

**TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
SIÇAN T ve B LENFOSİTLERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SENEM SUNAR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Birgül MAZMANCI**

**MERSİN
ARALIK – 2014**

Senem SUNAR tarafından Doç. Dr. Birgül MAZMANCI danışmanlığında hazırlanan "Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin Sıçan T ve B Lenfositleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Doç. Dr. Birgül MAZMANCI (Danışman)

Prof. Dr. Lütfiye TAMER

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.01.2015 tarih ve 2015.02/77 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet ÇUÇUKASLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, sözlü, yazılı ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN SIÇAN T ve B LENFOSİTLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Senem SUNAR

ÖZ

Nanopartiküller son yıllarda büyük önem kazanmış ve gündelik hayatımızda kullandığımız birçok ürünün içeriğinde yer almaktadır. Nano boyutlardaki titanyum dioksit (TiO_2) partikülleri, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinin ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmün sistem yabancı etkilere karşı canlının korunmasından sorumludur. Lenfositler immün sistemin önemli elemanlarıdır. Bu çalışmada, TiO_2 in immün sistem üzerine etkisi ve etki süresinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ergin erkek sıçanlara 25 nm boyutundaki TiO_2 in 250 mg/kg'lık süspanse dozu 30 gün boyunca, gınaşırı olarak TiO_2 gavaj ile oral olarak verilmiştir. 30 gün sonunda bir grup sıçan disekte edilerek, T ve B lenfositler üzerine etkisi kemik iliğinde CD3, CD4, CD8, CD20 CD45 miktarları ölçülerek tespit edilmiştir. Ayrıca lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT) trombosit (PLT), lenfosit sayısı (LEN) ve lenfosit yüzdesi (LEN %) ölçülmüştür. TiO_2 ' in etki süresini ölçmek için 30 günlük uygulama sonrası kalan sıçanlara herhangi bir işlem yapılmamış bir grup uygulama bitimini takip eden 15. günde ve bir grup 30. günde disekte edilerek aynı analizler tekrarlanmıştır. Bulgular kontrol değerleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 30 günlük uygulama sonrası B hücre markerları olan CD45 ve CD20 miktarlarında anlamlı bir artış görülürken, T hücre markerı olan CD4 miktarında artış ve CD8 miktarında ise azalış gözlenmiştir. Değişimler uygulama sonrası 30 günlük bekleme süresinde düzelerek kontrol değerleri ile aynı olmuştur. 30 günlük uygulama sonrası periferik kan değerlerinde belirgin bir farklılık gözlenmezken, uygulamadan sonraki 15 günlük bekleme süresi sonrası WBC, RBC, HCT, LEN ve LEN % artışlar olmuştur. 30 günlük bekleme süresi sonrasında ise WBC, RBC, HGB, HCT, PLT ve LEN sayıları belirgin şekilde azalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, toksikoloji, titanyum dioksit, immün sistem, lenfosit.

Danışman: Doç. Dr. Birgül MAZMANCI, Biyoloji Bölümü, Mersin Üniversitesi

THE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON RAT T AND B CELLS

Senem SUNAR

ABSTRACT

Nanoparticles have gained importance in recent years and are currently essential constituents in a multitude of convenience products. Nanosized titanium dioxide (TiO₂) particles are widely used in products of the food, cosmetic, pharmaceutical industry. The immune system the safeguards to internal and external environment. Lymphocytes are the major components of the immune system. In this study it is aimed to investigate effects and continuance in time of TiO₂ on immune system. For this purpose 25 nm and 250mg/kg TiO₂ suspension is given to mature rats via intra gastric gavage instillation as every other day for 30 days. A group of rats are dissected at 1st day after 30 days administration and CD45, CD3, CD4, CD8 and CD20 markers were analyzed to determination effect of TiO₂ on T and B cells. Additionally leucocyte (WBC), erythrocyte (RBC), hemaglobin (HGB), hematocrit (HCT), Platelet (PLT), lymphocyte (LYM) ve lymphocyte percentage (LYM %) amounts are also analyzed. After 30 days administration, it wasn't affect any treatment and one group of rats were dissected at 15th day and the other group were dissected at 30th day and done same analysis for evaluate TiO₂ effects in time manner. Findings are compared with control group results. It is found that CD45 and CD20 B cell marker and CD4 T cell marker values increased and CD8 T cell marker values decreased after 30 days administration. However it is observed recovery at 30th days of waiting period. Values were similar with the control group. For the first dissected rats after administration there isn't any significant difference between peripheral blood values of two groups. It is observed increased WBC, RBC, HCT, LYM values at 15th day of waiting period after administration but reported significantly decreased WBC, RBC, HGB, HCT, PLT ve LYM values at 30th day of waiting period for complete blood count analysis.

Key Words: Nanoparticles, toxicology, titanium dioxide, immune system, lymphocytes

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Birgül MAZMANCI, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince engin bilgisi ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan ve yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Birgül MAZMANCI'ya, tez çalışmasını birlikte yürüttüğüm meslektaşım Ali KORKUT'a, gerek çalışma hayatım gerekse tezim konusunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Lülüfer TAMER'e, tecrübelerini paylaşan ve değerli vaktini ayıran Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e, çalışmam boyunca laboratuvarlarını bana açan Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürbüz POLAT'a, bilgilerinden istifade ettiğim Prof. Dr. Mehmet Burak Yavuz ÇİMEN ile Prof. Dr. Gülçin ESKANDARI'ya, sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan Biyolog Murat AĞCA'ya, Kimyager Cemil GÜLÜM'e ve tüm biyokimya laboratuvarı çalışanlarına ayrıca varlığı ve desteğiyle hep yanımda olan değerli arkadaşım Kimyager Buket KIRKYAŞAROĞLU'na ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. NANOTEKNOLOJİ.....	4
2.2. TİTANYUM DİOKSİT	5
2.2.1. Titanyum Dioksitin Toksik Özellikleri	6
2.3. İMMÜN SİSTEM	10
2.3.1. Nanopartiküller ve İmmün Sistem	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1 MATERYAL.....	16
3.1.1. Deney Grupları ve Uygulamalar.....	16
3.1.2. Örneklerin Alınması.....	17
3.2. YÖNTEM.....	17
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Teçhizat.....	17
3.2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	17
3.2.1.2. Kullanılan Teçhizatlar.....	18
3.2.2. Analizlerin Yapılması.....	19
3.2.2.1. Tam Kan Sayımı.....	19
3.2.2.2 Akım Sitometri Yöntemi ve Lenfosit Analizi.....	19

3.2.2.3. Flowsitometrik Prensi ve Değerlendirme.....	20
3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	24
4.1. BULGULAR.....	24
4.1.1. Kontrol ve Uygulama Grupları İçin Akım Sitometri alışma Sonuçları.....	24
4.1.2. Kontrol ve Uygulama Grupları İçin Tam Kan alışma Sonuçları.....	30
4.2. TARTIŞMA.....	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Kontrol grubu ve 30. gün TiO ₂ uygulama grubunun karşılaştırılması...	24
Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve 15 günlük bekleme gruplarının karşılaştırılması.....	26
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve 30 günlük bekleme gruplarının karşılaştırılması.....	27
Çizelge 4.4. 30 günlük TiO ₂ uygulama sonrası süreye bağlı etkileri.....	28
Çizelge 4.5. 30. gün uygulama ve kontrol gruplarının tam kan değerlerinin karşılaştırılması.....	31
Çizelge 4.6. 15 gün bekleme sonundaki uygulama ve kontrol gruplarının tam kan değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Çizelge 4.7. 30 gün bekleme sonundaki uygulama ve kontrol gruplarının tam kan değerlerinin karşılaştırılması.....	35
Çizelge 4.8. Tüm gruplar için, uygulama gruplarının tam kan değerlerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Yardımcı ve sitotoksik T hücrelerin antijen sunucu hücreler ve hedef hücrelerle etkileşimi.....	13
Şekil 3.1. Akım sitometri cihazının çalışma şeması.....	21
Şekil 3.2. Lenfosit yüzdelerini belirlemek için kapılama (gating) yapılması.....	22
Şekil 3.3. Kapılanan lenfosit bölgesi baz alınarak CD4 yüzdesinin Belirlenmesi.....	23



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

TiO ₂	: Titanyum Dioksit
CD	: Cluster of Differentiation, Farklılaşma Kümesi
WBC	: White Blood Cell, Beyaz Kan Hücreleri
RBC	: Red Blood Cell, Kırmızı Kan Hücreleri
HGB	: Hemoglobin
HCT	: Hematokrit
PLT	: Platelet, Trombosit
LEN	: Lenfosit

1. GİRİŞ

Boyutları 0,1-100 nm arasında değişen yapılara nanomateryaller denir. Başta boyutları olmak üzere sahip oldukları birtakım fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı büyük avantajlara sahip olan nanomateryallerin gündelik hayatımızdaki kullanım alanları hızla çoğalmaktadır. Nanoteknolojide görülen bu hızlı gelişim, yeni fikirler için ilham kaynağı olmuş sonuçta ürün çeşitliliğinde büyük bir artış meydana gelmiştir. Teknolojik üretimin ucuzlaması ise bu ürünlere erişimi kolaylaştırmıştır [Hashimoto vd., 2007; Tsuji vd., 2006]. Ancak zamanla bu durumun sonucu olarak, doğaya salınan nanoteknolojik maddelerin çevre ve sağlık üzerindeki potansiyel etkileri yeni bir merak ve tartışma konusu olmaya başlamıştır [Hood, 2004]. Genetik olarak modifiye edilen organizmalarda olduğu gibi nanoteknolojinin de geleceği, insanların bu maddelerin kullanımlarıyla ortaya çıkan kar zarar ilişkisini nasıl değerlendireceklerine bağlıdır. Bunun da ötesinde asbest gibi zamanında mucize olarak sunulan maddelerin yol açtığı zararlar, etkileri tamamen aydınlatılmamış, kimyasallara karşı daha dikkatli olunması konusunda uyarıcı niteliğe sahiptir [Tsuji vd., 2006].

Titanyum dioksit ise nano boyutlarda üretimi yapılabilen, pek çok alanda kullanılan sentetik bir pigment ve E171 olarak da adlandırılan bir gıda maddesidir [Greenwood ve Earnshaw, 1984]. Çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Cam, seramik, boya üretimi, kozmetik, tıbbi ürünler, tekstil, hava temizleme sistemleri ve hatta diş macunları gibi birçok ürünle günlük hayatımıza girmiştir. Antik dönemlerden beri boyar madde olarak kullanılan TiO_2 , ucuz olduğu ve kimyasal stabilitesi yüksek olduğu için günümüz endüstrisinde de sıkça tercih edilmektedir. Ancak tespit edilen bu stabilite sadece karanlık ortamlar için geçerlidir. UV ışığı altında ise aktif hale geçip, fotokataliz yoluyla bazı kimyasal reaksiyonları başlatabilmektedir [Hashimoto vd., 2007; Maggos vd., 2007]. Gerçekleşen bazı kimyasal reaksiyonların sonucunda ise serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller ve biriken TiO_2 sonucunda ise, oksidatif stres, kronik enflamasyon ve hücre çoğalması meydana geldiği bildirilmiştir [Schins ve Knapen, 2007].

Yaygınlaşan kullanımı nedeniyle üretim ve tüketim sürecinde çevreye bol miktarda TiO_2 yayılmaktadır. Bu durum ekosistemde su ve gıda kaynaklarına bulaşarak canlılar ile etkileşim içine girmesine sebep olabilir. Gıda ve ilaçlarla doğrudan veya solunum ve temas yoluyla dolaylı olarak vücuda giren TiO_2 , biyolojik olarak parçalanamadığı için dokularda depolanabilir ve istenmeyen yan etkilere yol açabilir [Ramsden vd., 2009; Lomer vd, 2004]. Çevresel partiküllerin alerjik reaksiyonlar başta olmak üzere çeşitli immün sistem rahatsızlıklarına yol açtığına; uzun dönem maruziyetin astım riskini ve deri hassasiyetini artırdığına dair günümüzde birçok kanıt bulunmaktadır. Vücuda giren titanyum dioksit de yabancı bir antijen olduğundan immün sistemi uyarabilme potansiyeline sahiptir [Kleinman vd., 2007]. Lenfosit artışı immün sistem yanıtının önemli bir aşamasıdır. Lenfosit gelişiminin daha erken evrelerinde, B ve T lenfositler sadece yabancı antijenlere karşı reaksiyon verecek şekilde gelişirler. Yabancı antijenin lenfositlere bağlanması immün cevabı başlatır ve lenfosit antijeni yok eder. İmmün cevabı uyaran her zaman antijen molekülünün tamamı değildir. Bazen molekül üzerindeki bir grup antikor cevabı uyarabilir. Lenfositler gelişimleri sırasında çok çeşitli antijenlerle karşılaşır ve bu antijenlere karşı antikor sentezleyerek kendilerini hazırlarlar. İşte bu hücreler artık farklı tipteki antijene karşı savunma için hazır olurlar [Başaran, 1999].

Bu bilgiler ışığında planlanan tez çalışmasında son derece hızlı gelişen nanoteknoloji sürecinde üretilen, yoğun kullanım ve çevresel deşarj potansiyeline sahip olan TiO_2 nanopartikülünün immünotoksik ve kan parametreleri üzerine etkisinin araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla TiO_2 nanopartikülünün T ve B lenfositler üzerindeki kantitatif etkisinin saptanması için TiO_2 , 30 gün süresince oral olarak erkek sıçanlara verilmiştir. 30 gün sonunda sıçanlardan elde edilen taze kemik iliği örnekleri, florokrom antikorlarla işaretlenip, akım sitometri cihazında okutulmuştur. Florokrom işaretleyici olarak CD45, CD3, CD4, CD8 ve CD20 seçilmiştir. Bu şekilde T ve B hücre miktarlarındaki değişimin saptanması öngörülmüştür. Periferik kanda hematolojik parametreler olarak lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HTC) trombosit (PLT), lenfosit sayısı (LEN) ve lenfosit yüzdesi (LEN %) ölçülmüştür. TiO_2 nanopartikülünün etki süresini incelemek için 30 günlük uygulama bittikten sonraki 15. ve 30. günlerde

alınan kemik iliğinde T hem de B hücre miktarları (CD45, CD3, CD4, CD8, CD20), hematolojik parametreler (WBC, RBC, HGB, HTC, PLT, LEN, LEN %) incelenmiştir.



2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji kelimesini ilk defa kullanan Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Norio Taniguchi olmuştur. 1974'de yayınlanan bir makalede Taniguchi nanoteknolojiyi “genel olarak malzemelerin atom ya da molekül molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır” şeklinde tanımlamıştır [Taniguchi, 1974].

En az bir yüzeyi 1-100 nm arasında olan partiküller olarak tanımlanan nanopartiküllerin kullanım alanları, eşsiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı oldukça geniştir [Hood vd., 2004]. Başta boyutları olmak üzere sahip oldukları birtakım fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı büyük avantajlara sahip olan nanomateriyallerin gündelik hayatımızdaki kullanım alanları hızla çoğalmaktadır. Nanoteknolojide görülen bu hızlı gelişim, yeni fikirler için ilham kaynağı olmuş sonuçta ürün çeşitliliğinde büyük bir artış meydana gelmiştir. Teknolojik üretimin ucuzlaması ise bu ürünlere erişimi kolaylaştırmıştır [Hashimoto vd., 2007].

Elektronik, biyomedikal cihazlar, ilaç ve kozmetik sektörleri gibi birçok endüstriyel uygulamada nanopartiküllere yer verilmiştir [Young vd., 2009]. Araştırmalar, maddelerin nano boyutlarda farklı davranışlar sergilediğini göstermektedir. Olağan halde ışığı ya da elektriği iletmeyen maddelerin nano boyutlarda tam tersi etki göstermesi ya da normal boyutlarda o kadar da sert olmayan bir maddenin nano boyutlara indirildiğinde elmadan bile sert olduğunun fark edilmesi nanoteknolojiyi günümüzün ilgi alanları arasında üst sıralara taşımıştır [Hashimoto vd., 2007] .

2.2. TİTANYUM DİOKSİT

Titanyum (IV) oksit ya da titanya olarak da bilinen titanyum dioksit, doğada titanyumun oksitlenmesi sonucu oluşur ve TiO_2 kimyasal formülüyle gösterilir. Titanyum dioksit doğada rutil, anatas ve brokit olarak bulunur. En çok rastlanan formu ise bütün sıcaklıklarda denge hali gösteren rutildir ve anatas ve brokitin ısıtılmasıyla elde edilir. Hem anatas hem rutil hem de brokit 6 tane titanyum atomundan oluşur. Doğadan elde edilen saf TiO_2 , klorid yöntemiyle, titanyum tetraklorid'e dönüştürülerek saflaştırılır. Demir (II) oksit ile kristalize hale getirilen TiO_2 , sülfürik asit içeren bir solüsyonun yardımıyla saflaştırılır. Nanoteknolojik ürünlerde kullanılan TiO_2 ise solvotermal sentezle elde edilir [Greenwood ve Earnshaw, 1984; El Goresy vd., 2001]. Amaca göre yağda ve suda çözünürlüğü farklı olan, çeşitli boyutlarda TiO_2 partikülleri üretmek mümkündür.

TiO_2 'in fotokatalitik özellikleri ilk defa 1967 yılında Akira Fujishima tarafından keşfedilmiştir. TiO_2 'in yüzeyinde gerçekleşen prosese Honda-Fujishima etkisi denmektedir. Bu reaksiyonlarda su oksitlenerek hidroksil radikalleri oluşturulmaktadır. Bunun yanı sıra TiO_2 oksijeni ya da organik materyalleri de direkt olarak oksitleyebilmektedir. Bu özelliği TiO_2 'in sterilizasyon amacıyla dezenfeksiyonda, çevre, atık su ve hava temizleme sistemlerinde kullanılmasına yol açmıştır [Fujishima ve Honda, 1972; Gurr vd., 2005; Kurtoglu vd., 2011]. Daha sonra TiO_2 için süperhidrofilite kavramı ortaya çıkmış ve bu kavramla birlikte kendi kendini temizleyen camların ve buğulanmayı engelleyen nano- TiO_2 'ten yapılan kaplama malzemelerinin üretim çalışmaları başlamıştır [Hwang vd., 2005]. Ayrıca nitrojen oksit ve volatil organik bileşikler gibi hava kaynaklı kirleticilerin konsantrasyonlarını düşürdüğü için, inşaat malzemelerinde ve dış cephe boyalarında da titanyum dioksit kullanılmaktadır. Yeni bir elektronik devre elemanı olan memristörün yapısında TiO_2 kullanılmıştır. Bu şekilde boya ya da kuantum dotlara duyarlı TiO_2 nanokristallerine bağlı polimerler yoluyla, güneş enerjisi elde edilmiştir. Nanopartikül formunda elektrik de üretebilen TiO_2 , Nokia tarafından kendi enerjisini üretebilen 200X200 monokromatik ekran imalatında kullanılmıştır. Plastik sanayinde de, UV'ye karşı dirençli oluşundan dolayı kullanılmaktadır [Lewis, Nathan,2009].

Solvotermal yöntemle üretilen TiO_2 'in %70'i pigment olarak piyasaya sürülmektedir. Bu pigmentler titanyum beyazı, pigment beyaz 6 veya CI77891 olarak adlandırılır. Dünya çapında bir yılda tüketilen TiO_2 pigmenti 4 milyon ton civarındadır ve gıda endüstrisinde gıda boyası olarak E171 kodu ile kullanılmaktadır. Ayrıca yağı alınmış sütlerin rengini beyazlatıp, ticari değerini arttırmak için titanyum dioksit eklenmektedir [Phillips and Barbano, 1997]. Kullanıldığı besin maddeleri aracılığıyla, sahip olunan her kilo başına günlük yaklaşık olarak 0,2-3 μg TiO_2 vücudumuza girmektedir [Weir vd., 2012]. Bu da 70 kilogramlık ortalama bir birey için günlük 1.4-210 μg arası bir miktar anlamına gelir.

Kırılma indeksi ve kararlılığı oldukça yüksektir. Fotokatalitik etkisi nedeniyle hava ve suyun arındırılmasında da kullanılır [Pelaez vd., 2012]. Ayrıca yayılım göstermeyen bazı kanser türleri için fotodinamik terapi adı altında TiO_2 uygulanmaya başlanmıştır [Yin vd., 2013].

2.2.1. Titanyum Dioksitin Toksik Özellikleri

1969 yılında Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü adına TiO_2 'in makro ve mikro partikülleri ile yapılan bir dizi çalışmada rat, köpek, gine domuzu, tavşanlarda TiO_2 'in uzun dönemde sindirim yoluyla absorblanmadığı sonucuna ulaşılmıştır. TiO_2 partiküllerine, kan, böbrek veya idrarda rastlanmamış ve sindiriminin önemli etkilere yol açmadığına dikkat çekilmiştir.

Ancak Kumazawa ve arkadaşlarının titanyum iyon ve partiküllerinin nötrofil fonksiyon ve morfolojisi üzerine etkisi konulu çalışmalarında, oluşan sitotoksisitenin TiO_2 'in boyutuyla direkt olarak bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur [Kumazawa, vd., 2002]. Boyutu küçülen partiküllerin yüzey alanları ve toksisiteleri artmaktadır. Bu sonuç, ürünlerinde gittikçe daha küçük yapıda mineral kullanan kozmetik sektörünü yakından ilgilendirmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler arasında bazı çelişkiler olmasına rağmen TiO_2 nanopartikülü içeren ürünlerin uzun süreli kullanımının getirebileceği riskler hala dikkat çekicidir [Kiss vd., 2008; Wu

vd., 2009]. TiO_2 partikülleri nano boyutlarda renksizdir ancak UV absorblama etkisi devam eder. Bundan dolayı nano TiO_2 güneş koruyucu kremler için ideal bir maddedir. Ancak bu boyutlarda bir mineral kolayca hücre içine girip, hücre hasarına yol açabilir. Bazı in vitro çalışmalar TiO_2 nanopartiküllerinin serbest oksijen radikalleri üreterek DNA'ya hasar verdiklerini ortaya koymuştur [Gurr vd., 2005; Türkez ve Geyikoğlu, 2007; Wang vd., 2007]. Nano TiO_2 moleküllerinin hücrelere ne kadar kolay nüfuz ettiğini gösteren diğer bir çalışma 2005 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada sıçanlar bir saat boyunca 0.1 mg/m^3 yoğunluğundaki 22 nm çaplı TiO_2 partiküllerini solumuş ve deneyden 24 saat sonra akciğerleri incelenmiştir. Sıçanların akciğer hücre ve hücre organellerinde TiO_2 partiküllerine rastlanmıştır [Geiser vd., 2005]. 2008 yılında yine Geiser ve arkadaşları tarafından yayımlanan bir çalışmada alveolar makrofajların nano- TiO_2 'i akciğerlerden temizlemede yetersiz kaldığı, akciğer dokularında ve kılcal damarlar içerisinde TiO_2 partikülleri gözleendiği bildirilmiştir [Geiser vd., 2008]. Meydana gelen toksisite sadece moleküllerin boyutlarıyla değil aynı zamanda şekilleriyle de bağlantılıdır. Yamamoto ve arkadaşları dendritik ve iğnemi yapıdaki partiküllerin sferik partiküllerden daha yüksek bir toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir [Yamamoto vd., 2004].

Wang ve ekibinin yaptığı çalışmada kullanılan farklı boyutlardaki TiO_2 'in yapıları transmisyon elektron mikroskopuyla incelenmiş, 25 ve 80 nm'lik partiküllerin iğnemi/kolon; 155 nm boyutundaki partiküllerin ise oktohedral yapıda olduğu bulunmuştur ve TiO_2 partiküllerinin toksisitesini değerlendirmek için, yetişkin farelere verilen nano TiO_2 (25 ve 80 nm) ve ince TiO_2 (155 nm) yol açtığı akut etkiler incelenmiştir. Bu çalışmada bilinen düşük toksik etkisinden dolayı OECD prosedürleri gözetilerek TiO_2 süspansiyonu oral gavaj yoluyla farelere verilmiştir. Uygulama dozu 5g/kg olarak belirlenmiştir. İki hafta içinde belirgin bir akut toksisite gözlenmemiştir. Bununla birlikte nano TiO_2 'in, 25 ve 80 nm boyutuna maruz kalan dişi farelerin karaciğerlerin yüksek oranda etkilendiği görülmüştür. ALT, AST, LDH serum düzeylerinin değişmesi, karaciğerdeki sentral vendeki hidropik dejenerasyonuna ve hepatositlerdeki noktasal nekrozlara işaret etmektedir. Ayrıca deney gruplarında böbrek yapılarının değişmesi ve BUN seviyesinin artışı gibi nefrotoksisite belirtileri de gözlenmiştir. 25 ve 80 nm uygulanan gruplarla

kontrol grupları karşılaştırıldığında serum LDH ve alfa-HBDH seviyelerindeki önemli farklar gözlenmesi miyokardial hasara da işaret etmektedir. Bununla birlikte kalp, akciğer, testis, yumurtalık ve dalak dokularında anormal patolojik değişimler izlenmemiştir. Deney sonucu, gastrointestinal yolla alınan TiO_2 'in başlıca karaciğer, dalak, böbrekler ve akciğerde depolandığı ve bu organlardan vücudun diğer bölümlerine transfer edildiğini göstermiştir [Wang vd., 2007].

Ayrıca TiO_2 nanopartiküllerinin solunum sisteminde fibroza yol açtığı [Bermudez vd., 2004; Driscoll vd., 1991] ve akciğer enflamasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [Nemmar vd., 2008; Höhr vd., 2002; Park vd., 2009; van Ravenzwaay vd., 2009].

Oral yoldan alınan TiO_2 nanopartiküllerinin insanda sindirim sistemi hücrelerinde biriktiği ve crohn hastalığına benzer semptomlar gösteren yangılı kolon hastalıklarına yol açtığı tespit edilmiştir [Lomer vd, 2004].

Linglan ve arkadaşları da, organizma içine giren TiO_2 'in nasıl hareket ettiğini bulmak ve bunun beyin üzerindeki etkilerini araştırmak üzere 14 gün boyunca, çeşitli dozlarda, 5nm boyutlarında TiO_2 'i farelere abdominal kavite yoluyla enjekte etmiştir. Sonuçta enjekte edilen TiO_2 miktarıyla doğru orantılı olarak beyinde patolojik değişimler meydana geldiği görülmüştür [Linglan vd., 2010]. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda gastrik yoldan verilen nano boyutlardaki TiO_2 ve bakırın böbrek hücrelerinde hasara; lipid, protein ve DNA peroksidasyonuna yol açtığı izlenmiştir [Gui vd., 2013; Liao vd., 2012].

TiO_2 'in mutajenik bir ajan olduğunu gösteren başka bir çalışmada boraks ve TiO_2 birlikte kullanılmışlardır. TiO_2 nanopartikülleri (2,3,5,7.5 ve 10 μm) tek başına kullanıldığında kardeş kromatid değişimlerine neden olurken aynı uygulama boraks eşliğinde yapıldığında, DNA'nın TiO_2 karşısında direncinin arttığı görülmüştür [Turkez, 2008].

Nano ve mikro ölçekli TiO₂'in ekosistem ve insan üzerindeki potansiyel zararlı etkilerini ortaya çıkarmak için, çeşitli memeli hayvanların kullanıldığı birçok deney yapıldığı gibi sucul organizmalarla da çalışılmıştır. Gerçekleştirilen bu ekotoksikolojik çalışmalarda TiO₂'in bakteri, alg, zooplankton ve balıklar üzerindeki etkileri araştırılmış ve toksik birikimlere rastlanmıştır [Liu vd., 2009; Adams vd., 2006; Federici vd., 2007; Aruoja vd., 2009; Lee vd., 2009; Ramsden vd., 2009]. Sonuçta nanomateryallerin ekosisteme karışması için birçok farklı giriş yolu vardır. Bu partiküller balıklar tarafından sudan daha uzun süre için absorbe edilebilirler. Yapılan bir çalışmada zebra balığı (Danio rerio) TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakılmış, bunun sonucunda da ribozomal fonksiyonları yöneten bir dizi gende mutasyonlar meydana geldiği görülmüştür [Chen vd., 2011]. Gökkuşluğu alabalığının (Oncorhynchus mykiss) kullanıldığı diğer bir çalışmada 14 gün boyunca TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakılan balıklarda, nanopartikülün birçok organda birikim yaptığı; beyinde görülen birikimin ise maruziyetin sonlandırılmasına rağmen temizlenmediği görülmüştür [Ramsden vd., 2009].

Doğa Bilimleri Enstitüsü Araştırma Topluluğu / Risk Bilim Enstitüsü Nanomateryal Toksisitesi Çalışma Grubu tarafından da nanomateryallerin önemli toksik etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır [Öberdörster vd., 2005]. Kasım 2005'te yapılan bir seminerde ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) tarafından nanopartiküllerin insan sağlığı üzerine etkilerinin ele alınmasını önermiştir [Fabian vd., 2007]. 2006 yılında Arizona Devlet Üniversitesinde yapılan bir çalışmayla , solüsyon ya da süspansiyon haline getirilmiş titanyum dioksitin, prolin içeren proteinleri, prolinin olduğu kısımdan parçaladığı gösterilmiştir [Jones vd., 2007].

Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalarda nano TiO₂'in küçük dozlarda güvenle kullanılabilmesi gösterilmeye çalışılmıştır [Fabian vd., 2008]. Ancak TiO₂ nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerinin açığa çıkmasına neden olarak enflamatuar cevabı başlattığı, amfizem , KOAH , fibrozis ve akciğer kanseri gibi ciddi rahatsızlıklara yol açtığı gözlenmiştir [Reeves vd., 2008].

2.3 İMMÜN SİSTEM

İnsan vücudunun doku ve organları, bütün yabancı organizma ve toksinlere karşı direnme yeteneğindedir. Bazı mikroorganizmalara karşı hayat boyu yenilmeden kalırlar ki bu yeteneğe bağışıklık (immünite) denir. İmmün sistem, bireyi enfeksiyon ve dış etkenlerden korumak üzere gelişmiş olup omurgalıların hepsinde mevcuttur. İmmün sistem elemanları kemik iliği, timus, dalak, lenf düğümleri, tonsillerde şekillenen hücrelerdir. Organizma için yabancı olan ve immün sistemi uyarıcı ajanlara antijen adı verilir. Antijenler protein, karbohidrat ya da nükleik yapıda olabilirler. Ayrıca yaşlı eritrositler, polen taneleri, bakteri toksinleri, bakteri ve virüslerin kendileri antijen niteliğinde birçok kimyasal bileşik içerirler. Bir canlıdan diğerine nakledilen dokular da antijenik özellik gösterir. Organizma kendisine zarar verecek yabancı maddelere (antijen) karşı immün cevap olarak vücudu koruyucu antikor (immünglobülin) üretir. İmmünglobülinler kendilerine ait antijeni kolaylıkla tanır ve onu hemen yok ederler, yani spesifikler [Camcıoğlu, 2007].

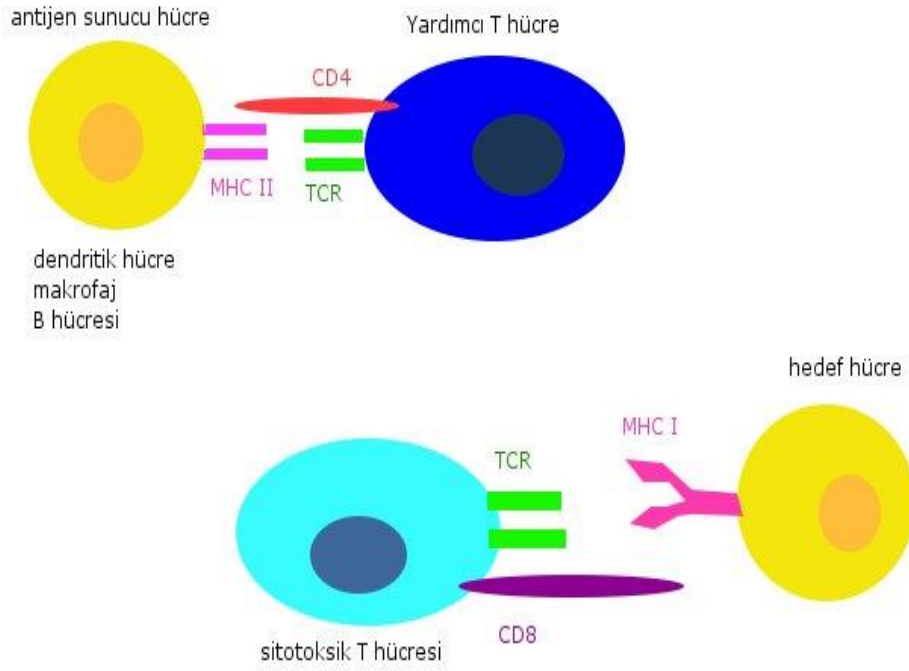
İmmün sistemin fonksiyonları, tüm vücuda dağılmış olmakla birlikte esas olarak timus, lenf nodülleri ve dalakta bulunan hücrelerin oluşturdukları lenforetiküler sistem tarafından yürütülür. Bu sistemin en önemli parçası olan lenfoid hücreler, lenfositler ve plazma hücrelerinden oluşmaktadır. Plazma hücreleri, antijen veya yabancı cisimlere karşı reaksiyon oluşturan protein yapıdaki antikorların üretiminden sorumlu iken, lenfositlerin antijene özgün tepki gösterme ve sonuçta bazı hücresel ürünler oluşturma yeteneği vardır [Friedlaender, 1993]. Doğumdan sonraki yaşam süresince organizmadaki lenfosit yapımı, esas itibarıyla lenf düğümlerinde olmak üzere lenfoid dokulardaki lenfositlerin çoğalması ile sağlanır. Ancak bu yapım, normal lenfosit sayısını karşılamaya yetmediğinden, kök hücrelerinin farklılaşması ile kemik iliğinden de dolaşıma lenfosit verilir. Erişkinde bir günde dolaşıma verilen lenfosit sayısı yaklaşık 10^9 'dur [Kılıçturgay, 1991; Roitt, 1993]. Morfolojik olarak birbirine çok benzemekle beraber birbirinden bağımsız olarak gelişen, görevleri ve antijen yapıları birbirinden farklı iki ana lenfosit grubu mevcuttur. Lenfosit klonları, merkezi lenfoid dokuları oluşturan fetal karaciğer, kemik iliği ve timusta iki ayrı doğrultuda fonksiyonel farklılaşmaya uğrarlar.

Kuşlarda son barsaktaki kloakda yer almış bir lenfoid organ olan Bursa of Fabricious'a bağımlı gelişme göstererek hümorale (antikora dayalı) immüniteyi oluşturan lenfositlere B lenfositleri; timusa bağımlı gelişme göstererek hücrel immüniteyi oluşturan lenfositlere de T lenfositleri denmektedir. Bursa'nın memelilerdeki karşılığının fetal karaciğer ve erişkin kemik iliği olduğu kabul edilmektedir [Çetin, 1981]. Her iki lenfosit grubu da uyarıldığında morfolojik değişiklikler gösterir ve bölünmeye başlar. T hücreleri özgün antijenleri tanıma özelliğine sahip blast formuna bürünürken, B lenfositleri antikor oluşturmak üzere plazma hücrelerine dönüşürler. [Friedlander, 1993]. Üçüncü bir lenfosit grubu olarak kabul edilen doğal katil (NK) hücreler veya null cell olarak adlandırılan grup ise, bazı T hücre belirteçleri taşıdıkları halde olgunlaşma için timustan geçmeyen ancak doğal konak savunmasında önemli bir rol oynayan büyük sitoplazmik granüllü lenfositlerdir [Lewinson, 1998]. Lenfoid kök hücrelerinden farklılaşan T, B ve NK hücrelerinin aksine lenfoid sistemin diğer elemanları olan monositler; makrofajlardan, granüositler; myeloid öncüllerinden gelişirler [Roitt, 1993].

T- Hücreleri, doğrudan antikora bağımlı olmayan kazanılmış immuniteden sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler pek çok değişik tipte immunolojik reaksiyon yürütürler. Bunlar arasında pek çok virüs, bakteri ve mantara karşı olan immün reaksiyonlar, kontakt alerji, greft reddi ve bazı otoimmün hastalıklar sayılabilir. T- Hücreleri timusta gelişirler. Kemik iliğinden gelen kök hücreleri, timus korteksine girerler ve gelişen hücreler (timosit) medullaya doğru hareket ederken, timus hormonları (timozin, timulin, timopoyetin) ile birlikte, timus stroması tarafından yönlendirilerek bir seri reaksiyon sonrası olgun (immünkompetan) T hücrelerine farklılaşırlar [Kılıçturgay, 1991]. B lenfositler kemik iliğinde olgunlaştıktan sonra dolaşıma geçer, periferel lenf organları olan dalak, lenf düğümleri, bademciklere giderek lenf foliküllerine yerleşirler. Bunlara primer lenf folikülleri adı verilir. Doğumdan sonra organizmaya antijen girdiğinde, bu antijene karşı antikor üretmek için uyarılırlar. B lenfositler farklılaşarak lenfoblastlara dönüşürler. Meydana gelen lenfoblastlar sürekli bölünüp çoğalarak sayılarını artırır. Oluşan hücrelerin bir kısmı plazma hücrelerine bir kısmı tekrar aynı antijenle karşılaştığında hızlı yanıtın oluşmasını sağlayan hafıza B hücrelerine dönüşür. Plazma hücreleri antikor

ürettikten birkaç hafta sonra ölür. Hafıza B hücreleri ise uzun ömürlüdür. B lenfositlerin plazma hücresine dönüşmesi ve antikor yapması T hücreler tarafından kontrol edilir [Akay, 2008].

Başlangıçta yüzey antijen reseptörleri ve antijenleri bulunmayan bu T ve B lenfosit kök hücreleri, farklılaşma sırasında onları karakterize eden ve Cluster of Differentiation (CD), farklılaşma kümesi antijenleri olarak ifade edilen, glikoprotein tabiatında birtakım yüzey antijenleri kazanırlar [Kılıçturgay, 1991]. CD yüzey antijenleri lökositler üzerinde üretilen membran proteinleridirler. Küçük bir kısmı ise endotelial hücre, eritrosit ve kök hücre kaynaklıdır. Şimdiye kadar yaklaşık 340 CD molekülü tanımlanmıştır. CD antijenler genellikle hücre markeri olarak kullanılırlar ve hücrelerin yüzeyindeki moleküllere göre tanımlanmasına olanak sağlarlar. CD antijenleri, hücre yüzeyinde bulunan sıradan markerlar değildir. Bir çok şekilde iş görebilir ve organizmada gerçekleşen immün reaksiyonlar içinde önemlidirler. Genellikle hücre için önemli bir reseptör yada bağ olarak hareket eder bir sinyal kaskadı uyarır ve hücrenin davranışını değiştirirler. CD yüzey antijenleri immünohistokimyasal yöntemlerle birbirlerinden kolayca ayırt edilebilirler. Örneğin en çok kullanılan CD moleküllerden CD4; T helper hücresi spesifik antijeni, CD8; T supresör/sitotoksik hücrenin antijeni, CD3; T hücrelerinin ortak yüzey antijendir, CD20; B hücre yüzey antijeni, CD45; T ve B hücre, natural killer hücrelerin yüzey antijendir. İnterlökinleri üreten CD4 (T-helper) hücreler düzenleyici olarak görev yaparken, virüsle enfekte hücreleri, tümör hücrelerini ve allogreftleri öldüren CD8 (sitotoksik) T hücreleri ise efektör olarak işlev gösterir. B hücrelerin genomunda Ig G, IgM ve Ig D gen ifadesi bulunur [Akay, 2008; Lewinson, 1998].



Şekil 2.1. Yardımcı ve sitotoksik T hücrelerin antijen sunucu hücreler ve hedef hücrelerle etkileşimi.

2.3.1. Nanopartiküller ve immün sistem

Farklı tipte nanopartiküller ve farklı türde canlılar kullanılarak yapılan çalışmalarda, hem sindirim sistemi hücrelerinin hem de immün sistem hücrelerinin nanopartiküller için hedef oldukları ortaya çıkmıştır. Dahası bu veriler beslenme prosesleri içindeki fizyolojik mekanizmalar yoluyla, nanopartikül aglomerat/agregatlarının önce sindirim sistemi hücrelerine oradan da kan sıvısına ve kan hücrelerine transfer edildiğini ortaya çıkarmıştır [Wang vd., 2007; Chen vd., 2011].

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada boyutları 5-200 nm arasında değişen TiO₂ partikülleri, ratlara intratrakeal yoldan verilmiş sonrada akciğer lavaj sıvısı alınarak, alveolar makrofaj hücreleri incelenmiştir. Sonuçta bu hücrelerde hem yapısal hem de fonksiyonel anomaliler saptanmıştır. Nano boyutlarda TiO₂'e maruz bırakılan ratlarda hem spesifik hem de non-spesifik immün yanıtta düşüş gözlenmiştir [Liu,2010 a] .

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada, değişik boyutlarda, farklı kristal yapılar gösteren TiO₂ nanopartikülleri kullanılmış ve bunların akciğer alveolar makrofajlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda salınan nitrik oksit ve TNF- α miktarlarının TiO₂ maruziyetiyle arttığı fakat makrofajlardaki Fc reseptör ve MHC II ekspresyonunun, fagositotik ve kemotaktik aktivitelerin inhibe olduğu görülmüştür. Maruz kalınan titanyum dioksit miktarının ve kristal yapısının alınan sonuçlara direkt etkisi olduğu tespit edilmiştir [Liu vd, 2010] .

Subkutan ve intravenöz uygulamaların yapıldığı bir çalışmada yine immün sistemin etkilendiği gösterilmiştir. 4,6 nm'lik TiO₂ nanopartikülleri, farelere subkutan (5600mg/kg) ve intravenöz (560mg/kg) olarak uygulanmıştır. 5. günden sonra subkutan uygulama yapılan farelerde dikkat çekici bir granülosit artışı görülürken; dolaşımdaki lenfosit yüzdesi düşmüştür. Makrofaj yüzdeleri ise etkilenmemiştir. Bununla birlikte intravenöz uygulama yapılan farelerin dalağındaki makrofajların bir kısmında, TiO₂ agregatları gözlenmiştir. Bu gözlem T hücrelerin TiO₂'le nasıl etkileşime girdiklerine dair bir fikir edinilmesine yardımcı olmuştur [Weaver vd., 2007]. Polimorf nükleer nötrofiller (PMNs) edilgen immünitenin en önemli unsurlarıdır. Bakteriyal ve fungal enfeksiyonlara karşı etkili bir savunma oluştururlar [Goncalves vd., 2010]. TiO₂ ile başlatılan akciğer enflamasyonu sırasında gözlenen PMN artışına, enflamasyon sırasında nötrofillerin oynadığı önemli rollere rağmen, TiO₂ nanopartiküllerinin, nötrofil hücre fizyolojisi ve özellikle de insan PMN'leri üzerindeki etkileri hakkında yeterli literatür bulunmamaktadır. 26 yıl önce yapılan bir çalışma saf rutil ve ya anatasin sadece zayıf bir kemoluminesans etki oluşturduğunu rapor etmiştir [Hedenborg, 1988] . Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada nano TiO₂ partiküllerinin, mikro partiküllere göre çok daha kolay ve etkili bir şekilde akciğer dokusuna nüfuz ettiği ve bu bölgeyle bağlantılı lenf düğümlerinde de birikim yaptığı gösterilmiştir [Sager vd., 2008].

Bu bilgiler ışığında ve son yıllarda artan immunolojik fonksiyon bozukluklarını göz önüne alınarak yapılan çalışmada ratlar, gavaj yoluyla TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakılarak kemik iliğindeki B ve T lenfosit miktarlarındaki

değişim ile tam kan sayım değerleri incelenmiştir. Uygulama sonrası meydana gelen etkinin ortadan kalkma süresi tespit edilmeye çalışılmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deney Grupları ve Uygulamalar

Araştırmada erkek wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan wistar albino sıçanlar, *Rattus norvegicus*'un alt türünün mutant soylarıdır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilmiştir, bakımları ve deneysel çalışmalar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Deneyler süresince hayvanlar standart deney koşullarında (% 40-60 nem, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık) yaşatılmıştır. Çalışmada aynı yaştaki bireylerin kullanılmasına dikkat edilmiş 6-8 haftalık genç erkek sıçanlar kullanılmıştır. Ortalama birey ağırlığı 250 ± 30 gramdır ve sıçanlar deneyler süresince 25 cm x 35 cm. büyüklüğünde üstten çelik ızgara ile kapatılan plastik kafeslerde beşli gruplar halinde tutulmuştur. Standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslenmiş, güneşli kafesleri temizlenerek yem ve suları değiştirilmiştir.

Deneylerde TiO_2 in 250 mg/ kg dozu hazırlanarak kullanılmıştır. Toz formda temin edilen TiO_2 (25 nm/Sigma-Aldrich) sulu süspansiyonu uzun süreli karıştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Burada % 5'lik hidroksipropil metil selüloz (HPMC) tampon ajan olarak kullanılmıştır. HPMC oral ve topik formülasyonlarda viskozite ajanı olarak oldukça sık kullanılan bir polimerdir. Hazırlanan süspansiyonların karakterizasyonu spektrofotometrik ve elektron mikroskopik yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. TiO_2 'in 250 mg/kg süspansiyonu her uygulamadan uygulanmadan önce karıştırılarak 5 dk süresince ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

Çalışmada uygulama grubu (U) ve kontrol grubu (K) olmak üzere hazırlanan 250 mg/ kg TiO_2 süspansiyonu 30 gün boyunca güneşli oral olarak gavaj yoluyla verilmiştir. Uygulama 24 sıçan ile başlanmış, 30. günde son uygulamadan 24 saat sonra 8 sıçan (U) anestezi madde olan ketaminle (ketalar- Parkedavis)

uyutularak disekte edilmiştir. Daha sonra kalan sıçanlar standart deney koşullarında TiO₂ uygulaması yapılmaksızın yaşatılmış, 8 sıçan 45. Günde (15 gün bekleme grubu), 8 sıçan 60. günde (30 gün bekleme grubu) uyutularak disekte edilmiştir. Aynı şekilde TiO₂ içermeyen tampon çözelti verilen kontrol grubundaki sıçanlardan da 8 tanesi 30. günde, 8 tanesi 45. günde (15 gün bekleme grubu), 8 tanesi ise 60. günde (30 gün bekleme grubu) uyutularak disekte edilmiştir.

3.1.2. Örneklerin Alınması

Uygulama grupları ve kontrol gruplarında sıçanlar uyutulduktan sonra kalp kanları EDTA' lı tüplere alınarak tam kan analizleri için kullanılmıştır. Kanları alınan sıçanlar disekte edilmiş kemik iliği almak için femur ve tibia kemikleri çıkarılmıştır. Buz içeren kutulara alınan kan ve kemik örnekleri hızlı bir şekilde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarına götürülerek gerekli işlemler yapılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Teçhizat

3.2.1.1. Kullanılan kimyasallar

FITC Mouse Anti-Rat CD3 (BD Pharmingen™ katalog no BD-557354) : Ürünün içinde bulunan 1F4 antikoru, timositler, periferal T lenfositler ve dentritik epidermal T hücrelerindeki CD3 hücre yüzey antijenine bağlı T hücre reseptörüyle reaksiyona girer.

FITC Mouse Anti-Rat CD4 (BD Pharmingen™ katalog no BD-554837) : Ürün içerisindeki OX-35 antikor klonu, timositler, olgun yardımcı T hücreleri, monositler, makrofajlar, bazı dendritik hücreler ve mikroglialar üzerinde bulunan CD4 antijeniyle reaksiyona girer.

PE Mouse Anti-Rat CD8a (BD Pharmingen™ Katalog no BD-559976) : OX-8 antikor klonunu içerir. Bu antikor CD8 farklılaşma antijeninin 32 kDa α zincirinin menteşe benzeri membran proksimal bölgesiyle reaksiyona girer.

FITC Mouse Anti-Rat CD45RA (BD Pharmingen™ Katalog no BD-554883) : İçeriğindeki OX-33 antikoru sadece B lenfositlerin yüzeyinde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı CD45 formuyla reaksiyona girer.

FITC Mouse Anti-Rat CD20 (BD Pharmingen™ Katalog no BD-556632) : İçeriğindeki 2H7 klonu, B lenfositlerde bulunan CD20 de ki bir fosfoproteinle reaksiyona girer.

BD CellWash (Yıkama Solüsyonu Katalog no BD-342409)

B ve T lenfosit sayılarının tespit edileceği flow sitometrik analiz için gerekli kitler BD BIOSCIENCES şirketinden temin edilmiştir. Kullanılan monoklonal antikorların tamamı, çalışma gününe kadar, 4°C ' de saklanmış ve üretici firmanın belirlediği yönteme uygun olarak kullanılmışlardır.

3.2.1.2. Kullanılan teçhizatlar

Flow sitometri cihazı	FaxCalibur
Santrifüj cihazı	Nüve NF 800
Tam kan sayımı (hemogram) cihazı	Sysmex XT2000i
Buzdolabı	Electrolux
Otomatik ayarlanabilir pipet (2-20 μ L)	Eppendorf
Otomatik ayarlanabilir pipet (20-100 μ L)	Gilson Pipetman
Otomatik ayarlanabilir pipet (200-1000 μ L)	Gilson Pipetman
Pastör pipeti (0,5-3mL)	Citotest
Plastik pipet ucu (sarı, mavi)	LP Italiana Spa

3.2.2. Analizlerin Yapılması

3.2.2.1. Tam kan sayımı

Tam kan analizi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan Sysmex XT-2000 hemogram cihazı kullanılmıştır. Kan analizi çerçevesinde toplam lökosit sayısı (WBC), toplam eritrosit sayısı (RBC), hemogloblin miktarı (HGB), hemotokrit oranı (HCT), trombosit sayısı (PLT), total ve yüzde lenfosit değerleri ölçülmüştür.

3.2.2.2. Akım sitometri yöntemi ile lenfosit analizi

Alınan kemikler dokulardan arındırılarak uçları kırılmış, fetal calf serum kemik içine enjekte edilerek kemik iliği tüplere alınmıştır. Elde edilen ilik analizler için aşağıdaki şekilde hazır hale getirilmiştir.

- 1- Örnekler 1/25 oranında yıkama solüsyonu ile yıkandı. (200µl örnek ile 4.8 ml cellwash karıştırıldı, 1300rpm'de 10 dk santrifüjlendi).
- 2- Yıkanan örneklerden 100 µl alınıp falcon tüplere aktarılıp üzerlerine 20µl ilgili boyalardan ilave edildi.
- 3- Tüpler 2 sn düşük devirde vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 15 dakika inkübe edilen örneklerin üzerine 2 ml 1/10 oranında dilue edilmiş Lysing solüsyonu ilave edilip tekrar 2 sn düşük devirde vortekslendi.
- 4- Vortekslenen örnekler oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 8 dakika daha bekletildikten sonra tekrar 2 sn düşük devirde vortekslenip hemen sonra 1300 rpm'de, 5 dakika santrifüjlendi.
- 5- Santrifüjden sarsmadan alınan tüpler tek hamlede ters çevrilip içlerindeki sıvı boşaltıldıktan sonra tüplerin ağzında kalan sıvı, tüpler tekrar ters çevrilmeden bir peçete yardımıyla alınarak örnek kaybının yaşanmaması sağlandı.
- 6- Tüplere 2 ml yıkama solüsyonu ilave edilerek 2 sn düşük devirde vortekslendi.
- 7- Bu işlemden sonra tekrar 1300 rpm devirde, 5 dakika santrifüjlenen örnekler dikkatle alınıp, tek bir hamlede ters çevrilmiş, içlerindeki sıvı boşaltıldıktan sonra tüpün ağzında kalan sıvı tüp tekrar ters çevrilmeden bir peçete yardımıyla alındı.

8- Analize hazır hale getirilen örnekler vakit geçirilmeden FaxCalibur akım sitometri cihazında okutuldu.

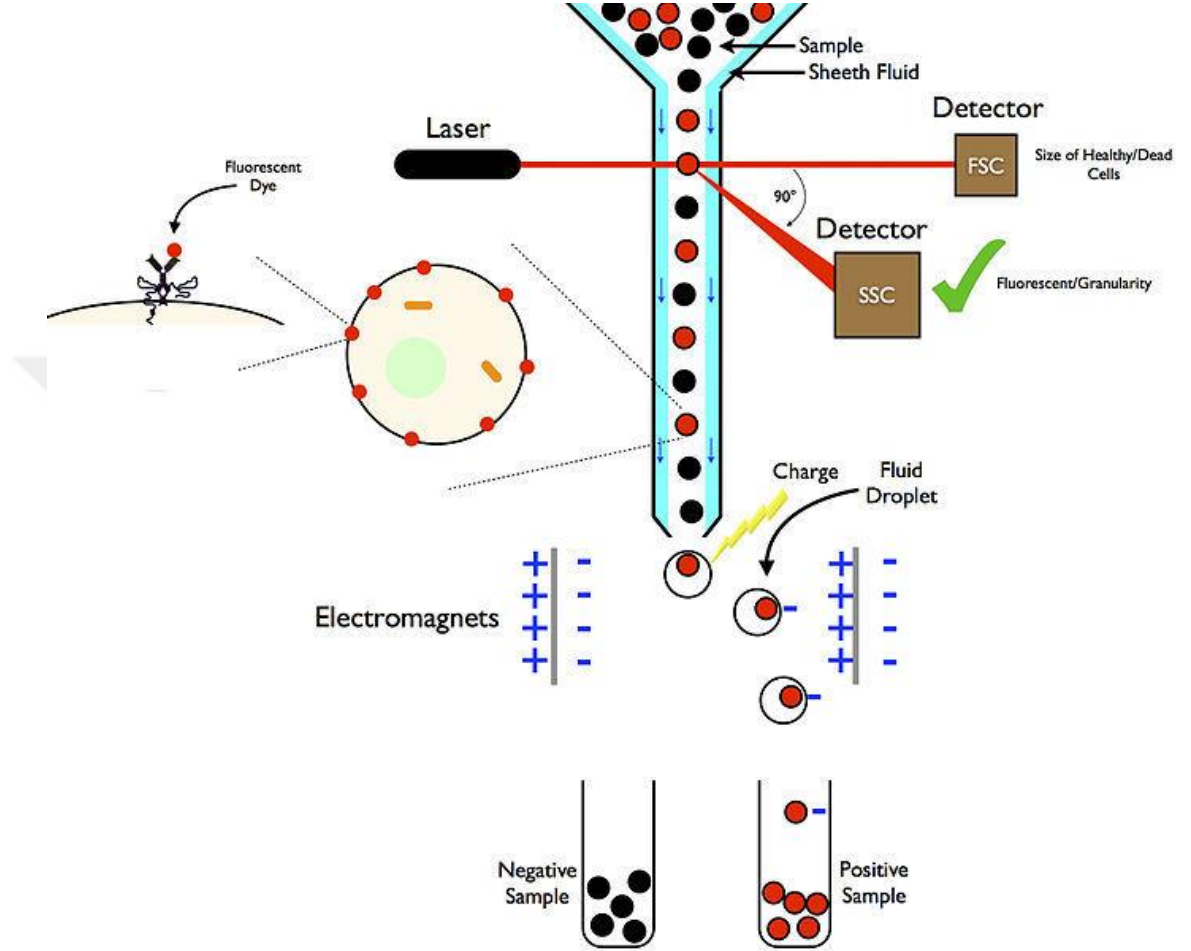
3.2.2.3. Flowsitometrik Prensip ve Değerlendirme

Flow sitometri birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), ışık kaynağı (laser kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), ve bilgisayardan (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) oluşur.

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) gibi florokrom maddelerle konjuge olmuş monoklonal antikolarla işaretlenmiş hücreler süspansiyon halinde hava basıncı ile sheath fluid içinden geçirilir. Sheath fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler cam veya kuartzdan yapılmış (flow chamber) akış kabineye gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminer akışı, hücrelerin tek sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak; argon iyonu, kripton, helium-kadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan problar lazer kaynağıyla eksite olup, farklı bir dalga boyunda emisyon gösterirler ve bu sayede dedekte edilebilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak Argon iyonu kullanılır ve FITC, PE, propidium iodide (PI) gibi florokrom maddelerin 488 nm’de eksitasyonu sağlanır. Hücreye bağlı florokrom lazer ışığı ile belli bir dalga boyunda aktiflenir ve bu enerjiyle farklı bir dalga boyunda ışın yayar. İleri ve yana olan ışık saçılımına göre hücre boyutu, iç yapısı hakkında, prob bağlanma yoğunluğuna göre de antijenik özellikleri hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucu açığa çıkan floresan fotodiodlarla toplanır, Photo Multiply Tubes (PMT’s) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara aktarılır. [Gazioğlu, 2004]

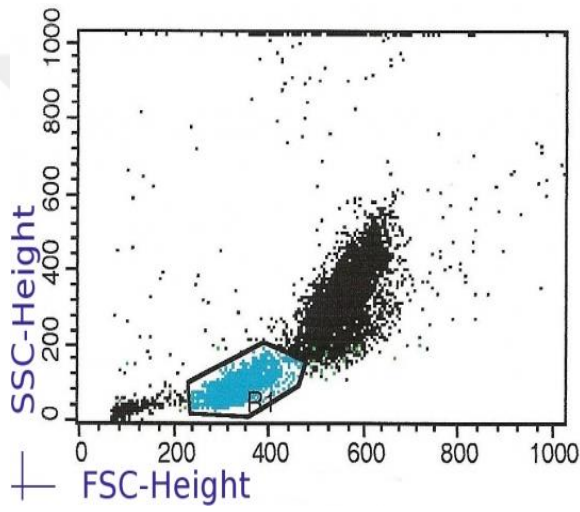
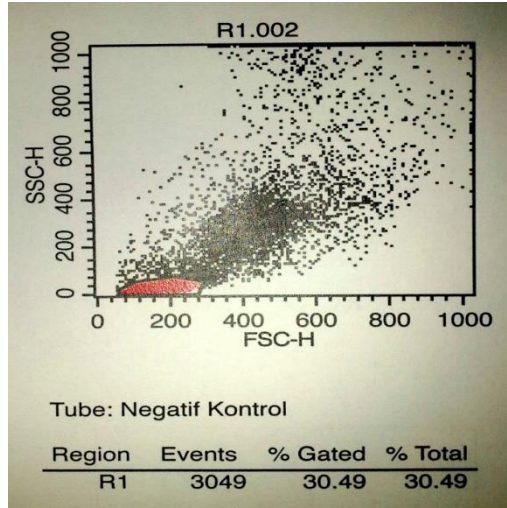
Flow sitometri cihazında bulunan dedektör ve filtreler: FSC (Forward Scatter Channel; ileri saçılım kanal) dedektörü; hücrenin boyutu hakkında bilgi verir.

SSC (Side Scatter Channel; yana saçılım kanal) dedektörü hücre granül içerikleri hakkında bilgi verir. Floresan Filtreler ve dedektörler; değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verirler. [Gazioğlu, 2004]

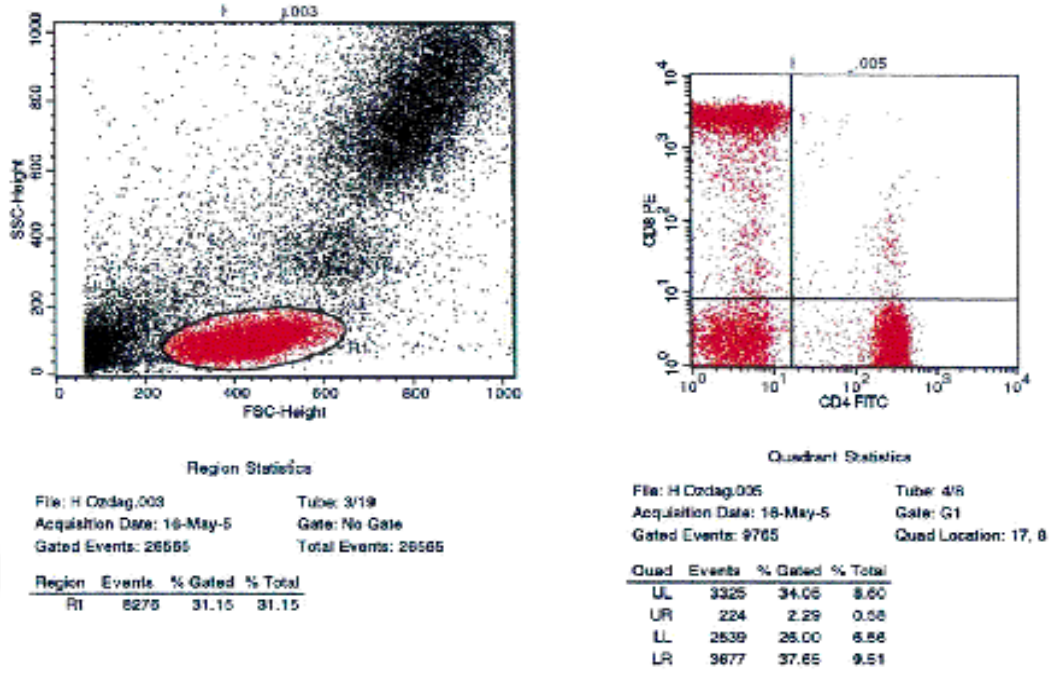


Şekil 3.1. Akım sitometri cihazının çalışma şeması [Sabban, 2011].

Çalışmada değerlendirme yapılırken öncelikle önden saçılım (Forward Scatter: FSC) ve yandan saçılım (Side Scatter: SSC) histogramında hücrelerin büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ortamına yansıtılıp lenfositler, diğer periferik kan hücrelerinden karakteristik görünüm ve yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı ve lenfosit kapısı (gating) belirlendi. Alınan kapı içerisinde 10.000 hücre saydırılarak, lenfosit kapısında CD45, CD3, CD4, CD8 ve CD20 yüzdeleri değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Lenfosit yüzdelerini belirlemek için kapılama (gating) yapılması [Gilmor, 2010].



Şekil 3.3. Kapılanan lenfosit bölgesi baz alınarak CD4 yüzdesinin belirlenmesi [Taneli, 2007].

3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Her bir uygulama döneminde uygulama ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında Independent Samples t-test, farklı uygulama dönemlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasında ise One-Way ANOVA kullanılmıştır. Varyans analizi sonucunda önemli farklılık gösteren alt grupların belirlenmesinde Tukey HSD Post hoc testinden yararlanılmıştır. Grupların tanımlayıcı istatistikleri ortalama \pm standart sapma cinsinden tablo halinde özetlenmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış ve önemlilik düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Kontrol ve Uygulama Grupları İçin Akım Sitometri Çalışma Sonuçları

30 günlük TiO₂ uygulamasının T ve B lenfositler üzerine etkisi çizelge 4.1.'de verilmiş olup, çizelgede TOTAL kavramı, akım sitometrik analizde boyanan tüm bölgeyi, GATE ise kapılanan lenfosit bölgesini ifade etmektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol grubu ve 30 gün TiO₂ uygulamasının T ve B hücre markerları üzerine etkisi

Gruplar	Kontrol Grubu	Uygulama Grubu
	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss
CD45 GATE	95,72 ± 1,4	97,39 ± 1,11*
CD45 TOTAL	28,40 ± 7,57	25,42 ± 3,63
CD3 GATE	97,93 ± 1,32	98,04 ± 2,09
CD3 TOTAL	24,90 ± 5,88	20,10 ± 5,2
CD4 GATE	74,35 ± 14,43	73,70 ± 6,13
CD4 TOTAL	22,83 ± 7,77	16,13 ± 2,28*
CD8 GATE	12,29 ± 2,71	12,43 ± 2,24
CD8 TOTAL	3,92 ± 0,9	2,90 ± 0,72*
CD20 GATE	1,58 ± 1,24	0,97 ± 0,81
CD20 TOTAL	0,44 ± 0,31	0,21 ± 0,16

n=8; p<0,05 (Sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.)

30 günlük TiO₂ uygulamasının ardından ilk disekte edilen kontrol ve uygulama gruplarının istatistik verileri değerlendirildiğinde; CD45 GATE miktarının uygulama grubunda kontrol grubuna göre arttığı ($p < 0,05$) görülürken, TOTAL bölgede CD45 miktarı kontrole göre azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. CD3 GATE, uygulama gruplarında kontrol grubuna göre artarken, CD3 TOTAL miktarı uygulama gruplarında azalmış ancak bu artış ve azalışlar anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). 30 günlük uygulama sonrası, CD4 GATE ve CD8 GATE miktarında uygulama grubunda kontrole göre anlamlı olmayan bir azalma gözlenirken, CD4 TOTAL ve CD8 TOTAL miktarı ise uygulama grubunda kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). CD 20 GATE ve CD 20 TOTAL miktarları uygulama gruplarında kontrol grubuna göre azalmış ancak bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Planlanan tez çalışmasında, 30 günlük TiO₂ uygulama sonrası meydana gelen değişimlerin düzelleme süresi de incelenmiştir. Bunun için 30 günlük uygulama sonrası sıçanlara herhangi bir doz uygulaması yapılmamış bir grup 15. Günde bir grup 30. Günde disekte edilerek CD45, CD3, CD4, CD8 ve CD20 yüzdeleri analiz edilmiştir. 15 günlük bekleme grubunda meydana gelen değişimler kontrol grubu verileri ile karşılaştırılarak çizelge 4.2’de verilmiştir. İki grubun karşılaştırılmasında t testi yapılmış istatistiksel önem sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Uygulama kesildikten 15 gün sonra TiO₂'in T ve B hücre markerları üzerine etkisi

Gruplar	Kontrol Grubu Ort. ± Ss	15 Günlük Bekleme Grubu Ort. ± Ss
CD45 GATE	50,64 ± 34,74	82,7 ± 17,25*
CD45 TOTAL	12,88 ± 8,58	16,42 ± 7,81
CD3 GATE	78,39 ± 17,43	90,3 ± 9,94
CD3 TOTAL	15,58 ± 2,9	18,29 ± 7,81
CD4 GATE	80,27 ± 17,56	92,41 ± 9,17
CD4 TOTAL	17,40 ± 3,03	19,25 ± 7,26
CD8 GATE	14,59 ± 7,28	10,96 ± 2,65
CD8 TOTAL	4,41 ± 2,96	2,1 ± 0,87
CD20 GATE	10,60 ± 8,4	19,09 ± 7,49*
CD20 TOTAL	2,67 ± 1,47	3,74 ± 1,91

n=8; p<0,05 (Sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.)

TiO₂ uygulaması kesildikten sonraki 15 günlük sürecin sonunda disekte edilen sıçanların flow sitometrik verileri istatistik olarak değerlendirildiğinde; 15 günlük bekleme grubundan CD45 GATE ve CD45 TOTAL miktarında artış görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD45 GATE deki artış anlamlı bulunurken (p<0,05), CD45 TOTAL miktarındaki artış ise anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Yine 15 günlük bekleme grubunda CD3 GATE, CD3 TOTAL ve CD4 GATE, CD4 TOTAL miktarları kontrol grubuna göre artmış bu artışlar da anlamlı bulunmamıştır. CD8 GATE ve CD8 TOTAL değerleri ise 15 günlük bekleme grubunda kontrole göre azalmıştır (p>0,05). 15 günlük bekleme grubunda CD20 GATE miktarının

kontrol grubuna göre artışı anlamlıyken ($p < 0,05$), CD20 TOTAL artışı anlamlı değildir ($p > 0,05$).

30 günlük bekleme süresi ve kontrol grubu karşılaştırılmaları çizelge 4.3'de verilmiştir. İki grubun karşılaştırılmasında t testi yapılmış istatistiksel önem sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir

Çizelge 4.3. Uygulama kesildikten 30 gün sonra TiO₂'in T ve B hücre markerları üzerine etkisi

	Kontrol Grubu Ort. ± Ss	30 Günlük Bekleme Grubu Ort. ± Ss
CD45 GATE	95,99 ± 3,07	87,95 ± 28,5
CD45 TOTAL	16,74 ± 5,55	23,42 ± 11,41
CD3 GATE	94,87 ± 1,94	94,82 ± 4,73
CD3 TOTAL	17,16 ± 4,16	24,73 ± 8,9*
CD4 GATE	91,39 ± 5,19	85,22 ± 28,71
CD4 TOTAL	15,87 ± 4,98	24,07 ± 11,61
CD8 GATE	8,31 ± 4,39	7,08 ± 4,66
CD8 TOTAL	1,34 ± 0,78	1,95 ± 1,27
CD20 GATE	0,88 ± 1,42	1,57 ± 1,82
CD20 TOTAL	0,11 ± 0,13	0,41 ± 0,54

n=8; $p < 0,05$ (Sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.)

Kontrolle karşılaştırıldığında 30 günlük bekleme grubunda CD45 GATE oranı azalırken, CD45 TOTAL değerleri artmış ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. 30 günlük bekleme grubundaki CD3 GATE miktarı kontrol grubu

ile benzer ortalama değerde sahipken CD3 TOTAL oranı ise kontrole göre artmıştır ($p<0,05$). CD4 GATE ve CD8 GATE miktarları 30 günlük bekleme grubunda kontrole göre azalmış, CD4 TOTAL ve CD8 TOTAL miktarı ise artmıştır. Ancak CD4 ve CD8 değerlerindeki bu artış ve azalışlar anlamlı bulunmamıştır. CD20 GATE ve CD20 TOTAL miktarı 30 günlük bekleme grubunda kontrole göre artmış ancak artışlar anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

TiO₂ in süreye bağlı etkisinin değerlendirildiği çalışmada 15 ve 30 günlük bekleme süreleri kendi aralarında ve uygulama grubu ile karşılaştırılmış verilere ait varyans analizi sonuçları çizelge 4.4. de verilmiştir. Varyans analizi sonuçları içinde istatistiksel önem sınırı $p<0,05$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. 30 günlük TiO₂ uygulama sonrası bekleme sürelerinin karşılaştırılması.

	Uygulama grubu Ort ± Ss	15 gün bekleme grubu Ort ± Ss	30 gün bekleme grubu Ort. ± Ss.
CD45 GATE	97,39 ± 1,11	82,7 ± 17,25	87,95 ± 28,5
CD45 TOTAL	25,42 ± 3,63	16,42 ± 7,81	23,42 ± 11,41
CD3 GATE	98,04 ± 2,09	90,3 ± 9,94	94,82 ± 4,73
CD3 TOTAL	20,1 ± 5,2	18,29 ± 7,81	24,73 ± 8,9
CD4 GATE	73,71 ± 6,13	92,41 ± 9,17*	85,22 ± 28,71
CD4 TOTAL	16,13 ± 2,28	19,25 ± 7,26	24,07 ± 11,61
CD8 GATE	12,43 ± 2,24	10,96 ± 2,65	7,08 ± 4,66*
CD8 TOTAL	2,9 ± 0,72	2,1 ± 0,87	1,95 ± 1,27
CD20 GATE	0,97 ± 0,81	19,09 ± 7,49*	1,57 ± 1,82*
CD20 TOTAL	0,21 ± 0,16	3,74 ± 1,91*	0,41 ± 0,54*

n=8; $p<0,05$ (Sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.)

30 günlük TiO₂ uygulama sonrası $97,39 \pm 1,11$ olan CD45 GATE ortalaması 15. günlük bekleme süresinde $82,7 \pm 17,25$ düşmüş, 30 günlük beklemede ortalama $87,95 \pm 28,5$ olmuştur. CD45 TOTAL değerleri 30 günlük uygulama sonrası $25,42 \pm 3,63$, 15 günlük beklemede bu değer $16,42 \pm 7,81$ düşmüş, 30 gün bekleme gruplarında $23,42 \pm 11,41$ olmuştur. CD3 GATE ortalaması 30 günlük uygulama sonrası $98,04 \pm 2,09$ iken, 15 günlük bekleme süresi sonrası $90,3 \pm 9,94$ olmuş, 30 günlük bekleme sonrası $94,82 \pm 4,73$ olmuştur. 30 günlük uygulama sonrası $20,1 \pm 5,2$ olan CD3 TOTAL ortalaması, 15 günlük bekleme süresinde $18,29 \pm 7,81$ 30 günlük bekleme sonrası ise $24,73 \pm 8,9$ olmuştur. CD4 GATE değeri 30 günlük uygulama sonrası $73,71 \pm 6,13$ iken, 15 günlük bekleme grubunda istatistiksel olarak önemli artmış $92,41 \pm 9,17$ olmuştur ($p < 0,05$). 30 gün bekleme grubunda artan CD4 GATE değeri $85,22 \pm 28,71$ olmuştur. 30 günlük bekleme grubu ortalaması uygulama grubundan yüksek, 15 günlük bekleme süresindeki değerden düşüktür. CD4 TOTAL değeri 30 günlük uygulama grubunda $16,13 \pm 2,28$ bulunmuş, 15 bekleme grubu ve 30 günlük bekleme gruplarında ortalamalar artmıştır (sırasıyla $19,25 \pm 7,26$; $24,07 \pm 11,61$). 30 gün bekleme grubundaki artış daha fazladır. CD8 GATE ortalama değeri 30 günlük uygulama grubunda $12,43 \pm 2,24$ olarak tespit edilmiş, 15 gün ve 30 gün bekleme gruplarında CD8 GATE ortalaması azalmıştır. En düşük değer 30 gün bekleme grubunda tespit edilmiştir. CD8 TOTAL değerleri 30 günlük uygulama grubunda $2,9 \pm 0,72$; 15 gün bekleme grubunda $2,1 \pm 0,87$; 30 gün bekleme grubunda $1,95 \pm 1,27$ olarak tespit edilmiştir. 30 günlük uygulama grubunda $0,97 \pm 0,81$ olarak bulunan CD20 GATE ortalama değeri 15 günlük bekleme grubunda istatistiksel olarak önemli şekilde artmış, $19,09 \pm 7,49$ olmuştur. 30 günlük bekleme grubunda CD20 GATE ortalaması $1,57 \pm 1,82$ olarak bulunmuştur. CD20 TOTAL değeri 30 günlük uygulama grubunda $0,21 \pm 0,16$; 15 gün bekleme grubunda artmış $3,74 \pm 1,91$ olmuştur. 30 gün bekleme grubundan elde edilen CD20 TOTAL değeri $0,41 \pm 0,54$ dir. Bu ortalama değer 30 günlük uygulama grubundan istatistiksel olarak önemli şekilde yüksek, 15 gün bekleme grubuna göre ise istatistiksel olarak önemli şekilde düşüktür ($p < 0,05$).

4.1.2. Kontrol ve Uygulama Grupları İçin Tam Kan Çalışma Sonuçları

TiO₂'in kan parametreleri üzerine etkisini ölçmek için kontrol grubu ve 30 günlük TiO₂ uygulama gruplarının karşılaştırılması için t test yapılmış, istatistiksel önem sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir (çizelge 4.5).



Çizelge 4.5. 30 gün boyunca uygulanan TiO₂ 'in kan parametreleri üzerine etkisi.

	WBC (10 ³ /μ)	RBC (10 ⁶ /μl)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (10 ³ /μ)	LEN (10 ³ /μ)	%LEN (%)
	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss	Ort. ± Ss
Kontrol Grubu	7.87 ± 1,97	8,16 ± 1,63	14,35± 0,58	41,57 ± 2,16	751,12±109,04	5,33 ± 1,39	67,67 ± 6,43
Uygulama Grubu	7,63 ± 3,37	8,45 ± 0,53	14,27 ± 0,79	42,0 1± 3,05	718,87±179,15	4,72 ± 1,98	62,45 ± 4,84

(n=8; p<0,05)

30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası uygulama grubu ve kontrol grubu tam kan sonuçları incelendiğinde, WBC, RBC, HGB ve HCT değerleri açısından benzer ortalama değerler göze çarpmaktadır. PLT sayısı ortalaması kontrol grubunda 751,12; 30 günlük uygulama grubunda 718,87 olarak bulunmuştur. Değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Kontrol grubu ve uygulama grubunda LEN sayısı ve % LEN değerleri açısından da istatistiksel olarak fark yoktur.

Planlanan tez çalışmasında, 30 günlük TiO₂ uygulama sonrası kontrol grubuna göre meydana gelen değişimlerin düzelleme süresi de incelenmiştir. 30 günlük uygulama sonrası sıçanlara herhangi bir doz uygulaması yapılmamış 15 günlük bekleme süresi sonrası meydana gelen değişimler ile kontrol grubuna ait veriler çizelge 4.6 da verilmiştir. İki grubun karşılaştırılmasında t testi yapılmış istatistiksel önem sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. 30 günlük TiO₂ uygulaması kesildikten sonra 15 gün bekleme süresinin kan parametreleri üzerine etkisi.

	WBC (10 ³ /μ)	RBC (10 ⁶ /μl)	HGB (g/dL)	HCT (%)	PLT (10 ³ /μ)	LEN (10 ³ /μ)	%LEN (%)
	Ort± Ss	Ort± Ss	Ort ± Ss	Ort± Ss	Ort ± Ss	Ort± Ss	Ort ± Std
Kontrol Grubu	4,6± 0,35	8,32± 0,59	14,36± 0,33	28,8±1,27	874,62± 129,67	3,31± 0,56	71,66 ± 7,9
15gün Bekleme Grubu	9,08± 2,18*	9,04± 0,55*	14,56± 0,78	45,8±2,52*	865,75 ± 124,4	4,72 ± 1,54*	59,78± 7,59*

(n=8; p<0,05)

15 günlük bekleme süresi sonunda WBC ortalama sayısı, kontrol grubu için $4,6 \pm 0,35$; 30 gün TiO_2 uygulanmış grup için ise $9,08 \pm 2,18$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunda görülen artış istatistiksel olarak önemlidir. RBC ortalama değeri, kontrol grubu için $8,32 \pm 0,59$, uygulama grubu için $9,04 \pm 0,55$ olarak bulunmuştur. 15 günlük bekleme süresi sonunda, uygulama grubu RBC değerinde görülen bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. HCT değerlerinin ortalaması, kontrol grubu için $28,8 \pm 1,27$ uygulama grubu için ise $45,8 \pm 2,52$ şeklinde ölçülmüştür. Uygulama grubunun HCT değerinde görülen artış istatistiksel olarak önemlidir. Kontrol grubunda $3,31 \pm 0,56$ olarak bulunan ortalama LEN sayısı, uygulama sonrası 15 gün bekleme grubunda $4,72 \pm 1,54$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunda gözlenen artış istatistiksel olarak önemlidir. Ortalama % LEN değeri kontrol grubunda $71,66 \pm 7,9$, uygulama grubunda ise $59,78 \pm 7,59$ olarak bulunmuştur. Uygulama grubu %LEN değerinde görülen bu azalış istatistiksel olarak önemlidir. Ortalama HGB ve PLT sayıları açısından ise benzer ortalama değerler göze çarpmaktadır. Değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Kan parametrelerinde 30 günlük uygulama sonrası sıçanlara herhangi bir doz uygulamasının yapılmadığı 30 günlük bekleme süresi sonrası meydana gelen değişimler ile kontrol grubuna ait veriler çizelge 4.7 de verilmiştir. İki grubun karşılaştırılmasında t testi yapılmış istatistiksel önem sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir

Çizelge 4.7. 30 günlük TiO₂ uygulaması kesildikten sonra 30 gün bekleme süresinin kan parametreleri üzerine etkisi.

	WBC (10 ³ /μ)		RBC (10 ⁶ /μl)		HGB (g/dL)		HCT (%)		PLT (10 ³ /μ)		LEN (10 ³ /μ)		%LEN (%)	
	Ort±	Ss	Ort ±	Ss	Ort ±	Ss	Ort±	Ss	Ort ±	Ss	Ort±	Ss	Ort ±	Ss
Kontrol Grubu	8,46±	1,99	8,26±	0,68	13,97±	1,02	42,6±	2,67	657,25±	213,18	5,56±	1,25	66,27 ±	6,04
30gün Grubu	5,12±	0,53*	6,64±	0,52*	10,13±	0,25*	29,01±	0,57*	201,25 ±	67,4*	3,55 ±	0,6*	69,39±	8,18

(n=8; p<0,05)

TiO₂ uygulamasının ardından 30 gün bekleme süresi sonunda WBC ortalama sayısı, kontrol grubunda $8,46 \pm 1,99$, uygulama grubunda $5,12 \pm 0,53$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubu WBC değer ortalamasında görülen bu düşüş istatistiksel olarak önemlidir. Kontrol grubunun ortalama RBC sayısı, $8,26 \pm 0,68$ olarak bulunurken uygulama grubunun ortalama RBC sayısı $6,64 \pm 0,52$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunda tespit edilen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. Ortalama HGB sayısı kontrol grubu için $13,97 \pm 1,02$, uygulama grubu için $10,13 \pm 0,25$ olarak tespit edilmiştir. Uygulama grubunun ortalama HGB sayısında görülen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. Kontrol grubu için ortalama HCT değeri $42,6 \pm 2,67$, uygulama grubu için ise aynı parametrenin değeri $29,01 \pm 0,57$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunda izlenen ortalama HCT değerinde görülen düşüş istatistiksel olarak önemlidir. Ortalama PLT sayısı kontrol grubu için $657,25 \pm 213,18$, uygulama grubu için $201,25 \pm 67,4$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunun ortalama PLT değerinde görülen bu düşüş istatistiksel olarak önemlidir. Kontrol grubu ortalama LEN sayısı $5,56 \pm 1,25$ olarak bulunurken, uygulama grubu için bu değer $3,55 \pm 0,6$ olarak ölçülmüştür. Uygulama grubunun ortalama LEN sayısında tespit edilen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. 30 gün bekleme süresi sonunda ölçülen ortalama %LEN değeri açısından kontrol ve uygulama grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

TiO₂ in kan parametreleri üzerine süreye bağlı etkisinin değerlendirildiği çalışmada 15 ve 30 günlük bekleme süreleri kendi aralarında ve uygulama grubu ile karşılaştırılmış verilere ait varyans analizi çizelge 4.8. de verilmiştir.

Çizelge 4.8. 30 gün uygulanan TiO₂ 'in kan parametreleri üzerine süreye bağlı etkisi.

	WBC (10 ³ /μ)		RBC (10 ⁶ /μl)		HGB (g/dL)		HCT (%)		PLT (10 ³ /μ)		LEN (10 ³ /μ)		%LEN (%)	
	Ort±	Std	Ort ±	Std	Ort±	Std	Ort ±	Std	Ort±	Std	Ort±	Std	Ort±	Std
Uygulama	7,63±	3,37	8,45±	0,53	14,27 ±	0,79	42,01±	3,05	718,87±	179,15	4,72±	1,98	62,45 ±	4,84
15gün	9,08±	2,18	9,04±	0,55	14,56 ±	0,78	45,8 ±	2,52	865,75±	124,4	5,43 ±	1,54	59,78±	7,59
Bekleme														
30.gün	5,12 ±	0,53*	6,64±	0,52*	10,13±	0,25*	29,01±	0,57*	201,25±	67,4*	3,55±	0,6	69,39±	8,18*

(n=8; p<0,05)

30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası ortalama WBC sayısı $7,63 \pm 3,37$ olarak tespit edilmiştir. Uygulamanın yapılmadığı 15 günlük bekleme grubunda ortalama WBC sayısı $9,08 \pm 2,18$ ve 30 gün bekleme grubunda $5,12 \pm 0,53$ olmuştur. 30 günlük bekleme süresi sonrası meydana gelen azalma ilk uygulama ve 15 günlük bekleme grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir. 30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası $8,45 \pm 0,53$ olarak belirlenen ortalama RBC sayısı, 15 günlük bekleme grubunda $9,04 \pm 0,55$, 30 gün bekleme grubunda ise $6,64 \pm 0,52$ olarak tespit edilmiştir. 30 gün bekleme grubunda gözlenen azalma, ilk uygulama ve 15 gün bekleme grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir. Ortalama HGB miktarı, 30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası $14,27 \pm 0,79$ olarak ölçülmüştür. 15 gün bekleme grubunda $14,56 \pm 0,78$ olarak tespit edilen ortalama HGB sayısının 30 gün bekleme grubu için değeri $10,13 \pm 0,25$ olarak bulunmuştur. 30 gün bekleme süresi sonunda tespit edilen azalma, ilk uygulama ve 15 gün bekleme grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir. 30 günlük TiO₂ uygulamasının ardından $42,01 \pm 3,05$ olarak ölçülen ortalama HCT değeri, 15 günlük bekleme grubunda $45,8 \pm 2,52$ olarak ölçülmüştür. 30 gün bekleme grubunda ise ortalama HCT değeri $29,01 \pm 0,57$ olarak ölçülmüş ve değerinde görülen bu düşüş, ilk uygulama ve 15 gün bekleme grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ortalama PLT sayısı, 30 günlük uygulama grubunda, $718,87 \pm 179,15$ olarak tespit edilmiştir. 15 günlük bekleme grubunda bu değer $865,75 \pm 124,4$ olarak bulunmuş, 30 günlük bekleme grubunda ise ortalama PLT sayısında düşüş gözlenmiş ve $201,25 \pm 67,4$ olarak ölçülmüştür. Ortalama PLT sayısında gözlenen azalış, uygulama ve 15 gün bekleme gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Ortalama LEN sayısı, 30 günlük TiO₂ uygulama grubunda $4,72 \pm 1,98$, 15 gün bekleme grubunda $5,43 \pm 1,54$, 30 gün bekleme grubunda ise $3,55 \pm 0,6$ olarak tespit edilmiştir. Ancak gözlemlenen bu fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası ölçülen ortalama %LEN değeri $62,45 \pm 4,84$ olarak ölçülmüştür. Uygulamanın yapılmadığı 15 günlük bekleme grubunda ortalama %LEN değeri $59,78 \pm 7,59$ ve 30 gün bekleme grubunda $69,39 \pm 8,18$ olmuştur. 30 gün bekleme grubunda görülen artış, uygulama ve 15 gün bekleme grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir.

4.2. TARTIŞMA

Nanopartiküllerin kullanımının artması, potansiyel bir nanopartikül kirliliğine sebep olmaktadır. Bundan dolayı özellikle son 5 yıldır nanotoksikolojik çalışmalarda bir artış görülmektedir. Yapılan bu çalışmalarla nanopartiküllerin oksidatif strese bağlı karaciğer hasarına yol açtığı ortaya konmuştur. Ayrıca immün sistemi uyararak veya baskılayarak etkilediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada 30 gün süreyle nano-TiO₂'e maruz bırakılan sıçanlarda, sistemik immün yanıtlarında oluşabilecek değişimlerin gözlenmesi için kemik iliğindeki B ve T lenfosit proliferasyonu ve periferik kan değerleri ölçülmüştür. Ayrıca nano-TiO₂ uygulamasını takiben 15 ve 30 günlük bekleme süreleri sonrası da B ve T lenfosit proliferasyonu ve periferik kan değerleri değerlendirilerek immün sistem üzerine etki süresi tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre 30 günlük TiO₂ uygulaması sonrası ortalama CD45 GATE miktarının uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli şekilde arttığı, ortalama CD4 TOTAL ve CD8 TOTAL miktarının ise uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli şekilde azaldığı görülmüştür. Ölçülen ortalama CD45 TOTAL, CD3 TOTAL, CD3 GATE, CD4 GATE, CD8 GATE, CD 20 TOTAL ve CD 20 GATE değerleri istatistiksel olarak önemli olmasa bile kontrol grubuna göre değişiklikler göstermiştir (çizelge 4.1).

Canlı sistemlerde immün yanıtın oluşabilmesi için, antijen tanınmalı ve gerekli ise antijen sunucu hücreler tarafından bir dizi işlem den geçirilmeli daha sonra da T, B hücreleri aktive edilmelidir. Ayrıca yardımcı T, B ve sitotoksik T hücre prokürsörlerinin sayıları arttırılmalıdır. Bu mekanizmalar, hücre sel ve hü moral immünite mediatörlerinin farklılaşmasına yol açar [Roitt, 2008]. T ve B lenfositlerin antijenleri ve mutajenleri tanıyıcı reseptörleri vardır [Friedlaender, 1993]. İmmün sistem hücrelerinin fenotipini tayin eden CD antijenleri, hücre yüzeyinde bulunan sıradan markerlar değildir. Birçok şekilde iş görebilir ve organizmada gerçekleşen immün reaksiyonlar içinde önemlidirler. Genellikle hücre için önemli bir reseptör ya da bağ olarak hareket eder bir sinyal kaskadı uyarır ve hücrenin davranışını

değiştirirler. CD45, lökosit genel antijeni olup T, B lenfositler ile lenfosit öncüllerinde bulunur. T ve B hücrelerinin antijen reseptörlerini ve bu hücrelerin büyüüp farklılaşmasını düzenler. Erken dönem B hücre öncüllerinde sentezlenmeye başlar. CD3, T lenfositlerin ve timositlerin yüzeyinde bulunur. Yapısında immünglobulin süper ailesine ait 4 tane değişmez zincir bulunur. Bu zincirlerin yardımıyla T-hücre antijen reseptörlerine bağlanırlar. T hücre aktivasyonunda görev alan bir protein kompleksidir. CD4, yardımcı T hücrelerinin yüzey belirteçidir. Erken dönem T hücre aktivasyonunu başlatır. T ve B hücre üretimini uyarır. CD8 ise sitotoksik T hücre yüzey antijenidir. Hücre aracılı immüniteden sorumludur. Herhangi bir alerji durumunda, alerji oluşturmak, otoimmün bir saldırıyı engellemek adına CD8 T hücreler inaktive edilir. CD20 ise B hücre belirteçidir. Henüz olgunlaşmamış olan B lenfositlerde bulunur [Janeway vd., 2005, Akbar vd., 1988].

30 günlük uygulama sonrası CD45 artması immün sistemin uyarıldığını ifade etmektedir. CD4 TOTAL ve CD8 TOTAL miktarları ise azalmıştır. Duan vd (2010) farklı dozlarda TiO₂' in CD3, CD4, ve CD8 miktarlarının azaldığını rapor etmişlerdir. Çevresel partiküllerin alerjik reaksiyonlar başta olmak üzere çeşitli immün sistem rahatsızlıklarına yol açtığına; uzun dönem maruziyetin astım riskini ve deri hassasiyetini arttırdığına dair çeşitli araştırmalar da bulunmaktadır [Kleinman vd., 2007, Siegel vd.,2004, Ma vd., 2002, Li, vd., 2008].

İmmün sistem üzerine etki mekanizması ile ilgili bir çalışmada titanyum dioksite maruz kalan makrofajlar IL-1 β , TNF- α , IL-6 sitokinleriyle inaktif durumdaki T hücrelerini uyardığı, T hücreleri yardımcı (CD4+) ve sitotoksik (CD8+) T hücrelerine farklılaştığı ifade edilmiştir. Mekanizmanın devamında yardımcı T hücreleri Th1 ve Th2 olarak kendi içlerinde farklılaşmakta, bu süreçte IL-4, IL-5, IL-10 sitokinleri T hücreleri, alerjik ve otoimmün yanıtlarla alakalı olan Th2 hücrelere dönüştürmektedir. Aktive olan Th2 hücreleri IgE üretilmesi için B hücreleri aktive etmektedir. Park vd. (2010), titanyum dioksit nanopartiküllerinin intratrakeal instillasyondan hemen bir gün sonra bronko alveolar lavaj içindeki Th2 sitokinlerinden olan IL-4 ve IL-5'in sırasıyla 14.4 ve 4.9 kat arttığını rapor etmişlerdir. Her ne kadar hem Th1 hem de Th2 sitokinleri eş zamanlı olarak artış

gösterse de Th2 hücreleri ilk yanıtta B hücrelerini uyarmada daha etkindir. Th1 hücreleri ise daha çok makrofajları aktive eder ve gecikmiş tip yanıtta görev alır [Park vd., 2009]. Yapılan bir başka çalışmada nanopartikül uygulamasının ardından mast hücre aktivasyonuna bağlı olarak hem pulmoner hem de kardiyovasküler sistem etkilendiği gösterilmiştir [Shannahan vd., 2012]. Dolayısıyla immün hücrelerin aktivasyonu başka sistemleri de etkileyen süreci başlatabilmektedir.

CD4 hücreler, diğer hücrelerin büyümelerini ve farklılaşmalarını uyarabildiği gibi, T hücre büyüme faktörü ya da IL-2 de üretebilir. Bundan dolayı T lenfosit düzeyine bakılarak immünolojik durum veya organizmaların immün düzeyleri belirlenebilir [Domzig vd., 1983].

Fukami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anti-MHC I antikoru intra bronkial yoldan verilmiş, MHC I geninin otoimmün rahatsızlıklarda aktivitesinin artarken; MHC II geninin alerjik reaksiyonlarda arttığı rapor edilmiştir [Fukami vd., 2009]. Yapılan diğer bir çalışmada ise nano-TiO₂ 0.5mg/kg, 4 mg/kg ve 32 mg/kg'lık dozlar halinde haftada iki kere verilmek üzere intratrakeal yoldan 4 hafta boyunca sıçanlara uygulanmış. Sonuçta 32mg/kg doz uygulama yapılan sıçan grubunda B lenfosit sayısı önemli ölçüde artış gösterirken, T lenfosit sayısı için hiçbir uygulama grubunda anlamlı bir değişim olmamıştır. [Fu vd., 2014]. Ancak nanopartiküllerin yüzey yapıları ve büyüklükleri gibi fizikokimyasal özellikleri, bu maddelerin lenfosit, fagosit ve mast hücresi gibi immün sistem elemanlarıyla etkileşimlerinde farklılıklara neden olurlar [Fischer ve Chan, 2007].

Titanyum dioksit'in immün sistem üzerindeki ciddi etkisinin, ürettiği reaktif oksijen türevleriyle ilişkilendirilmiş, reaktif oksijen türlerinin enflamatuvar yanıtları tetiklediği ve amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), fibrozis ve akciğer kanseri gibi çeşitli hastalıklara sebep olduğu ileri sürülmüştür [Reeves vd., 2008, Park vd., 2009, Kang vd., 2008, Driscoll ve Maure, 1991]. Reaktif oksijen türevlerinin birikimi, sitokin üretimini değiştirerek immün fonksiyonun işleyişine zarar verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. [Li vd., 2008, Liu vd., 2010, Liu vd., 2011, Sang vd., 2012].

30 günlük TiO₂'in uygulama sonrası meydana gelen değişimler incelendiğinde immün sistemin etkilendiği görülmektedir. Uygulama bittikten sonra sıçanlara her hangi bir uygulama yapılmadan 15 ve 30 gün beklenmiş, TiO₂'in immün sistem üzerindeki etki süresi araştırılmıştır.

Uygulama bittikten sonraki 15 günlük bekleme süresi sonrasında ölçülen ortalama CD45 GATE ve CD20 GATE değerlerinin istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı görülürken; ortalama CD45 TOTAL, CD3 GATE, CD3 TOTAL, CD4 GATE, CD4 TOTAL, CD8 GATE, CD8 TOTAL ve CD20 TOTAL değerlerinin ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.2). Kontrolle karşılaştırıldığında 30 günlük bekleme grubunda ortalama CD3 TOTAL değerinin kontrole göre istatistiksel olarak önemli şekilde arttığı tespit edilmiş; ölçülen ortalama CD45 TOTAL, CD45 GATE, CD3 GATE, CD4 TOTAL, CD4 GATE, CD8 TOTAL, CD8 GATE, CD 20 TOTAL ve CD 20 GATE uygulama değerlerinin ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3).

Çalışma sonuçlarına göre uygulama grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, 15 gün bekleme süresi sonrasında ölçülen ortalama CD4 GATE değerinin, diğer iki uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Ortalama CD20 GATE ve CD20 TOTAL değerlerinin 15 gün bekleme ve 30 gün bekleme gruplarından alınan ölçümlerinin, ilk gün uygulama grubu ölçümlerine göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur.

Kemik iliği kullandığımız çalışmada ise MHC II genine bağlı olarak aktive olan CD4+ miktarında bir artış görülürken, MHC I'e bağlı CD8+ sayısında ise düşüş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca uygulama grupları arasında yapılan karşılaştırmada bekleme süreleri sonunda yüksek olduğu tespit edilen CD20, B lenfosit yüzey antijenidir. B hücre çoğalması ve farklılaşması sırasında sentezlenir. Erken dönem B hücre öncüllerinde ya da plazma hücrelerinde görülmez; geç dönem B hücre öncüllerinde sentezi yapılır [Janeway, 2005]. Bulgulara göre 15 ve 30 günlük

bekleme sürelerinde de TiO₂ immün sistem üzerine etkisi devam ediyor veya bozulan immün fonksiyonun düzelmediği söylenebilir.

Hematolojik veriler insan ve hayvanların fizyolojik durumunu değerlendirebilmek için önemli parametrelerdir. Hematolojik parametrelerdeki değişimler canlının çevre koşulları ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle çalışmada TiO₂' in kan parametreleri üzerine etkisi de incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; TiO₂ uygulamasının bitiminde (30. günde) ölçülen WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, LEN sayılarının ve % LEN oranının kontrole göre değişmediği tespit edilmiştir (çizelge 4.5). Ancak uygulama bitikten sonraki 15 günlük bekleme süresi sonrası WBC, RBC, HCT, LEN sayılarının ve % LEN oranının arttığı tespit edilmiştir (çizelge 4.6). 30 günlük bekleme süresinde ise WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, LEN sayılarının kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (çizelge 4.7).

WBC, enfeksiyöz hastalıklar sırasında ya da vücuda giren yabancı bir maddeye karşı immün sistem tarafından üretilen savunma hücreleridirler [Maton vd., 1997]. 15 günlük bekleme süresi sonunda WBC sayısı artışı ile birlikte LEN sayılarının ve % LEN artması enfeksiyonel yanıt olarak değerlendirilebilir. RBC, en yaygın bulunan kan hücreleridir ve asli olarak görevleri hücre solunumunun gerçekleşmesi ve ATP üretilmesi için gerekli oksijeni, dolaşım sistemi yoluyla ihtiyaç duyulan dokulara götürmektir. Bununla beraber eritrositler, sekonder olarak vücut savunmasına katılırlar. Eğer organizmaya giren bir patojen yüzünden hücre yıkımına uğrarlarsa, açığa çıkan hemoglobinleri aracılığıyla serbest radikaller üretirler [Jiang vd., 2007]. Çalışmada 15 günlük bekleme sonrası RBC artışı vücut savunması için artış olarak yorumlanabilir. HCT eritrositlerin total kana göre hacim yüzdelerini gösterir. Yaklaşık olarak HGB değerinin 3 katıdır. Dehidrasyon durumunda ya da myeloproliferatif hastalıklarda olduğu gibi kemik iliğindeki eritrosit üretiminin aşırı arttığı durumlarda HCT değeri yükselir. Demir eksikliği, kan kaybı, böbrek hasarına bağlı eritropoietin sentezinin azalmasına bağlı olarak da HCT değeri düşer [Jelkmann, 2004]. Çalışmada 15 günlük bekleme süresi sonrası HCT artışı dehidratasyon olarak yorumlanabilir.

Nanopartiküllerin periferik kana olan etkilerini araştıran bir dizi çalışma sonucunda, pozitif yüklü nanopartiküllerin sitotoksik olduğu ve pıhtılaşmayı arttırdığı gözlenirken kuvarz gibi yüzeyleri pozitif yüklü olmayan partiküllerin de pıhtılaşmayı tetiklediği raporlanmıştır [Najlah vd., 2007, Jevsprasephant vd., 2003, Hadnagy vd., 2003]

Duan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 30 gün boyunca her gün sıçanlara anatas TiO₂, 125mg/kg ve 250mg/kg olarak iki doz halinde verilmiş ve uygulamanın bitiminden hemen sonra yapılan ölçümlerde ise vücut ağırlıklarının azaldığı, karaciğer, böbrek, dalak, timus yapılarında ciddi hasarlar olduğu gözlenmiş. WBC, RBC, HGB sayılarında düşüş; PLT, HCT değerlerinde ise artış olduğu gözlenmiştir [Duan vd., 2010]. Bizim çalışmamızda; oral olarak uygulanan titanyum dioksit hemen uygulama sonrası değil uygulama bittikten sonraki günlerde özellikle 15. günde WBC, RBC, HCT, LEN sayılarını ve % LEN oranını arttırmış, 30. günde WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, LEN azalmaya başlamıştır. Bu durumu düzelleme süreci olarak değerlendirebiliriz. Daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alındığında nanopartiküllerin etkileri boyut, türü ve uygulanma şekline göre değişmektedir. Netice itibariyle immün sistem yanıtının etkilenmesine ilaveten fizyolojik fonksiyonların da değiştiği bunun da hematolojik parametrelere yansıdığı söylenebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması sonuçlarına göre; B lenfosit belirteçleri olan CD45+ ve CD20+ hücre miktarı ile yardımcı T hücre belirteci olan CD4+ hücre miktarında artış olduğu görülürken, sitotoksik T hücre belirteci olan CD8+ miktarında ise bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Lenfosit sayısındaki değişim, immün cevabın önemli bir basamağını oluşturur. Elde edilen sonuçlara göre nano-TiO₂'in sistemik bir immün etki meydana getirdiği düşünülebilir.

Çalışmamızda, periferik kan içeriğine bakıldığında, uygulamanın hemen bitiminde yani 30. günde ölçülen WBC, RBC, HGB, HCT ve PLT sayılarının kontrol grubuna göre değişmediği ancak 15 gün bekleme sonunda kemik iliği uyarımına ve sistemik kanda dolaştığı düşünülen nano-TiO₂ varlığına bağlı olarak RBC, HCT, LEN sayılarının ve % LEN oranının anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumda uygulanan titanyum dioksitin ratlarda lökosit, eritrosit miktarını dolayısıyla toplam hücre sayısının plazmaya oranını arttırdığını, bunun da kanın akışkanlığını azalttığını söyleyebiliriz. Ayrıca platelet sayısındaki artışla birlikte pıhtılaşma yatkınlığının arttığı düşünülebilir.

30 gün bekleme sonunda ise WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, LEN değerlerinin kontrolden de düşük olduğunu görüyoruz. HGB, RBC ya da PLT sayılarındaki azalma kan kaybına, damar hasarına işaret ediyor olabilir. WBC sayısındaki azalma CD8 T lenfosit hücrelerin baskılanıp, enerji oluşturmaları sebebiyle ya da vücut içi hasar gören organlar varsa, bu bölgeler enfeksiyon kapmış ve lökositler o bölgelere gönderilmesine bağlı olarak meydana gelmiş olabilir.

Sonuç olarak; nano-TiO₂'in sistemik immün yanıt üzerinde etkilidir ve bu etkisi uzun süreli devam edebilmektedir. Nano-TiO₂ gibi kullanılan diğer nanopartiküller ekosisteme karışmakta, bu da nanopartiküllerin diğer çevresel kirlenmelerle birlikte (pestisit, ilaç, ağır metal vb) toksik etki potansiyellerinin değiştirebileceğini akla getirmektedir. Giderek gelişen teknolojiye nanomateryallerin üretimi ve kullanımı kaçınılmazdır. Dolayısıyla biyolojik sistemlere daha uygun yeni maddelerin sentezi ön planda olmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adams, L.K., Lyon, D.Y., Alvarez, P.J.J. "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions." *Water Res.* 40:3, 527–532, (2006).
- Afaq , F., Abidi, P., Martin,R., Rahman, Q. "Cytotoxicity , pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide." *J. Appl. Toxicol.*18: 307-312. (1998)
- Akay, T. "Genel Histoloji" 7. Baskı ’’ Palme Yayıncılık, Ankara, 262s., (2011).
- Akbatur H.H., Şengün A." Behçet Hastalığı, Endoftalmiler ve Üveitler" , 1. baskı. Ankara: Atlas Kitabevi, 1-481, (2002).
- Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G . "Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells". *J. Immunol.*140 (7): 2171–8, (1988)
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*." *Sci Total Environ.*407:1461–1468, (2009)
- Bailie, M.B., Pearson, J.M., Lappin, P.B., Killam, A.L., Roth, R.A. "Platelets and α -Naphthylisothiocyanate-Induced Liver Injury" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129:207-213, (1994).
- Bang,H.S., Lee, Y.K." The functional TiO₂- biodegradable plastic composite material produced by HVOF spraying process." *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7: 3830 - 3833, (2007).
- Başaran, A. "Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı" 5. baskı Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, Bursa, 240-242, (1999).
- Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B., Everitt J.I." Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles." *Toxicol. Sci.* (2004);77:347–357, (2004). doi:10.1093/toxsci/kfh019.
- Camcıoğlu Y. İmmün Sisteme Giriş. İn: Camcıoğlu Y, Deniz G (ed)." Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları, 1. baskı." Medikal Yayıncılık, İstanbul, 1-123, (2007).
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G. " Bivalve molluscs as an unique target group for nanoparticle toxicity", *Marine Environmental Research* 76: 16-21, (2012). doi:10.1016/j.marenvres.2011.06.005

- Carbon-doped titanium dioxide is an effective photocatalyst " Advanced Ceramics Report." (December 2003.) <http://www.highbeam.com/doc/1G1-110587279.html>
- Caren B. Les, "Light spells doom for bacteria" Biophotonics, <http://www.photonics.com/Article.aspx?AID=35722> (November, 2008)
- Chen, H.W., Su, S.F., Chien, C.T., Lin, W.H., Yu, S.L., Chou, C.C., Chen, J.J., Ynag, P.C. "Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice" FASEB J. 20(13): E1732- E1741, (2006).
- Chen, J., Dong, X., Xin, Y., Zhao, M. "Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure" Volume 101, Issues 3–4, February 2011, Pages 493–499, (2011).
- Chen, J., Dong, X., zhao, J., Tang, G. "In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection." J. Appl. Toxicol. 29: 330-337, (2009).
- Cui, Y., Liu, H., Ze, Y., Zengli, Z., Hu, Y., Cheng, Z., Cheng, J., Hu, R., Gao, G., Wang, L. "Gene expression in liver injury caused by long term exposure to titanium dioxide nanoparticles in mice. " Toxicol. Sci. 128: 171-185, (2012).
- Çetin ET. İmmünoloji, 1. ed. İstanbul: Bayda Yayınevi, 1-235, (1981).
- D. Gong et al., "Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation" Journal of Materials Research, 16(12): 3331–3334, (2001). doi:10.1557/JMR.2001.0457
- Driscoll, K.E., Maurer, J.K. "Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity." Toxicol. Pathol. 19(4): 398-405, (1991).
- Driscoll K.E., Lindenschmidt R.C., Maurer J.K., Perkins L., Perkins M., Higgins J. "Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide." Toxicol. Appl. Pharmacol. 111: 201–210, (1991). doi: 10.1016/0041-008X(91)90024-9.
- Domzig W, Stadler BM, Herberman RB. "Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) activity" J Immunol ;130:1970–3, (1983)
- Duan, Y., Liu, J., M, Linglan., Li, N., Liu, H., Wang, J., Zheng, L., Liu, C., Wang, X., Zhao, X., Yan, J., Wang, S., Wang, H., Zhang, X., Hong, F. "Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice" Biomaterials 31, 894–899, (2010).
- Earle, M. D., "The Electrical Conductivity of Titanium Dioxide". Physical Review 61 (1–2): 56, (1942). doi:10.1103/PhysRev.61.56

- El Goresy, A., Chen, M., Dubrovinsky, L., Gillet, P., Graup, G(2001). "An ultradense polymorph of rutile with seven-coordinated titanium from the Ries crater.". *Science* 293 (5534):1467-1470, (2001). doi:10.1126/science.1062342. PMID 11520981
- Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohlleben, W. "Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rat" 82(3): 151-157, (2007).
- Farombi, E.A., Tahnteng, J.G., Agboola, A.O., Nwankwo, J.O., Emerole, G.O. "Chemoprevention of 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats by kolaviron—A *Garcinia kola* seed extract" *Food and Chemical Toxicology*, 3: 535-541, (2000).
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D. "Toxicity of titaniumdioxide nanoparticles to rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects" *Aquat Toxicol* 84:415–30, (2007).
- Fischer, H.C. and Chan, W.C. "Nanotoxicity: the growing need for in vivo study" *Curr Opin Biotechnol* 18: 565-567, (2007).
- Friedlaender M.H. "Allergy and Immunology of the Eye" 2. ed. Raven Press, NewYork 1-325, (1993).
- Fu, Y., Zhang, Y., Chang, X., Zhang, Y., Ma, S., Sui, J., Yin, L., Pu, Y., Liang, G. "Systemic immune effects of titanium dioxide nanoparticles after repeated intratracheal instillation in rat" *J. Mol. Sci.* 15: 6961-6973, (2014). doi: 10.3390/ijms14046961
- Fujishima, A., Honda, K . "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode" *Nature* 238 (5358): 37–38, (1972). doi:10.1038/238037a0
- Fukami, N., Ramachandran, S., Saini, D., Walter, M., Chapman, W., Patterson, G.A., Mohanakumar, T. "Antibodies to MHC class I induce autoimmunity: role in pathogenesis of chronic rejection" *J. Immunol.* 182 (1): 309-318, (2009).
- Gazioğlu S. "Flowsitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi" 2. baskı. İstanbul: Bilmedya Grup, 1-11, (2004).
- Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., Kreyling, W. "The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles" *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38: 371-376, (2008).
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Gehr, P. "Ultrafine particles cross cellular membranes by non-phagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells" *Environ. Health perspect.* 113: 1555-1560, (2005)

- Gilmour, K. Centre for Immunodeficiency, Great Ormond Street Hospital, London, UK. <http://www.ipidnet.org/protocol-data-5> (2010)
- Gonçalves, D.M., Chiasson, S., Girard, D. "Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles" *Toxicology in Vitro* 24 : 1002–1008, (2010).
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A. "Chemistry of the Elements" Oxford: Pergamon. 1117–1119, (1984). ISBN 0-08-022057-6
- Gui, S., Sang, X., Zheng, L., Ze, Y., Zhao, X., Sheng, L., Sun, Q., Cheng, Z., Cheng, J., Hu, R., Wang, L., Hong F., Tang, M. "Intragastric exposure to titanium dioxide nanoparticles induced nephrotoxicity in mice, assessed by physiological and gene expression modifications" *Particle and Fibre Toxicology* 10(4): 1-16, (2013) doi:10.1186/1743-8977-10-4
- Gui, S., Zhang, Z., Zheng, L., Cui, Y., Liu, X., Li, N., Sang, X., Sun, Q., Gao, G., Cheng, Z. "Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles." *J. Hazard Mater.* 195: 365-370, (2011).
- Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y. "Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells." *Toxicology* 213: 66-73, (2005).
- Hadnagy, W., Marsetz, B., Idel, H., 2003. "Hemolytic activity of crystalline silica-separated erythrocytes versus whole blood." *Int J. Hyg. Environ. Health.* 206, 103-107, (2003).
- Halappanavar, S., Jackson, P., William, A., Jensen, K.A., Hougaard, K.S., Vogel, U., Yauk, C.L., Wallin, H. "Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: A toxicogenomic study." *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 425-439, (2011).
- Hashimoto, K., Irie, H. and Fujishima, A. "TiO₂ Photocatalysis", *AAPPS Bulletin* 17(6): 12-28, (2007).
- Hedenborg, M., "Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes." *International Archives of Occupational and Environmental Health* 61: 1–6, (1988).
- Hood, E. "Nanotechnology: Looking as we leap." *Environ. Health Perspect.* 112: A741- A749 (2004).

