

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**SiO₂ NANOPARÇACIĞININ
SIÇAN UTERUS DÜZ KAS SPONTAN AKTİVİTESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Selma YAMAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ülku ÇÖMELEKOĞLU

MERSİN-2016

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**SiO₂ NANO PARÇACIĞININ
SIÇAN UTERUS DÜZ KAS SPONTAN AKTİVİTESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Selma YAMAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Bu tez, Mersin Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
BAP-SBE TTb (SY) 2014-4 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.
Tez No:44

MERSİN-2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “SiO₂ nanoparçacığının sıçan uterus düz kas spontan aktivitesi üzerine olan etkisi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

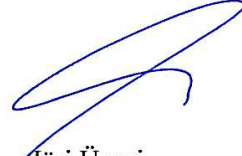
Tez Savunma Tarihi 05/02/2016



Jüri Başkanı
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Nurten ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Serap YALIN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Tufan MERT
K.Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Yunus KARAKOÇ
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...18.02.2016...tarih ve 2016/63 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Fehmi ATEŞ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Nurten ERDAL'a, Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın veri analizi kısmında katkılarından dolayı Mühendislik Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Evren DEĞİRMENCI'ye teşekkür ederim. Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma Merkezi müdürü Doç. Dr. Kasım OCAKOĞLU'na ve Saadet YILDIRIMCAN'a NP üretimindeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve katkılarını gördüğüm, bilgilerinden yararlandığım K. Maraş Sütçü İmam Üniv. Biyofizik AD öğretim üyesi Prof. Dr. Tufan MERT'e ve Farmakoloji AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Yusuf ERGÜN, Yrd. Doç. Dr. A. Hakan KURT'a, ayrıca tezimin istatistikleri konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Adem DOĞANER'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuarda birlikte çalıştığım arkadaşlarımın hepsine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında, maddi ve manevi destekleriyle, yanımda olan kıymetli anne, babama ve sevgi dolu ablam Serpil KARADOĞAN'a, yol göstericiliği ile örnek aldığım değerli abim Salih KORKUTAN'a, sevgili eşim Fatih YAMAN'a ve biricik kızım İpek'e sonsuz teşekkürlerimle...

Selma YAMAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanotoksosite	5
2.2. Nanoyapıların Vücuda Giriş Yolları	6
2.3. Uterus	9
2.4. İnterstisyel Cajal Hücreleri (ICC)	12
2.5. Telositler	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
3.1. Deney Hayvanları	18
3.2. Deney	18
3.3. Nanoparçacık Boyutunun ve Dozunun Belirlenmesi	18
3.4. SiO ₂ NP Üretimi	19
3.5. Deney Grupları ve İşlemler	21
3.6. Preparat Hazırlanması	21
3.7. Organ Banyosu ve Deney Sistemi	23
3.8. Çözeltiler	23
3.9. Deneyin Akışı	24
3.10. Biyokimyasal Takip	24

3.10.1. Protein Ölçümü.....	25
3.10.1.1. Deney Prensibi	25
3.10.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü.	26
3.10.2.1. Deney Prensibi	26
3.10.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini.....	27
3.10.3.1. Deney Prensibi	27
3.10.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü.....	29
3.10.4.1. Deneyin Yapılışı.....	30
3.11. Histolojik İncelemeler	30
3.11.1. Dokunun Eldesi ve Fiksasyonu	30
3.11.2. İmmün Floresan İşaretleme Protokolü	31
3.11.3. Elektron Mikroskopik Doku Takibi Protokolü.....	32
3.11.3.1. Elektron Mikroskopik Değerlendirme.....	33
3.12. Biyofiziksel Verilerin Wavelet Dönüşümü ile Analizi.....	33
3.13. İstatistiksel Değerlendirme	36
4. BULGULAR	37
4.1. SiO ₂ NP'nın Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Etkileri	37
4.2. SiO ₂ NP'nın Uterus Miyometrium Tabakası Üzerine Etkilerinin Elektron Mikroskopik Değerlendirilmesi.....	44
4.3. SiO ₂ NP'nın Uterus Miyometrium Tabakası Üzerine Etkilerinin İmmün Floresan Değerlendirilmesi.....	46
4.4. SiO ₂ NP'nın Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Biyokimyasal Değerlendirilmesi	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR	57
8. EKLER	
EK 1. Wavelet Analizi Matlab Programı.....	62
9. ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyolojik yapıların boyutları	5
Şekil 2.2. NP'ların neden olduğu genotoksisitenin mekanizması	8
Şekil 2.3. İnsan uterus düz kas spontan kasılma kaydı.....	9
Şekil 2.4. Rat miyometriyumunda kasılma kuvveti ve $[Ca]_i$ ilişkisi	11
Şekil 2.5. Uterus düz kas hücresinde kasılma mekanizması	12
Şekil 2.6. İnsan miyometriyumunda ICLC gösterimi.....	14
Şekil 2.7. Rat endometrial hücre kültürü Giemsa ile Telosit gösterimi	15
Şekil 2.8. Telosit hücre kültüründen ekstrasellüler tek ünite kaydı.....	17
Şekil 3.1. Stöber metodu ile elde edilen SiO_2 NP'nın FE-SEM görüntüleri	19
Şekil 3.2. Stöber metodu ile elde edilen SiO_2 NP'nın FE-SEM boyut görüntüleri.....	20
Şekil 3.3. 20 nm boyutundaki NP'ların DLS histogramı	20
Şekil 3.4. Smear testi ışık mikroskopik görüntüleme	22
Şekil 3.5. Spontan aktivite kayıt sistemi.....	23
Şekil 3.6. Sıçan uterus düz kas spontan aktivite grafikleri.....	35
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait grafikler.....	39
Şekil 4.2. Doz 1'e ait grafikler	40
Şekil 4.3. Doz 2'ye ait grafikler	41
Şekil 4.4. Doz 3'e ait grafikler	42
Şekil 4.5. SiO_2 NP için enerji değerlerinin doza bağlı değişimi	43
Şekil 4.6. SiO_2 NP için frekans değerlerinin doza bağlı değişimi	43
Şekil 4.7. Kontrol grubu miyometriyum düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri.....	44
Şekil 4.8. Doz 1 miyometriyum düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri.....	45
Şekil 4.9. Doz 2 miyometriyum düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri.....	45
Şekil 4.10. Doz 3 miyometriyum düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri.....	46
Şekil 4.11. Deney gruplarında uterus miyometriyum hücre sitoplazmalarında 20 nm boyutunda SiO_2 NP gösterimi	46
Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarında Caspase 3 immün işaretlemesi	47
Şekil 4.13. Apoptotik hücre sayısının doza bağlı değişimi	48
Şekil 4.14. Ortalama MDA düzeyinin doza bağlı değişimi.....	49

Şekil 4.15. Ortalama SOD aktivitesinin doza bağlı değişimi	49
Şekil 4.16. Ortalama GSH-Px düzeyinin doza bağlı değişimi	50



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılan nanomalzemeler	4
Çizelge 2.2. Farklı tipte NP uygulamalarının çevreye ulaşım yolları	4
Çizelge 2.3. Nanomalzemelerin temel etkileri	7
Çizelge 3.1. Protein ölçüm (Lowry Metodu) protokolü	25
Çizelge 3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivite ölçüm protokolü.....	27
Çizelge 3.3. Malondialdehit (MDA) ölçüm protokolü	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
Ag	: Gümüş
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPase	: Adenozin trifosfataz
BSA	: Bovin serum albümin
Ca	: Kalsiyum
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CaM	: Kalmodulin
CICR	: Ca uyarılı Ca salınımı
Cl	: Klor
CuCl₂	: Bakır klorür
CuSO₄	: Bakır (II) sülfat
CWT	: Sürekli wavelet dönüşümü
DAG	: Diaçilgliserol
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EM	: Elektron mikroskop
FE-SEM	: Alan emisyon taramalı elektron mikroskopi
FITC	: Floresein izotiosiyanat
GİS	: Gastrointestinal sistem
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG-Rd	: Glutasyon redüktaz
GTP	: Guanozin trifosfat
ICC	: İnterstisyel Cajal hücreleri
ICLC	: İnterstisyel Cajal benzeri hücre
IgG	: İmmünglobulin

IICR	: Agonist- uyarısı ile kalsiyum salınımı
IP3	: İnositol trifosfat
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı
K	: Potasyum
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Mono potasyum fosfat
MDA	: Malondialdehit
MeHg	: Metil civa
MEİTAM	: Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma Merkezi
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
mL	: Mililitre
MLCK	: Miyozin hafif zincir
mM	: Milimolar
ms	: Milisaniye
mV	: Milivolt
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
NaH CO₃	: Sodyum bikarbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH₄OH	: Amonyum hidroksit
nM	: Nanomolar
NO	: Nitrik oksit
NP	: Nano parçacık
P	: Fosfor
PBS	: Fosfatlı tuz tamponu
PGF2α	: Prostaglandin 2 fosfat
PIP2	: Fosfatidilinositol bifosfat
PLC	: Fosfolipaz
ROS	: Reaktif okijen türleri
RyRs	: Ryanodin reseptörleri

SR	: Sarkoplazmik retikulum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskop
UV	: Ultraviyole
ZnO	: Çinko oksit
Zp	: Zeta potansiyel
Zs	: Zeta sizer



ÖZET

SiO₂ Nanoparçacığının Sıçan Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi

Gelişen teknolojiye bağlı olarak günlük yaşamda nanoparçacık kullanımı giderek artmaktadır. Birçok kimyasal gibi nanoparçacıkların da toksik etkileri mevcuttur. Bu çalışmada özellikle tekstil alanında yaygın olarak kullanılan SiO₂ nanoparçacıklarının uterus spontan aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 64 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, doz 1 (250 µg/mL), doz 2 (500 µg/mL) ve doz 3 (1000 µg/mL) olarak 4 gruba ayrıldı. Nanoparçacığın boyutu 20 nm olarak seçildi. Deneyler izole uterus preparatlarında yürütüldü. Spontan aktivite kayıtlarında 0. dakika kayıtları (SiO₂ eklenmeden önce) kontrol olarak alındı ve SiO₂ eklendikten sonra 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kayıt alındı ve uygulama süresinin spontan aktivite üzerine etkisi wavelet dönüşümü kullanılarak belirlendi. Biyokimyasal ve histolojik incelemeler için dört gruba ait preparatlar değerlendirildi. Biyokimyasal incelemelerde oksidatif stresi değerlendirmek üzere malondialdehit düzeyi (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ölçüldü. Histolojik incelemede elektron mikroskop ile uterus ultrayapısının incelenmesinin yanı sıra, immünfloresan işaretleme yöntemiyle apoptotik hücreler saptandı. Grup içi ve gruplararası farklılıklar istatistiksel analiz ile belirlendi.

