


Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.


  
Prof.Dr.Selim KUTLU  
Başkan

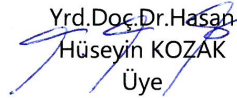
  
Prof.Dr.Lema TAVLI  
Üye


  
Prof.Dr.Ayşe Saide  
ŞAHİN  
Üye

  
Prof.Dr.Mehmet GÜL  
Üye


  
Doç.Dr.Ercan KURAR  
Üye

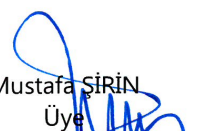
  
Doç.Dr.Tefik  
KÜÇÜKKARTALLAR  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Hasan  
Hüseyin KOZAK  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Ömer  
TANYELİ  
Üye

Vet.Hek.Halil Aydın  
ŞİMŞEK  
Üye-Katılmadı

  
Vet.Hek.Atıpaslan ÖZKÜRKÜLER  
Üye

  
Mustafa ŞİRİN  
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA  
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr  
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam