

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN RAT KALP DOKUSUNDAKİ SIRT3
PROTEİN EXPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nursu DENİZ ÇEVİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN**

HAZİRAN -2019

KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI



**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN RAT KALP DOKUSUNDAKİ SIRT3
PROTEİN EXPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nursu DENİZ ÇEVİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN**

**HAZİRAN -2019
KARS**



T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nursu DENİZ'in Doç.Dr. Özkan ÖZDEN danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Çinko Oksit Nanopartiküllerinin Rat Kalp Dokusundaki Sirt3 Protein Expresyonuna Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliğiyle kabul edilmiştir.

25 / 06 / 2019

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Canan GÜLMEZ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20. gün ve
.. / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Nursu DENİZ ÇEVİK

Tarih

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN RAT KALP DOKUSUNDAKİ SIRT3 PROTEİN EXPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nursu DENİZ ÇEVİK

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Yapılan bu araştırmada çinko oksit nanopartikülleri (ZnO-Np) verilmiş olan albino ırkı ratlarda SIRT3 ve piruvat dehidrogenaz (PDH) enzimlerinin düzeyleri immünohistokimyasal olarak araştırılması hedeflendi. Çalışmada, *Wistar albino* ırkında erkek ratlar kullanıldı. Her grupta sekiz rat bulunacak şekilde dört grup oluşturuldu ve 14 gün boyunca ratlara ZnO-Np verildi. Bunlar; öncelikle ilk grup kontrol grubu olarak seçildi ve doz uygulaması yapılmadı, II. gruptaki ratlara 100 mg/kg ZnO-Np oral gavaj ile uygulandı, III. gruptaki ratlara 300 mg/kg ZnO-Np oral gavaj ile uygulandı, IV. gruptaki ratlara ise 600 mg/kg ZnO-Np uygulandı. Yapılan bu doz uygulaması ardından hayvanlardan kalp dokuları alındı ve SIRT3 ve PDH enziminin hücre içi yerleşimleri immünoboyama tekniğiyle belirlendi.

Yapılan çalışmada ZnO-Np'in konsantrasyon miktarının değiştirilmesiyle SIRT3 ve PDH enzimi miktarlarında artış veya azalmalar olduğu, buna ilaveten 600 mg/kg verilen ratlardaki SIRT3 proteinlerinin çekirdekte sitoplazmaya doğru hareket ettiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler; Çinko oksit, Sirtuin, SIRT3, Pirüvat dehidrojenaz enzimi, Kardiyovasküler sistem.

2019, 74 Sayfa

ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

THE EFFECT OF ZINC OXIDE NANOPARTICULES (ZnO-Np) ON THE PROTEIN EXPRESSION OF SIRT3 IN THE RAT HEART TISSUE

Nursu DENİZ ÇEVİK

Kafkas University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Bioengineering

Supervisor: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

In this study, it was aimed to investigate the levels of SIRT3 and pyruvate dehydrogenase (PDH) enzymes in albino rats with zinc oxide nanoparticles (ZnO-Np) by the immunohistochemistry method. Male *Wistar albino* rats were used in the study. Four groups were formed with eight rats in each group and ZnO-Np was given to the rats for 14 days. These; first group was selected as the control group and no dose was applied, rats in group II were administered with 100 mg/kg ZnO-Np oral gavage, rats in group III were administered with 300 mg/kg ZnO-Np via oral gavage, and in rats in group IV, 600 mg/kg ZnO-Np was applied. Following this dose application, heart tissues were taken from the animals and intracellular localizations of SIRT3 and PDH enzymes were determined by the immunostaining technique.

In this study, it was found that by changing the concentration of ZnO-Np, SIRT3 proteins in the rats given 600 mg/kg moved from the nucleus to the cytoplasm, and in addition, there is an increase or decrease in the levels of SIRT3 and PDH enzymes.

Keywords; Zinc oxide, Sirtuin, SIRT3, Pyruvate dehydrogenase enzyme, Cardiovascular System.

2019, 74 pages

ÖNSÖZ

Yapılan bu çalışma Doç. Dr. Özkan ÖZDEN danışmanlığında, Kafkas Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışması sırasında her türlü bilgi, teşvik ve deneyimleri ile yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Özkan ÖZDEN'e çalışmalarımda yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ'a ve Yüksek Lisan Öğrencisi Aycan CANLI'ya, doktora öğrencisi Ayşe AYDOĞAN'a teşekkür eder saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü maddi ve manevi destekleri ile göstermiş oldukları sabırdan dolayı aileme teşekkür ederim.

İmza

Nursu DENİZ ÇEVİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	II
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1.GENEL BİLGİLER	1
1.1.Giriş.....	1
1.2. ZnO ve Özellikleri.....	2
1.2.1. ZnO'in Oluşum ve Üretimi	4
1.2.2. Piezoelektrik Özellikler	8
1.2.3. ZnO'un Optik Özellikleri	9
1.3. ZnO'nun Sağlık Üzerindeki Etkileri	10
1.3.1. ZnO'in Antibakteriyel Etkisi.....	10
1.3.2. ZnO Partikül Özelliklerinin Antibakteriyel Aktiviteye Etkisi	12
1.3.3. Antibakteriyel Uygulamalar	12
1.4. ZnO'nun Kardiyovasküler Sisteme Etkileri	15
1.5. SIRT Proteinleri	15
1.5.1. Memeli Sirtuinleri ve İşlevleri	18
1.6. Kalp ve SIRT Proteinlerinin İlişkisi	22
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1. Materyal.....	27
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	27
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ile Sarf Malzemeler	27
2.2. Metot	28
2.2.1. Deney Hayvanları.....	28
2.2.2. Deneysel Dizayn.....	28
2.2.3. İmmünohistokimya Metodu	31
2.2.3. İmmünolojik Teknikler.....	33

2.2.4. ABC Yöntemi ile İmmüno-boyama	34
2.2.5. Mikroskop ile Görüntü Alınması.....	38
3. BULGULAR.....	39
3.1. SIRT3 Proteininin Kontrol Grubu Kalp Dokusundaki Ekspresyonu	39
3.2. SIRT3 Proteininin 100 mg/kg ZnO-Np Uygulanan Ratlarda Hücre İçi Yerleşimi.....	40
3.4. SIRT3 Proteininin 300 mg/kg ZnO Uygulanan Ratlarda Hücre İçi Yerleşimi	40
3.4. SIRT3 Proteininin 600 mg/kg ZnO Uygulanan Ratların Kalp Dokularında Hücre İçi Yerleşimi	42
3.5 ZnO-Np Pirüvat Dehidrojenaz Enzimi (PDH) Üzerine Etkisi	43
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: ZnO ve hegzagonal würtzit yapı	3
Şekil 1.2: ZnO kristal yapıların gösterimi	5
Şekil 1.3: Hücrede sirtuinlerin lokasyonları	17
Şekil 1.4: EMT'in sirtuinler tarafından pozitif düzenlenmesi	22
Şekil 1.5: EMT'in sirtuinler tarafından negatif düzenlenmesi	22
Şekil 1.6: Kalbin genel yapısı	23
Şekil 2.1: Deney hayvanlarına oral gavınaj uygulanması	29
Şekil 2.2: Mikrotom cihazı	30
Şekil 2.3: Antijen antikor eşleşmesi	33
Şekil 2.4: Ratlara (intradermal veya subkutan) saf antijen verilmesi antikor üretilmesi	33
Şekil 2.5: Primer antikor damlatılmış doku örnekleri	35
Şekil 2.6: Ticari vectastain ABC kiti	35
Şekil 2.7: Enzim kompleks antikoru damlatıldıktan sonra kahverengi lekelerin oluşumu	36
Şekil 2.8: DAB ve H ₂ O ₂ reaksiyonu	47
Şekil 2.9: Hemotoksilen çözeltisi damlatıldıktan sonra dokular	38
Şekil 2.10: Kameralı best scope mikroskobu	38
Şekil 3.1: Kontrol grubu rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi	39
Şekil 3.2: 100 mg/kg ZnO verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi ..	40
Şekil 3.3: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi	41
Şekil 3.4: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında negatif kontrol.	42
Şekil 3.5: 600 mg/kg ZnO verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi	42
Şekil 3.6: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında negatif kontrol	44
Şekil 3.7: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında hücre içi PDH yerleşimi	44

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1: ZnO'in temel fiziksel özellikleri.....	6
--	---



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- °C : Sıcaklık birimi Celcius
- ADP : Adenozin difosfat
- BCL11A : B-cell lymphoma/leukemia 11A protein
- CS : Kitosan
- DAC : Bağımlı deasetilaz (DAC)
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş
- HepG₂ : Karaciğer kanseri
- HIC1 : Kansergen 1
- HTS : Yüksek verimli tarama cihazı
- MCF-7: Göğüs kanseri
- mL : Mililitre
- mm : Milimetre
- NAD⁺ : Nikotinamid adenin dinükleotit
- nm : Nanometre
- NP : Nanopartikül
- PDH : Piruvat dehidrogenaz
- PVP : Poly-N-vinyl-2-pyrrolidone
- RNA : Ribo nüleik asit
- ROS : Reaktif oksijen türleri
- SIRT : Sirtuin proteini
- TATA : Kutu bağlayıcı protein
- TEM : Trasmisyon elektron mikroskobu
- TNF- α : Tümör nekroz faktörü
- XRD : X ışını kırınım cihazı
- μ g : Mikrogram

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Günümüz dünyasında tıp ve kimya alanlarında çeşitli çalışmalar kanser, kalp-damar hastalıkları, diyabet gibi tedavisi zor ve uzun süreçler gerektiren hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Hastalıkların tedavisinde son yıllarda biyoteknolojik yollarla üretilen modifiye edilmiş enzim ve proteinler ciddi rol oynamaktadır [1].

Metabolizma üzerinde etkinliği tartışılmaz olan hücre içi organellerden olan mitokondri, hücrelerin yaşamsal fonksiyonları etkilemesinde belirleyici bir role sahiptir. Metabolizma ve enerji üretiminde rol oynayan mitokondrilerde bulunan sirtüin (SIRT) proteinlerinin bu organelde bulunan diğer birçok enzimin fonksiyonların düzenlenmesinde önemli işlevleri olduğu rapor edilmiştir. SIRT protein ailesinin bir üyesi olan SIRT3, piruvat dehidrogenazın (PDH) bilinen bir aktivatörüdür ve piruvatın TCA döngüsüne katılmasını sağlar. SIRT3'ün tümör oluşumunu engelleyici bir fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir ve piruvat dehidrogenaz aktivitesini artırarak Warburg etkisini azalttığı ve hücre bölünmesini yavaşlattığı gösterilmiştir [2]. SIRT3, ağırlıklı olarak mitokondride lokalizedir, ancak aynı zamanda, etoposide ve UV kaynaklı DNA hasarına bağlı olarak nükleer bir NAD⁺ bağımlı histon diasetilaz olduğu da bildirilmiştir [3]. SIRT3 ayrıca, mtDNA onarımını kolaylaştırır [4]. Mitokondriyal zar bütünlüğünü korur [5,6,10] ve çevresel strese karşı hücre direncinin arttırılmasını sağlar [7-10].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, çeşitli nanopartiküllerin mitokondri de bulunan enzimleri aktive/inaktive etme potansiyeli olabileceğini ve hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir [11]. Yapılan bu çalışmada, ZnO-Np'in SIRT3 ve PDH enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırılmış, çalışma yöntemi olarak immünohistokimya kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre, ZnO-Np'lerin uygun dozlarda kullanılmasıyla, SIRT3 ve PDH enzim miktarlarının değişmesinin yanısıra, hücre içi yerleşimlerinde de değişimlere sebep olduğu belirlenmiştir.

1.2. ZnO ve Özellikleri

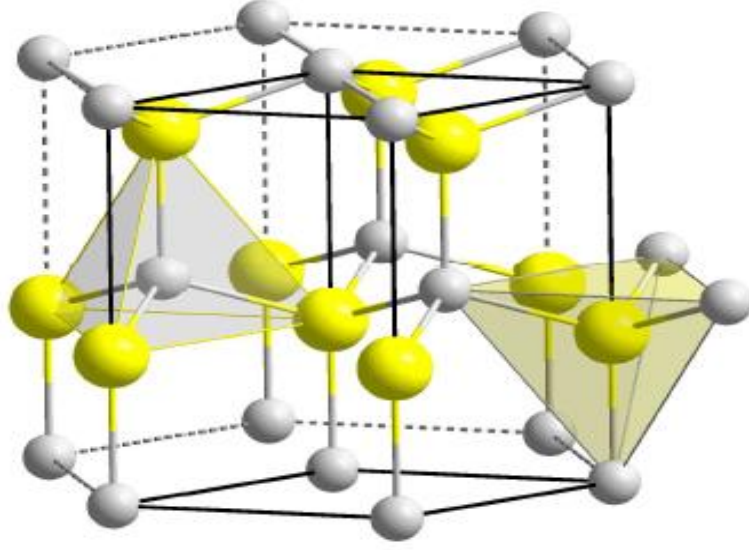
ZnO doğada iki farklı halde bulunan çinko (Zn) ve oksijenin (O) bir araya gelmesi ile oluşan yarı iletken malzemedir. Wurtize veya kaya tuzu kristali şeklinde iki farklı yapıda bulunabilen ZnO, doğada genellikle altıgen wurtize özelliği taşıyan hali ile elde edilmektedir. Nano özellik taşıyan ZnO, fotonik, elektronik, spintronik ve optik alanlarında yüksek verimlilik sağlaması yönü dolayısıyla belirginleşmektedir. Manyetik özellik taşıyan geçiş metal (TM) iyonlarının az miktarda ZnO'ya katıldığı hallerde ise elde edilen yapının seyreltik özellikteki manyetik yarı iletken (DMS) türe doğru revize olduğu anlaşılmıştır. ZnO kimyasal cetvelde bulunan birçok grup ile çalışabilme özelliği taşımaktadır [11].

Geride bırakılan gelişme dönemi içinde kullanım sıklığı yükselen ZnO'nun farklı metotlarla elde edilmesi mümkündür. Bu metotların başlıcaları şunlardır;

- Hidrotermal,
- Kimyasal çöktürme,
- Termal ayrışma
- Kimyasal buhar biriktirme
- Elektrokimyasal çöktürme,
- Pechini,
- Sol-jel şeklinde sıralanabilir [12,].

Geçiş metalleri arasında yer alan ve 2B grubu olarak bilinen D bloğundaki Zn ile ametaller grubundaki (6A grubu) O'nun birleşimi olarak ortaya çıkan ZnO taşıdığı birçok farklı özellik ile tanınmaktadır. ZnO nanoparçacık arayüzlerinin bileşimindeki ve yapısındaki değişiklikler, malzemelerin optoelektronik özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. [12,1]

ZnO, tipik sp^3 hibritleşmesi oluşturan kovalent tetrahedral bağlar sayesinde polar-simetrik bir yapı özelliği gösterir. Bunun yanı sıra IVA grubu elementlerinin birbirine benzeyen bir bağlantı şekliyle tümüyle kovalent bağlanma özelliği taşımalarına rağmen bileşik halindeki bağ yapılarında tamamen kovalent bağ durumu göstermezler. Yarı iletkenler grubunda yer alan ZnO, yapısında iyonik bağ bulundurmaz [13].



Şekil 1.1: ZnO ve hegzagonal würtzit yapı [13,12].

ZnO, şekil 1.1’de görüleceği üzere hegzagonal würtzit yapıda taşımaktadır ve kübik kaya tuzu ile çinko blend biçimi kristalizasyona uğramaktadır. Bir başka deyişle 2B ve 6A grubu bileşikler genel anlamda üç farklı yapıda ortaya çıkar. Bu yapılardan ilki Zn blend, diğeri kübik ve sonuncusu da hegzagonal würtzit yapı şeklinde bilinmektedir. Şekil 1.1’de resmedilmiş ve ZnO bileşiğinin gösterildiği hegzagonal würtzit yapı için durum analizi yapılırsa; toplamda 6 farklı bölümde yerleşmiş siyah küreler, O ve dört farklı bölümde yerleşen gri renkli küreler Zn’ye ait atomların temsilidir. Yüksek kararlılıkta olan ve doğada hegzagonal birim hücresi özelliği taşıyan bu yapıya ek olarak a ve c şeklinde iki örgü parametresi de bulunmaktadır [13].

Yarı iletken olarak tanınan ZnO, ancak bileşiğin ortaya çıkışı sırasında herhangi bir hata olmadan oluşturulma ihtimali gerçekleşirse (dislokasyon, tane sınırları, vb.) yalıtkan özellik taşıyabilecektir. Mevcut oluşumunda n-tipi yarı iletken olarak özellik göstermektedir. Bunun sebebi ise yapısında taşıdığı stokiyometrik bozukluk olarak özetlenebilir. Kusursuz üretimin hayata geçirilmesine gösterge olarak her bir metreküpte dört elektron taşınması gösterilebilir ki bu durumda ZnO yalıtkan özellik taşıyacaktır. Buna karşın birleşim sırasında, ZnO’nun yapısındaki O boşlukları veya ara yer konumundaki Zn iyonları ZnO yapısında bozulmaya neden olup (stokiyometri) mevcut haline erişmesine yardımcı olmaktadır [14].

ZnO işleminden geçirildiği esnada, renksiz altıgen kristal yapıda veya beyaz renkte bir toz oluşturmaktadır. Isıtıldığı sırada ve ardından soğuduktan sonra tekrar tekrar beyaza dönüşerek son olarak limon sarısı rengi alır. ZnO, 5,61 g/cm³ yoğunluktadır. 1300 °C'de ve üzerinde buharlaşır ve 1800 °C'lik bir sıcaklığa ulaştığı durumda yüceltilir. Bu nedenle de hiçbir sıvı eriyik bulundurmaz ancak katıdan gaz haline doğrudan geçiş durumu oluşabilmektedir [14,1].

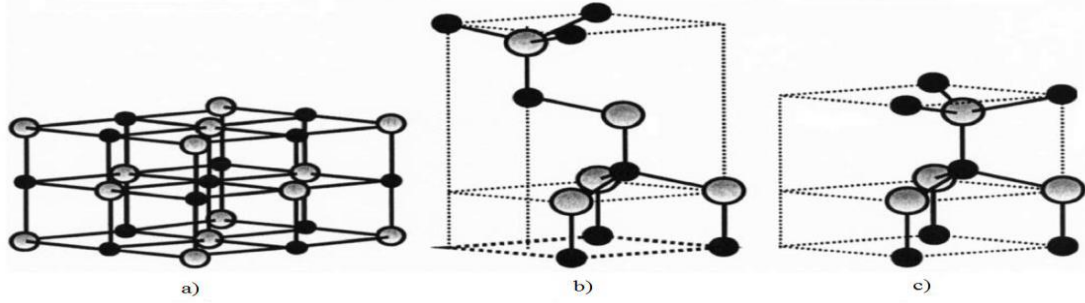
ZnO maddesi, imalatında alternatifsiz bir yer tuttuğu piezo-elektrik dönüştürücü, şeffaf iletken oksitler, sensörler, ışık diyotları ve optoelektronik veya spintronik bileşenler gibi birçok farklı ürün günümüz yaşantısında yer alan ürünlerin ana bileşenini oluşturmaktadır. Ayrıca ZnO bazlı yarı iletkenler, mavi ışık yayan diyotların, sıvı kristal ekranların, varistörlerin ve ince film güneş pillerinin içinde bulunan şeffaf iletken tabakaların imalatında da yer alırlar. Nanopartiküler ZnO, ışık spektrumunun görünür aralığında saydamdır ve güneşin UV-B ve özellikle UV-A ışınlarına karşı fiziksel bir filtre görevi görür. Ultraviyole ışınlarının absorbe edildiği ve küçük aynalar gibi yansıtıldığı gerçeği, güneş kremlerinde fiziksel bir UV filtresi olarak çinko oksidin kullanılmasını ilginç hale getirmektedir. Fiziksel UV filtreleri, güneş koruyucularda ağırlıklı olarak güneş koruma faktörleri ile 25'in üzerinde kullanılabilir. Alerjiyi tetikleyen kimyasal UV filtrelerin aksine, fiziksel filtreler çocukların ve alerjiklerin hassas ciltlerine uygulama için uygundur. Kimyasal UV filtreleri, UV radyasyonu emer ve ısıya dönüştürmektedir [15].