Wavelet dönüşümü kullanılarak yapılan analizlerde uterus kontraksiyonlarının enerjisinin değişmediği ancak her doz grubu için frekansın uygulama süresine bağlı olarak azaldığı saptandı (p<0.05). Frekans üzerine dozun etkisi gözlenmedi. MDA düzeyi doza bağlı olarak artarken, SOD düzeyi doza bağlı olarak azaldı. GSH-Px değeri her doz için kontrole göre azaldı. Ancak doz grupları arasında önemli bir fark bulunmadı. Elektron mikroskopik incelemede uterus ultrayapısında kontrole göre bir değişiklik gözlenmedi. Ancak immünfloresan işaretlemede apoptozisin doz gruplarında kontrol grubuna göre arttığı saptandı.

Sonuç olarak 20 nm büyüklüğünde ve 250, 500 ve 1000 µg/mL dozundaki SiO₂ NP'ların izole uterus dokusuna uygulanmasını uterus spontan aktivitesinin frekansının azalmasına, oksidatif stresin artmasına ve apoptozisin hızlanmasına neden olarak uterusun işlevini bozabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Nanao parçacık, nanotoksiste, uterus spontan aktivitesi, Wavelet dönüşümü, interstisyel Cajal hücreleri, telosit.

ABSTRACT

The Effects of SiO₂ Nanoparticles of Rat Uterine Smooth Muscles Spontaneous Activity

Usage of nanoparticles in daily life is increasing with technology. Like a lot of chemicals, nanoparticles has toxic effects. In this work effects of specially used in textile field SiO₂ nanoparticles on uterus spontaneous activity was aimed to be researched.

In this study 64 Wistar albino female rats were used. Rats were separated in 4 groups as control, dose 1 (250 µg/mL), dose 2 (500 µg/mL) and dose 3 (1000 µg/mL). Nanoparticle's size was chosen as 20 nm. Experiments were carried out on isolated uterus preparations. In spontaneous activity records 0. minute records (before SiO₂ was added) were taken as controls and after SiO₂ was added records were taken at 30, 60, 90 and 120. minutes, and effects of application time on spontaneous activity by using wavelet transformation. Preparations of four groups were evaluated for biochemical and histological examinations. In biochemical examinations in order to evaluate oxidative stress level of malondialdehit (MDA), activity of superoxide dysmutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured. In histological examinations via electron microscope ultrastructure of uterus was examined as well as apoptotic cells detected with immunofluorescent labeling method. In group and intergroups differences were defined by statistical analysis.

In analysis was made by using wavelet transformations no change in contraction energy of uterus was detected, but for each group of dosage it decreased by application of frequency time ($p < 0.005$). Dosage effects were observed on frequency. While MDA level increased depending on the dosage, SOD level was decreased depending on the dosage. GSH-Px rate was decreased for each dosage with respect to control. However, no important difference is detected between groups. In electron microscopic examination no changes were observed in uterus ultrastructure with respect to control. However, in immunofluorescent labeling it was detected that apoptosis increased in dosage groups with respect to control group.

As a result, it was thought that application of SiO₂ nanoparticles, in 20 nm size and in 250, 500 and 1000 µg/mL dosages, on isolated uterus tissue can disturb uterus function by causing frequency of uterus spontaneous activity to decrease, oxidative stress to increase and to trigger apoptosis.

Key Words: Nanoparticles, nano-toxicity, spontaneous uterine activity, wavelet transform, interstitial cells of Cajal, telocytes

1. GİRİŞ

Nano terimi, Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) tarafından 1-100 nm aralığındaki boyutlara sahip parçacıkları kapsayan genel bir tanımlamadır. Nanomalzemeler ISO'ya göre; nanoparçacık (NP), nanaofiber ve nanaotabaka olarak alt gruplara ayrılır. NP, makro boyutlu parçacıklara kıyasla elektron tutuculuğu, parçacık yüzey kimyası, parçacık şekilleri, kristalleşebilme, ısı ve elektrik iletme, manyetik ve optik özelliklerindeki artış veya azalma, renk değiştirebilme gibi farklı fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklere sahiptir. Boyutlarının küçülmesiyle artan yüzey/hacim oranı kimyasal aktifliklerini artırır ve bu artış nanobiyolojik etkileşimlerde önemli rol oynar.

Nanoteknoloji, NP'ları gerek fonksiyonel grup ilave ederek gerek steril durumda tıp, askeriye, elektronik, otomotiv sanayi, boya sanayi, gıda sektörü, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda ürüne dönüştürerek güncel yaşantıya sunmaktadır. Güncel yaşantıda maruz kalınan NP'lar canlı organizmalar üzerinde istenmeyen yan etkiler gösterirler. Nanoyapıların küçük boyutları onların kolayca doku, hücre, organeller ve fonksiyonel biyomoleküler yapılara (DNA, ribozom vb.) girmesine izin verir. Nanoyapılar vücuda, oral, dermal, inhalasyon, intraperitonel, subkutanöz, intravenöz gibi yollarla giriş yaparlar. Sonra karşılaştıkları ilk biyolojik komponent (protein, hücre) tarafından absorbe edilirler ve vücutta çeşitli organlara dağılırlar. Buralarda yüksek reaktif özelliklerinden dolayı modifiye olabilir veya metabolize edilirler. Nüfuz ettikleri dokulardaki miktar ve burada ne kadar süre kalacakları cevabı henüz bilinmeyen sorulardır. Bir biyolojik yapı, NP ile karşılaştığında, etkilenme düzeyi nanoyapının, toksitesi ve aktiflikleri gibi birtakım fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır.

Uterus spontan kasılmaları, sperm ve embriyo transferi, implantasyon, menstrüasyon, hamilelik ve doğum dahil olmak üzere çeşitli üreme fonksiyonlarında önemli rollere sahiptir. Uterus spontan kasılmaları, kendi kendine kasılma gevşeme çiftlenimlerini gerçekleştiren düz kaslarca sağlanır. Uterus, düz kas içeren diğer visseral organlarda da olduğu gibi çeşitli genlik ve frekanslara sahip, düzensiz sürelerde ve ayırık zamanlı fazik kasılmalar gösterir. Uterus düz kas hücre membran

potansiyeli -35 mV ile -80 mV aralığındadır. Uterus miyositlerinin spontan elektriksel aktivitesi plazma membranın depolarizasyonu ve repolarizasyonu ile sağlanır. Spontan kasılmanın varlığını devam ettirilebilmesi membran potansiyelinin bu çiftlenimini sürdürebilmesine bağlıdır. Uterus düz kas tabakasında da varlığı gösterilen pacemaker hücre grupları, uterus düz kas spontan aktivitesinin hormonal, nöral, mekanik bir uyarı olmadan sürdürülmesini sağlar.

Hemen hemen tüm canlılarda sirkadiyen ritim sergileyen fizyolojik değişkenler mevcuttur. Örneğin kalp, gastrointestinal sistem (GİS), beyin, ürogenital sistem gibi yapılar belirli frekans ve genlikte elektrofizyolojik veya mekanik karakterde ritmik davranış gösterirler. Bu davranışların analizlerini yapmak üzere Fourier ve Wavelet (Dalgacık) dönüşümlerinin de aralarında bulunduğu çeşitli yöntemler kullanılabilir. Fourier analizi ritmik sinyalin frekans bandında incelenmesini sağlar zaman bilgisi barındırmaz. Wavelet analizi ise zaman frekans çözünürlüğünü aynı anda verir.

Günlük yaşantıda sağladıkları kolaylık ve cazip özelliklerinden dolayı fazlasıyla karşılaşılan NP'ların toksik etkileri ile ilişkili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Literatür taramalarında silisyum dioksit nanopartikülünün uterus kasılmaları üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında silisyum dioksit (SiO_2) nanoparçacıklarının uterus düz kas spontan aktivitesi üzerine etkisinin biyofiziksel, histolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak incelenmesi ve disiplinler arası yaklaşımla etki mekanizmasının açıklanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Nanoparçacık terimi, boyutu 1-100 nm aralığında yer alan parçacıklar için kullanılan genel bir tanımlamadır. Elektron tutuculuğu, parçacık yüzey kimyası, parçacık şekilleri, kristalleşebilme, ısı ve elektrik iletme, manyetik ve optik özelliklerindeki artış veya azalma, renk değişebilme gibi nano boyutlu parçacıklar, makro boyutlu parçacıklara kıyasla çok daha farklı fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklere sahiptir. Bunların yanı sıra küçülen boyut etkileşme yüzeyini de arttırarak yüzeyler arasındaki molekül sayısı, kuantum elektromanyetik etkileşim ve yüzey gerilimini de arttırır (1, 2). Son yıllarda sanayide ve günlük hayatta geniş kullanım alanına ulaşan nanoparçacıklar tıp, askeriye, elektronik, otomotiv sanayi, boya sanayi, gıda sektörü, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadır (3). Anti-mikrobiyal özellik, koku gidericilik, vücut sıcaklığını düzenleme, kir tutmazlık gibi giysi kullanımında konforu arttırmak, antisitativ giysilerde kullanım, UV ışınlarından koruma, parfümlü giysiler, tıbbi koruyucu giysiler, elektromanyetik alanlara karşı koruma gibi vücut sağlığını korumaya katkıda bulunmak ve giyilebilir elektronik, fotovoltatik giysiler, kendinden ışıklı giysiler gibi yaşantıyı kolaylaştırmak amacıyla tekstil ürünlerinde de kullanılan bu parçacıklar günlük hayatta büyük yer tutmaktadır (4).

Günlük yaşamda kullanılan nanoparçacıklar oldukça çeşitlidir. Gümüş (Ag), atık/kaynak su temizliği, tekstil ve kozmetik alanlarında, titanyum dioksit (TiO₂) kozmetik, güneş koruyucu, gıda paketlenme, inşaat ve araç kaplamalarında organik kontaminantlara karşı kataliz olarak sunulmaktadır. SiO₂ tekstil, ve kaplama, çinko oksit (ZnO) ise kozmetik, güneş koruyucu, gıda ve kaplamada kullanılmaktadır. Farklı kullanım alanları, ürün çeşitlilikleri ve çevreye geçiş yolları Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılan nanomalzemeler (5)

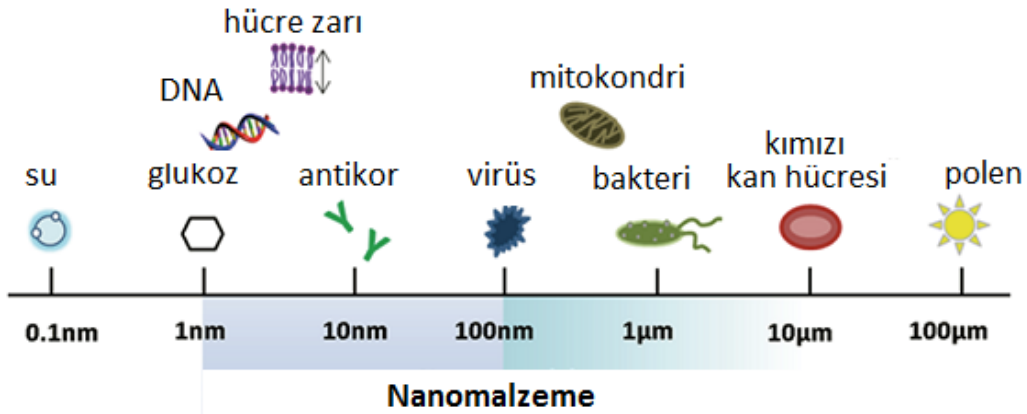
Nanoparçacık	Kullanılabilirlik Sayısı	Ürün
Gümüş	235	Çorap, saç fırçaları, sıvalar, gıda ambalajı, gıda takviyeleri
Karbon	71	Spor malzemeleri, filtrasyon ve depolama aygıtları, kozmetik, bilgisayar donanımı
Titanyum dioksit	38	Boyalar, güneş koruyucu, antibakteriyel kaplamalar, temizlik ürünleri
Çinko oksit	29	Güneş koruyucu
Silisyum dioksit	31	Boyalar, temizlik ürünleri, kozmetik, gıda takviyeleri, spor malzemeleri, tekstil
Altın	16	Kozmetik, kişisel bakım ürünleri, yakıt katalizörleri, gıda takviyeleri

Çizelge 2.2. Farklı tipte NP uygulamalarının çevreye ulaşım yolları (5)

		Çevrede Bulunma Durumu			
		Hava	Su Kaynakları	Atık	Toprak
Kozmetik ve Kişisel Bakım	Titanyum dioksit Çinko Altın	x	x	x	
Katalizörler ve Yağlar	Seryum oksit Platinyum, Molibdentioksit		x	x	
Boya ve Kaplama	Titanyum dioksit, Altın Kuantum dotlar	x	x	x	
Çevre ve Suyun Gerikazanımı	Demir Poliüretan Karbonano tüpler		x	x	
Zirai İlaçlar	Silisyum	x	x		x
Gıda Ambalajlama	Altın Titanyumdioksit Gümüş		x		x
İlaç ve Tıp	Nano tıp Taşıyıcıları			x	x

2.1. Nanotoksosite

Nanoyapıların küçük boyutları onların kolayca doku, hücre, organellere ve fonksiyonel biyomoleküler yapılara (DNA, ribozom vb.) girmesi için izin vermektedir. Nano yapılar diğer moleküllere oranla oldukça küçüktür ve bu boyut farklı NP'ların penetrasyonunu artırır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Biyolojik yapıların boyutları (6).

Nanoyapılar vücuda, oral, dermal, inhalasyon, intraperitonel, subkutanöz, intra venöz gibi yollarla giriş yaparlar. Sonra karşılaştıkları ilk biyolojik komponent (protein, hücre) tarafından absorbe edilirler ve vücutta çeşitli organlara dağılırlar. Buralarda yüksek reaktif özelliklerinden dolayı modifiye olabilir veya metabolize edilirler. Nüfuz ettikleri, dokulardaki miktar ve burada ne kadar süre kalacakları cevabı henüz bilinmeyen sorulardır.

Bir biyolojik yapı, NP ile karşılaştığında, biyolojik yapıların etkilenme düzeyi nanoyapının, toksisitesi ve aktifliği gibi birtakım fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (7). Bunlar;

- 1) Boyut: Parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanı artma eğilimindedir. Bu da makro boyuttan nanoboyuta inildiğinde neden daha toksik etkileşimler olduğunu açıklamaktadır,

- 2) Şekil: Tüp ve yuvarlak şekilde üretilen nanomalzemelerin şekil farklılıkları penetrasyonlarını etkilemektedir,
- 3) Yüzey/hacim oranı: Bu oranın artışı diğer moleküllerle aktivasyonunu artırır,
- 4) Zeta potansiyel (Zp): Bir taneciğin bir dispersiyonda kazandığı net yüküdür ve kararlılık ifadesidir,
- 5) Toksik metal grupları içerip içermemeleri: SiO₂, ZnO, TiO₂ gibi toksik metal gruplarını içeriyor olması aktivasyonunu etkiler,
- 6) Kimyasal içerik: NP'ların diğer molekülle temas eden yüzeylerinde fonksiyonel grup içerip içermemesi,
- 7) Yüzeyel yük: NP yükü elektrostatik etkilenme düzeyini belirler,
- 8) Hidrofobik olma: NP'ların su ile temastan kaçınıyor olması,
- 9) Lipofolik grup içerme: NP'ın bağlanma isteğini artırıcı/azaltıcı etki,
- 10) Enzimatik etkinlik düzeyi: NP'ların biyomoleküller ile etkileşimde enzim aktivite inhibisyonu gerçekleşirse yarışmalı yada yarışmalı olmayan yolu tercih etmeleri,
- 11) Yüzey genişliği: NP boyutunun küçülmesi ile yüzey genişliğinin artması (8).

Nanoyapıların, normal işleyiş gösteren hücre ve dokular ile temaslarında biyouyumluluk (biyokompatibilite), biyodağılım, biyolojik parçalanma (biyodegradasyonu), inflamasyon gibi özellikler o yapının toksitesini etkileyen diğer faktörlerdir (9).

2.2. Nanoyapıların Vücuda Giriş Yolları

Doğal ortamda veya endüstriyel ürünlerde bulunan NP'lar buldukları ortamdan ayrılarak kolaylıkla hava ortamına geçerler. Boşlukta bağımsız bulunan nano düzeydeki bu parçacıkların hem absorpsiyonları hem de membran transferleri mümkündür. Vücuda inhalasyon, oral, dermal, intravenöz ve intraperiton yollar ile girerler.

NP'lar vücuda inhalasyon yoluyla girdiklerinde akciğer, kalp, dalak ve beyine kadar ulaşırlar. İnsan solunum sisteminde nanomalzemelerin ortalama yarı ömrü 700

gün kadardır. İnhalasyon sonrası akciğerin farklı bölgelerinde depo edilirler. Nanomalzemelerin solunum yolundaki taşınımları veya birikimleri, solunum yolu anatomisi, hava akış paterni ve parçacıkların aerodinamik yapısı ve parçacık boyutu gibi özellikleriyle ilişkilidir.

İntravenöz girişlerde ise nanomalzeme kolon, akciğer, kemik, karaciğer, dalak, lenfatik nodlara kadar uzak organ dağılımı gösterebilir. İntraperiton etkileşimlerinde, periton boşluğunu geçerek uterusu, plasentaya kadar ulaşır bu da fetal beyin yetmezliği veya fetal ölüm ile sonuçlanabilir.

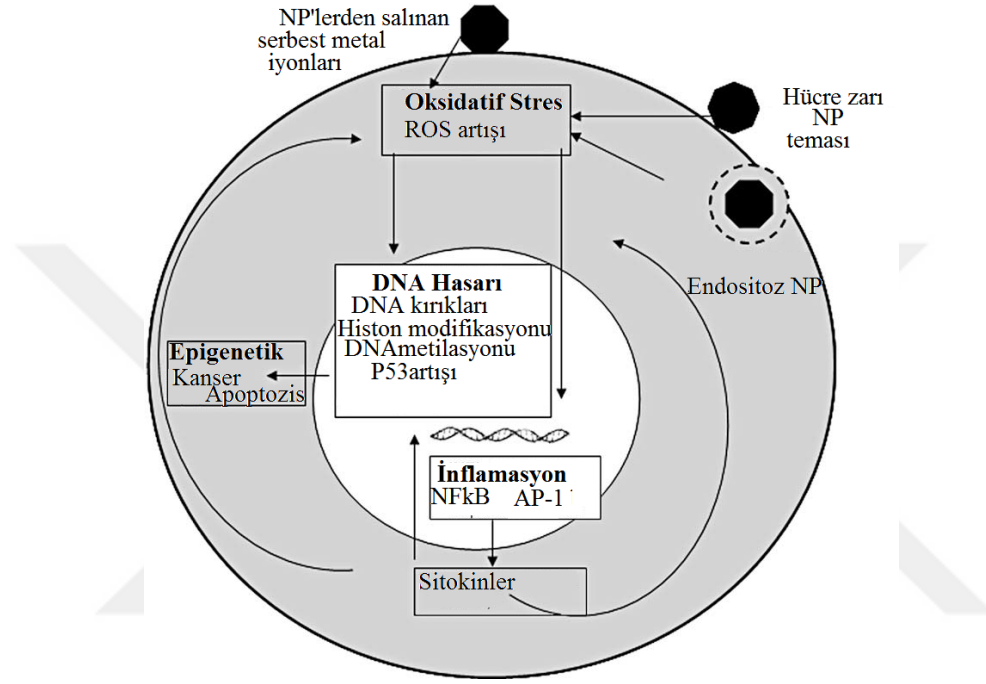
Oral maruziyette böbrek, dalak, akciğer, beyin ve gastrointestinal sisteme (GİS) ulaşır. GİS boyunca ilerleyerek feçesle atılabilir veya GİS mukozası tarafından absorbe edilerek idrar yoluyla atılımı mümkün olur.

Biyolojik sistemlerin NP maruziyetlerindeki toksik etkiler, alerji, fibrozis, organ yetmezlikleri, inflamasyon, sitotoksik, doku kaybı, reaktif oksijen (ROS) üretimi, DNA hasarı gibi toksik etkilere neden olmaktadır (Şekil 2.2., Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Nanomalzemelerin temel etkileri (10)

NANOMALZEMELERİN ETKİLERİ	MUHEMEL PATOFİZYOLOJİK SONUÇLARI
ROS üretimi	Protein, DNA ve membran hasarı, oksidatif stres
DNA hasarı	Mutajenez, metaplazi, karsinogenez
Oksidatif stres	Faz II enzim indüksiyonu, enflamasyon, mitokondriyal pertürbasyon
Mitokondriyal pertürbasyon	İç membran hasarı, gözenek geçişleri, enerji kesintisi, apoptoz, aponekroz, sitotoksik etki
Enflamasyon	İnflamatuvar hücreler ile doku infiltrasyonu, fibrozis, granülom, aterojenez, akut faz protein ekspresyonu (örneğin, C-reaktif protein)
Retikuloendotelial sistem tarafından alım	Karaciğerde kontrolsüz giriş, dalak ve lenf düğümlerinde büyüme ve disfonksiyonu
Protein denatürasyonu	Enzim aktivitesi kaybı, oto-antijenite bozulması
Nükleer etki	DNA hasarı, nükleoprotein kümeselleşmesi, otoantijenite
Endotel disfonksiyonu, kan etkileri	Pıhtılaşma, aterogenezis, tromboz, felç, miyokard enfarktüsü
Hücre döngüsü regülasyonunda değişiklik	Çoğalma, hücre döngüsünde tutukluk, yaşlanma

Mühendislik ürünü NP'lerden serbestlenen metal iyonlarının veya metaloksit NP'lar, quantum dotlar, fulerenler DNA ile direk etkileşime girerek DNA hasarı oluşturur veya kromozomal kırıklar, nokta mutasyonlar, oksidatif stres ile DNA üzerinde değişikliklere neden olurlar (10).



Şekil 2.2. NP'ların neden olduğu genotoksitenin mekanizması (11).

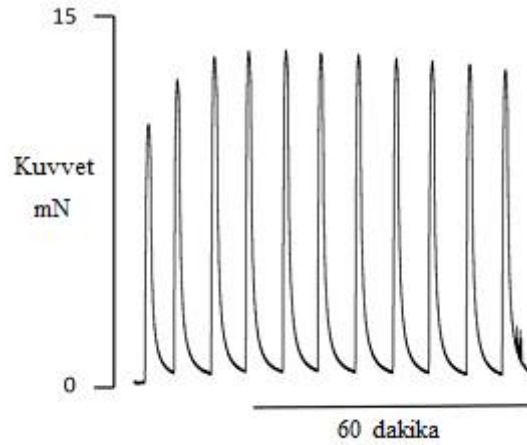
Tüketicilere sunulan ürünlerde yer alan, karbon tüp, gümüş, titanyum dioksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO), bakır oksit (CuO) ve silisyum dioksit (SiO_2) gibi bazı metaloksit nanoparçacıkların yan etkilerini gösteren çalışmalar da giderek artmaktadır.

2014 yılında yapılan bazı çalışmalarda, Yongbo Yu ve arkadaşları amorf SiO_2 NP ve metil civa (MeHg) nanoparçacıklarının insan akciğer epitel hücrelerinde toksik etkilerini gözlemlemişlerdir (11). Mendoza ve arkadaşları SiO_2 NP'larının insan periferik kanı mononükleer hücrelerinde yaptıkları çalışmada, sitokin inflamasyonu ile oksidatif stres oluşumunu ve kullanılan parçacık boyutunun değişimi ile parçacığın hücre içi dağılımının değiştiğini ve immunomodulator cevabını etkilediğini göstermişlerdir (12). Shim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada

20 nm boyutunda ZnO ve SiO₂ NP'larının oral, dermal ve intravenöz uygulandığı bir rat çalışmasında bu parçacıkların transmisyon elektron mikroskop (TEM) sonuçlarına göre kan beyin bariyerini geçerek beyine ulaştıklarını ve toksiteye neden olduklarını göstermişlerdir (13).

2.3. Uterus

Uterus kasılmaları sperm ve embriyo transferi, implantasyon, menstrüasyon, hamilelik ve doğum dahil olmak üzere çeşitli üreme fonksiyonlarında önemli bir role sahiptir. Gebelik öncesi ve sonrasında aktif olarak kasılır ancak kasılma çiftlenimi iki evrede birbirinden farklıdır. Gebelik öncesi menstrüasyon sırasında rahim iç duvarının yıkılmasını sağlar ve adet dönemi boyunca sub-endometriyum tabakada “dalga biçimli aktivite” olarak isimlendirilen dalgalar üretir. Kasılmalar düzensiz ve koordinasyonsuzdur ve düz kas içeren diğer viseral organlarda olduğu gibi çeşitli genlik ve frekanslara sahip, düzensiz sürelerde ve ayrık zamanlı fazik kasılmalardır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. İnsan uterus düz kas spontan kasılma kaydı (14).

Fertilizasyon için ise tuba uterinalara gelen spermin yumurta ile buluşmasını sağlayan kasılma bileşenlerine sahiptir. Gebeliğin ilk döneminde yavaş kasılmalar

üretirken doğumda fetus ve plasentanın dışarı çıkarılması için oldukça kuvvetli ve düzenli kasılma çiftlenimleri üretir.

Uterus duvarı içten dışa doğru: Endometrium (Tunika mukoza), miyometrium (tunika muskularis), perimetrium (tunika seroza) adını alan üç ana katmandan oluşur. Miyometrium iki kat düz kas tabakası arasına yerleşmiş kan ve lenf damarlarından meydana gelen uterusun düz kas tabakasıdır (15). Miyometriumun iç kısmında uterus boşluğunu saran sirküler yapıda “endometrial dalgaları” tetikleyen düz kas hücreleri yer alırken dış tabaka doğum ve düşüklerde yer alan kasılmalardan sorumludur (16).

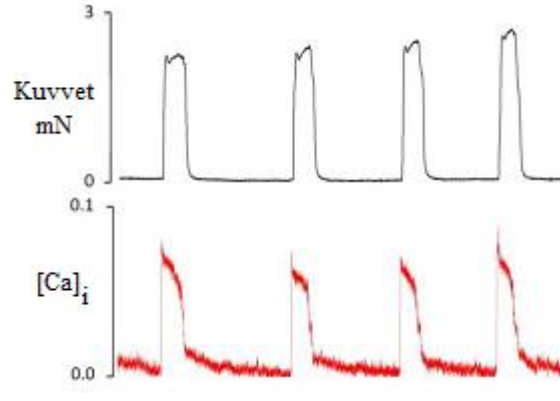
Miyometriumda Ca^{2+} kaynağı hücre zarına çok yakın yerleşen veya merkezi olan endoplazmik retikulumlardır. Miyometrial sarkoplazmik retikulumun (SR) görevi Ca^{2+} sağlamak ve depolamaktır.

Kalsiyum iyonları SR membranında bulunan iki temel kanal tarafından sağlanır. Bunlardan ilki IP3 ile aktive olur ve SR membranı üzerindeki reseptörlere IP3 bağlandığında SR den kalsiyum salınır (Agonist uyarısı ile Ca^{2+} salınımı, IICR). İkinci mekanizma ise hücre içi kalsiyum arttığında bu kanallar aktif hale gelir ve SR'dan kalsiyum salınır (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release, CICR). Bu kanallar kalsiyum ile indüklenerek kalsiyum salınımı yapan Ryanodin reseptörleri (RyRs)'dir.

Kasılma gevşeme çiftlenimini uterus kendisi geliştirir. Uterus düz kas hücre membran potansiyeli -35 mV ile -80 mV aralığındadır. Uterus miyositlerinin spontan elektriksel aktivitesi plazma membranın depolarizasyonu ve repolarizasyonu ile sağlanır. Spontan kasılmanın varlığını devam ettirilebilmesi membran potansiyelinin bu çiftlenimini sürdürebilmesine bağlıdır. Diğer uyarılabilir hücreler gibi uterus miyosit membranının uyarılabilmesi için de temelde Na^+ , Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarının sitoplazmaya K^+ iyonunun ise ekstrasellüler ortama geçişi gerekir. İntrasellüler Ca^{2+} miktarı (50-100 nM), ekstrasellüler ortama (2 mM) kıyasla oldukça düşüktür. Miyometrium düz kas hücreleri kasılması temelde intrasellüler Ca^{2+} artışına bağlıdır. İntrasellüler Ca^{2+} konsantrasyon artışını sağlayan, membran üzerinden veya SR'dan serbestlenmesini sağlayan akım yollarıdır. İçeri Ca^{2+} girişi, L-tipi kalsiyum kanalları, depo kontrollü kalsiyum kanalları ve reseptör kontrollü kalsiyum kanalları aracılığıyla gerçekleşir.

Miyometrium düz kasında gevşeme intrasellüler Ca^{2+} miktarının azalmasıyla yani membran üzerinden sağlanan geçişler ile dışarı atılması ve SR'da

depolanmasıyla sağlanır. Membran üzerinden geçiş bir kalsiyuma karşın üç sodyum değişimi (Na^+ - Ca^{2+} değiş tokuşu, NCX) ve Ca^{2+} ATPase (SERCA2) aktivitesiyle sağlanır (Şekil 2.4.).

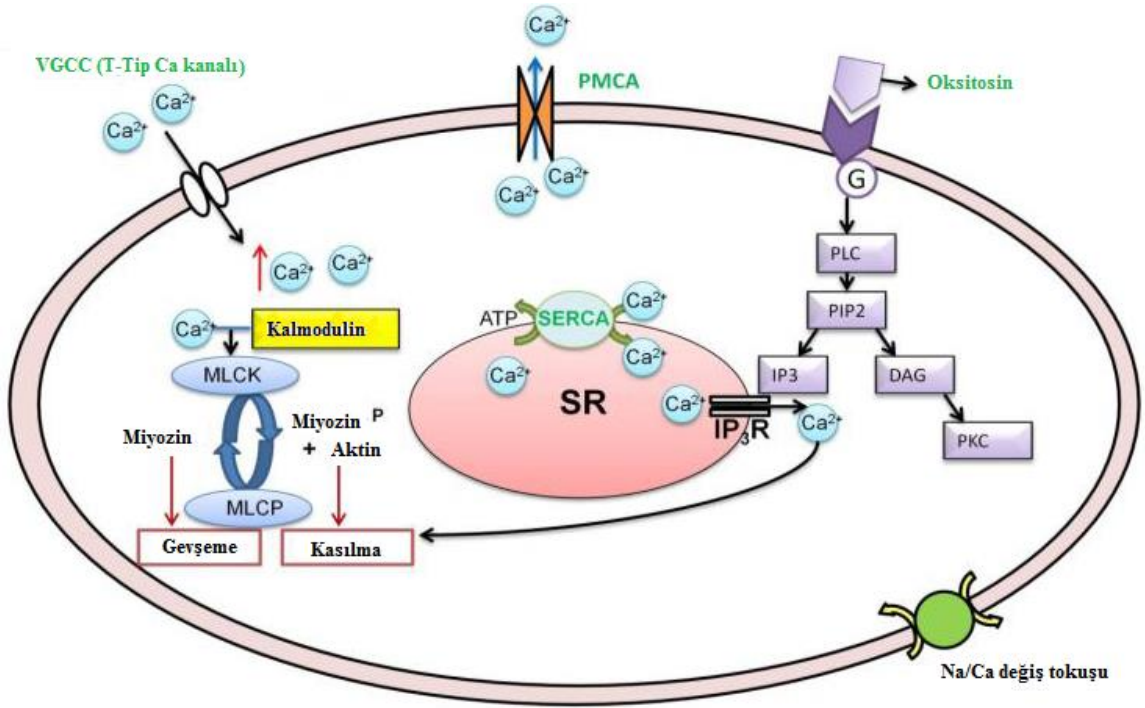


Şekil 2.4. Rat miyometriyumunda kasılma kuvveti ve $[\text{Ca}]_i$ ilişkisi (14).

Miyometriyumun kasılma gevşeme çiftlenimi iki mekanizmaya bağlıdır bunlardan ilki elektrokimyasal çiftlenimdir ki intrasellüler sıvıda Ca^{2+} artışına bağlıdır. Basitçe, uterin hücre zarının iyonik permabilitesinin değişimi ve voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının (VGCC/L tip Ca kanal) açılması ile hücre içine Ca^{2+} akışı sağlanır. Kalsiyum, kalmoduline (CaM) bağlanır. Ca-CaM kompleksi miyozin hafif zincir kinazı (MLCK) aktifleştirir. C19 fosforillenerek hafif zincir miyozin (MLC_{20}) oluşur, akto-miyozin çapraz köprü siklusu ve Mg-ATP hidrolizini sağlayarak kasılma gerçekleşir. Yani, MLCK, miyozin hafif zincirin fosforilasyonunu aktifleştirmesiyle çapraz köprülerin aktin bağlanma bölgelerine tutunmasını (AM.ADP.P) sağlar. (AM.ADP.P) kompleksinden ADP, daha sonra da P'ın ayrılması bir kuvvet oluşturur ve çapraz köprüde bir takım değişimler olur. Akto-miyozin birlikteliği ATP'nin bağlanmasıyla bozulur ve çapraz-köprü döngüsü başa döner. Döngü içerisinde reaksiyon hızları MLCK, MLCPase, ATP konsantrasyonlarına bağlıdır (17, 18).

Farmakolojik çiftlenim sırasında hücre içi kalsiyum $[\text{Ca}]_i$ artışı depolarizasyondan çok, reseptörlere agonist bağlanması ile sağlanır. Oksitosin veya prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) gibi agonistler plazma membranında bulunan özel reseptörlerine bağlandıklarında, monomerik G-proteinin GTP'ye bağlanmasını

sağlarlar ve fosfolipaz C (PLC) aktifleşir. Daha sonra membrandan fosfatidilinositol bifosfat (PIP2) ayrılır ve inositoltrifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) ikinci mesajcılara izin verilir. IP3, SR üzerindeki özel reseptörüne bağlanır ve $[Ca^{2+}]_i$ artar. DAG protein kinaz C (PKC)'yi aktifleştirir. Bu iki çiftlenimin gerçekleşmesi uterus kasılmasını artırır (Şekil 2.5.) (14).



Şekil 2.5. Uterus düz kas hücresinde kasılma mekanizması (14).

2.4. İnterstisyel Cajal Hücreleri (ICC)

İnterstisyel Cajal hücreleri (ICC), 100 yıl kadar önce İspanyol bilim adamı Santiago Ramon Y. Cajal'ın (1852-1934), gastrointestinal sisteme (GİS) ait kaslarda nörona benzettiği hücre gruplarıdır ve bunlar Cajal tarafından "İnterstisyel nöron" olarak isimlendirmiştir. Cajal'a göre bu hücreler, sempatik nöronlardan düz kas hücrelerine sinyal taşıyan sinir hücreleridir. Yapılan çalışmalar ICC'lerin gastrointestinal sistemde içi boş organların motor işlevlerinde pacemaker aktivite gösterme, nörotransmisyonundan sorumlu olma ve aynı zamanda uygulanan gerime

duyarlı davranma gibi önemli rollerinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca ICC'lerin Gastro İntestinal Tümör kaynağı olmalarının yanı sıra bir takım GİS hastalıklarına kaynaklık edebileceği de bildirilmiştir (19).

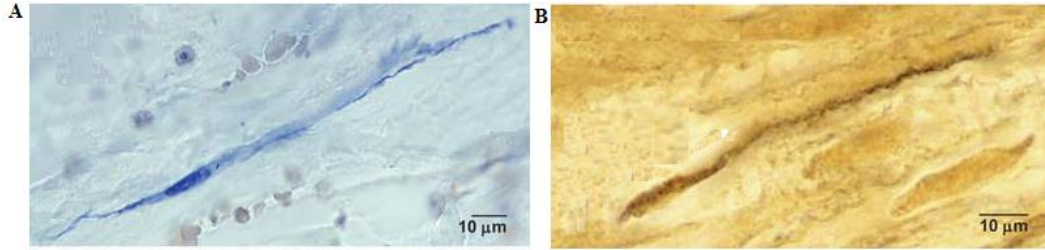
Farklı organizmalara ait gastrointestinal sistem çalışmalarında ICC varlığı tespit edilmiştir. 1969 yılında İmaizumi ve Hama yaptıkları çalışmada kuş taşlıklarında (20), 1977'de Yamamoto fare ince bağırsağında (21), 2005'de R. J. Lang ve ark. üst üriner sisteminde (22), 2007'de M. E. Hinescu ve ark. rat mezenterinde (23), aynı dönemlerde Concepcion Junquera ve ark. tavşan duodenumunda (24). Faussone-Pellegrini ve ark. insan midesinde ve özofagusta ICC varlığını tespit etmişlerdir ve 2009'da Song Eun Lee ve arkadaşları rat mide ve duodenumunda ICC yerleşimini üç boyutlu teknik kullanarak göstermiştir (25). Araştırmacılarca yapılan bir dizi çalışmada ICC'nin GİS haricinde farklı organlarda da varlığı tespit edilmiştir. Miyometrium, fallop tüp, plasenta, meme bezi, safra kesesi, mezenter, pulmoner vende ICC hücreleri gösterilmiştir (26). Yine, Junquera C. ve ekibi tarafından tavşan duodenum hücreleri ultra yapısında İnterstisyel Cajal benzeri hücre (ICLC) hücre varlığı gösterilmiştir (27).

Bunlar dışında 2000'de G. P. Sergeant ve ekibi tavşan üretrasında özel pacemaker hücre varlığını (28), 2002'de K. D. Mc. Closkey ve ark. koyun mezenterik lenfatik damarlarında C-kit pozitif hücre tespit etmiştir (29).

2004'te Maksym I. Harhun tavşan portal veninde ICC fonksiyonlarına dikkat çekmiş (30), Hikaru Hashitani ve ekibi domuz penisinde (31), 2005'de R. J. Lang ve arkadaşları üst üriner sisteminde (32), Popescu ve ark. insan fallop tüpünde, 2006'da M. E. Hinescu ve arkadaşlarınca arterial miyokartta ICLC'nin ultrayapısal ve immunohistokimyasal özellikleri belirlenmiştir (34). Aynı yıl bir diğer kalp çalışmasında L. M. Popescu tarafından ventriküler miyokardiumda ICLC varlığı gösterilmiştir (35). 2008'de Noe ve arkadaşları fare uterus kasılmalarının ICC ilişkisini farmakolojik ve genetik açıdan göstermişlerdir (36). 2010'da Louise Johnston arkadaşları ile yaptığı çalışmada insanda idrar kesesine ait kit pozitif ICC'lerin morfolojik ekspresyonunu göstermiştir (37).

Popescu EM ve immünohistokimyasal incelemelerde Cajal'ın da kullandığı yöntemle benzer uygulamalar ile intersitisyel olan ve ICC'ye benzeyen hücrelerin

varlığını görerek bunlara “Intersititial Cajal Like Cells (ICLC)” ismini vermiştir (Şekil 2.6.) (38).



Şekil 2.6. İnsan miyometriyumunda ICLC gösterimi. A. metilen mavisi ve B. gümüş paslandırma (38).

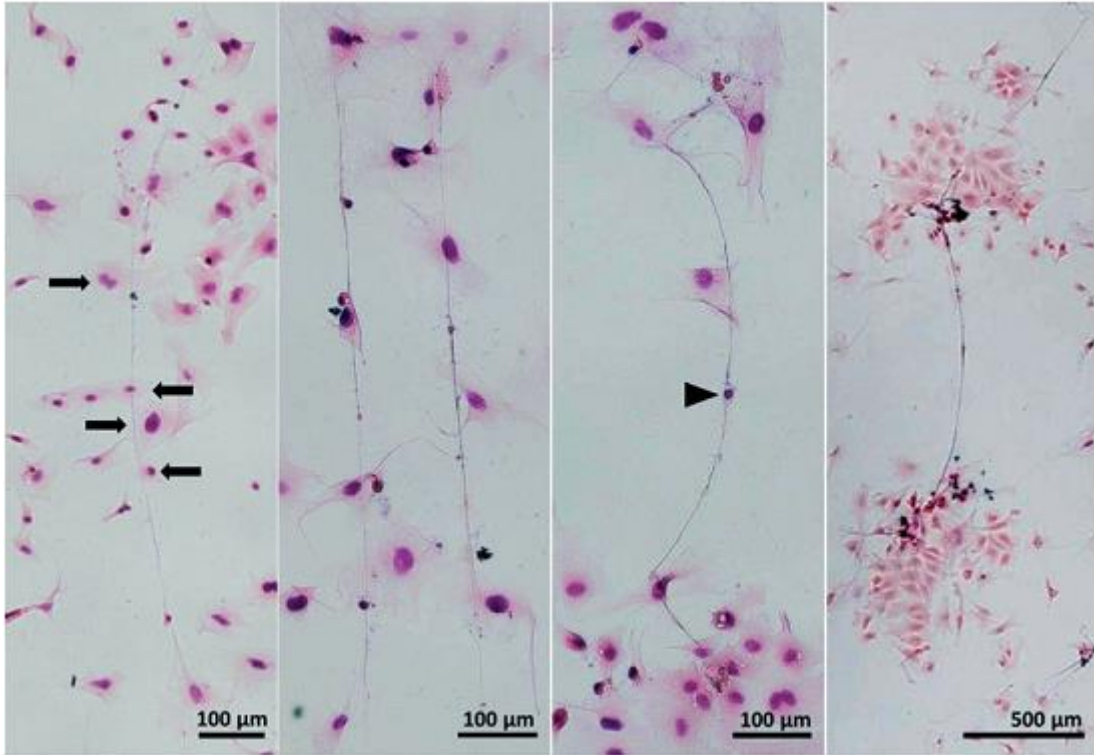
İlerleyen çalışmalarla başlangıçta bir seçenek olan ICLC isimlendirmesinin aslında çok da doğru bir isimlendirme olmadığı, çünkü hücrelerin tam olarak ICC'lere benzemediği düşünülmüştür ve özelliklerinin tam olarak belirlenmesi ve işlevlerinin netleştirilebilmesi için de EM ve immünohistokimya çalışmalarına devam edilmiştir. Yapılan araştırmaların sonucunda ICLC'lerin aslında bir ICC olmadığı ve farklı isimle isimlendirilmesi gerektiği kanısıyla ICLC'lere “Telosit” adı verilmiştir (39).

Sinir sonlanmaları ile yakınlıkları Cajal hücrelerin nörotransmisyonunda yer aldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra GİS'de belirli tabaklarda yer alan düz kaslar ile yapılan “gap junctionlar (kapı bağlantılar)” ICC'lerin bir pacemaker olduğunu ve “fonksiyonel iletken” olduklarını destekler. İlk yıllardan beri var olan pacemaker hücre tanımlaması EM gibi ilerleyen araştırma teknikleri ile ICC'lerin elektriksel ritmik olduklarını yani pacemaker aktivite gösterdiklerini desteklemiştir. ICC'ler üniter potansiyel olarak bilinen temel ritmik salınımları üretirler ve bu nörol inputa veya bir repolarizasyona yanıt olabilmektedir (40).

2.5. Telositler

Telositler küçük, oval biçimli hücre gövdeleri olan, çekirdekli, bir miktar sitoplazma ile çevrili hücrelerdir.

Çekirdek, hücre hacminin %25'ni kaplar, perinükleus stoplazmada bol miktarda mitokondri yer almaktadır. Golgi kompleksi küçüktür ve hücre iskeletini oluşturan filamentleri içermektedir. Telositler “Telepot” lardan oluşur ve farklı sayıda telepot ile çevrili olabildikleri için telepot sayılarına göre de sınıflandırılırlar (Şekil 2.7.)



Şekil 2.7. Rat endometrial hücre kültürü Giemsa ile telosit gösterimi (41).

Telositler, kan kapilleri ve onların hedef dokuları ve bunlara yakın olan sinir sonlanmaları gibi dokuda önemli yerleşimlere sahiptirler. Telositlerde bulunan telepotlar ile miyositler arasında nm boyutunda aralıklar bulunur ki bu da makromoleküler etkileşim gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır (39). Ayrıca çeşitli organlarda da telepotlar bir stromal sinaps olarak immünoreaktif hücrelerle yakın komşuluklarda bulunurlar ve “birleştirici bağlantı” olarak isimlendirilmektedirler (39).

Telepotların buldukları bölgelere göre fonksiyonel farklılıklarının olduğu tespit edilmiştir, pankreas, mezenter, hatta plasenta gibi organlarda farklı

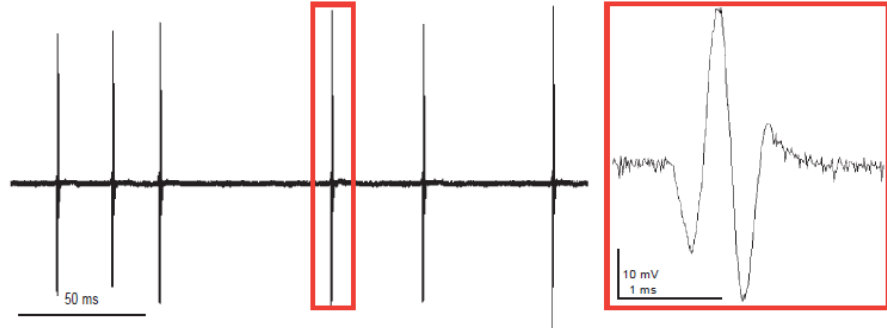
fonksiyonlara sahiptirler örneğin ICC hücreleri pacemaker özelliğe sahipken, kardiyak telositler nodal sistem üzerinden kalp hızı ve ritmine etki etmektedirler. Telositler, buldukları özel konumları sayesinde intrasellüler sinyal mekanizmalarında da işlevseldirler. Bir diğer önemli özellikleri ise kardiyak yenilenmede önemli role sahip olmalarıdır (39).

Telositlerin, uterus seviyesinde, en az iki popülasyonu bulunur: “C-kit negatif/vimentin pozitif” ile “C-kit pozitif/vimentin pozitif” ve küçük bir alt küme grubu olan “C-kit pozitif/CD34 pozitif”. Telositlerin, bu farklı fenotip özelliği düz kas içerisinde sahip oldukları farklı görevler ile açıklanabilir. C-kit sinyal yolu bloklandığında patolojik koşullar altında miyometrium veya fallop tüplerde stromal tümörlerin oluşumu da rapor edilmiştir.

Telositler hücreler arası haberleşmede aktif bir role sahiptir, tıpkı gastrointestinal sistemde olduğu gibi insan fallop tüpünde ve miyometriumda da terminal sinir lifleri ile yakından ilgili olması nöromüsküler iletimle ilişkili olabildiklerini gösterir. Dişi üreme sisteminde, NO-cGMP yolu, insan fallop tüpünü de kapsar ve burada telositler tubal kasılmaları inhibe ederek doğuma kadar rahim sessizliğini korumaktadır. Bunlardan yola çıkarak araştırmacılar sinyal entegrasyonu ile sinirler ve miyositler arasında bir modülatör işleve sahip olan telositlerin kadın genital organlarında ideal bir oyuncu olabildiği iddiasında bulunmaktadır. Telositler ayrıca komşu hücrelerin aktivitesini de düzenleyebilir.

Kas hücreleri uygulanan gerime nasıl cevap verirler bu konuda az sayıda kanıt vardır ve telositlerin düz kasta mekano transdüksiyondan sorumlu olabilecekleri iddia edilmektedir. Bununla birlikte telositlerin hormonal reseptör olduğu ve östrojen ve progesteron reseptörü olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Miyometriumda telositlerin pacemaker aktivitesini göstermek üzere yapılan bir çalışmada, ekstrasellüler tek ünite kaydı alınarak alan potansiyel ortalaması 62.4 ± 7.22 mV olarak ölçülmüş ve düz kas hücresi özelliği ile kıyaslandığında potansiyellerin oldukça kısa oldukları 1.197 ± 0.04 ms ve telositlerin spontan aktivite üretebildiklerini göstermiştir (Şekil 2.8.) (42).



Şekil 2.8. Telosit hücre kültüründen ekstrasellüler tek ünite kaydı (42).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Sütçü İmam Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 64 adet, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen Wistar Albino türü dişi sıçan kullanıldı. Deney gününe kadar sıçanlar 12 saat gündüz-12 saat gece koşulu sağlanan, sıcaklığı 25 ± 2 °C ve nem oranı % 55 olan bir odada, standart pellet yem ve çeşme suları verilerek uygun kafesler içerisinde tutuldular. Sıçanlar üzerinde yürütülen deney protokolü, 13.06.2013 tarihinde 52602694-050/42 nolu Mersin Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nca alınan karar gereğince onaylandı.

3.2. Deney

Sıçanlar her grupta eşit sayıda hayvan olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı. Doz 1; düşük (250 µg/mL), doz 2, orta (500 µg/mL), doz 3 yüksek doz (1000 µg/mL) grupları ve kontrol grubu olarak belirlendi. Gruplardaki hayvan sayısı Mersin Üniversitesi Bilişim ve Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapılan güç analizi ile belirlendi. Deneylerde boyutu 20 nm olan SiO₂ nanoparçacıkları kullanıldı.