- Höhr D., Steinfartz Y., Schinsm R.P., Knaapen A.M., Martra G., Fubini B., Borm P.J. "The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat." *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205:239–244, (2002). doi: 10.1078/1438-4639-00123
- Hwang, Y.K., Patil, K.R., Kim, H.K., Sathaye, S.D., Hwang, J.S., Park, S.E., Chang, J.S. "Photoinduced Superhydrophilicity in TiO₂ Thin Films Modified with WO₃" *Bull. Korean Chem. Soc.* 26(10): 1515-1519, (2005).
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Selomchik, M. J. "Immunobiology: the immune system in health and disease", 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216, (2005)
- Jelkmann W. "Molecular biology of erythropoietin" *Intern Med.* ; 43: 649–659, (2004)
- Jevsprasephant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, B.N., D'Emanuele, A. "The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers." *Int. J. Pharm.* 252, 263-266, (2003).
- Jones, B.J., Vergne, M.J., Bunk, D. M., Locascio, L.E., Hayes, M.A. "Cleavage of Peptides and Proteins Using Light-Generated Radicals from Titanium Dioxide". *Anal.Chem.* 79 (4):1327–1332,(2007). doi:10.1021/ac0613737. PMID 17297930
- Jiang N, Tan NS, Ho B, Ding JL "Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy" *Nature Immunology* 8 (10): 1114–22, (2007)
- Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J., Chung H.W. "Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes." *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (5): 399-405, (2008).
- Kılıçturgay K. "İmmünolojiye giriş", 2. Baskı Güneş Kitabevi, Bursa, 1-150, (1991).
- Kiss, B., Biro, T., Czifra, G., Toth, B.I., Kertesz, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., Juhasz, I., Zouboulis, C.C., Hunyadi, J. "Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells." *Exp. Dermatol.* 17: 659-667, (2008).
- Kleinman, M.T., Sioutas, C., Froines, J.R., Fanning, E., Hamade, A., Mendez, L., Meacher, D., Oldham, M., "Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked, road stimulates antigen-induced airway responses in mice." *Inhal. Toxicol.* 19: 117-126, (2007).

- Kumazawa, R., Watari, F., Takashi, N., Tanimura, Y., Uo, M., Totsuka, Y. "Effects of Titanium Ions and Particles of Neutrophil Function and Morphology." *Biomaterials* sep23(17): 3757-3764, (2002).
- Kurtoglu M. E., Longenbach T., Gogotsi Y. "Preventing Sodium Poisoning of Photocatalytic TiO₂ Films on Glass by Metal Doping." *International Journal of Applied Glass Science* 2 (2): 108–116, (2011). doi:10.1111/j.2041-1294.2011.00040.x
- Lee, S.W., Kim, S.M., Choi, J. "Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphniamagna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure." *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28:86–91, (2009).
- Lee, Y.S., Yoon, S., Yoon, H.J., Lee, K., Yoon, H.K., Lee, J.H., Song, C.W. "Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO₂ – induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells." *Toxicol. Let.* 189(3): 191-199, (2009).
- Lewinson W, Jawetz E. İmmünoloji. In: *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*, 5. ed. Çeviri Editörü: İsmail H Dündar. İstanbul: Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 327-400 (1998).
- Lewis, N. "Nanocrystalline TiO₂". Research. California Institute of Technology. R (October 9, 2009).
- Li, N., Nei, A.E. "The role of oxidative stress in ambient particulate matter induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles." *Free Redic. Biol. Med.* 44(9): 1689-1699, (2008).
- Li, Y., Liu, R., Liang, G., Pu, Y., Yin, L. "Effect of the transbronchial intoxication of TiO₂ nanoparticles on immune function of pulmonary alveolar macrophages in rat." *J. Environ. Occup. Med.* 25: 156-158, (2008).
- Liao M.Y., Liu H.G., "Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration." *Environ Toxicol Pharm.* 34:67-80, (2012)
- Liu, H., Ma, L., Liu, J., Zhao, J., Yan, J., Hong, F. "Toxicity of nano-anatase TiO₂ to mice: Liver injury, oxidative stress." *Toxicol. Environ. Chem.* 92: 175-186, (2010).
- Liu, H., Ma, L., Zhao, J., Liu, J., Yan, J., Ruan, J., Hong, F. "Biochemical Toxicity of Nano-anatase TiO₂ Particles in Mice." *Biological Trace Element Research* 129(1-3), pp 170-180, (2009).

- Liu, H., Yang, D., Zhang, H., Yang, H., Zhang, W., Liu, L., Lin, Z., Yan, J., Lin, B., Xi, Z. "Immunity toxic effects induced by three kinds of nanomaterials in rat." *J. Prev. Med. Chin. PLA* 28: 163-166, (2010).
- Liu, H., Zhang, H., Yang, D., Yang, H., Lin, Z., Yan, J., Lin, B., Tian, L., Huang, J., Xi, Z. "The effect of nanoparticles on T-lymphocyte populations of peripheral blood in rat." *J. Environ. Occup. Med.* 29: 320-323, (2011).
- Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Xiao, Z., Ye, B. "Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intratracheal instillation in rats." *Prog. Nat. Sci.* 19: 573-579, (2009).
- Liu, R., Yin, L.H., Pu, Y.P., Li, Y.H., Zhang, X.Q., Liang, G.Y., Li, X.B., Zhang, J., Li, Y.F., Zhang, X.Y. "The immune toxicity of titanium dioxide on primary pulmonary alveolar macrophages relies on their surface area and crystal structure." *J Nanosci Nanotechnol.* 10(12): 8491-8499, (2010a).
- Liu, R., Zhang, X., Pu, Y., Yin, L., Li, Y., Zhang, X., Liang, G., Li, X., Zhang, J. "Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages *in vivo*." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(8): 5161-5169, (2010b).
- Lomer, M.C.E., Hutchinson, C., Volkert, S., Greenfield, S.M., Catterall, A., Thompson, R.P.H., Powell, J.J "Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease" *Brit. J. Nutr.*, 92(6): 947-955, (2004)
- Ma, J.Y., Ma, J.K. "The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes." *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 20 (2): 117-147, (2002).
- Ma, L., Jie Liu, J., Li, N., Wang, J., Duan, Y., Yan, J., Liu, H., Wang, H., Hong, F. "Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity." *Biomaterials*, 31(1): 99-105, (2010).
- Maggos, T.B., Liakou, M., Gobbin, C. "Photocatalytic degradation of NO_x gases using TiO₂ -containing paint: a real scale study." *J.Hazard. Mater.* 146, 668-673, (2007).
- Maton, D., Hopkins, J., McLaughlin, Ch. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D., & Wright, J. D., Deep V. Kulkarni "Human Biology and Health" Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall, (1997).
- Meek, B., Speijer, D. "The ocular humoral immune response in health and disease." *Prog Retin Eye Res* 22(3): 391-415, (2003).
- Murray, A.R., Kisin, E., Leonard, S.S., Young, S.H., Kommineni, C., Kagan, V.E., Castranova, V., Shvedova, A.A. "Oxidative stress and inflammatory response

- in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes." *Toxicology* 257: 161-171, (2009).
- N. Taniguchi, "On the Basic Concept of 'Nano-Technology'," *Proc. Intl. Conf. Prod. London, Part II, British Society of Precision Engineering*, (1974).
- Najlah, M., Freeman, S., Attwood, D., D'Emanuele, A. "In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery." *Int. J. Pharm.* 336: 183-190, (2007).
- Nemmar, A., Melghit, K., Ali, B.H. "The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO₂ nanorods in rats." *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 33:610–619, (2008). doi: 10.3181/0706-RM-165.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environ. Health Perspect.* 113(7): 823-839, (2005).
- Park, E.J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., Park, K. "Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation." *Toxicology* 260: 37-46, (2009).
- Pelaez, M., Nolan, N.T., Pillai, S.C., Seery, M.K., Falaras, P., Kontos, A.G., Dunlop, P.S.M., Hamilton, J.W.J., Byrne, J.A., O'Shea, K., Entezari, M., Dionysiou, D.D. "A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications" 125: 331-349, (2012).
- Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt (çeviri editörleri Dr. M. Nevzat İlman, Dr. Mehmet Yıldız) ROITT'S Temel İmmünoloji 11. baskı Atlas Kitapçılık, 2008, 155-156-157
- Phillips, L.G., and Barbano, D.M. "The Influence of Fat Substitutes Based on Protein and Titanium Dioxide on the Sensory Properties of Lowfat Milk." *Journal of Dairy Science* 80 (11): 2726, (1997).
- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D. "Dietary exposure to titaniumdioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain." *Ecotoxicology* 18(7):939-951, (2009).
- Razzaboni, L.B., Bolsaitis, P., 1990. "Evidence of an oxidative mechanism for the hemolytic activity of silica particles." *Environ. Health Perspect.* 87, 337-341.
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N. "Hydroxyl radicals(*OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells." *Mutat. Res.* 640: 113-122, (2008).
- Roitt I, Brostoff J, Male D. "Immunology", 3. ed. Mosby, London, 1.1-25.16, (1993).

- Sabban, Sari "Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high- affinity FcεRI receptor." (PhD thesis), The University of Sheffield (2011).
- Sager, T.M., Kommineni, C., Castranova, V. "Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area" Part Fibre Toxicol. 5: 17,(2008).
- Sang, X., Zheng, L., Sun, Q., Li, N., Cui, Y., Hu, R., Gao, G., Cheng, Z., Cheng, J., Gui, S. "The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. " J. Biomed. Mater. Res. 100: 894-902, (2012).
- Schins, R.P., Knaapen, A.M." Genotoxicity of poorly soluble particles." Inhal Toxicol., 19: 189-198, (2007).
- Shannahan, J.H., Kodavanti, U.P. and Brown, J.M. "Manufactured and airborne nanoparticle cardiopulmonary interactions: a review of mechanisms and the possible contribution of mast cells." Inhal Toxicol 24: 320-339, (2012).
- Siegel, P.D., Saxena, R.K., Saxena, Q.B., Ma, J.K., Ma, J.Y., Yin, X.J., Castranova, V., Al-Humadi, N., Lewis, D.M. "Effect of diesel exhaust particulate on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components." J. Toxicol. Environ. Res. 98. 341-348, (2004).
- Stryker, L. B.Sc., B.H.Ec., B.Ed. "Titanium Dioxide: Toxic or Safe" (April 30, 2013). <http://www.organicmakeup.ca/ca/titaniumdioxide.asp>
- Sul, Y.T., Johansson, C.B., Petronis,S.,Krozer,A., Jeong,Y.,Wenneberg, A., Albrektsson, T. "Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition." Biomaterials 23: 491-501, (2002).
- Taneli,F. "Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı" Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa. Türk Klinik Biyokimya Dergisi; 5(2): 75-82, (2007).
- Tsuji, J.S., Maynard, A.D., Howard, P.C., James, J.T., Lam, C., Warheit, D.B., Santamaria, A.B. "Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part IV: Risk Assessment of Nanoparticles." Toxicological sciences 89(1): 42-50 (2006).
- Turkez, H., "Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity" J. Appl. Toxicol. 28: 658–664, (2008).

- Türkan, İ., Demirsoy, A., (Çeviri Editörleri) "Genel Biyoloji 1", 1. baskı Palme Yayıncılık, Ankara, 381s, (1999). [Keton, W., Gould, J.L. with Gould, C.G. "Biological Science", 5th ed. WW. Norton&Company, Newyork, (1993).]
- Türkez, H., Geyikoğlu, F. "An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes." *Toxicol Ind Health*, 23: 19-23, (2007).
- Uto, T., Akagib, T., Hamasakia, T., Akashib, M., Baba, M. "Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles" 2009 Elsevier B.V. doi:10.1016/j.imlet.2009.05.008
- van Ravenzwaay B., Landsiedel R., Fabian E., Burkhardt S., Strauss V., Ma-Hock L. "Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: Nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz." *Toxicol. Lett.* 186:152–159, (2009). doi:10.1016/j.toxlet.2008.11.020.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Yongmei Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li B., Suna, J., Li Y., Jiao F., Zhao, Y., Chai, Z. "Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration", *Toxicology Letters*. 168: 176–185, (2007).
- Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., Wang, H. "Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells." *Mutat Res*. 628: 99-106, (2007).
- Wang, X., Katwa, P., Podila, R., Chen, P., Ke, P.C., Rao, A.M., Walters, D.M., Wingard, C.J. and Brown, J.M. "Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice." *Part Fibre Toxicol* 8: 24, (2011).
- Wang, Y., Chen, Z., Ba, T., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Qian, Q., Xu, Y., Xiang, K., Wang, H. And Jia, G. "Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles" *Small* 9: 1742-1752, (2013).
- Weaver, J., Umbreit, T.H., Miller, T.J., Zhang, J., Stratmeyer, M.E., Tomazic-Jezic, F.J. "Toxicology of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: Immunological effects in subcutaneously and intravenously injected mice" *Meetings & Symposia*, (2007).
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N. "Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products" *Environ. Sci. Technol.*, 46 (4), 2242–2250, (2012).
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F.D. "Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine

skin after subchronic dermal exposure." *Toxicology Letters* 191(1) 2009, 1–8 (2009).

Xu, J., Futakuchi, M., Ligo, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Shimizu, H., Sakai, Y., Tamano, S., Furukawa, F., Uchino, T., Tokunaga, H., Nishimura, T., Hirose, A., Kann, J. and Tsuda, H. "Involvement of macrophage inflammatory protein 1 α (MIP1 α) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying." *Oxford Journals*, 31(5): 927-935, (2010).

Yabuki, K., Inoko H., Ohno, S. "HLA testing in patients with uveitis." *Int Ophtalmol Clin Spring*; 40(2): 19-35, (2000).

Yamamoto, A., Honma, R., Sumita, M., Hanawa, T. " Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes." *J. Biomed. Mater. Res.* 68A, 244-256, (2004).

Yin, Z.F., Wu, L., Yang, H.G., Su, Y.H. "Recent progress in biomedical application of titanium dioxide" *Phys. Chem. Chem. Phys.*15: 4844-4858, (2013).

Ze, Y., Hu., R., Wang, X., Sang, X., Ze, X., Li, B., Su, J., Wang, Y., Guan, N., Zhao, X. "Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles." *J. Biomed. Mater. Res.* 102: 470-478, (2014).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Senem Sunar

Doğum Tarihi: 01/01/1981

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise		Niğde Süper Lisesi	1994-1998
Lisans	Biyoloji	Ege Üniversitesi	1999-2004
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2009-2014

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Biyolog	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı	2007-Devam ediyor.