Nanometre boyutundaki tozlar şeklinde iken kendiliğinden tutuşmayacakları bilinen ZnO'lerin bir ateş ya da tahrik kaynağının da etkimesi ile ZnO ve hava (toz) karışımı yanıcı bir noktaya gelmeyecektir, dolayısıyla toz patlaması olasılığı bulunmamaktadır [15].

1.2.1. ZnO'in Oluşum ve Üretimi

ZnO doğada iri taneli mineraller şeklinde bulunmaktadır. Teknik anlamda, Zn veya Zn buharının atmosferik oksijenle (çinko beyazı) oksidasyonu sonrasında veya çinko

hidroksit, çinko karbonat veya çinko nitrat gibi farklı bileşenler ile kalsinasyonu sonucunda elde edilebilmektedir. Teknik ZnO'ler genellikle kurşun içermektedirler [16].



Şekil 1.2: ZnO kristal yapıların gösterimi: a) Kübik kayatuzu, b) Kübik çinko sülfid, c) Hegzagonal würtzit (Gri küreler Zn, siyah küreler ise O atomlarını ifade etmektedir) [17].

ZnO, 2A grubu metalik Zn'in bir oksidi olarak tanımlanır. Piezoelektrik olma, yarı iletkenlik ve optik olma özelliklerini (morötesi absorplama, düşük kırınım indisi gibi) bir arada gösterebilmesi ile bilinen nadir malzemeler arasındadır. Tablo 1.2'de ZnO'in temel fiziksel özellikleri gösterilmiştir [17]. II ve VI grubu ikili bileşik yarı iletkenlerin, würtzit yapıda kristalize olduğu bilinmektedir. Bu yapı kovalent bağlı sp^3 'tür ancak bu malzemeler diğer yandan güçlü iyonik karakter göstermektedirler. ZnO'nun iyonikliği, aralarında kimyasal bağlar bulunan yarıiletkenler içinde II-VI grubu bileşiği yarı iletkenidir. ZnO'nun kristal yapısı Şekil 1.2'de gösterildiği gibi würtzit (a), çinkosülfid (zincblende) (b) ve kayatuzu (c)'dur. ZnO çevre şartlarında termodinamik olarak kararlı hali olan würtzit fazındadır. ZnO'in 300 Kelvin de latis parametreleri aşağıdaki şekilde belirtildiği gibi $a = 0.32495$ nanometre ve $c = 0.52069$ nanometredir. Bu yapı incelendiğinde ZnO'in 1.602 oranla ideal sıkı paket hegzagonal yapısındadır [16,17].

Tablo 1.2: ZnO'in temel fiziksel özellikleri [17,18].

FİZİKSEL ÖZELLİKLER	
Latis sabitleri (T=300 K)	
a_0	0,32469 nm
c_0	0,52069 nm
Yoğunluk	5,606 g/cm ³
Ergime noktası	2248 K
Dielektrik sabiti	8,66
Enerji boşluğu	3,37 eV
Taşıyıcı konsantrasyonu	<10 ⁶ cm ⁻³
Uyarım(aktivasyon) enerjisi	60 meV
Etkin elektron kütlesi	0,24
Elektron hareketliliği (T=300 K)	200 cm ² /V. s
Boşluk hareketliliği (T=300 K)	5-50 cm ² /V. s

ZnO eldesi sırasında kullanılan yöntemlerden birinde fırınlarda çinko buharının oksidize edilmesi öne çıkmaktadır. Çinko buharının konsantrasyonu ve havanın akış hızı fırınlarda üretilen ZnO'in partikül boyutunlarında ve şeklinde belirleyici rol alır. Bu haliyle genel olarak iki farklı metot kullanılmaktadır:

- 1) Amerikan Prosesi
- 2) Fransız Prosesi

Fransız Prosesi'ne bakıldığında, çinko metali geniş konteynerlerde ısıtılarak buharlaştırılmakta ve buhar özel yanma odalarına yönlendirilmekte olduğu, odalarda yakılarak ZnO üretildiği görülmektedir. Amerikan Prosesi incelendiğinde ise, oksidize edilmiş sülfür cevherinin antrasit kömürü aracılığıyla karıştırılarak Wetherill tipi büyük

ocaklarda yakıldığı görülmektedir. Partikül boyutu reaksiyon koşullarına, örneğin sıcaklığa bağlıdır. Bunun yanında havanın ve çinko buharının akış hızı, tozun parçacık boyutu dağılımını etkiler. Kömür ve kısmi yanma ürünleri, özellikle karbon monoksit, metalik çinkoyu indirgeyerek, buharlaşmayı sağlamaktadır. Buhar ve kömürden çıkan gazlar kontrollü şartlar altında yakılmakta ve ZnO oluşturulmaktadır. Bu proseslere ek olarak kullanımı az olmakla birlikte ıslak kimyasal proses ve hurda metallere ZnO üretimi bulunmaktadır [19].

Amerikan Prosesi ile üretilmiş ZnO'ler sülfürlü bileşikler içerebilir ve bunların giderilmesi süreci oldukça zor süreçlerdir. Çinko cevherinin direkt olarak oksitlendirilmesi yöntemi ile ZnO üretiminin sağlandığı Amerikan Prosesi, 1851 yılında geliştirilmiştir. Amerikan Prosesi ile üretilen ZnO, direkt proses olarak da bilinmektedir. Çinko cevherinden, kömürün ve kısmi yanma ürünlerinin varlığında indirgenmesi sonucunda elde edilen çinko buharının oksitlendirilmesiyle sonuca ulaşılır. Amerikan Prosesi ile ZnO üretiminin yapıldığı ilk yıllarda oksitlenmiş çinko cevherleri (kalamın) veya kavrulmuş sülfür konsantreleri kullanılmaktaydı. Gelişen teknikler ve teknoloji ile birlikte rafine edilmiş oksitlerden, çinko karbonat ve diğer çinko hammaddelerinden, yakılmış lastik kalıntılarından ZnO üretilmektedir. Amerikan Prosesi üretim aşamasında ZnO hammaddeleri kömürle karıştırılmakta ve döner fırında, ısıtılmış gaz içerisinde eritilip oksitlendirilmektedir. Oluşan ZnO tozları ve katı atıkları barındıran bir toz tutucuya gönderilmektedir ve temizlenmiş halde depolanmaktadır [19,13].

ZnO'in üretim sahasında laboratuvar ölçekli çalışmaların yoğunluğu oldukça yüksektir. Farklı boyut ve morfoloji de elde edilebilen ZnO'in çok fazla uygulama alanı bulunmaktadır. Bu sebeple de birçok üretim metodu geliştirilmiştir. Sol-jel yöntemi, çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, solokimyasal, sonokimyasal ve mekanokimyasal yöntem ZnO üretim yöntemlerinin başta gelenleri olarak bilinmektedir [19,18].

1.2.2. Piezoelektrik Özellikler

ZnO yapısında bulunan en önemli özelliklerin başında piezoelektrik etki sayılmaktadır ki bunun basınç hissetme, akustik dalga, bazı modülatörlerin oluşumu gibi değişkenlik gösteren çalışma segmentlerinde geniş bir şekilde incelenme altındadır ve hala bu alanda uygulama örnekleri görülebilmektedir [19].

ZnO'in yapısında yer alan piezoelektrik davranış incelendiğinde, davranışın çinko ve oksijen atomları arasında tetrahedral yapıda bağlanma oluştuğu ve bu durumun ortaya koyduğu kristal yapının belirtilen etkiyi yarattığı anlaşılmaktadır. Bu ve buna benzer merkezi simetri özelliği göstermeyen kristal yapılarda (+) ve (-) yük merkezleri, dışında basınç kaynaklı latis deformasyonları sonucunda değiştirilebilmektedir. Burada oluşan hasar kutupların farklı bölgelerde yoğunlaşması sonucunu verirken, makroskopik dipol momentler oluşur. Farklı ZnO yapılarının piezoelektrik yapılarının incelenmesi gelecekte geliştirilmesi potansiyel nano-elektromekanik sistemlerin oluşumu bakımından önem arz eder [20].

Yapılan bir çalışmada ZnO nano-kemerin üzerinde piezoelektrik davranışı AFM ile incelenmiş, sonuçları incelendiğinde ZnO nano-kemer yapısının etkin piezoelektrik sabitinin hacimsel (bulk) ZnO'dan çok daha fazla olması sonucuna ulaşılmıştır. Hacimsel ZnO'in piezoelektrik sabiti 9.93 pm/V olarak ölçülmekteyken, benzer frekans değerlerinde yer alan ZnO nano-kemerin piezoelektrik sabiti 14.3-26.7 pm/V olarak farklılık göstermektedir [20].

ZnO yapılarında görülen elektriksel özellikler, gelecek dönemde nanoelektronik alanında yaşanacak uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Elektriksel geçirgenlik ZnO'in fiziksel yapısına bağlı olarak, örneğin nanotel, nano çubuk olması durumuna bağlı halde değişkenlikler gösterebilir. Yani ZnO elektriksel anlamda yalıtkanlıktan iletkenliğe kadar çok farklı özellikler ortaya koyabilecek nitelikte bir malzemedir [21].

ZnO'nun doğrusal olmayan akım-voltaj (I-V) özelliğinin keşfi ilk defa Matsuoka tarafından 1968 yılında yapılmıştır. Bu durum farklılık gösteren voltaj değerlerine

rağmen oluşan akım değerindeki malzemenin direncindeki değişimle ilgilidir. Varistör etkisi olarak isimlendirilen bu özellik bulunduğu beri yaygın olarak kullanılan elektronik devreler, voltaj değişimleri durumuna karşı ZnO varistörlerin etkisiyle korumaya alınabilmektedir. Kristalin elektriksel direnci iyonik bağlı a-yönünde 3 cm olarak bulunurken, kovalent bağlı c-yönünde 8.1 cm olarak ölçülmüştür [20,21].

1.2.3. ZnO'un Optik Özellikleri

ZnO, 3.37 eV' luk bir bant aralığına ve 60 meV gibi GaN (25 meV) ile karşı karşıya getirildiğinde çok daha fazla bir aktivasyon enerjisi taşımaktadırlar. Bu sebeple ZnO, küçük miktarda enerji harcaması sonrası güçlü bir emisyon değeri oluşturması nedeniyle mavi-morötesi ışık düzeyinde kullanılan fotonik malzemeler içerisinde önemli bir yeri vardır. Ayrıca geniş band aralığı özelliği nedeniyle güneşten gelen morötesi ışınlarını absorbe etmek için de çok uygun bir malzemedir. ZnO yüksek kırınım indisine sahiptir. Elmas malzemesinden sonra gelen bu kırınım indisi değeri sebebiyle beyazlaştıran pigmentler ve kozmetik uygulamalarda morötesi koruyucular içerisinde önemli bir kullanım alanına sahiptir [22].

1.2.4. ZnO'in Endüstriyel Uygulamaları

ZnO, teknik ürünler, kozmetik ürünler ve farmasötik kullanımlar gibi birçok alanda oldukça geniş ve çok yönlü kullanım alanına sahiptir. Günümüzde ZnO'in en yoğun kullanıldığı alanların başında kauçuk endüstrisi gelmektedir. Katkı maddesi olarak kullanıldığı durumda, lastik üretiminde kullanılan kauçukta vulkanizasyon sürecini teşvik etmektedir. Bunun yanı sıra yüksek iletkenlik özelliği, lastikler çalkalandığı esnada oluşan ısının giderilmesinde rol alır. Çimento malzemesine eklendiği hallerde ise, ZnO su direncinin artırılmasında görev alır ve işlem süresinin uzamasına neden olur. Çinko tozu ve "çinko beyazı" da yüzey aktif maddeler ve düzgünleşen çimentolar gibi ürünlerde gözenek dolgu maddesi olarak ve gri, beyaz duvarlarda veya sanatçı boya olarak kullanılmakta ve kullanım alanını her geçen gün genişletmektedir [23].

ZnO nano tanecikleri, UV-A ve UV-B koruma özellikleri ile daha önce açıklanan şeffaflık, antibakteriyel ve fungistatik etkileriyle karakterize edildiklerinden, aynı

zamanda tekstil ürünlerinde, ahşap ürünlerde, mobilyalar sektörü için şeffaf verniklerin eldesinde ve şeffaf plastiklerin imalatında da kullanılırlar. Ayrıca görünür spektral aralığında yüksek bir şeffaflık (>%90 iletim) ve 360 nm'nin altındaki dalga boyları için UV geçirgenliği (<%10 transmisyon) ile karakterize edilir [24].

Tüm bu özelliklerinin yanında kimya endüstrisinde katalizör görevinde kullanılabilen ZnO, kozmetik ürünlerin imalatında kilit unsur olarak görev almaktadır. ZnO, demir bazlı malzemeler ile birlikte antiseptik ve büzücü çinko tuzlarına dönüşmektedirler. Bu özelliği nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından çinko merhemleri, çinko macunları, yapışkan bantlar ile cilt ve yara tedavisi için üretilen bandajların imalatı için yoğun bir kullanım sahasına sahiptir [25,23].

Güneş kremlerinin imalatında kullanılmakta olan ZnO partikülleri boyut olarak 20 ila 60 nm arasındadır. Eklenmeden önce, silisyum ya da alüminyum oksit ile bu küçük ZnO-Np kaplanır. Daha sonra 200-500 nm büyüklüğündeki agregalar halinde birleşirler. Endüstride yürütülen çalışmaların ve AB Nano Derm projesinin kapsamı dahilinde yürütülmüş olan bağımsız çalışmalarda, güneş koruyucu ürünler içinde bulunan bu tür partiküllerin cilt sağlığına yönelik olumsuz bir etki göstermediğini, dolayısıyla tüketicilerin sağlığına zararı olmadığı belirlenmiştir [25].

1.3. ZnO'nun Sağlık Üzerindeki Etkileri

1.3.1. ZnO'in Antibakteriyel Etkisi

ZnO ile ilgili yapılan ilk bilimsel çalışmalar antibakteriyel etkiler üzerine gerçekleştirilmiştir. ZnO'in *E. coli* üzerinde yarattığı bu bakteriyel özellik etkisi ve H₂O₂'in bu antibakteriyel etki mekanizmasında yer alan özelliklerini irdelemişlerdir. Çalışmaya göre ZnO ve H₂O₂ maddelerinin uygulanışı farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde yapılması öngörülmüş olup H₂O₂ konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak öldürme etkisinin de yükselişe geçtiği, deney sonucunda ZnO ve H₂O₂'in benzer etkiler oluşturduğu bildirilmiştir. ZnO'in sahip olduğu antibakteriyel etkinin H₂O₂ üretme mekanizması kaynaklı olduğu düşüncesini doğrulamaktadır. ZnO'un bakteri hücre membranına nüfuz ettiği anda H₂O₂ üretiminin başladığı belirlenmiştir [26].

Zhang ve arkadaşları, ZnO-Np'in ZnCl₂ ve H₂O₂ eşliğinde yarattığı antibakteriyel etki üzerinde durmuşlardır. 1,25×10⁻³ M konsantrasyonda olan ZnO süspansiyonu bakteri koloni sayısında bir azalmaya neden olurken ZnCl₂ antibakteriyel etki yaratmadığı ve H₂O₂ ise bakteri sayısında %100 azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. [27].

Yamamoto, farklı büyüklükteki ZnO-Np'in *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerindeki etkilerini araştırmıştır. Sonuç olarak partikül büyüklüğü azaldıkça antibakteriyel aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. Bunun nedeni de partikül büyüklüğü düştükçe mikroorganizmalarla temas halinde bulunan ZnO yüzey alanının artması olarak açıklığa kavuşturulmuştur. Aynı şekilde ZnO yüzeyi kullanılarak oluşturulan H₂O₂ miktarının da doğru orantılı olarak çoğalmasıyla açıklanmıştır. ZnO partikül büyüklüğünün etkisinin *S. aureus* üzerinde daha küçük miktarda olduğu saptanmıştır. Bunun sebebi de iki bakteri türü hücre yüzeyindeki kimyasal kompozisyonun ve yapıların farklı olmasına bağlanmıştır. *E. coli* bakterisi hücrelerinde lipit A, lipopolisakarit ve peptidoglukandan oluşan üç katman bulunurken *S. aureus* hücre yüzeyinde sadece peptidoglukan tabakası yer almaktadır [28].

Bir başka araştırma da 700 °C'de bir saat boyunca Fransız Prosesi ile oluşturulmuş 800 nm boyutundaki ZnO-Np'in *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel etki faktörü incelemişlerdir. ZnO konsantrasyonu artışına bağlı olarak bakteri inhibisyonunun da arttığı belirlenmiştir [29].

Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu olan FESEM de ZnO-Np'in hücre içerisine işlemediği ancak bakteriyel büyümenin inhibe olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi ile ZnO'nun antibakteriyel etkisinin doğrudan bağlantılı olduğu belirlenmiştir. ZnO-Np'in gösterdiği toksik etkinin sadece mikroorganizmalar ile sınırlı olduğu, gıda güvenliği çerçevesinde de kullanılabilir durumda olduğu görülmüştür [30].

Dutta ve arkadaşları, Gram-negatif türü bir bakteri olan *E. coli* bakterisine ıslak kimyasal yöntemle elde edilmiş tiyogliserol (TG) eklenmiş ZnO'nun antibakteriyel etki

faktörünü araştırmışlardır. ZnO ve TG katkısı yapılmış ZnO 8-55 mg/100 mL olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Histidin antioksidanı eşliğinde üretilen ZnO-Np'in antibakteriyel etkisi incelenerek bu etkinin ROS'la ilişkisi araştırılmıştır. Histidin, hidroksilin radikalleri ve serbest oksijen temizleyicisi olması ve antibakteriyel etki göstermesi bilinen özelliklerdendir. Yapılan çalışmalar neticesinde histidin miktarının azalmasına bağlı olarak antibakteriyel etkinin de artış gösterdiği bildirilmiştir [30].

1.3.2. ZnO Partikül Özelliklerinin Antibakteriyel Aktiviteye Etkisi

Yapılan çalışmalarda 1400 °C'de 3 saat süre ile ezilen ZnO materyalinin farklı partikül büyüklüklerinin *E. coli* ve *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisi irdelenmiştir. Partikül büyüklüğü azalmasına bağlı olarak antibakteriyel aktivitenin arttığı sonucuna ulaşılmıştır [31,28].

Jalal ve arkadaşları gliserol içerisine disperse edilerek hazırlanmış ZnO nano akışkanının *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkisini incelemiştir. Konsantrasyon ve uygulama süresi arttıkça kullanılan ZnO'nin çok iyi bir antibakteriyel ajan olduğu amonyum sitrat da antibakteriyel etkiyi destekleyici özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [31,29].

Yapılan başka bir çalışmada, ZnO'nin partikül büyüklüğü ve konsantrasyonunun ZnO'nin sahip olduğu antibakteriyel aktivitesinin üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada hedef mikroorganizma olarak *E. coli* seçilmiş, yapılan deneyler ZnO partikül konsantrasyonu arttıkça antibakteriyel aktivitenin arttığını, partikül büyüklüğü arttıkça antibakteriyel aktivitenin azaldığını göstermiş en fazla partikül büyüklüğüne sahip ZnO (2417 nm) kullanıldığında antibakteriyel aktivitenin yok denecek kadar az olduğu bildirilmiştir [32,27].

1.3.3. Antibakteriyel Uygulamalar

Selvam ve Sundrarajan, Poly-N-vinyl-2-pyrrolidone (PVP) ve ZnO ile kaplanmış pamuklu kumaşlarda bu maddelerin antibakteriyel etkisi üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışma da için elde edilen ZnO, kimyasal çöktürme metodu ile üretilmiştir. Bu ZnO, pamuklu kumaşlara pad-dry-cure yöntemi ile kaplanmıştır. Pad-dry-cure yöntemi,

emdirme-kurutma-kondenzasyon sırasıyla yapılan bir kumaş yöntemidir. Antibakteriyel aktivite testi PVP ve ZnO ile modifiye edilmiş PVP için ayrı ayrı uygulanmıştır. ZnO konsantrasyonu 5, 10, 15 ve 20 mg/L olacak şekilde kullanılmıştır. ZnO ile modifiye edilmiş PVP'nin çok daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği; 20 mg/L konsantrasyonda ZnO kullanıldığında %100 bakteriyel azalma sağlandığı gözlenmiştir [32].