3.3. Nanoparçacık Boyutunun ve Dozlarının Belirlenmesi

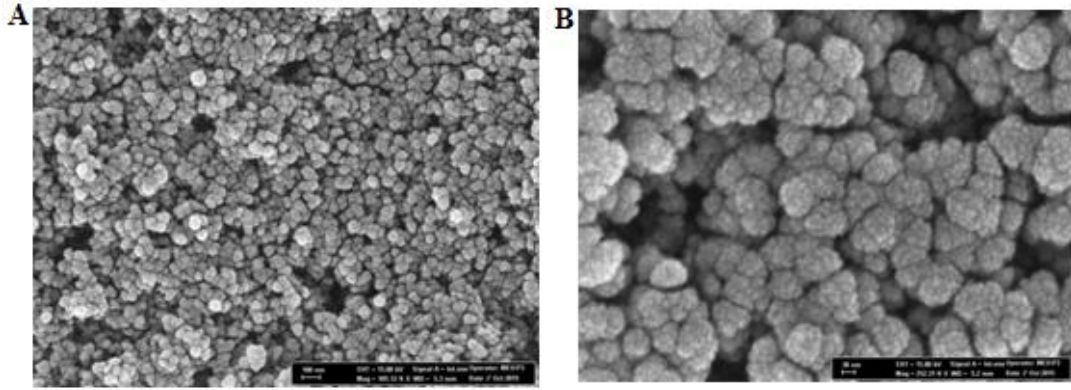
Nanoparçacıkların boyutu ve dozlar daha önceki çalışmalara göre belirlendi (43, 44, 53, 54, 55, 56). Literatürde kullanılan nanoparçacık boyutları 6-1000 nm aralığında, dozlar ise 10-2000 µg/mL aralığında değişmektedir. Biz bu çalışmada 20 nm boyutunda ve düşük 250 µg/mL, orta 500 µg/mL ve yüksek 1000 µg/mL olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda SiO₂ NP seçtik.

3.4. SiO₂ NP Üretimi

SiO₂ NP'ları Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) araştırma laboratuvarlarında Stöber yöntemine göre üretilmiştir (45,46).

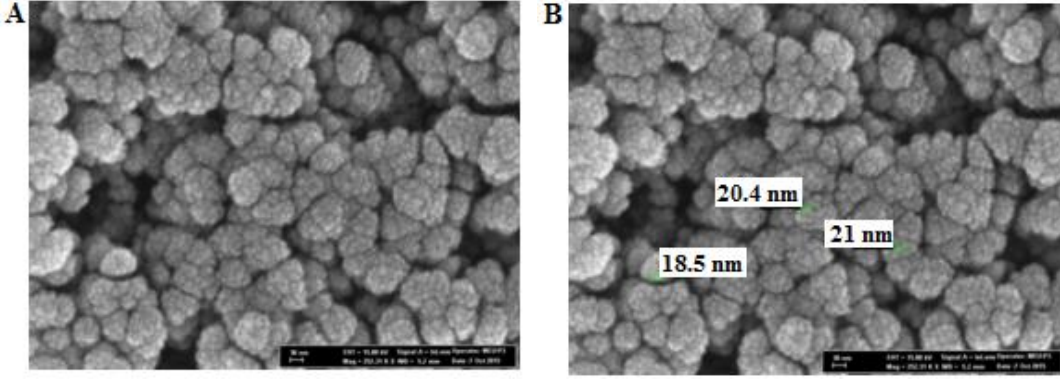
Kullanılan karışım solüsyonu (1.2 mL TEOS, 0.1 mL APTES, 1.2 mL NH₄OH, 5 mL Ethanol) atmosfersiz ortamda bir gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonunda SiO₂ nanoparçacıklar istenmeyen reaktiflerden temizlenmek üzere 4 kez yıkandı. Daha sonra silisyum nanoparçacık örnekleri fizikokimyasal özellik için nitrojen atmosferi altında yıkandı.

Alan emisyon-taramalı elektron mikroskopi (FE-SEM) görüntüleri Zeiss/Supra 55 FE-SEM kullanılarak elde edildi. Parçacıkların şekil ve boyutları eşit ve küresel oldukları FE-SEM görüntüleri ile doğrulandı (Şekil 3.1.).



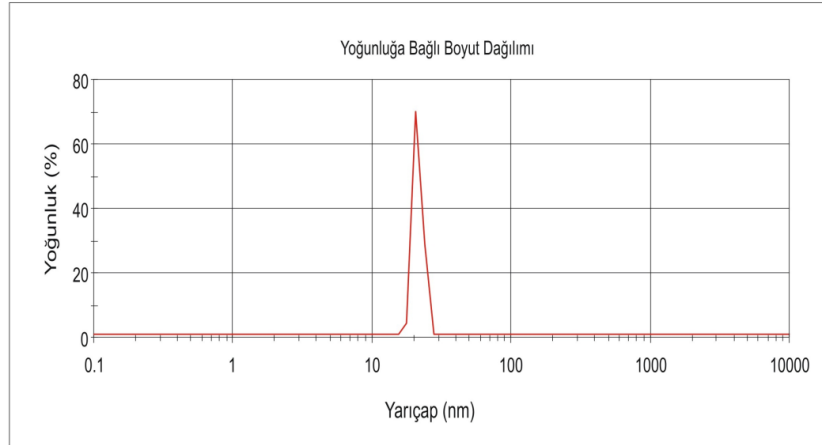
Şekil 3.1. Stöber metodu ile elde edilen SiO₂ NP'nın FE-SEM görüntüleri. A. 100 nm B. 30 nm skalasında gösterilmiştir.

Elde edilen parçacıkların boyutları 30 nm skalasında işaretlenerek Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Üretim reaksiyonları sonucu oluşan parçacık büyüklüklerinin yalnızca 20 nm'de elde etmek olanaklı değildir ancak yaklaşık 20 nm edilebilmektedir.



Şekil 3.2. Stöber metodu ile elde edilen SiO₂ NP'nın FE-SEM boyut görüntüleri. A. 30 nm, B. 30 nm skalasında gösterilmiştir.

Nanoparçacık boyutlarını belirlemek üzere ayrıca DLS ((Dinamik Işık Dağılımı, Zetasizer Nano ZS) de kullanılmıştır. DLS solüsyonda dispers olan nanoparçacıkların boyutlarını göstermekte sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Dispers olmuş nanoparçacıklar önce inorganik membran (Whatman Anotop filtre, por boyutu 0.02 mm ve 0.1 mm) kullanılarak filtrelenmiş böylece agregasyona uğrayarak birbirine tutunan parçacıklar uzaklaştırılmıştır. DLS sonuçlarının FE-SEM görüntülerini doğruladığı Şekil 3.3.'de görülmektedir.



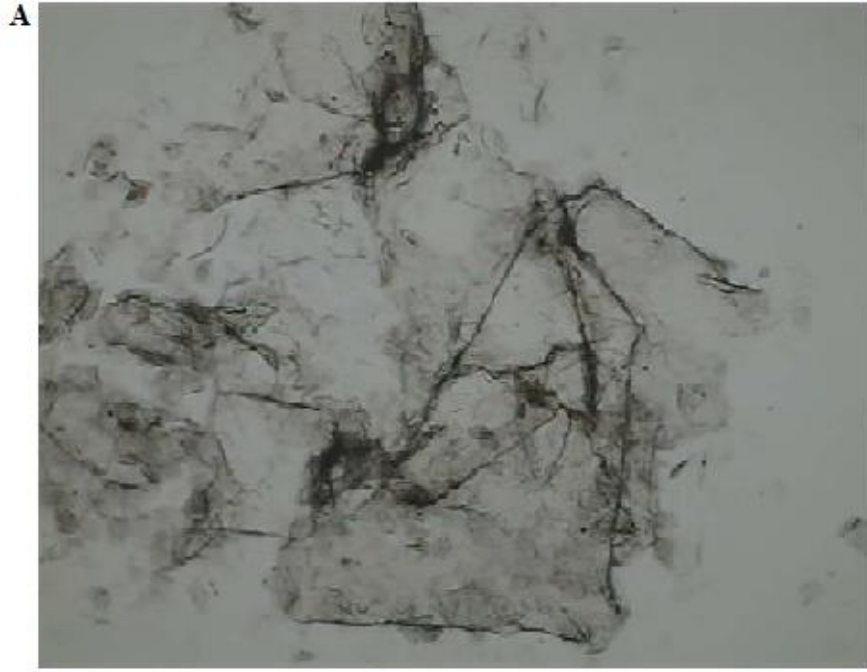
Şekil 3.3. 20 nm boyutundaki NP'ların DLS histogramı (Salin içerisinde).

3.5. Deney Grupları ve İşlemler

Biyofiziksel analiz için her sıçana ait uterusların sağ tüplerinin bir kısmı kullanıldı. Sağ tüplerin kalan bölümü biyokimyasal analizler için, sol tüpler ise histolojik incelemeler için kullanıldı.

3.6. Preparat Hazırlanması

Farklı menstrual sikluslarındaki uterus aktivite farklılıklarının önüne geçebilmek için sıçanların aynı evrede olmaları öngörüldü ve denek sıçanlar arasından östrus evresinde olan sıçanlar seçildi. Bunun saptanması için sıçanlara smear testi yapılmak üzere vajinalarından sürüntü alındı, sürüntülerin lam üzerine yayılması ardından kuruması beklendi ve ışık mikroskobunda incelenerek patlamış, çekirdeğini kaybetmiş çok sayıda düzensiz hücre ve hücre gruplarının gözlenmesi ile sıçanların östrus evrede olup olmadıkları saptandı (Şekil 3.4.). Östrus evrede olan sıçanlar servikal dislokasyon yolu ile sakrifiye edildi. Yaşam faaliyetlerinin sonlandığı görüldükten hemen sonra abdomen bölgesi orta hat boyunca açıldı. Pelvis boşluğunda, vertikal eksen boyunca önünde mesane, arkasında rektum bulunacak şekilde yer alan uterus, fallop tüpleri ile birlikte izole edildi. Fallop tüplerinin etrafındaki yağ doku temizlenerek 5-8 mm uzunluğunda, yaklaşık 1 mm kalınlığında izole düz kas şeritleri hazırlandı. Şeritler iki ucundan ipek ipliklerle bağlanarak fizyolojik Krebs çözeltisine bırakıldı.