Selvam ve arkadaşları pamuklu kumaşlar üzerine uygulanmış ZnO, TiO₂ ve AgO nanopartiküllerinin antibakteriyel etkilerini incelemişlerdir. Deneyler *S. aureus* ve *E. coli* ile yapılmıştır. Yapılan çalışmalar en güçlü antibakteriyel etkiyi (%100 azalma ile) ZnO'in gösterdiğini ortaya koymuştur. TiO₂ ve AgO ise bakteri sayısında %90 ve %85 azaldığı sonucuna ulaşmışlardır [32].

Rajendra ve arkadaşları, ıslak kimyasal metodla elde edilmiş olan ZnO'i pamuklu dokuma kumaş üzerine uygulayarak *E. coli* ve *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. ZnO uygulanmamış kumaşlarda yapılan deneylerde bakteri sayısında hiçbir azalma görülmezken ZnO ile kaplanmış kumaşların kullanıldığı deneylerde %94,16 düzeyinde azalma görülmüştür. Bu kumaşlar on kez yıkandığında bile ZnO'in bu etkisinin devam ettiği fakat on yıkamadan daha fazlasında bakteri sayısındaki azalma miktarının düştüğü gözlenmiştir [33].

Adams ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TiO₂, SiO₂ ve ZnO'in *E. coli* ve *B. subtilis* üzerindeki antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Antibakteriyel aktivite ölçümü her bir metal oksitin 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 ve 5000 ppm konsantrasyonu için yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda en güçlü antibakteriyel etkiyi ZnO'in gösterdiği, en az etkiyi ise SiO₂'in gösterdiği saptanmıştır [34].

Vasanthi ve arkadaşları, sprej piroliz yöntemiyle üretilmiş Sn katkılı ZnO'in *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir. Deneyler farklı oranlarda (%0-10) Sn içeren her bir örnek için 600 nm'de ki optik yoğunluk ölçülerek yapılmıştır. Sonuçta Sn oranı arttıkça antibakteriyel etkinin de arttığı gözlemlenmiştir [35].

Li ve arkadaşları, Kitosan (CS), Ag^+ ve ZnO karışımından olan filmleri hazırlamışlar ve çeşitli organizmalar olan, *E. coli bakterisi*, *B. Subtilis*, *S. aureus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* organizmaları üzerindeki antibakteriyel etkileri incelemişlerdir. Yapılan çalışmalar, CS/ Ag^+ /ZnO karışımının CS/ Ag^+ ve CS/ZnO karışımına göre çok daha güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu karışım medikal uygulamalarda ve gıda ambalajlama sanayinde kullanılabilir [36].

Tayel ve arkadaşları, ZnO'in antibakteriyel etkisini gıda kaynaklı patojenler olan *Salmonella typhimurium* ve *S. aureus* bakterileri için disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Yapılan deneyler ZnO partikül büyüklüğü küçüldükçe ve ZnO konsantrasyonu arttıkça bakteri etrafında oluşan inhibisyonzon çapının arttığını; antibakteriyel aktivitenin arttığını göstermiştir [37].

Yapılan bir çalışmada oral enfeksiyonlara sebep olan altı patojen bakteri (*Streptococcusmutans*, *S. mutans*, *Actinomycesviscosus*, *Lactobacilluscasei*, *Staphylococcus aureus* ve *Camdidaalbicans*) üzerinde etkili olan antibakteriyel ajanlar üzerinde çalışmışlardır. Antibakteriyel ajan olarak iki farklı ZnO kompleksi, magnezyum hipoklorit ve üç farklı Ag^+ içeren bileşik kullanmışlardır. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemek için dilüsyon yöntemi seçilmiştir. Yapılan deneyler kullanılan bütün inorganik materyallerin antibakteriyel etki gösterdiğini fakat Ag^+ ve Zn^{+2} içeren komplekslerin çok daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu ispatlamıştır [38].

Uygulamada birçok alanda ve birden çok amaçla kullanılan ZnO çağın hastalığı olan kanser üzerindeki etkisi de merak konusu olmuştur. Bir başka çalışmada, ZnO HepG2 (karaciğer kanseri) ve MCF-7 (göğüs kanseri) kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Kullanılan ZnO konsantrasyonu 2,5-5 $\mu\text{g/mL}$ seviyesinde iken hücreler üzerinde herhangi bir etki görülmezken, konsantrasyon 10–25 $\mu\text{g/mL}$ seviyesine çıktığında kanser hücrelerinin hasara uğradığı ve büyümelerinin durduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile ZnO'in kanser tedavisinde kullanılacak ilaçlarda yer alabilecek daha ucuz bir inorganik materyal olduğunu göstermiştir [38].

Queiroz ve arkadaşları diş kanal tedavisinde kullanılacak dolgu maddesi olarak ZnO ve diğer üç maddeyi antibakteriyel etkinlik açısından incelemişlerdir. Hedef mikroorganizma olarak *Kocuriarhizophila*, *Enterococcusfaecalis*, *Streptococcusmutans*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri seçilmiş ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar en güçlü antibakteriyel etkiyi ZnO ve öjenol dolgu maddesinin *K. Rhizopila*'ya (32,67 mm) karşı gösterdiğini ortaya koymuştur [39].

1.4. ZnO'nun Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Sağlıklı bir yaşam sürdürebilmenin en temel yolu doğru ve dengeli beslenmeden geçer. Vücuda alınan her gıda organlara etkilerde bulunmaktadır. Özellikle kalp damar hastalıklarının ortaya çıkış nedenleri, işlenmiş ve besin değeri açısından zayıf gıdalardan beslenmedir. Vücuda aldığımız besinlerde birtakım mineraller, vitaminler ve proteinler gibi moleküller vardır. Burada adı geçen minerallerden bazıları çinko, selenyum, magnezyum ve bakırdır. Özellikle bu mineraller kalbi etkileyen oksidatif stres ile doğrudan ilişkilidir. Diğer bir deyişle, bu mineraller antioksidan enzimlerle etkileşimli olarak görev yapmaktadırlar. Antioksidanlar, vücutta gerçekleşen oksidatif reaksiyonlarda oksijeni alıkoyarak reaksiyonun başlamasına engel olurlar. Bir diğer şekilde de başlamış olan reaksiyonun ilerlemesi durabilir. Bu oksidasyon reaksiyonları sonucunda serbest radikaller açığa çıkar. Serbest radikaller hücre ve doku hasarına neden olduğu için kalp damar rahatsızlıkları başta olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkar. İnsan vücudunda hastalıklarla mücadele etmek için çeşitli proteinler, enzimler ve farklı mekanizmalar bulunur. SIRT proteinlerinin görevi burada devreye girmektedir. Oksidatif stresi azaltarak kalp hastalıklarının oluşumuna engel olur [40]. ZnO-Np ise bazı SIRT proteinlerinin miktarını belli oranlarda artırarak kalp sağlığının korunmasına fayda sağlayabilir.

1.5. SIRT Proteinleri

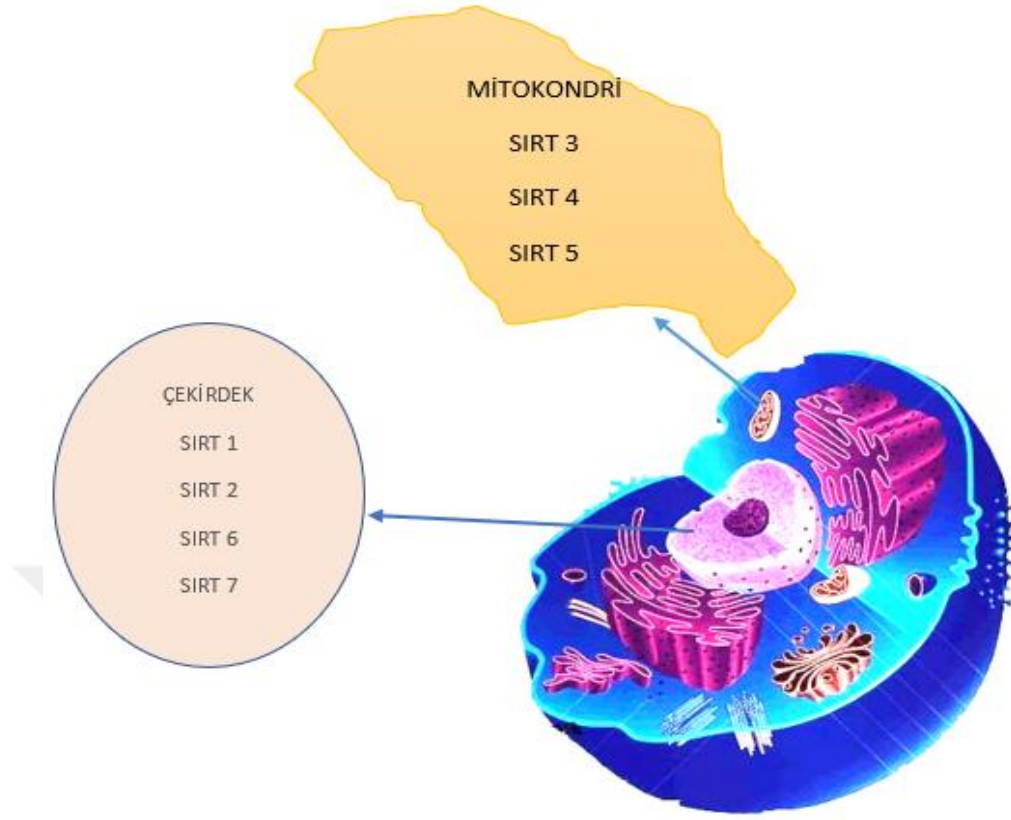
SIRT'ler hücrelerde yaşlanma kaynaklı fonksiyonlarda azalma konusunda hücreleri korumaya almada önemli görev üstlenen protein sınıfları arasındadır. SIRT'lerin NAD⁺ faktörüyle ilişkili olan diasetilaz ve ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösteren protein

sınıfları arasında yer aldığı belirlenmiştir. Memelilerde yedi SIRT proteini karakterize edilmiştir [41].

SIRT proteinleri arasında aktivasyon bazında bir sınıflandırma yapılmak istenirse, SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5 proteinlerinin NAD⁺-bağlı diasetilaz, SIRT4 ve SIRT6 proteinlerinin ise ADP-riboziltransferaz etkileşimine sahip oldukları şekilde basit bir sınıflandırma yapılabilir. SIRT7 proteini için tanımlanan henüz bir enzimatik aktivite bulunmamaktadır. SIRT proteinin aracı görevinde olduğu diasetilasyon reaksiyonlarında, lizinde asetilasyonunu NAD⁺ hidrolizi ile birleştirme görevini yerine getirmektedir. Hidroliz işlemi sonrası SIRT aktivitesi inhibitörü olan nikotinamid ürününün ortaya çıkışı sağlanmaktadır [41,42].

SIR2 geni üzerinde yürütülen araştırmalarda bu genin genom instabilitesi unsurunu bastırıldığı ve yaşam süresinin uzamasına yol açtığı birkaç model organizmada belirlenmiştir. SIR2 geninin ilk olarak tanımlanmış olduğu ökaryot modelinin *Saccharomyces cerevisiae* ile *Caenorhabditis elegans* gibi pek çok basit model organizmanın yaşam döngüsüne etki ettiği bilinmekte ve NAD⁺-bağlı histon diasetilazlar olduğu anlaşılmaktadır. SIR2 benzeri genler memeli canlılarda SIRT olarak bilinmektedir ve bu proteinler bakterilerden itibaren birçok organizmada yer almaktadır [43,8,9].

Bakteriler başta olmak üzere memelilere kadar uzanan cinslerin çoğunda ve değişen sayılarda bulunmasının yanında, memelilerde SIRT ailesinin yedi farklı türü yer almaktadır. Her bir SIRT proteininde, 273 aminoasit içeren, türler arasında korunmuş katalitik bir bölge bulunmaktadır ve bu temel alanı çevreleyen N-terminal ve C-terminal zincirlerinin boyları değişen SIRT'ler birbirlerinden hücre içi lokasyonları ve substratlarında farklılık gösterebilmektedir. SIRT'ler farklı dokularda, değişken miktarlarda ifade edilmektedir. SIRT1, 2, 6 ve 7 çoğunlukla çekirdekte, SIRT2 büyük ölçüde sitoplazma kısmında, SIRT 3, 4 ve 5 ise mitokondri içinde yer almaktadır (Şekil 1.3) [44,8,9,10].



Şekil 1.3: Hücrede sirtuinlerin lokasyonları [44].

SIRT6 ve SIRT7 ise nükleer SIRT'ler olarak bilinirler. SIRT'lerin yer aldığı organeler ve fonksiyonları için özet bilgi verilecek olursa; çekirdekte bulunan SIRT1 çoğunlukla metabolizmada, SIRT2 proteini sitoplazma içerisinde bulunarak hücre döngüsünde rol oynar. SIRT3 mitokondrilerde bulunarak termogenezis ve ATP üretiminde, SIRT4 mitokondrilerde bulunarak insülin salınımında, SIRT5 yine mitokondrilerde üre döngüsünde, SIRT6 çekirdekte bulunarak DNA onarımında ve metabolizmanın düzenlenmesinde, SIRT7 ise çekirdekçik RNA transkripsiyonu ve memeli SIRT'lerinin DNA onarımında, metabolizmanın düzenlenmesinde, yaşlanma ile ilgili hastalıklarda ve diğer pek çok alanda rollere sahiptirler [44,45,41,10].

SIRT3 mitokondriyal matrikste yer alır. SIRT3, tübülin ile histon peptidleri gibi pek çok substratın deasetilasyonundan sorumlu durumdadır. SIRT3'ün mitokondriyal fonksiyonlarda düzenleyici rol oynadığı belirlenmiştir [44,41,10].

1.5.1. Memeli Sirtuinleri ve İşlevleri

Çeşitlilik açısından incelendiğinde SIRT ailesinde yedi adet varyant bulunduğu görülmektedir (SIRT1-7) ve NAD^+ bağımlı katalitik temel alanı bulundurmaktadırlar. Katalizör alan unsurunu çevreleyen N-terminal ve C-terminal gruplarına ait zincirler, değişen SIRT tipine göre farklı boylarda olmaktadır. Memeli SIRT'i olarak bilinen yedi SIRT'inin alt-hücresele lokalizasyonlarının kendi aralarında değişken durumları görülmektedir; ağırlığı çekirdeksel olan SIRT1, SIRT6 ve SIRT7, sitoplazmik olan SIRT2, mitokondriyal olan SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 bunların arasında sayılabilir [45,41].

Çekirdeğin iç alanı incelendiğinde, SIRT1 unsurunun geniş bir parçasının ökrömatin ile bağlantılı olduğu görülürken, SIRT6 proteininin heterokromatin ile bağlantıda olduğu, SIRT7 proteininin ise çekirdek içinde bulunduğu anlaşılmaktadır. SIRTler arasında en dayanıklı deasetilaz faaliyetini (SIRT1-SIRT7 arasında) SIRT1 göstermektedir. Zayıf deasetilaz faaliyeti SIRT5 tarafından gösterilmektedirken SIRT2 ve SIRT3 mono-ADP ribosiltransferaz faaliyeti sonrası deasetilaza sahip duruma geçmektedirler. SIRT4 ve 6 proteinlerinde mono-ADP ribosil transferinin az olduğu gözlemlenmiştir. SIRT7 proteininin moleküler işlevi hakkında literatürde fazla bilgi yer almamaktadır. İnsan metabolizması üzerinde yaşlanma etkileri, kanser ve hücre yaşamı gibi oldukça önemli konuları da kapsamak üzere memeli SIRT'leri birçok hücresele işlevde etkin bir madde olarak öne çıkmaktadır [46].

SIRT proteinlerinin ana işlevleri arasında ilk olarak gen ifadesinin düzenlenmesi konusuna değinilmesi gerekmektedir. Histonların diasetilasyonu sonrası kromatinin yoğunlaşmasına (heterokromatin) ve ardından da gen ifadesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Mekanizmanın harekete geçmesiyle histonların amino bağlantılarındaki lizin amino asitleri ile histon etkisi bulunmayan proteinlerin asetil gruplarının, HDAC tarafından çıkartılması sonrası meydana gelebilmektedir. Histon deasetilazın üç sınıfı bulunmaktadır. Bunlar arasında III. sınıf diasetilazlar NAD^+ bağımlı SIRT enzim ailesine dahil olmakta bununla birlikte maya SIR2 proteiniyle homoloji göstermektedirler [46,44,43].

SIRT1, yedi türde bulunan memeli SIRT'i arasında, bir düzineden fazla bilinen ara ürünleri sayesinde geniş çaplı hücrel süreçlerde en yaygın olarak çalıştığı bilinen SIRT türüdür. Moleküler olarak en önemlilerinden biri olarak histon proteinlerinin diasetilize edilmesi bulunmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin hedeflenmesi ile gen de önemli bir görev alan SIRT1, histon olmayan çoğu hedefe de sahiptir [46].

Buna gösterilebilecek en iyi örnekler arasında TAFI68 (TBP (TATA-kutu bağlayıcı protein) bağlantılı faktör I 68) yer alır. SIRT1; TAFI68'i deasetilize etmekte, DNA bağlayıcı faaliyetini azaltarak RNA Pol-I aracılığıyla transkripsiyonunun baskılanmasında aktif görev üstlenmektedir. SIRT1, p300'ü engelleme yolu ile bağlamakta ve deasetilize etmektedir. p300 transkripsiyon faktörü hücre farklılaşmasında ve metabolizmasının düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır [47].

Yine SIRT proteinlerinin büyük bir görev olarak işlev yürüttüğü alanlar arasında SIRT'lerin kanser hücrelerindeki rolleri yer almaktadır [48,49]. SIRT proteinlerinin işlevleri arasında programlı hücre ölümü (apoptosis) yer alır. SIRT ailesinin etkilediği en önemli mekanizmalardan biri olarak apoptosis ve hücre sağ kalımı, SIRT1 proteini birtakım tümöre neden olan proteinleri hedef alarak gerçekleştirdiği programlı hücre ölümleri ile öne çıkmaktadır. SIRT1 maddesi tümör proteini lizin aminoasid kalıntılarından arındırarak (diasetilize ederek) transkripsiyon etkinliğinde azalmaya yol açar. Böylelikle oksidatif strese ve DNA zararları sonucu hücre ölümünü baskılamış olur. Vücudun tümündeki hücre sayısı değerinin sabitlenmesi, programlı hücre ölümü büyük bir gereksinim olarak ortaya çıkar. Bir immün bir reaksiyonu sonucu incelendiğinde etkin edilmiş lenfositlerin beraberinde apoptoz aracılığıyla kendi antijenlerini rol dışı bıraktığı anlaşılmaktadır. Buna göre apoptotik hücre miktarındaki yükselme sonrası dengenin negatif etkilenmesi birtakım dejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok immünolojik rahatsızlıkların ortaya çıkması gözlemlenebilecektir [50,49].

SIRT1 diğer taraftan hücre döngüsünde düzenleyici görevi yapan bir gen grubunu inhibe ederek, gendeki apoptoz işlevinin durdurulmasını sağlar. Bunun yanı sıra SIRT1,

DNA'nın replikasyonu mekanizmasında replikasyon baloncuğunun oluşturulması görevini yerine getiren transkriptozomların bileşenlerini düzenler ve bu yolla hücre yaşamında önemli bir yer edinir. Apoptoza neden olan stres unsurunu düşüren SIRT1, bu yolla DNA onarımını düzenler ve nöronlar ile fibroblastları etkiler. SIRT1 proteini vücuttaki diğer enzim ve proteinlerle beraber etki ederek yalnızca kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyici özellikteki proteazkaspazı-3 ve 7'yi baskılar [50].

SIRT'lerin ana işlevleri arasında yaşlanma mekanizmasındaki fonksiyonları gösterilebilir. Yaşlanma mekanizmasında da etkili olan SIRTler, hücre yaşlılığın dış görünüşteki değişimleri ile tanımlandığı kalıcı hücre döngüleri içinde önemli görevler üstlenir. SIRT1'in tümör proteinini inhibe etmesiyle ilk rat embriyonik fibroblastlarını, PML'nin bağ kurduğu prematür hücre yaşlılık durumundan alıkoyduğu düşünülmektedir [51,50].

SIRT proteinlerinin sağlık dünyasının üzerinde büyük araştırmalar yürüttüğü DNA onarımı üzerinde de etkisi ve işlevi olduğu düşünülmektedir. Bu gruplar arasında ilk sırayı memeli SIRTleri almaktadır. SIRT 6 geni susturulmuş ratlarla yapılan deneylerde baz kesip çıkarma işlemi (BER) bozulma gözlemlenmiştir. Yapılan bu araştırmalar SIRT1'in pek çok metabolik aktivitesinde DNA onarım mekanizması faaliyetinin devrede olduğu gözlemlenmiştir. Radyasyona uğraması sonrasında SIRT1'in DNA onarım kapasitesinde ve onarım proteinde görev verdiği Ku70'in deasetilasyonunu geliştirdiği belirlenmiştir [51].

NF-KB, tüm hücre türleride bulunan bir tür transkripsiyon faktörü, faaliyetinin baskılanması durumunun SIRT1'in çoklu mekanizmaları ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Kalori azaltımı yapılan kemirgenlerde SIRT1 miktarı yüksek seviyelerde bulunurken ek olarak iltihabi yanıtlarda da azalma belirlenmiştir. Yapılan son çalışmalarda yüksek çıktılı tarama HTS metoduyla SIRT1 faal bileşiklerinin, proinflamatuvar sitokinlerin etkilerinin azaltılmasında TNF- α (tümör necrosis factor) gibi iltihap attırıcı (anti-enflamatuvar) özellikleri taşıdığı belirlenmiştir [52,50]. SIRT1 genlerinin silinmesi sonrası ratlarda yüksek düzeyde spermelerde anormallik ve kısırlığa

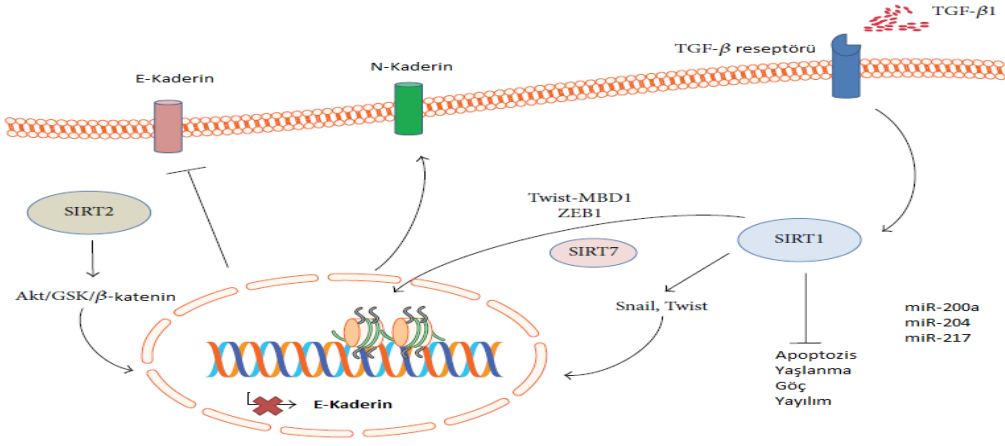
sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu sebeple SIRT1'in hayvanlarda üreme kapasiteleri konusunda da etkin olduğu düşünölmektedir [52].

Metabolik etkisi incelendiğinde SIRT1'in ilk rolünü işaret eden bulgu; SIRT1'in beyinde, iç yağda, böbrekte, kasta ve karaciğerde perhizden etkilenen organlarda başladığı bilgisine dayanmaktadır [53].

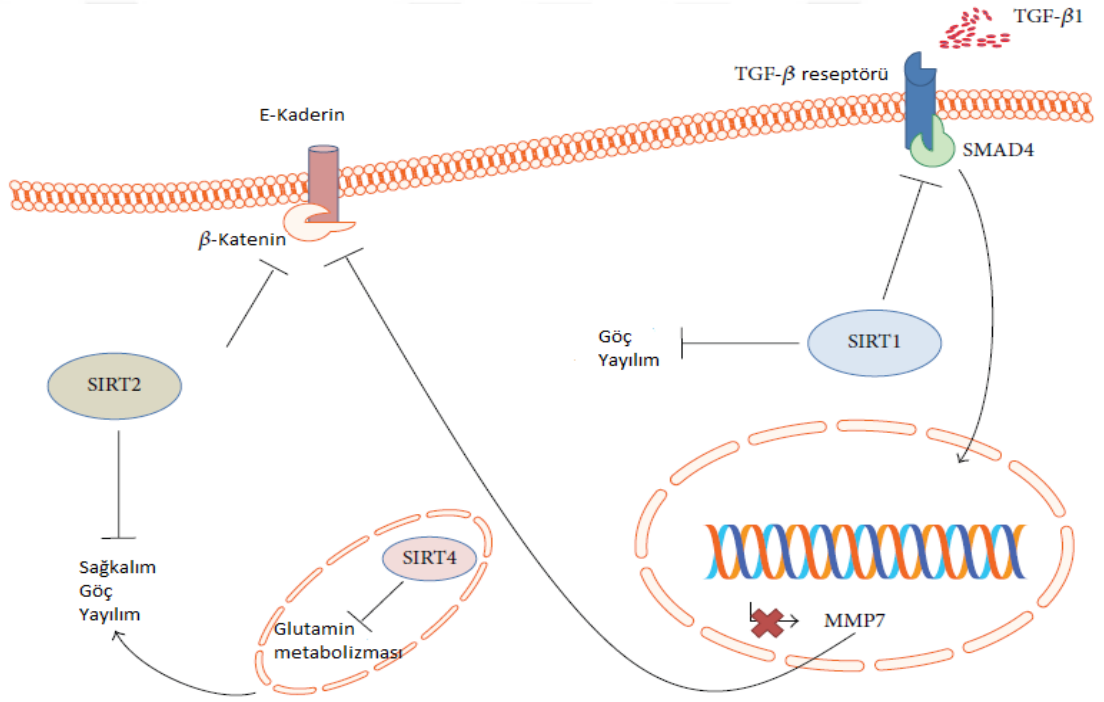
SIRT'ler epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sinyalinin artırılmasının yanı sıra baskılanmasında da kompleks bir yer tutmaktadır. EMT süreci içinde SIRT'lerin rolünün henüz tartişılmasının yanında fonksiyonel özelliklerinin önemli mertebede hücrenel içerik, kanser gelişim aşaması, doku türü ve mikro çevre yapısı gibi unsurlara bağlı olduğu düşünölmektedir. Kanser hücrelerindeki EMT gidişi, SIRT'ler tarafından etkileşimi başlatılmış olan sinyal yolu şekil 1.4 ve şekil 1.5'de özetlenmiştir [54].

SIRT1 ve SIRT2 tümör genlerinde süreç içinde hem pozitif hem de negatif yönlü düzenleyici olarak görev almaktadır. SIRT3'ün, oksidatif yanıtla, enerji dengesiyle ve metabolik regölasyonla alakalı mekanizmasından dolayı tümör baskılayıcı özellik taşıdığı düşünölmektedir. Düzeyi düşen SIRT3 aktivitesi, artan ROT üretimi ve SOD (mitokondrial izositrat dehidrojenaz) gibi ilgili antioksidan enzimlerin daha düşük aktivitesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [54].

SIRT1, TGF- β ve Smad4 'ü deasetilleyerek inhibe edebilme özelliği taşır. Böylece E-kaderinin yıkımında düşüşe yol ačan matriks metallopeptidaz 7 transkripsiyonunda ve ekspresyonunda azalmaya neden olur. Benzer şekilde SIRT2, E-kaderin ekspresyonunda artışa neden olurken β -kateninin ekspresyonunu azaltmaktadır. SIRT4 proteinin mitokondriyal glutamin metabolizmasını inhibe etkisi yaparak E-kaderini baskılamayı sağlar [54].



Şekil 1.4: EMT'in SIRT proteinleri aracılığıyla pozitif düzenlenmesi [54].



Şekil 1.5: EMT'in SIRT proteinleri aracılığıyla negatif düzenlenmesi [54].

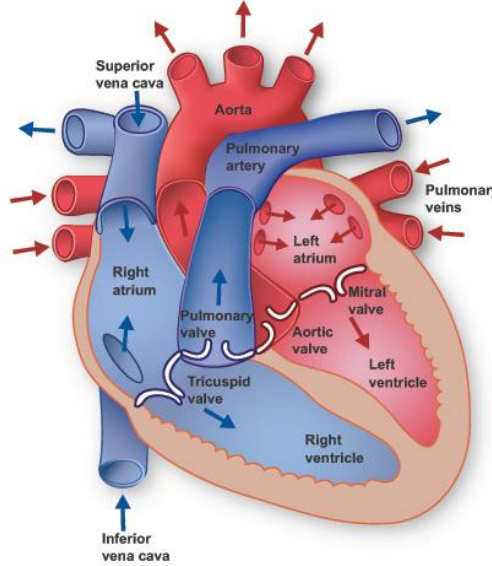
1.6. Kalp ve SIRT Proteinlerinin İlişkisi

Kalp, kabaca kapalı bir yumruk büyüklüğünde kaslı bir organdır. Göğüsün biraz solunda bulunur. Kalp kasıldıkça, vücudun etrafına kan pompalar. Oksijenli kanı, oksijenle yüklendiği ve metabolizmanın atık ürünü olan karbondioksiti boşalttığı akciğerlere taşır. Kombine kalp, kan ve kan damarlarına dolaşım sistemi denir. Ortalama bir insanın vücudunda sürekli olarak pompalanan yaklaşık 5 litre kan vardır. Kalp dört odadan oluşur:

- Atria: İki üst oda (kan alırlar).
- Ventriküller: İki alt oda (kan akıtır).

Sol atriyum ve sol ventrikül septum adı verilen kas duvarı ile sağ atriyumdan ve sağ ventrikülden ayrılır [55].

Kalp birçok faktöre bağlı olarak farklı oranlarda daralır. Dinlenme halinde, dakikada 60 kez yenebilir, ancak bir dakika veya daha fazla 100 atış yapabilir. Egzersiz, duygular, ateş, hastalıklar ve bazı ilaçlar kalp atış hızını etkileyebilir. Kalbin sol ve sağ tarafı birlikte çalışır. Kalbin sağ tarafı deoksijenlenmiş kan alır ve akciğerlere gönderir. Kalbin sol tarafı akciğerlerden kan alır ve vücudun geri kalanına pompalar. Sağ atriyum, üst ve alt vena kava (vücuttaki en büyük damarlar) olarak adlandırılan damarlar yoluyla vücuttan deoksijenlenmiş kan alır. Sağ atriyum büzülür ve kan sağ ventriküle geçer. Sağ ventrikül dolduğunda, kanı pulmoner arter yoluyla akciğerlere akıtır ve pompalar, burada oksijeni alır ve karbondioksiti boşaltır. Yeni oksijenli kan, pulmoner ven yoluyla sol atriyuma geri döner. Sol atriyum daralır ve kanı sol ventriküle iter [56,55].



Şekil 1.6: Kalbin genel yapısı [55]

Kalp kapakçıklarının amacı kalp içinde kan akışının sadece tek yönde ilerleyişinin sağlanması ve kanın geri dönüşünün engellenmesi için kalpte dört adet kapakçık bulunmaktadır [56,55].

SIRT1, memeli hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilir. Her ne kadar SIRT1 başlangıçta çekirdekte bulunan bir protein olarak tanımlanmış olsa da son zamanlarda, hücre içi lokalizasyonunun hücre tipine bağlı olduğu gösterilmiştir. Embriyonik rat kalplerinde, SIRT1 çekirdeğinde yüksek oranda eksprese edilir, ancak daha fazla organogenez ile azalır. SIRT1'in erişkin kalplerdeki ekspresyon düzeyi, embriyonik kalplerdeki oranın yaklaşık %20'sidir [57,43].

SIRT1'in deasetilaz aktivitesi, NAD⁺'in mevcudiyeti ile düzenlenir. Nikotinamid fosforibosiltransferaz (Namt), bir fosforibosil pirofosfatın NAM'ye transferini katalize ederek NAM mononükleotidi üreterek, memeli NAD⁺ kurtarma yolunda hız sınırlayıcı bir enzim görevi görür. Son araştırmalar Namt'ın BMAL1 ve PER2 dahil olmak üzere genler tarafından sirkadiyen ritmine göre düzenlendiğini, sırasıyla NIH3T3 hücrelerinde, rat embriyonik fibroblastlarda (MEF'ler) ve hepatositlerde SIRT1 aktivitesini pozitif olarak düzenleyen SAL1 aracılı deasetilasyon yoluyla düzenlendiğini göstermiştir [33]. Aşırı basınç, besleyici açlık, egzersiz ve akut IPC kalpte SIRT1'i yükseltir [57].

Nukleopilozmatik hareketlenme, SIRT'in fonksiyonunu da düzenleyebilir, çünkü SIRT1, hücrelerde fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) tarafından fosforilasyonla düzenlenen hem nükleer lokalizasyona hem de nükleer ihracat sinyallerine sahiptir. SIRT1'in hem sitoplazmada hem de çekirdekte bazal yerleşebileceği ve kalpteki strese cevaben çekirdeğe taşındığı düşünülmektedir. Kalp, yüksek enerji talebiyle karakterizedir, çünkü ana işlevi tansiyona karşı kan pompalamaktır. Kardiyomiyositler, kalbin kasılmasında merkezi bir rol oynar ve enerji üretimine aracılık eden önemli miktarda mitokondri içerir. Mitokondri, kalpte enerji metabolizmasında kritik rol oynayan ATP üreten organellerdir. SIRT familyası proteinleri arasında, SIRT1, nükleer proteinleri deasetile ederek mitokondriyal fonksiyonu düzenlerken, SIRT3 bunu mitokondriyal proteinleri deaktive ederek yapar [57,41].

Kalp, ağırlıklı olarak fizyolojik koşullar altında adenozin trifosfat (ATP) üretimi için substrat olarak serbest yağ asidini kullanır. Genel olarak, kalp hipertrofisi, kalbin basınç veya hacim aşırı yüklenmesi gibi hemodinamik aşırı yüke birincil tepkisidir ve artmış

kardiyomiyosit boyutuna yol açan gelişmiş protein sentezi ve sarkomerik yeniden yapılanma ile karakterize edilir. Hipertrofik büyüme başlangıçta duvar stresini azaltır, kardiyak fonksiyonu korur ve hipertrofik uyaranlara karşı telafi edici bir cevap görevi görür, ancak sonunda kardiyak remodeling ve kalp yetmezliği gelişimini başlatır [58,56,45]. Patolojik hipertrofi, kalp yetersizliğinde güçlü ve bağımsız bir faktördür. Proteinlerin asetilleme durumunun histon asetiltransferazlar ve HDAC'ler tarafından tersine çevrilebilir modifikasyonu, kalp hipertrofisine aracılık eden sinyal moleküllerinin aktivitesini kritik bir şekilde düzenler. SIRT'lerin kalp hipertrofisine karıştığı görülmüştür, bunun etkileri deneysel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Resveratrol, kardiyomiyositlerde ve basınç aşırı yüklenmesinin neden olduğu kardiyak hipertrofide fenilefrin kaynaklı hipertrofik yanıtı hafifletir [58]. SIRT'in farmakolojik inhibisyonu (NAM veya sirtinol ile) kardiyomiyositlerin boyutunu azalırken, SIRT'in aşırı ekspresyonu kardiyomiyositlerin boyutunu artırır.

SIRT3'ün ayrıca kardiyak hipertrofiye direnç verdiği gösterilmiştir. SIRT3 hafif kardiyak hipertrofi sırasında artmış, ağır kalp hipertrofisinde ise azalmıştır. SIRT3'ün aşırı ekspresyonu, agonistin neden olduğu kardiyak hipertrofinin baskılanmasına neden olur. Tersine, SIRT3 nakavt ratlar, hipertrofik tepkinin alevlendiğini gösterir. Ekzojen NAD⁺ tedavisi, SIRT 3'ün aktivasyonu ile birlikte SIRT1'in aktivitesine eşlik eden, ancak SIRT1'in aktif olmadığına eşlik eden antihipertrofik karaciğer kinaz B1-AMPK sinyalini bloke eder ve SIRT1'in kardiyak hipertrofide kritik rol oynadığını ve fazlalığın SIRT1 hedeflerinde olduğunu gösterir [59,47,41].

SIRT3'in mitokondriyal düzende artması hücre içindeki ATP değerlerinde artış sağladığı görülmektedir. Mekanizma incelendiğinde damar ve kan hücrelerinde elektron transferi hızının da bu ATP değerlerinin artışı ile hız kazandığı görülmüştür. Kalori restriksiyonu denilen parametreler zinciri içinde değerlendirmesi yapıldığında kalp ve karaciğer hücrelerinde asit oksidasyonuna bağlı olarak hücre yaşlanmasında hızlanmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu asit oksidasyonunun getirilerini dengeleyen SIRT3 proteini hücre yaşlanmasında hızı azaltır ve hücre kaybının kalp ve karaciğer organlarına olacak etkisinde yavaşlama sağlar [60,10].

SIRT3 proteinlerinin duyu kaybının azalmasını da engellediği kaloriyal restriksiyon koşulları altında yapılan deneyler yoluyla belirlenmiştir. Bu tespite ise SIRT3 proteinleri memelilerde protein ve lipid hücrelerde metabolik bozunma hızını düşürmesi ile açıklık getirilmiştir. Hücre direncinin artırılması sonrası bozunma hızının düştüğü ve duyu kaybına neden olan hücre kayıplarının azalması sonrası kayıp miktarında azaltılma olduğu ya da tamamen engellendiği anlaşılmıştır [60].

SIRT3 proteini hücre duvarında yer alan hücrelerde yenilenmeyi kolaylaştırması sonrası kalp damar hastalıklarında ve beyin hücrelerinin ölümünde yavaşlama ya da durdurma etkisi göstermektedir. Hücrelerde zar geçirgenliği üzerinde etkili olan bu protein türü geçirgenliğin zamanla azalmasında bariyer görevi gören pıhtılaşma ve iskemi gibi olayların oluşumunu engellemektedir [61].

SIRT proteinleri arasında özellikle kalp ve karaciğer hücreleri mitokntrilerine yerleşmiş durumda olan SIRT3, organelin enerji üretiminde ve benzeri görevlerinde gösterdiği düzenleyici özelliği neticesinde birçok hastalık ve kanser türüne karşı hücre ve organları koruduğu tespit edilmiştir. SIRT3 bu özelliğiyle düzenleyici proteinler arasında kalp kapakçıklarında yaşanan sorunların, kalp damar hastalıklarının ve dolayısıyla kalp krizinin önlenmesi noktasında öne çıkmaktadır [61,14].

Bu çalışma da ZnO-Np'in oksidatif stresle ve hücre içi metabolizma ile ilişkileri bulunan SIRT3 ve PDH proteinlerinin miktarı ve hücre içi yerleşimlerini değiştirerek kalbe yararının olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Derin dondurucu (Beko,3400 CF)
- Mikrotom (Leica RM 2135)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1610)
- Filtre kağıtları (Biorad, USA)
- PAP Pen (Elite, CA)
- Best Scope Görüntülü Mikroskop (Bestscope, CHINA)
- Hasas Terazı (Precisa, 205A SCS)

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ile Sarf Malzemeler

- DAB Peroksidazsubstrat kit (Vector Labs, USA)
- Rabbit Vectastainabc kiti (Vector Labs, USA)
- DietlilEter (Sigma)
- ZnO-Np (Nanoparticles)
- SIRT3 (Cell Signaling, USA)
- Pirüvat Dehidrogenaz Enzim (CAS No.: 252017-04-2, AZD7545)
- Ksilen (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- İzopropanol (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- 0,5-2,5µl, 2-20µl, 100-1000 µl pipetler (Eppendorf)
- Lam (Isolab, 24x50 mm)
- Lamel (Isolab, 24x30 mm)
- Hidrojen Peroksit (64271 Darmstadt, Germany)
- DistileSu (GFL, WaterStills 2004, Germany)
- Tris-tamponlu yıkama solüsyonu (TBS)
- Hemotoksilen (Merck, 517-28-2, Darmstadt, Germany)
- Entellan (Merck, KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

2.2. Metot

2.2.1. Deneş Hayvanları

Yapılan bu çalışma da yaklaşık olarak 210 ile 250 gr arasında ağırlığı değişen 4 aylık 32 adet *Wistar albino* türünde erkek rat kullanıldı. Öncelikle çalışmalara başlamak için Kafkas Üniversitesi'ne ait deney hayvanlarının kullanılabilmesi için kurulmuş bir birim olan Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan izin alındı (2018/83). Çalışma da kullanılan hayvanlar işlemlere başlamadan önce ve deney sırasında uygun sıcaklık yani $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve %60 oranında nemli ortamda, 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde *ad libitum* olarak beslendi.

2.2.2. Deneşel Dizayn

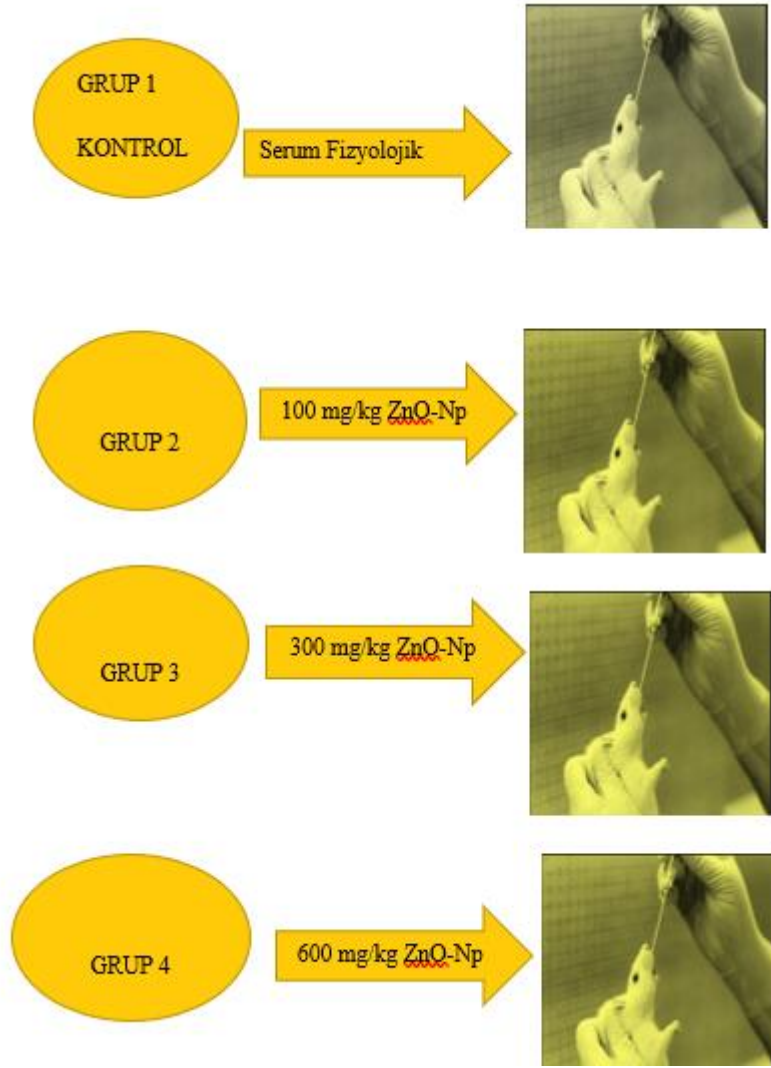
Deney hayvanları her grupta 8 tane rat olmak üzere 4 grup oluşturuldu.

I.gruptaki ratlara (kontrol grubu) oral gavaj ile 0.2 ml miktarında serum fizyolojik verildi.

II.gruptaki ratlara 14 gün boyunca 100 mg/kg ZnO-Np oral gavaj ile uygulandı.

III.gruptaki ratlara 14 gün boyunca 300 mg/kg ZnO-Np oral gavaj ile uygulandı.

IV. gruptaki ratlara 14 gün boyunca 600 mg/kg ZnO-Np oral gavaj ile uygulandı (Şekil 2.1).



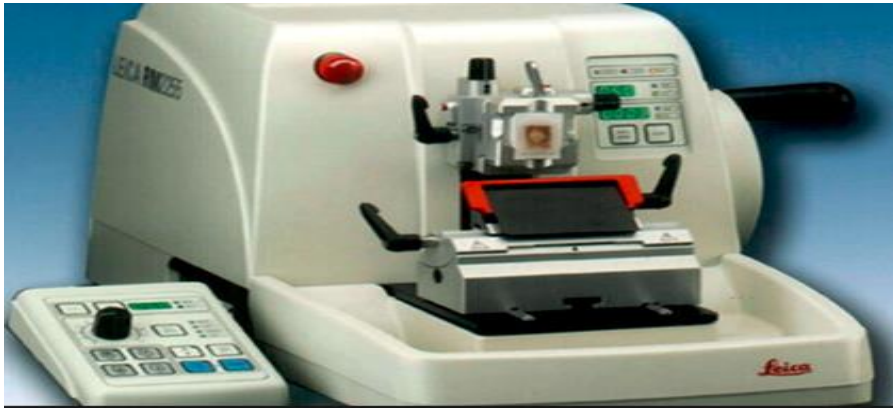
Şekil 2.1: Deney hayvanlarına oral gavaj uygulanması

ZnO-Np deney hayvanlarına 14 gün boyunca verilmesinin ardından dokuların alınabilmesi için deney hayvanları fiziksel ötenazi yöntemi ile öldürülerek kalp dokuları alındı, soğuk PBS ile hızlıca durulanmasının hemen ardından %10'luk formalinde 48 saat boyunca fikse edildi. Doku içindeki suyun uzaklaştırılması için dokular sırasıyla %50 %70 %90 %95 %100 ve tekrar %100'lük alkollerden geçirildi. Bunu takiben dokular bir parafin çözücüsü olan ksilenden iki kez her biri 30 dakika maruz bırakılmasının ardından parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklar laboratuvar analizlerinin yapılacağı güne kadar 4 °C'de saklandı. Parafine gömme (bloklama), doku takibi bitmiş olan dokuları, daha sonra katılacak olan sıvı ve kaplayıcı bir madde içerisine (parafin) alma işlemidir. Parafin bir süre sonra katılaşıp ve gerçek dokuya

zarar vermeden, mikrotom cihazı ile kesilmeye olanak sağlar. Doku örnekleri sırasıyla belirli yüzdeler de hazırlanmış olan dereceli alkol ve ksilen adımlarından geçirildikten sonra parafinle doyurma işlemi yapılır. Dokular, alkol ve parafin ile karışabilme özelliğindeki başka bir ortama geçirilerek alkolden ayrıştırılırlar. Bu adım ksilen gibi saydamlaştırıcı maddeler ile yapılabilir. Sonrasında doku parafin ile beslenir uygun kesitlerin olması için gömme işlemi ile kalıp şeklinde oluşturulur. Bu işlem dokuda şekil bozukluğu oluşturmadan çok ince kesitler halinde olmalıdır. İşlem boyama kalitesinin iyi olması ve mikroskobik çalışmalar da ciddi önem arz etmektedir.

Parafine gömme işlemi adımları;

- 1- Kasetler gömme merkezine alınmalıdır.
- 2- Kaset kapakları açılarak dokular gözden geçirilir.
- 3- Seçilen kalıp dokunun özelliğine göre olmalıdır.
- 4- Kalıbın içerisine sıcak parafin eklenir.
- 5- Pens yardımı ile dokular kalıp içine alınır.
- 6- Kalıptaki parafinin tabanının biraz soğuması ve donması beklenir ve tüm dokular pens yardımıyla uygun olarak konulur. Parça tabanının tam oturması sağlanır. Daha sonra kalıp soğutulur ve soğutulan kalıplardan dokular mikrotom bıçağı ile kesilerek kalıptan çıkarılır.
- 7- Kalıptan çıkarılan bloklar kenarlarındaki fazla parafin temizlendikten sonra kesit işlemi için hazır hale gelir.



Şekil 2.2: Mikrotom cihazı [62].

2.2.3. İmmünohistokimya Metodu

İmmünohistokimya metodu, protein ekspresyonu analizi ile ilgilenilen proteinin hücre içi lokasyonunu belirleyen bir tekniktir.

Bu yöntem de bilinen antijen kullanıldığında örnek materyal içerisinde özgül antikor veya tam tersi durum söz konusu olabilir. Buna ek olarak, örnek materyal içindeki özgül antijen veya antikor miktarlar niceliksel testler sayesinde belirlenebilir.

Aşağıda immünokimya metodunun adımları verilmiştir.

İmmünohistokimya adımları

- Doku kesitleri
- Antijen alımı
- Endojen enzimlerin bloklanması
- Primer Antikor
- Sekonder Antikor
- Substrat eklenerek renk oluşumu
- Çekirdek Boyaması (hemotoksilen boyaması)
- Lam üzerine lamel kaplanması
- Mikroskopik fotoğraf çekimi ve analizleri

Antijen-antikor birleşmesinin özellikleri:

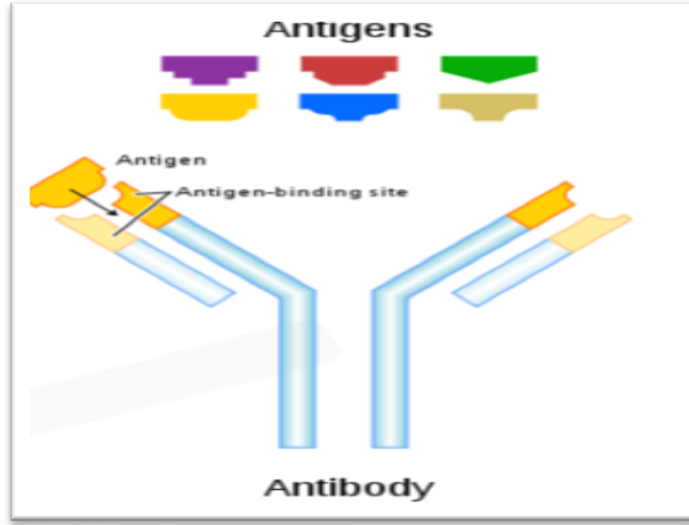
Antikor etkileşimleri, çapraz bağlanabilir hidrojeller olarak keşfedilmiştir. Bir antikor çoklu kovalent olmayan bağlardan yüksek antijen ile bağlanır. Bu spesifik antijeni tanımlamak için kullanılabilir. Antijen Anti mikrobiyal polimerik zincirler modifiye edilmiş monomer, çapraz bağlı bir antijen ve antikor etkileşimleri varlığında polimerize edilir. Anti bakteriyel antikor, antikor ve antikor bağlanması farklı bir biyolojik tepki sistemi olarak tanımlanmaktadır. Pozitif antijen kontrolleri, gösterilen antijeni içerdiği bilinen doku bölümleridir. Bu nedenle olumlu bir sonuç beklenir. Bu tür doku parçaları, genellikle bilinen spesifikliğe sahip bir antikorun (tipik olarak iyi kurulmuş bir monoklonal) kullanılması ve söz konusu antijenin mikroskopik boyama modeline aşına biri tarafından geçmişte doğrulanmış belirli antijenin gösterilmesini sağlamıştır. Pozitif

kontroller, boyama metodolojisinin ve tespit reaktiflerinin kalitesinin sağlam olduğu güvencesini verir. Pozitif kontrol bölümlerinin, değiştirilmiş metodolojiden herhangi bir sonuç değişimini ortadan kaldırmak için test dokuları ile aynı şekilde muamele edilmesi zorunludur. Pozitif kontroller, tüm dokulardaki o antijen için bilinen özgülüklü bir antikor kullanılarak, belirli bir antijen için bilinmeyen pozitif doku örnekleri test edilirken faydalıdır. Bunlar ayrıca, tüm antikorları test etmek için aynı pozitif kontrol dokusunu kullanarak, belirli bir antijene karşı bilinmeyen özgülüklü antikorları karakterize etmek için de değerlidir [63]. Negatif kontrolde ise birincil antikor kullanılmadığından, eğer bağlanmalar spesifikse, herhangi bir lekelenme görülmemesi beklenir.

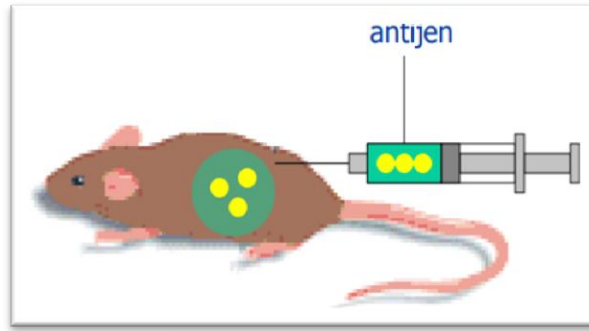
Antikor-Antijen Reaksiyonu:

Antijen-antikor etkileşimi veya antijen-antikor reaksiyonu, beyaz kan hücrelerinin B hücreleri (humoral bağışıklık yanıtında büyük bir rol oynayan lenfositler) tarafından üretilen antikorlar ve immün reaksiyon sırasında antijenler arasında spesifik bir kimyasal etkileşimdir. Vücutta, vücudun patojenler ve bunların kimyasal toksinleri gibi karmaşık yabancı moleküllerden korunduğu temel reaksiyondur. Kanda, antijenler spesifik olarak ve bir antijen-antikor kompleksi oluşturmak üzere antikorlarla bağlanmış yüksek afinitelidir. İmmün kompleks daha sonra tahrip edilebileceği veya devre dışı bırakılabileceği hücresel sistemlere taşınır. Antijen-antikor reaksiyonunun ilki "Goldberg'in teorisi" (antijen-antikor reaksiyonu) olarak bilinmeye başlandı [64]. Birkaç tipte antikor ve antijen vardır ve her bir antikor sadece belirli bir antijene bağlanabilir. Bağlamanın spesifikliği, her antikorun spesifik kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Antijenik determinant veya epitop, polipeptit zincirinin değişken bölgesinde bulunan antikorun paratopu ile tanınır [64]. Değişken bölge, her antikorda benzersiz amino asit dizileri olan hiper değişken bölgelere sahiptir. Antijenler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla antikorlara bağlanır.

Antikor-antijen reaksiyonunun da sıcaklık arttıkça, bağlanma artar. Tampon solüsyonun pH ve iyon konsantrasyon değerleri de aminoasit değişimine yol açar. Antijen antikor eşleşmesine ait bir görsel Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3: Antijen antikor eşleşmesi [65].



Şekil 2.4: Ratlara (intradermal veya subkutan) saf antijen verilmesi antikor üretilmesi [65].

2.2.3. İmmünolojik Teknikler

İmmünokimya da kullanılan birçok yöntem vardır Bunlar;

- Direkt Yöntem
- İki-Basamaklı Indirekt Yöntem
- Üç-Basamaklı Indirekt Yöntem
- Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Yöntem
- Alkaline-AntialkalinePhosphatase (APAAP) Yöntem
- Avidin-Biotin Kompleks (ABC) Yöntemi

- İşaretlenmiş Streptavidin-Biotin (LSAB) Yöntemi

Bu çalışmada kullanılan yöntem Avidin-Biotin Kompleks (ABC) yöntemidir [66].

2.2.4. ABC Yöntemi ile İmmüno-boyama

ABC metodu immunohistokimya da çok sık kullanılan boyama metotlarından biridir. Bu yöntemin kullanılma sebebi boyama metodu olduğu için antijen antikor uyumu açıkça görülebilmektedir. Protein üretimi ile alakalı olan işlemler de avidin-biyotin kompleks yönteminin kullanılması daha uygundur. Avidin peroksidazla işaretlenir sonrasında biyotine yüksek etki gösterir. ABC immünokimya üç aşamadan oluşur. İlk aşama işaretlenmemiş primer antikor iken ikinci aşama biyotinlenmiş sekonder antikor ile muamele edilmesidir. Üçüncü aşamada avidin-biyotin peroksidaz kompleksi olarak adlandırılır. Daha sonra peroksidaz, DAB ve diğer substratlarla reaksiyon meydana getirir. Ardından renk belirteci (kahverengi) oluşur. Bu yöntem üç adımda gerçekleşir bunlar;

1. Birincil antikor (SIRT3 veya PDH) eklenmesi,
2. Biotinlenmiş ikincil antikor eklenmesi,
3. Avidin-biotin peroksidaz kompleksi eklenmesi.

Peroksidaz DAB veya farklı substratlar tarafından farklı son ürünler ile kahverengi lekeleri görünür hale getirilir [66].

Yapılan deneyde daha önceden mikrotom ile kesilen rat kalbi dokularından ksilen kullanılarak parafini uzaklaştırma işlemi yapıldı. Deneyde dört grup rat kullanıldı. İşlemlerde negatif kontrol de kullanıldı ve bu gruba birincil antikor konulmadı. Bunun amacı ikincil antikor veya diğer moleküllerin spesifik olmayan boyamalar oluşturup oluşturmadığını test etmektir. Dokularda antijen madde SIRT3 veya PDH proteindir. Parafin bölümleri dokulardan ayırmak için, ksilen ve derecelendirilmiş alkol serileri kullanıldı. İki ayrı ksilen kullanılır. Her ksilende ayrı ayrı 5 dakika bekletilir. Dokulara su kazandırılması için dokular gittikçe azalan yüzde bileşimlerinde hazırlanmış alkol çözeltilerine daldırılır. İçsel peroksidaz aktivitesinin söndürülmesi için, dokular %3'lük H₂O₂ içinde 30 dakika boyunca bekletilir. Bunun amacı dokunun doğal yapısından

kaynaklanan peroksidaz aktivitesinin düşürülmesidir. Su ve alkolden ayrılan dokular kurumadan lam üzerine Pap pen kullanılarak bariyer oluşturulur. TBS ile seyreltilmiş normal bloklama serumu kit için önerilen şekilde hazırlanıp, 30 dakika inkübe edilir. 1/100 oranında hazırlanan birincil antikor (SIRT3 veya PDH) inkubasyonu için ise bir gece boyunca (16 saat 4 °C’de) bekletildi (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Primer antikor damlatılmış doku örnekleri

Daha sonra, bir gece boyunca bekleyen dokulardan bağlanamayan antikorların uzaklaşması için 5 dakika boyunca TBS çözeltisiyle yıkanır. Yıkama işleminden sonra biyotinli sekonder antikor ile 45 dakika inkübe edilir (Şekil 2.6). İkincil antikorda da anahtar kilit eşleşmesinin meydana gelmediği kısımların temizlenmesi üç kere her biri 5 dakika olarak TBS ile yıkama işlemi yapılır.

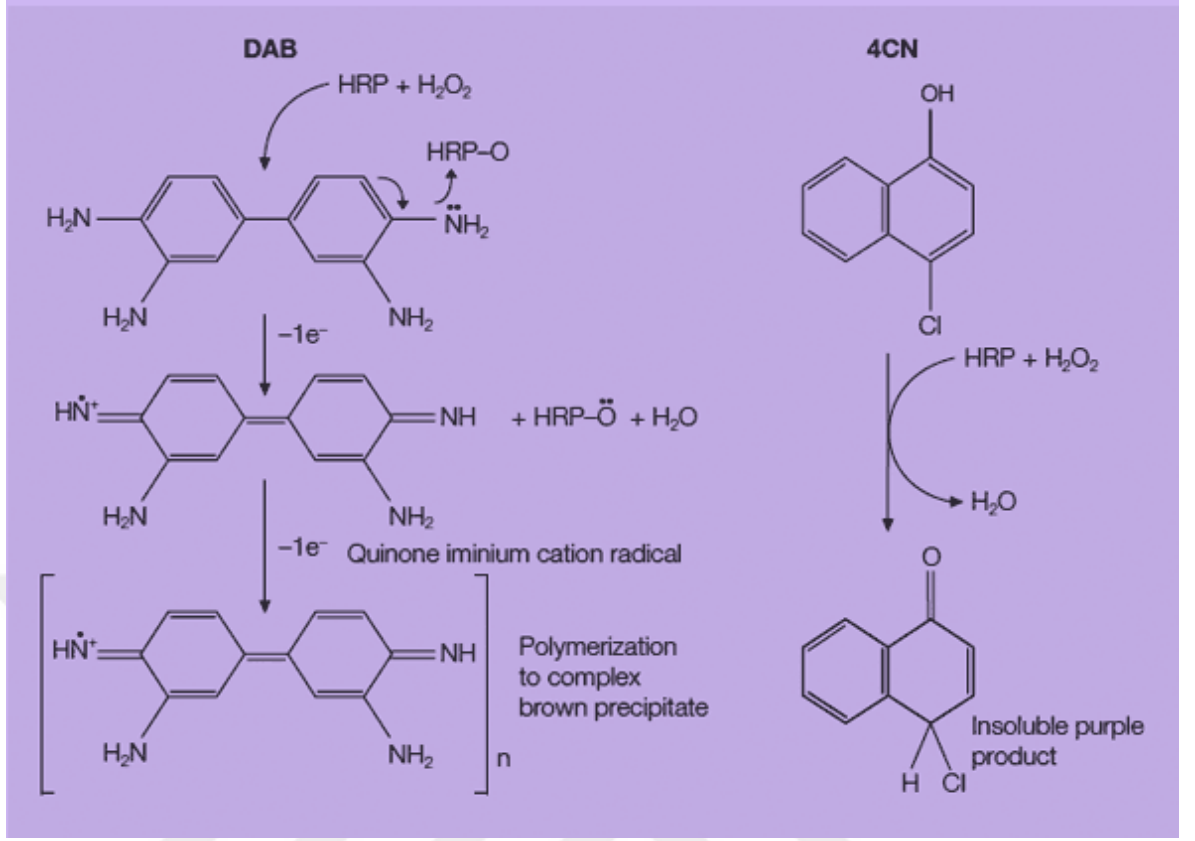


Şekil 2.6: Ticari vectastain ABC kiti (Vector labs)

ABC reaktifi ile 30 dakika inkübe edilerek sinyalin çoğaltılması sağlandı. Daha sonra, tampon TBS çözeltisinde 5 dakika yıkama yapılarak kesitler durulandı. Son olarak, 3,3' diaminobenzidin (DAB) ile birlikte substrat H_2O_2 çözeltisi hazırlanarak dokular inkübe edildi. Boyama işleminde iki kimyasal rol oynar. Bunlardan birinci H_2O_2 , diğeri ise DAB çözeltisidir. H_2O_2 bağlanan ikincil antikor üzerine konulduğunda tepkime verir ve DAB'ı parçalar. DAB oksitlenince renksiz halden renkli hale geçer ve SIRT3 veya PDH proteinlerin yoğun olarak bulunduğu yerlerde kahverengi rengini alır. Enzim ve substrat ilişkisinin tespitinde bu yöntemin kullanılmasının sebebi ekonomik olması ve diğertespit sistemlerine göre avantajlı olmasıdır. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi sırasında bazı istenmeyen durumlar olabilir. Bunlar ışığa maruz kaldığında lekelerin solması ve spesifik olmayan renk çökmesidir. Çökelti, leke üzerinde biriktiğinde, renkli bir sinyal oluşur ve kolayca leke üzerindeki gözle görülebilir. İstenilen arka plan üzerinde sinyale ulaşıldığında enzimatik reaksiyon izlenebilir ve durdurulabilir (Şekil 2.7 ve reaksiyon için Şekil 2.8).

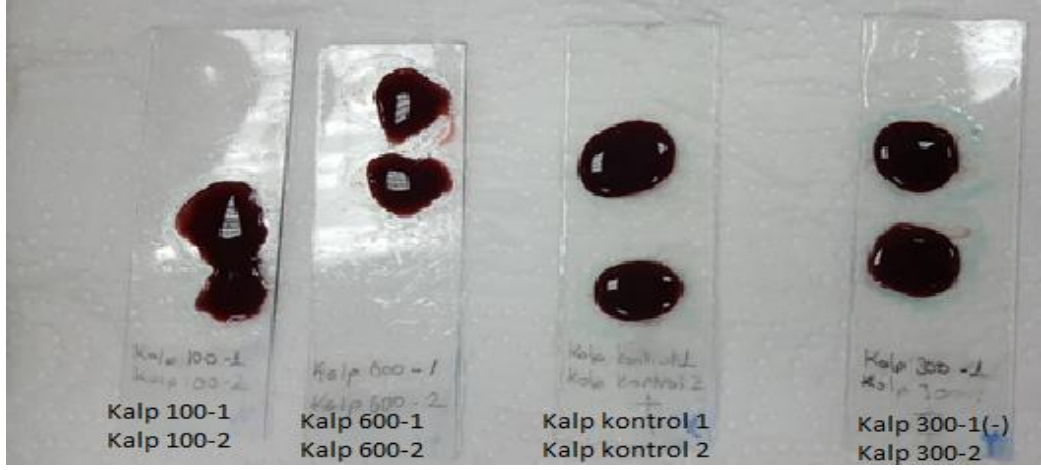


Şekil 2.7: Enzim kompleks antikoruna damlatıldıktan sonra kahverengi lekelerin oluşumu



Şekil 2.8: DAB ve H₂O₂ reaksiyonu [67].

DAB çözeltisi hazırlanırken 2,5 ml saf su, ABC kitte yer alan bir damla buffer çözeltisi, iki damla DAB ve bir damla H₂O₂ kullanıldı. Daha sonra dokuların bulunduğu lamlar yıkama aşaması için ksilene kadar getirilir ve ardından dokuların üzerindeki su, dereceli olarak artan alkol serileri kullanılarak çekilir. Hücrelerin çekirdeklerinin daha görülebilmesi için hemotoksilen karşıt boyası damlatılır (Şekil 2.9). Her bir doku üzerine mikroskopik görüntü alınabilmesi için lamel kapatılır. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen dokular ışık mikroskobu (Best Scope Kameralı Mikroskop) ile incelenir.



Şekil 2.9: Hemotoksilen çözeltisi damlatıldıktan sonra dokular

2.2.5. Mikroskop ile Görüntü Alınması

Kameralı ışık mikroskobu dokularda meydana gelen immunoaktivite sonucu oluşan kahverengi lekelerin çekirdek veya sitoplazma da birikmelerini göstermek için kullanıldı. Fotoğraflama yapıldı ve detaylı inceleme ve analizler yapıldı (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: Kameralı ışık mikroskobu

3. BULGULAR

SIRT3 proteinlerini de oksidatif stresi azaltıcı yönde etki gösteren antioksidatif proteindir. Bu çalışma da ZnO-Np'nin kalp sağlığı için önemli proteinlerden olan SIRT3 ve PDH proteinlerinin düzeyleri ve hücre içi yerleşimindeki değişikliklerin belirlenmiştir.

3.1. SIRT3 Proteininin Kontrol Grubu Kalp Dokusundaki Ekspresyonu

Bu çalışmada mevcut dört rat grubundan birisine ZnO verilmemiş ve gelişimlerinin normal düzeyde kalması sağlanmıştır. Alınan doku kesitine ABC boyama prosedürüne göre boyama işlemleri yapılmış ve görüntülü mikroskopta yapılan inceleme sonucunda kontrol grubunda SIRT3 proteini immün-reaksiyonu daha çok sitoplazma içinde çok az miktarlarda çekirdek bölgesinde belirlenmiştir.

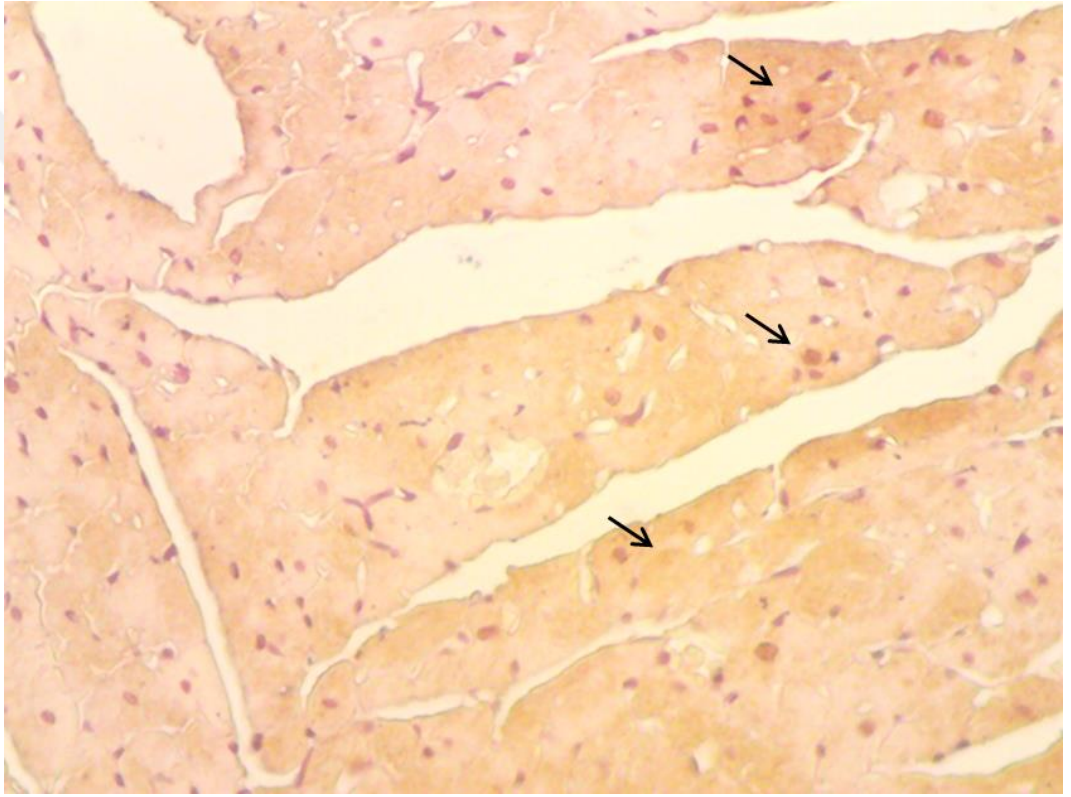
Kalp dokularında kalbi koruyan ve kalpte oksidatif stresin azalmasına sebep olan SIRT3 proteinlerinin içsel (endojen) olarak bulunduğu anlamına gelmektedir. Görüntülü mikroskop ile kontrol grubu için görüntü alınmış olup bunların içerisinde renkli lekelenmenin net olarak görüldüğü kısımlar incelenerek seçilmiştir. Şekil 3.1'de kontrol grubunda kahverengi lekelenmelerin genellikle sitoplazma ve az miktarda çekirdek bölgesinde olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1: Kontrol grubu rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi. Oklar SIRT3 immün-boyama gözlenen yerleri göstermektedir. 200x büyütme kullanılmıştır

3.2. SIRT3 Proteininin 100 mg/kg ZnO-Np Uygulanan Ratlarda Hücre İçi Yerleşimi

100 mg ZnO-Np verilmiş olan ratlardan alınan doku kesitleri immünokimya boyama yöntemiyle boyandı. Boyama işleminden sonra alınan mikroskopik görüntüde SIRT3 protein immün boyaması sonucu kahverengi lekelerin hem çekirdek hem de sitoplazma da oldukça arttığı görüldü. Şekil 3.2’de 100 mg/kg ZnO verilmiş olan ratların kalp dokuları içindeki yerleşimleri verilmiştir.

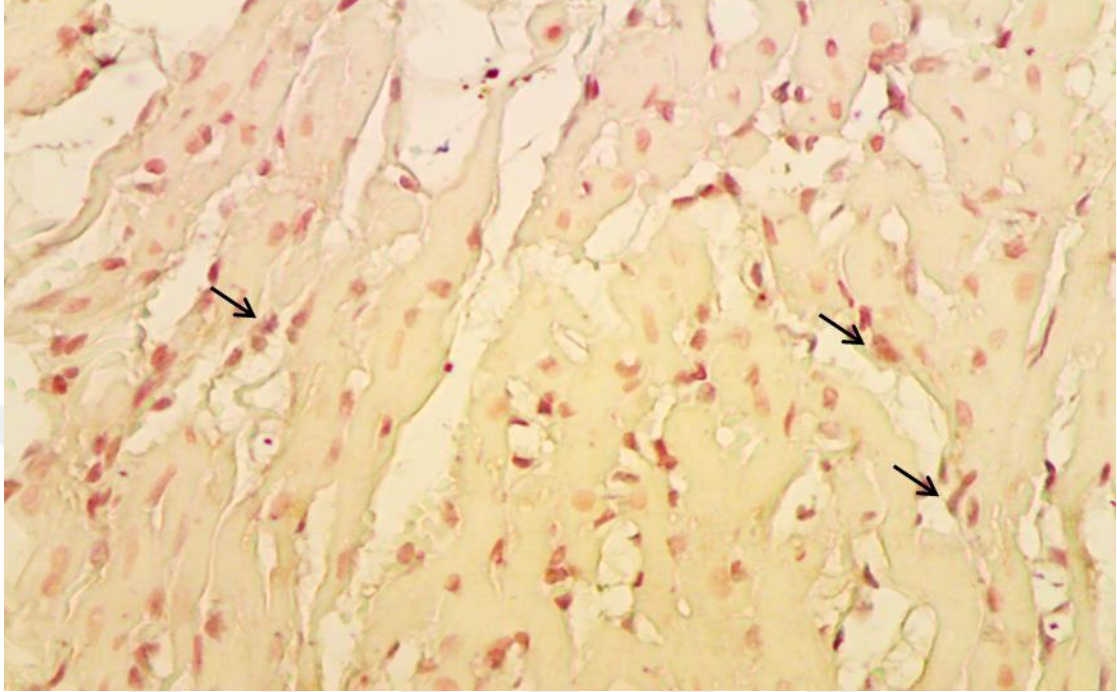


Şekil 3.2: 100 mg/kg ZnO verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi. Oklar SIRT3 immün-boyama gözlenen yerleri göstermektedir. 200x büyütme kullanılmıştır

3.4. SIRT3 Proteininin 300 mg/kg ZnO Uygulanan Ratlarda Hücre İçi Yerleşimi

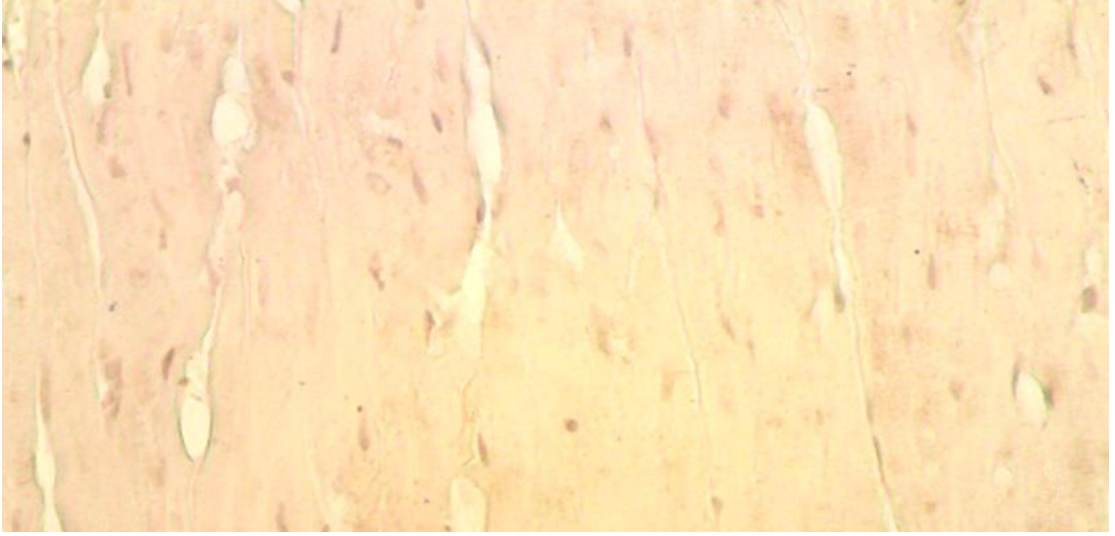
300 mg/kg ZnO uygulanan ratlardan bir grup negatif kontrol grubu olarak seçilmiştir. Daha sonra görüntüleme mikroskobu ile SIRT3 immün boyaması büyük miktarda çekirdekte ve çok az miktarda sitoplazmikte görüntülenmiştir (Şekil 3.3). 300 mg/kg

ZnO uygulanmış olan ratlardan alınan görüntülerde SIRT3 proteinlerinin birikmiş olduğu kahverengi alanlar Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi. Oklar SIRT3 immün-boyama gözlenen yerleri göstermektedir. 200x büyütme kullanılmıştır

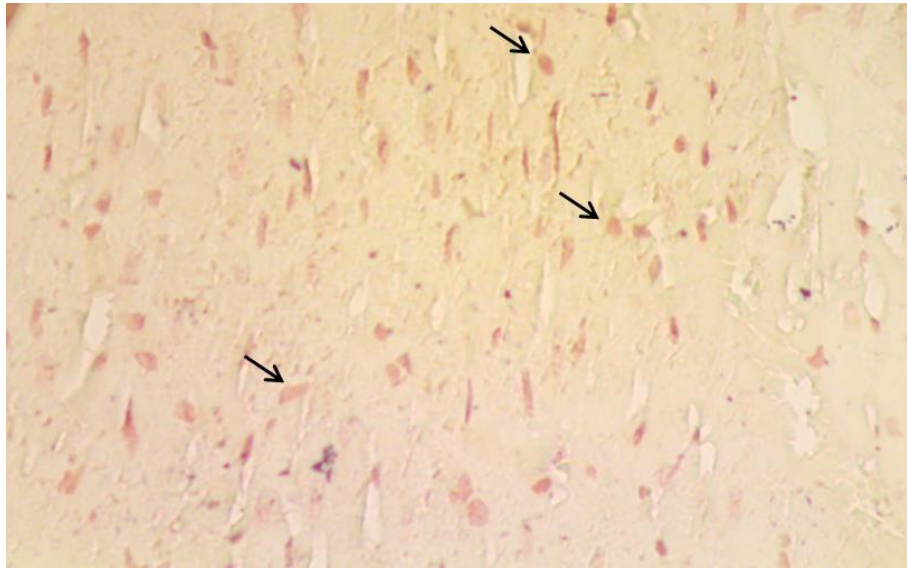
ZnO-Np uygulanan ratlardan her grup için bir grup negatif kontrol grubu olarak seçilmiştir. Bu gruba birincil antikor damlatılmamıştır. Birincil antikor anahtar kilit uyumunda temel zinciri oluşturduğundan negatif kontrol grubunda ilk basamakta herhangi bir bağlanma olmayacaktır. Bunun üzerine ABC kitte yer alan ikincil ve üçüncül antikorlar uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu için alınan mikroskopik görüntü Şekil 3.4'dedir.



Şekil 3.4: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında negatif kontrol. 200x büyütme kullanılmıştır

3.4. SIRT3 Proteininin 600 mg/kg ZnO Uygulanan Ratların Kalp Dokularında Hücre İçi Yerleşimi

600 mg ZnO-Np verilmiş olan ratlardan alınan kalp doku kesitleri ABC kit yöntemiyle boyandı. Boyama işleminden sonra alınan mikroskopik görüntüde, Şekil 3.5’de görüldüğü gibi SIRT3 immün boyamasının 300 mg ZnO-Np verilmiş dokularda olduğu gibi çekirdekte yoğunlaştığı ve sitoplazmadan büyük ölçüde kaybolduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.5: 600 mg/kg ZnO verilen rat kalp dokularında hücre içi SIRT3 yerleşimi. Oklar SIRT3 immün-boyama gözlenen yerleri göstermektedir. 200x büyütme kullanılmıştır.

3.5 ZnO-Np Pirüvat Dehidrojenaz Enzimi (PDH) Üzerine Etkisi

PDH, glikolizi TCA (Krebs döngüsü veya sitrik asit döngüsü) döngüsüne bağlar. Bu enzim kompleksi beş kofaktör ve üç enzimden oluşur. PDH asetil-coA üretmek için piruvatı okside eder. Piruvatın oksidasyonu, hücrenin mitokondrisinde meydana gelir. PDH kompleksi üç enzim kullanır:

E1 (PDH): Protetik grubu olarak tiaminpirofosfat (TPP) kullanan PDH.

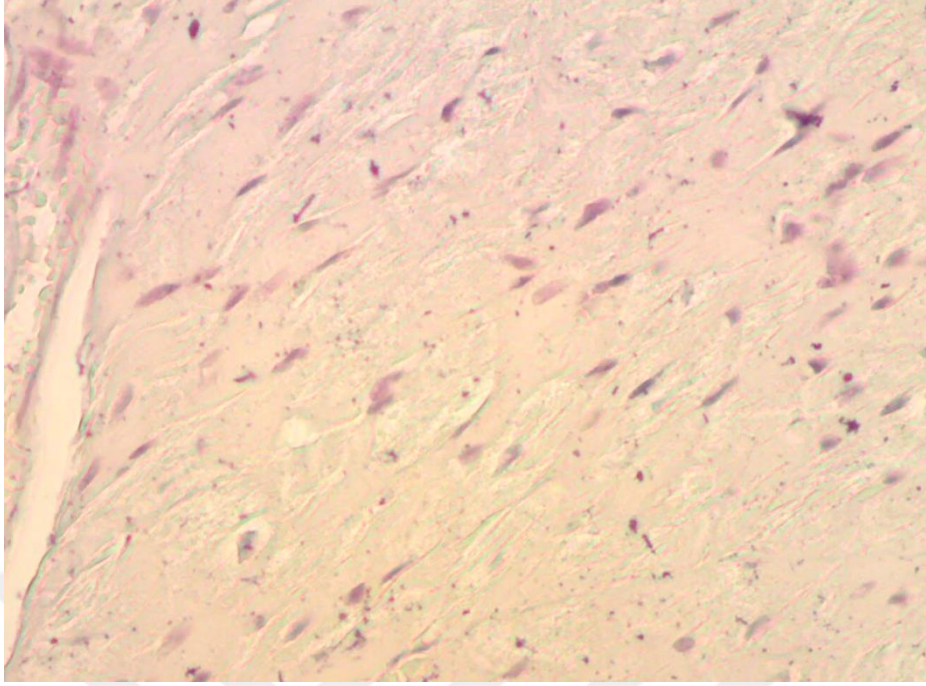
E2: Protez grupları olarak lipoamid ve koenzim A'yı (ayrıca koASH olarak da bilinir) kullanan Dihidrolipoililemelesi.

E3: Kovafaktörler olarak flavinadenin nükleotidi (FAD) ve NAD kullanılan dihidrol ipoil dehidrojenaz. Aşağıda piruvatın asetilcoA ve CO₂'ye dönüştürülmesinin net reaksiyonu verilmiştir.

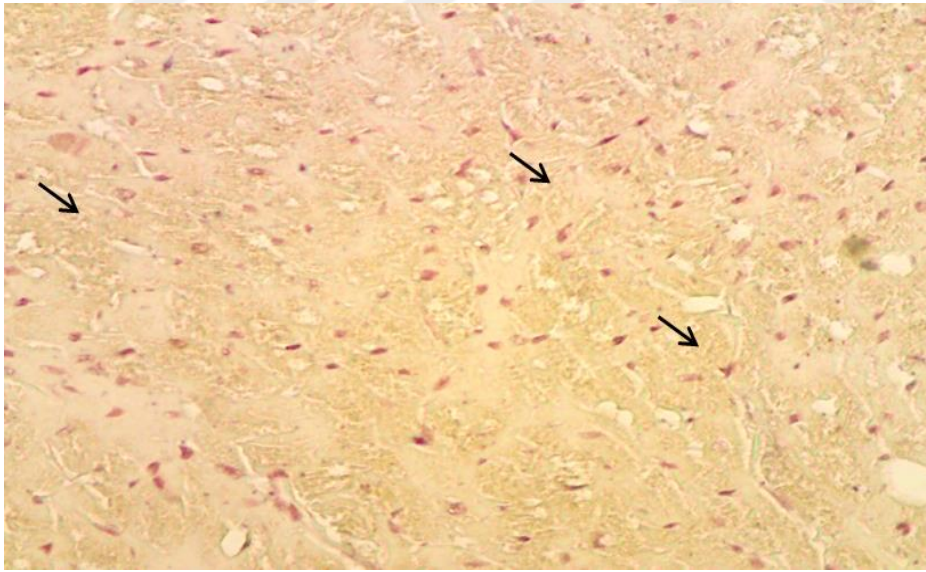


PDH, glikozun mitokondride yıkılıp oksidatif fosforilasyonda kullanılmasında rol alan bir enzimdir. Mitokondride bulunur. Piruvatın asetil koenzim A'ya dönüştürülmesinde rol alır. Ayrıca PDH'in fosforilasyonu piruvat dehidrojenaz kinaz 4'ü (PDK4) inhibe eder. Bu kinaz enzimi kanser tedavisi için önemli bir proteindir [68].

Tüm dokulardan biri negatif kontrol grubu olarak seçilse de, en iyi görüntünün 300 mg/kg ZnO-Np uygulanan ratlardan alınması nedeniyle 300 mg/kg ZnO-Np uygulanan ratların doku görüntüsü konulmuştur (Şekil 3.6). Yapılan çalışmaya göre, PDH enzimi miktarı, ZnO-Np artmasıyla birlikte artmıştır. Şekil 3.7'da görüldüğü üzere dokuda oluşan kahverengi lekelerin sitoplazmada ağırlıkta olduğu görülmüştür.



Şekil 3.6: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında negatif kontrol. 200x büyütme kullanılmıştır



Şekil 3.7: 300 mg/kg ZnO-Np verilen rat kalp dokularında hücre içi PDH yerleşimi. Oklar SIRT3 immün-boyama gözlenen yerleri göstermektedir. 200x büyütme kullanılmıştır

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda sağlık üzerine yapılan araştırmaların çoğu, hastalıkların kolay ve en kısa sürede tedavi edilebilmesi yönündedir. Bu sebeple birtakım nanopartiküller, enzimler veya proteinlerin etkilerini araştıran ilgi çekici çalışmalar mevcuttur. ZnO-Np'ler de bu çalışmalarda ciddi ilgi çekmektedir. ZnO-Np sadece sağlık sektöründe değil, kozmetik, plastik, elektronik ve kimyasal süreçlerde de karşımıza çıkmaktadır. ZnO-Np kanser ve tümör üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kurkumin yüklü ZnO-Np (ZnO-PBA-Curcumin), MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde oksidatif stres ve mitokondriyal hasara neden olarak apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur [69]. Buna göre, ZnO-PBA-Curcumin, meme kanseri tedavisi için potansiyel bir tedavi yöntemini temsil edebilir sonucuna ulaşıldı [69]. Kumar J ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise bir bitki türü olan Withaniasomnifera (WS) ekstratı ve Withaferin A (WA) takviyesinin deney ratlarında, ZnO-Np üzerindeki immünomodölatör ve koruyucu etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, hayvanlar 28 gün boyunca WS ve WA ile birlikte ZnO-Np'lere maruz bırakılmış ve vücut ağırlığı, organ katsayısı, sitotoksosite, nitrik oksit (NO), toplam serum proteini, fagositoz ve TLR6 ve ARG genlerinin gen ekspresyon seviyeleri gibi çeşitli parametreler kontrol edilmiştir. Çalışma, fagositozda doza bağımlı azalmanın, TLR6'nın yukarı regölasyonu ile birlikte NO üretim seviyelerinde bir artış olduğunu, ZnO-Np'leri verildiğinde arginaz geninin anlamlı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre ZnO-Np'lerin verilen dozlara göre bitkilerin etkilerini artırdığı ancak dozun artırılmasıyla toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır [70].

ZnO-Np'in rat bağırsaklarındaki mikrobiyota kısa yağ asitlerinin üretimi ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışma da 14 gün boyunca ratlara HAHp (3.0) / ZnO-Np uygulandı. Dışkı numunelerinin yüksek verimli 16S ribozomal RNA gen sekanslaması, HAHp (3.0) / ZnO-Np'lerin dişi ratlarda Firmicute'leri arttırdığını ve Bacteroidetes bolluğunu azalttığını ortaya koydu. Bu sonuçlar, HAHp (3.0) / ZnO-Np'lerin bağırsak mikrobiyosunun güvenli bir düzenleyicisi olarak potansiyel uygulamalara sahip olabileceğini veya gıda ürünlerinde kullanılan bir antioksidan olarak kullanılabileceğini göstermiştir [71].

Yapılan bir başka çalışma da *Wistar albino* türündeki ratlara 600 mg/kg ve 1 g/kg vücut ağırlığı olmak üzere günde iki kez ZnO-Np verildi. Burada amaç ZnO-Np'in nefrotoksiteye karşı koruyucu etkilerini tespit etmektir. Böbrek dokusu için histopatolojik inceleme yapıldı. Serum üre ve kreatinin düzeyleri de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ZnO-Np verilen ratlarda anlamlı olarak artmıştır. Ek olarak, böbrek dokularında enzimatik olmayan antioksidan indirgenmiş Glutasyon (GSH) belirgin bir azalma görülmüş ve serum glikoz seviyeleri artmıştır. Bu biyokimyasal bulgular, yüksek dozda ZnO-Np alan hayvanlarda çok sayıda böbrek glomerülünün atrofi ve parçalanma geçirdiğini gösteren, böbrek dokularının histopatolojik incelemesiyle desteklenmiştir. Bu etkilerin doza bağlı olduğu anlaşıldı ayrıca ZnO-Np'ler, oksidatif strese ve buna bağlı vasküler komplikasyonlara karşı faydalı olduğunu da göstermektedir. Çünkü ZnO böbrekteki nefrotoksiteyi belirgin düzeyde azaltmıştır [72].

ZnO-Np'in insan bedeninde enzimler, proteinler, DNA, kromozomlar, nükleotit ve diğer pek çok yapıyla etkileşimi mevcuttur. SIRT proteinleri, enerji metabolizması ve yaşlanmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan NAD⁺ bağımlı histon diasetilaz ailesidir. SIRT'lerin aktivasyonunun, lipid metabolizması ve antioksidanlar üzerinde yararlı etkileri olduğu ve bu proteinlerin aterogenezdaki rollerinin araştırılmasına yol açtığı görülmektedir. Her ne kadar klinik veriler sınırlı olsa da metformin ve resveratrol gibi SIRT aktivatörlerinin mevcudiyeti, SIRT'lerin insan aterosklerozunu önlemedeki rolünü daha iyi anlamak için araştırma yapmak için mükemmel bir fırsat sağladığı belirtilmiştir [73].

Muller ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre mitokondride yer alan SIRT3 proteini, solunumla ilişkili reaksiyonları etkiler. Mitokondriden SIRT3'ün uzaklaştırılmasıyla mitokondriyal kompleks 3 inhibitörü asetilasyonu yüksek seviyelere ulaşmıştır. Kompleks 3 reaktif oksijen türlerinin üretimini artırdığını bildirmişlerdir [74]. SIRT3 yine mitokondride bulunan diğer bir enzim olan PDH'i diasetile ederek onun enzimatik aktivitesini artırarak, piruvatın TCA döngüsüne katılmasını sağlar [2,4]. Çalışmamızda immuno-boyama sonucu aldığımız sonuçlar ZnO-Np'in PDH düzeylerinde bir miktar artmaya sebep olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar ZnO-Np'in

kardiyomiyosit hücrelerde enerji üretimi üzerine yararlı etkilerinin olabileceğini önermektedir.

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise kanser ve SIRT3 proteinleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Normal (wild tip) SIRT3^{+/+} ve SIRT3 geni silinen ratlarda ve SIRT3^{-/-} embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) izole edilmiş ve hücre bölünme oranları karşılaştırılmıştır. SIRT3 geninin silindiği ratlarda kanser hücrelerinde artış olduğu görüldü [75].

Oksidatif stres üzerine bir araştırma yapan Santos ve arkadaşları, SIRT1 proteinlerinin mevcut olduğu yapıya Zn verilmesi üzerine burada oluşan bir anahtar kilit uyumu gördüler. Çinkonun SIRT1 proteinine bağlandığı yerler sarı renge dönüştü. Geri kalan kısımlar ise tortu olarak ayrıldı. Yapılan reaksiyon da çinkonun katalitik reaksiyonlara fayda sağladığı ancak yüksek konsantrasyonlarda kayıplara neden olduğunu tespit edilmiştir [76]. Tüm bu bilimsel araştırmalar SIRT ile ZnO arasında doğrudan bir ilişki olabileceğini ortaya koymaktadır.

Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD) enziminin bir kofaktörü olup, süperoksit radikalının daha az zararlı O₂ ve H₂O₂'ye ayrışmasını katalize eder, ardından katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ile detoksifiye edilir. Aynı zamanda, NADPH oksidazları inhibe eder ve azalmış ROS üretimine neden olur. Ayrıca, çinko, yüksek sistein içeriği nedeniyle mükemmel ROS temizleyicileri olan MTS'nin üretimini tetiklemektedir. Protein sülfhidrillerin çinko tarafından oksidasyona karşı stabilizasyonu, çinkonun oksidatif işlemleri engellediği başka bir mekanizmadır. Çinko, doğrudan tiyol grubuna bağlanır, protein içindeki sülfhidril grubuna yakın bağlanarak sterik engel oluşturur ve protein içerisinde konformasyonel değişikliklere yol açan diğer bölgelere bağlanır. Bütün bunlar sülfidrilin aktivitesinin azalmasına neden olur. Ayrıca, çinko, öncelikle Fenton reaksiyonları yoluyla serbest radikallerin oluşumunu katalize eden bakır ve demir gibi redoks aktif geçiş metallerini antagonize eder. Bu geçiş metalleri, demir ve karbonhidratlar, DNA ve bakır için enzimler gibi nükleotidler, glikoz ve sitratlar gibi hücrel bileşenlerle kompleksler oluşturur [77]. Metal kompleksleştğinde, tuzağa düşüp H₂O₂ ile reaksiyona girer ve reaktif hidroksil radikali (HO) oluşturur. Bu, lipid

peroksidasyonuna, DNA ve protein hasarına ve ardından ciddi doku hasarına yol açar. Çinko, bakır ve demirin yerini alabilir ve lokalize oksidatif hasarı azaltabilir. Sağlıklı insan süjelerin çinko desteği, plazmadaki oksidatif stres ile ilişkili yan ürünler malondialdehit (MDA), 4-hidroksialkilenler (HAE) ve 8-hidroksideoksiganini azaltmıştır. Bu etki, genç insanlara göre genellikle daha düşük plazma çinko konsantrasyonuna sahip yaşlı bireylerde de görülmüştür [77].

Yapılan bu çalışmada, kalp dokusu içerisinde yer alan SIRT3 ile farklı dozlardaki ZnO-Np'in etkileşimi incelenmiştir. Mitokondride bulunan SIRT3 proteinleri, oksidatif stresin önüne geçerek antioksidan etki yaratma özelliğine sahiptirler. Mitokondri hücrede enerji olaylarının meydana geldiği yerdir. SIRT3 proteini birçok antioksidan genin aktivasyonunu artırarak oksidatif strese karşı koruma meydana getirebildiği bildirilmiştir [8]. Mitokondri heterojendir ve temel olarak hücre fonksiyonlarına ve doku homeostazisine katkıda bulunur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu genel hücre işlevini, doku hasarını ve hastalıkları tehlikeye atar. Mitokondri dinamikleri, biyoenerjisi ve redoks homeostazı kardiyometabolik hastalıklardaki fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olur. Mitokondrinin işlevleri esasen matrislerindeki enzimlere dayanır. Kardiyovasküler hastalıklar son zamanlarda görülen ölümler arasında ilk sıralarda yer alır. Mitokondriyal olarak oluşan bozuklukların çoğu kardiyovasküler sistemde sorunlara neden olur. Yapılan son çalışmalar, mitokondriyal NAD⁺ bağımlı diasetilaz etkisi olan SIRT3 proteinlerinin mitokondriyal fonksiyonlar ve glukoz ve yağ asidi bozuklukları ile oksidatif stres üzerinde etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. [78,4]. Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, SIRT3 proteini kalp dokusunu koruduğuna ve glukoz ve lipid metabolizmasını düzenlediğine dair bulgular elde etmişlerdir. Ayrıca SIRT3 proteinlerinin kalbi metabolik bozukluklardan koruyan miyokard ATP seviyelerini de koruduğu sonucuna ulaştılar [78]. Son raporlar, SIRT3'ün çeşitli kalp hastalıklarının korunmasında rol oynadığını göstermektedir. Bir başka çalışmada diyabet ile kalp hastalıkları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Diyabetik kardiyomiyopati diyabete bağlı bir kalp hastalığıdır ve mitokondriyal fonksiyonlarla ilişkilidir [79]. Yapılan çalışmaya göre, erkek ratlara diyabete neden olan streptozotosin maddesi 50 mg/kg kullanılarak ratlar uyarıldı. Kan şekeri değerleri 200 mg/dL olan ratlar rastgele iki gruba ayrıldı. Ratlara insülin düşürücü etken maddeler (resveratrol)

verildi ve oksidatif stres ve mitokondriyal parametreler değerlendirildi. Sekiz hafta sonunda diyabetik rat kalbi, kardiyak hücre boyutunun azaldığını, oksidatif stresin arttığını ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda yer alan enzimlerin aktivitelerinin azaldığını gösterdi. Diyabetik kalpte SIRT3 ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM) ekspresyonu ve aktivitesi azaldı. Resveratrolün SIRT3'ü aktive ettiğini, SIRT3'ün diyabetik rat kalbinde hücresel büyüklüğü ile birlikte mitokondriyal fonksiyonu koruduğunu göstermektedir [79].

Oksidatif stresin azaltılabilmesi için antioksidan savunma sisteminin desteklenmesi gerekmektedir. SIRT3 proteini antioksidan savunma sistemini destekleyen bir yapıdadır. Mitokondriyal SIRT'ler, mitokondriyal enerji ve redoks metabolizmasını da düzenler ve kardiyovasküler homeostazda rol oynarlar. SIRT3'ün, normal mitokondriyal biyolojik fonksiyonun geri dönüşümlü protein lizin diasetilasyonu yoluyla korunmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. SIRT3, enerji metabolizması, reaktif oksijen türlerinin üretimi, elektron taşıma zinciri akışı, mitokondriyal zar potansiyel bakımı ve mitokondriyal dinamiği gibi mitokondriyal biyolojik işlemlerde yer alan çeşitli substratlara sahiptir. SIRT3'ün baskılanmasıyla, mitokondrinin işlevsel eksiklikleri nedeniyle çeşitli kardiyovasküler bozuklukların gelişmesine katkıda bulunabilir. SIRT3'ün aktivasyonu, mitokondriyal fonksiyonun iyileştirilmesi ve ilgili kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için umut verici bir terapötik stratejiyi temsil edebilir. Elde edilen bu bilgilerden şu sonuca varılıyor ki SIRT3 oksidatif stres oluşumuna karşı mitokondrinin fizyolojik fonksiyonunu korumada çok önemli bir etkiye sahiptir [80,4]

Tüm bu araştırmalar SIRT proteinlerinin kalp sağlığıyla ilişkili olduğunu ve diğer organlarda mitokondriyal fonksiyonların etkinliğinde önemli rol oynadığını gösterir. Yapılan bu çalışmada elde edilen verilere göre, kontrol grubunda, hem çekirdek hem de sitoplazmada SIRT3 immun-reaktivitesi mevcut olduğu görülmüştür. 100 mg/kg ZnO verilen ratların doku incelenmesi yapıldığında, SIRT3 protein ifadesini gösteren kahverengi boyama bölgelerinin kontrol grubuna oranla arttığı ve boyamanın hem çekirdekte hem de sitoplazma da mevcut olduğu görülmüştür. 300 mg/kg ZnO verilen ratların doku incelemesinde ise kahverengi bölgelerin yine hem çekirdekte hem de

sitoplazma da mevcut olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ancak doz artırımıyla birlikte 600 mg/kg ZnO verilen ratlardan alınan doku örneklerinin mikroskopik incelemesinde kahverengi lekelenmelerin sitoplazma da mevcut olmadığı ve SIRT3 proteinlerinin çekirdek bölgesine doğru hareket ettiği ve az da olsa çekirdekte birikmeler olduğu saptanmıştır. Burada SIRT3 proteinlerinin hücrel stres kaynaklı olarak mitokondri içinden çekirdeğe doğru gittiği düşünülmektedir. SIRT3'ün çekirdekte bulunması, onun asetile bazı histon proteinleri diasetile etme özelliği gösterdiği düşünülmektedir [81,72]. SIRT3'ün çekirdekteki rolünün hücrel stresle ilişkili olabileceği ve nükleer kodlanmış bazı mitokondriyal genlerin ifadelerinin düzenlenmesi ile açıklanmıştır [81,72]. SIRT3 ifadesini gösteren kahverengi renklerin kontrol gruplarda dozlara göre farklılık göstermesi sebebiyle ZnO-Np 300 mg/kg dozajında kullanıldığında SIRT3 proteinlerinin miktarını artırarak kalp dokusunu koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, 600 mg/kg'dan daha yüksek dozlar verildiğinde, çekirdek ve sitoplazmada kahverengi lekelerin azalması, ZnO-Np'ın kardiyomiyosit hücrelerinde bir toksik etki yaratmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, ZnO dozunun uygun olarak kullanılması ile SIRT3 proteinlerinde görülen artışla birlikte kalp sağlığının korunabileceği, yine uygun dozlardaki ZnO-Np'lerin PDH'ı da etkileyerek kalp hastalıkları gibi durumların tedavisinde etkili bir rol oynayabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- [1] Doğan, N., Bingolbali, A. (2018). Sol-Jel Metodu ile Hazırlanmış Nikel Katkılı ZnO Nanotozların Manyetik Özelliklerinin İncelenmesi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22 (3), 862-869
- [2] Ozden, O., Park, SH., Wagner, BA., Yong Song, H., Zhu, Y., Vassilopoulos, A et al. (2014). SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells. *Free radical biology & medicine*, 76: 163–172.
- [3] M.B, Scher., A, Vaquero., D, Reinberg., (2007). SIRT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes & Development*, 21, pp. 920-928.
- [4] Cheng, Y., Ren, X., Gowda, AS., Shan, Y., Zhang, L., Yuan, YS., Patel, R., Wu, H., Huber-Keener, K., Yang, JW., Liu, D., Spratt, TE., Yang, JM., (2013). Interaction of SIRT3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. *Cell Death Dis.* 4:e731.
- [5] Kim, HS., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, KS., Aykin-Burns, N., Pennington, JD., Van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, KM., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, SH., Singh, KK., Abdulkadir, SA., Spitz, DR., Deng, CX., Gius, D., (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 17(1):41-52.
- [6] Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., Jeong, S., Hayes, SD., Jedrychowski, MP., Vyas, FS., Zaganjor, E., Guarani, V., Ringel, AE., Gygi, SP., Harper, JW., Haigis, MC., (2016). Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell.* 167(4):985-1000.e21.
- [7] Tao, R., Coleman, MC., Pennington, JD., Ozden, O., Park, SH., Jiang, H., Kim, HS., Flynn, CR., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, AK., Spitz, DR., Gius, D., (2010). Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell.* 40(6):893-904.

- [8] Ozden, O., Park, SH., Kim, HS., Jiang, H., Coleman, MC., Spitz, DR., Gius D., (2011). Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY)*. 3(2):102-7.
- [9] Park, SH., Ozden, O., Jiang, H., Cha, YI., Pennington, JD., Aykin-Burns, N., Spitz, DR., Gius, D., Kim, HS., (2011). Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *Int J Mol Sci*,12(9):6226-39.
- [10] Zhu, Y., Park, SH., Ozden, O., Kim, HS., Jiang, H., Vassilopoulos, A., Spitz, DR., Gius, D., (2012). Exploring the electrostatic repulsion model in the role of Sirt3 in directing MnSOD acetylation status and enzymatic activity. *Free Radic Biol Med*, 53(4):828-33.
- [11] Özbay, E., Gülce, H., (2014). Çinko oksit Nanopartikülleri Sentezi ve Karakterizasyonu. *S.Ü.Müh. Bilim ve Tekn. Dergisi*,2(4),1-5.
- [12] Topkaya, E., (2014). Boyar Madde, Pestisit ve Antibiyotik İçeren Suların Fotokatalitik Proseslerle Arıtımında ZnO/TiO₂ Kompozit Plakaların Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı,44.
- [13] Kerli, S., Alver, U., Yasyakası, H., Tekerek, S., (2014). Flor Katkılı ZnO İnce Filmlerin Üretimi ve Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2 (1), 56-63
- [14] Tok, K.C., Kartal, Y., Kayaaltı, Z., (2017). Sirtuins As Drug Targets Affecting Mitochondria Functions, *The Turkish Journal of Occupational / Environmental Medicine and Safety*, 2 (1), 307-307
- [15] Özgür, U., Alivov, Y., Liu, C., Teke, A., Reshchikov, M. A., Doğan, S., Avrutin, V., Cho, S. J., Morkoç, H., (2005). A comprehensive review of ZnO materials and devices, *Journal Of Applied Physcs*, 98, 298-301.
- [16] Fukui, H., Iwahashi, H., Endoh, S., Nishio, K., Yoshida, Y., Hagihara, Y., Horie, M., (2015). Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles. *J. Occup. Health* 57, 118–125
- [17] Özgür, Ü., Alivov, Y.I., Liu, C., Teke, A., Reshchikov, Ma., Doğan, S., Avrutin, V., Cho, S.-J., Morkoc, H., (2005). A comprehensive review of ZnO materials and devices. *J. Appl. Phys.* 98, 11.

- [18] Fan, Z., ve Lu, J.G., (2005). Zinc Oxide Nanostructures: Synthesis and Properties, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 1561-1573.
- [19] Zhong, Q., (1996). Precipitation and Characterization of Well Defined Colloids by Precipitation and Aerosol Methods, PhD Thesis, Clarkson University, Department of Chemistry, USA.
- [20] Zakaria, M., Johari, S., Ismail, M., Hashim, U., (2017). Characterization of Zinc Oxide (ZnO) piezoelectric properties for Surface Acoustic Wave (SAW) device. 162, 01055.
- [21] Steele B.C.H. (1991). *Electronic Ceramics*. Elsevier Science Publishing Co., London.
- [22] Wang, Z.L., (2004). Zincoxiden an ostructures: growth, properties and applications, *J. Phys.: Condens. Matter.*, 16, 829-858.
- [23] Heideman, G., (2004). Reduced zinc oxide levels in sulphur vulcanisation of rubber compounds-mechanistic aspects of the role of activators and multifunctional additives.
- [24] Yamamoto, O., (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zincoxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3, 643-646.
- [25] Porter, F.C., 1991. *Zinc handbook: properties, processing, and use in design*. Crc Press.
- [26] Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M., 1996. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J. Chem. Eng. Jpn.* 29, 627–633.
- [27] Zhang, L., Yunhong., Yulong D., Nikolaos D., Lars J., Malcolm P., Alex J O’N., and David, WY., (2010). Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1625-1636.
- [28] Yamamoto, O., (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zincoxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3, 643-646.
- [29] Jalal, R., Goharshadi, E.K., Abareshi, M., Moosavi, M., Yousefi, A., Nancarrow, P., (2010). ZnO nanofluids: Green synthesis, characterization, and antibacterial activity. In: *Materials Chemistry and Physics*, 121 (1-2), 198-201

- [30] Dutta, R.K., Bhavani P., Nenavathu M.K.G., and AVR. R., (2010). Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 143-150.
- [31] Sirelkhatim, A., Shahrom M., Azman S., Noor H., Mohamad K., Ling C. A., Siti K., Mohd B., Habsah H and Dasmawati M., (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7, 219-242.
- [32] Selvam, S.R., Rajiv G., J, Suresh., S, Gowri., S, Ravikumar and M, Sundrarajan., (2012). Antibacterial effect of novel synthesized sulfated β -cyclodextrin cross linked cotton fabric and its improved antibacterial activities with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticle coating. *International journal of pharmaceuticals*, 434, 366-374.
- [33] Rajendra, R., C, Balakumar., Mohammed, A., S, Jayakumar, K, Vaideki and E, Rajesh., (2010). Use of zinc oxide nanoparticles for production of antimicrobial textiles. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2, 202-208.
- [34] Adams, T., Laura K, Delina Y Lyon, and Pedro JJ A. (2006). Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, 40, 3527-3532
- [35] Vasanthi, M, K Ravichandran, N Jabena Begum, G Muruganatham, S Snega, A Panneerselvam, and P Kavitha. (2013). 'Influence of Sn doping level on antibacterial activity and certain physical properties of ZnO films deposited using a simplified spray pyrolysis technique'. *Superlattices and Microstructures*, 55, 180-90.
- [36] Li, L.H., Jian, C.D., Hui, R.D., Zi, L.L and Xiao, L., (2010). Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal*, 160, 378-382.
- [37] Tayel, A.A., Wael F.E., Shaabanmoussa, A.F., Hoda, M., Mohammed, F and Leon, B., (2011). Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against food born pathogens, *Journal of Food Safety*, 31, 211-218.
- [38] Wahab, R., Maqsood A, S., Quaiser, S., Sourabh, D., Javed, A., Javed, M., Abdulaziz A.A.K and Hyung, S.S., (2014). ZnO nanoparticles induced oxidative

stress and a poposis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 267-276.

- [39] Queiroz, A.M.D., Paulo, N.F., Léa, A.B.D.S., Sada A., Raquel, A.B.D.S and Izabel, Y.I., (2009). Antibacterial activity of root canal filling materials for primaryteeth: zincoxide and eugenolcement, Calen pastet hickened with zincoxide, Sealapex and EndoREZ. *Braziliandental Journal*, 20: 290-296.
- [40] Heyden, R. J., (2013). *Anatomy & Physiology*. Open Stax College, Chapter 19, The Cardiovascular System: The Heart.
- [41] Michan, S and Sinclair, D., (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404: 1-13.
- [42] Lucena Cacace, A., Umeda, M., Navas, LE., Carnero, A., (2019). NAMPT as a Dedifferentiation-Inducer Gene: NAD⁺ as Core Axis for Glioma Cancer Stem-Like Cells Maintenance 9,232.
- [43] Xu, D., Jiang, X., He, H., Liu, D., Yang, L., Chen, H., Wu L., Geng, G., Li, Q.,(2019). SIRT2 functions in aging, autophagy, and apoptosis in post-maturation bovine oocytes. 116639.
- [44] Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C. and Horikawa, I., (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4623-4635.
- [45] Kanwal, A., Pillai, V.B., Samant, S., Gupta, M., Gupta, M.P., (2019). The nuclear and mitochondrial sirtuins, SIRT6 and SIRT3, regulate each other's activity and protect the heart from developing obesity-mediated diabetic cardiomyopathy.
- [46] Parihar, P., Solanki, I., Mansuri, M.L. and Parihar, M.S., (2015). Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. *Experimental Gerontology*, 61, 130-41.
- [47] Chen, K.L., Li, L., Li, C.M., Wang, YR., Yang, F.X., Kuang, MQ., Wang, GL., (2019). SIRT7 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Injury by Suppressing the NF- κ B Signaling Pathway. 1-15.
- [48] De Nigris, F., Cerutti, J., Morelli, C., (2002). Isolation of a SIR-like gene, SIR-T8, that is overexpressed in thyroid carcinomacelllines and tissues. *Br J Cancer*, 86, 917-923.

- [49] George, J., Nihal, M., Singh, C.K., Ahmad, N., (2019). 4'-Bromo-resveratrol, a dual SIRT1 and SIRT3 inhibitor, inhibits melanoma cell growth through mitochondrial metabolic reprogramming.
- [50] Cohen, H.Y., Miller, C and Bitterman, K.J., (2004). Caloric restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 305, 390-392.
- [51] Sommer, M., Poliak, N and Upadhyay, S., (2006). Delta Np63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse. *Cell Cycle*, 5, 200-205.
- [52] Nayagam, VM., Wang, X., Tan, YC., et al. SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents. *J Biomol Screen* 2006; 11: 959-67.
- [53] Senawong, T., Peterson, VJ and Leid, M., (2005). BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys*, 434, 316-325.
- [54] Palmirotta, F., Cives, M., Della-Morte, D., Capuani, B., Lauro, D., Guadagni, F and Silvestris, F., (2016). Sirtuins and Cancer: Role in the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
- [55] Heyden, R. J., (2013). *Anatomy & Physiology*. Open Stax College, Chapter 19, The Cardiovascular System: The Heart.
- [56] By Tim Newman Reviewed by Sullivan, D., PhD., MSN., RN., CNE., COI., (2018). The heart: All you need to know. Last reviewed Wed 10 January.
- [57] Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, FW and Schibler, U., (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 134, 317–328.
- [58] Ding, J., Tang, Q., Luo, B., Zhang, L., Lin, L., Han, L., Hao, M., Li, M., Yu, L., Li, M., (2019). Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathway.

- [59] Arsenijevic, D., Onuma, H and Pecqueur, C., (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 26, 435–439.
- [60] Someya, S., Xu, J., Kondo, K., Ding, D., Salvi, R.J., Yamasoba, T., Rabinovitch, P.S., Weindruch, R., Leuwenburgh, C., Tanokura, M., Prolla, T.A., (2009). Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak dependent mitochondrial apoptosis. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 106, 19432-19437.
- [61] Chen, T., (2018). SIRT1-SIRT3 axis regulates human blood-brain barrier permeability in research.
- [62] Özkan, N., (2005). Microtomy and sectioning. *Aegean Pathology Journal* 2, 35–37.
- [63] Wild, D., (2013). *The Immunoassay Handbook, 4. Edition, Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, Elsevier Ltd.
- [64] Goldberg, R., Richard, J., (1952). Bir Antikor Teorisi – Antijen Reaksiyonları. I. Çok Değerli Antijenin İki Değerli ve Tek Değerli Antikorla Tepkimeleri Teorisi. *Amerikan Kimya Derneği Dergisi*. 74 (22): 5715-5725.
- [65] Spiers, J.A., (1958). Goldberg'in in vitro antijen-antikor reaksiyonları teorisi". *İmmünoloji*.
- [66] Butler, J.L., Barham, B.J., Heidenreich, B.A., (2019). Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for c-fos in rat brain. 936-942.
- [67] Nurjayadi, M., Apriyani, D., Hasan, U., Santoso, I., (2016). Immunogenicity and Specificity of Anti recombinant Protein Fim-C-Salmonella typhimurium Antibody as a Model to Develop Typhoid Vaccine. 1,696.
- [68] Tambe, Y., Terado, T., Kim, C.J., Mukaisho, K.I., Yoshida, S., Sugihara, H., Tanaka, H., Chida, J., Kido, H., Yamaji, K., Yamamoto, T., Nakano, H., Omura S., Inoue H. (2019). Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer. *Mol Carcinog*.
- [69] Kundu, M., Sadhukhan, P., Ghosh, N., Chatterjee, S., Manna, P., Das, J., Sil, P.C.. (2019). pH-responsive and targeted delivery of curcumin via phenylboronic acid-functionalized ZnO nanoparticles for breast cancer therapy. *Journal of Advanced Research*, 18, 161-172.

- [70] Kumar, J., Murli, D.M., Ahmad, H and Gautam, K., (2019). Exploration of immunomodulatory and protective effect of *Withaniasomnifera* on trace metal oxide (zinc oxide nanoparticles) induced toxicity in Balb/c mice. *Molecular Biology Reports*, 46 (10), 1-13.
- [71] Song, R., Yao, J., Shi, Q and Wei, R., (2018). Nanocomposite of Half-Fin Anchovy Hydrolysates/Zinc Oxide Nanoparticles Exhibits Actual Non-Toxicity and Regulates Intestinal Microbiota, Short-Chain Fatty Acids Production and Oxidative Status in Mice. *Mar Drugs*, 16 (1), 23.
- [72] Faddah, L.M., Baky, N.A.A., Al-Rasheed, Nouf M., Al-Rasheed, Nawal M., Fatani, A.J., Atteya, M., (2012). Role of quercetin and arginine in ameliorating nano zinc oxide-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 1062.
- [73] Sosnowska, B., Mazidi, M., Penson, P., Gluba-Brzózka A., Rysz, J and Banach, M., (2017). The sirtuin family members SIRT1, SIRT3 and SIRT6: Their role in vascular biology and atherogenesis. *Atherosclerosis*, 265, 275-282.
- [74] Muller, F.L., Liu, Y. and Van Remmen, H., (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (47), 49064–49073.
- [75] Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S.H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz, D.R., Deng, C.X and Gius, D., (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17, 41-52.
- [76] Leonardo, S., Carlos, E and Ana, D., (2015). Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-12
- [77] Nour, Z., (2017). Zinc in Infection and Inflammation, Nour Zahi Gammoh and Lothar Rink, Institute of Immunology, Faculty of Medicine, RWTH Aachen University, University Hospital, Pauwelstrasse 30, 52074 Aachen, Germany.
- [78] Wu, J., Zeng, Z., Zhang, W., Deng, Z., Wan, Y., Zhang, Y., An, S., Huang, Q. and Chen, Z. (2019). Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases. *Free Radical Research*, 53 (2), 139-149.

- [79] Bagul, PK., Katare, PB., Bugga, P., Dinda, AK. and Banerjee, SK. (2018). SIRT-3 Modulation by Resveratrol Improves Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Diabetic Heart through Deacetylation of TFAM. *Cells*, 7 (12), 1-13.
- [80] Wahab, R., Maqsood A, S., Quaiser, S., Sourabh, D., Javed, A., Javed, M., Abdulaziz A.A.K and Hyung, S.S., (2014). ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 267-276.
- [81] Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. and Reinberg, D., (2012). SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression *Molecular and Cellular Biology*, 32, 5022–5034.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nursu DENİZ ÇEVİK

Doğum Yeri ve Tarihi : Horasan-23.12.1991

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim (e-posta): nursu_deniz@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :

Alpaslan Lisesi – Kars - 2009

Lisans :

Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü -
2015.

Atatürk Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, Adalet Bölümü-2015

Yüksek Lisans :

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İş Sağlığı ve Güvenliği
Bölümü- 2017

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik AD. 2015-Devam
ediyor.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Fernas Anonim Şirketi- İş Güvenliği Uzmanı-2016-2017

Vakıf Osgb-B Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı -2017-Halen

Yayımları (SCI ve diğer) :

Diğer konular

1. **Deniz, N.**, Çalışkan, E., Zeybey, Ç., Lisans Bitirme Projesi” Enerji Depolama Yöntemleri” Atatürk Üniversitesi-2014
2. **Deniz, N.**, Korkmaz, D., Dıblen, E., Haghıghatnia, A., Mutlu, H., Sancal, C., Çelt, N., Lisans Tasarım Projesi “Dimetil Eter Üretim Fabrikası Kurulması ve İşletilmesi” Atatürk Üniversitesi-2015
3. **Deniz, N.**, Yüksek Lisans Bitirme Projesi “Uzuv Kopmalarında İlk Yardım”-Atatürk Üniversitesi-2017
4. **Deniz, N.**, Yüksek Lisans Semineri “Grafenin Biyosensör Uygulamaları”- Kafkas Üniversitesi-2017