Şekil 3.4. Smear testi ışık mikroskopik görüntüleme (A., B. X400 ve X10.000 büyütme).

3.7. Organ Banyosu ve Deney Sistemi

Hazırlanan düz kas şeritlerinin canlılığını uzun süre koruması için izole organ banyosu sistemi kullanıldı. Sisteme preparat takılmadan önce başlamak üzere deney süresince banyo çözeltisinin sıcaklığı 36-37 °C’de sabit tutuldu ve çözelti % 95 O₂ ve % 5 CO₂ karışımı ile gazlandı. Organ banyosunun sıcaklığını korumak için Isıtıcı Sirkülatör, MAY WBC3044-PR ısıtıcısı kullanıldı. 5-8 mm uzunluğunda, 1 mm kalınlığında hazırlanan izole düz kas şeritleri, içinde Krebs bulunan, 20 mL iç hacimli organ banyosunda horizontal eksen boyunca bir ucu sabit çengele, diğer ucu kuvvet transdüserine bağlandı. Fallop tüp preparatından kuvvet transdüseri (Kuvvet Transduseri, MAY FDT 10-A) yardımıyla ölçülen kasılmalara ait sinyaller MP35 (3.7.0-03.02.2004) sistemi aracılığıyla bilgisayara kaydedildi. Kayıt sisteminin genel görünüşü Şekil 3.5.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Spontan aktivite kayıt sistemi.

3.8. Çözeltiler

Krebs çözeltisi (g/L) olarak 6,9 g NaCl, 0,35 g KCl, 0,36 g CaCl₂, 2 g NaHCO₃, 0,16 g KH₂PO₄, 0,29 g MgSO₄ ve 2 g glukoz içermektedir.

Doz 1 solüsyonu, yukarıda içeriği verilen Krebs çözeltisine 20 nm boyutuna sahip, konsantrasyonu 250 µg/mL olacak şekilde SiO₂ Np karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Doz 2 solüsyonu, yukarıda içeriği verilen Krebs çözeltisine 20 nm boyutuna sahip, konsantrasyonu 500 µg/mL olacak şekilde SiO₂ NP karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Doz 3 solüsyonu, yukarıda içeriği verilen Krebs çözeltisine 20 nm boyutuna sahip, konsantrasyonu 1000 µg/mL olacak şekilde SiO₂ NP karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

3.9. Deneyin Akışı

Kas banyosuna yerleştirilen izole düz kas şeritleri 2 g ön gerilim verilerek gerdirildi. 36-37 °C'deki Krebs çözeltisinde ortama uyum sağlaması için 1 saat süre ile bekletildi. Deney süresince banyo solüsyon hacminin 20 mL'de korunmasına dikkat edildi. Banyo ortamına SiO₂ NP eklemeyen spontan aktivite oluştuğunda kayıtlar alınmaya başlandı. Başlangıçta kasın dengeye ulaşması için bir saat süresince alınan kayıt sonrasında kontrol olarak kullanılmak üzere 0. dakika kayıtları alındı. Daha sonra kas banyolarına doz gruplarına özgü hazırlanan SiO₂ NP içeren Krebs solüsyonları eklendi. Dozların, kontrol (0. dk) ile arasındaki farkı gözlemek üzere 30, 60, 90, 120., dakikalarda 2 saat süresince kayıtlara devam edildi. Biyokimyasal ve histolojik incelemeler için dört gruptan elde edilen preparatlar kullanıldı.

3.10. Biyokimyasal Takip

Dokuların lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) düzeylerine, antioksidan düzeylerini belirlemek için ise glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine bakıldı. Enzim aktivitelerinin U/mg protein olarak belirtebilmek için ise tüm dokuların protein düzeyleri ölçüldü.

3.10.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)

3.10.1.1 Deney Prensibi:

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdat fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kullanılan reaktifler aşağıda sıralanmıştır (47).

A Reaktif: 0,1 N NaOH çözeltisi kullanılarak % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi hazırlandı.

B₁ Reaktif: % 1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı.

B₂ Reaktif: % 2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlandı.

B Reaktif: B₁ ve B₂ eşit hacimde karıştırıldı.

C Reaktif: 50 mL B reaktifine 1 mL A reaktifi eklendi. Reaktif taze hazırlandı ve bekletilmeden kullanıldı.

D Reaktif: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile karıştırıldı.

Protein standardı: 250 mg/100 mL bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$, protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

Çizelge 3.1. Protein ölçüm (Lowry Metodu) protokolü

	Kör tüpü	Numune tüpü	Standart
Numune (μL)	-	300	-
Distile su (μL)	300	-	-
Standart (μL)	-	-	300
C reaktifi (μL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dakika beklendi			
D reaktifi(μL)	300	300	300

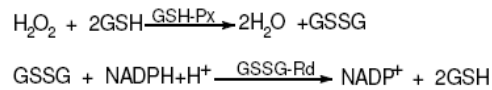
Tüpler vortekslenerek 20-30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okundu.

Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. % 10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı mg olarak bulundu.

3.10.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü

3.10.2.1. Deney Prensi: GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonda GSH'nın H₂O₂ ile oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'nin glutasyonredüktaz (GSSG-Rd) kataliziyle tekrar GSH'a dönüşmesi sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden 340 nm'de oluşan absorbans azalmasının 4 dakika boyunca izlenmesi prensibine dayanır. Kullanılan reaktifler aşağıda sıralanmıştır.

Fosfat tamponu	: 0,05 M (pH 6,8) (5 mM EDTA içerir)
Redükte L-Glutasyon çözeltisi	: 0,15 M
NADPH çözeltisi	: 7,2 mM
Glutasyon Redüktaz çözeltisi	: 100 U/mg protein/mL
Sodyum Azid çözeltisi	: 2 M
Hidrojen Peroksit çözeltisi	: 30 mM



Çizelge 3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivite ölçüm protokolü

	Örnek (Doku Homojenizati)
Fosfat Tamponu	2,65 mL
Redükte Glutasyon çöz.	0,1 mL
NADPH çözeltisi	0,1 mL
Glutasyon Redüktaz çözeltisi	0,01 mL
Sodyum Azid çözeltisi	0,01 mL
Numune	0,1 mL
Hidrojen Peroksit çözeltisi	0,1 mL

Hazırlanan çözelti 25 °C’de 2 dakika inkübe edildikten sonra 340 nm’deki absorbanı ölçüldü ve bu değere karşı spektrofotometre sıfırlandı. Bu çözelti üzerine 0,1 mL H₂O₂ çözeltisi eklenerek 2 dakika boyunca enzim aktivitesindeki düşüş gözlemlendi (48).

Her numune ve kontrol tüpü için, 2. ve 4. dakikalarda OD değerleri kullanılarak, $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı. Daha sonra numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net $\Delta OD/dk$ değerleri elde edildi. Doku GSH-Px aktivitesi, miligram protein başına (U/mg protein) spesifik aktivite cinsinden verildi.

3.10.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini

3.10.3.1. Deney Prensipleri: Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksiksüperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantinoksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin

nitrobluetetrazolium (NBT) ile 560 nm'de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır (49). Kullanılan reaktifler aşağıda sıralanmıştır.

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOHbidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C'de bir hafta dayanıklıdır.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

EtilendiamintetraasetikAsid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg Na₂EDTA. 2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

NitroblueTetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 mL ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na₂EDTA, 3 mL 400 mM Na₂CO₃, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g (NH₄)₂SO₄ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş (NH₄)₂SO₄ çözeltisinde çözülerek 1 mL'ye tamamlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg CuCl₂.2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: 2,85 mL SOD reaktifi örnek tüpüne ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µL süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µL ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra tüplere 100 µL CuCl₂ çözeltisi eklendi. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µL süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör tüpünün ve örnek tüpünün 560 nm'de

absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edildi. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.10.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Lipit peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (50). Kullanılan reaktifler aşağıda sıralanmıştır.

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksipropan 1 mL'de çözülür.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.

SDS çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve çözülür.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH'sı 3,5'e ayarlanır.

TBA çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve ısıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridinin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılır.

3.10.4.1 Deneyin Yapılışı:

Çizelge 3.3. Malondialdehit (MDA) ölçüm protokolü

	Kör	Standart	Örnek
Standart (1/10 dilüe) (µL)	-	50	-
Örnek (µL)	-	-	50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
	400	350	350

Tüpler 95 °C’de 30 dakika süre ile inkübe edildi. Musluk suyunda soğutuldu. 500 µL distile su elkendi 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak karışımlar beyazlaşınca kadar vortekslendi. 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.11. Histolojik İncelemeler

3.11.1. Dokuların Elde Edilmesi ve Fiksasyonu

Histolojik takip için ratların sol uterusları tercih edildi. Deney süresince toplam 64 preparat kullanıldı. Kontrol grubuna ait preparatlar izolasyondan hemen sonra immünfloresan preparasyon için % 4’lük paraformaldehit çözeltisine, elektron mikroskopik preparasyon için % 2,5’luk gluteraldehit çözeltisine alınırken deney grupları 2 saatlik doz 1, doz 2, doz 3 çözeltilerinde bekletildikten sonra immünfloresan ve elektronmikroskopik preparasyona alındı.

3.11.2. İmmün Floresan İşaretleme Protokolü

1. Paraformaldehit çözeltisindeki dokular bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletildi.

2. Dokular % 20’lik süktroz solüsyonda 12 saat, bunu takiben % 30 süktroz ve % 0,1 sodyum azid içeren solüsyonda 12 saat bekletildi. Daha sonra -20 °C’ye konarak donmaları sağlandı.

3. Donan dokulardan, Leica® CM1900 marka kriyostat ile 5 µm kalınlığında kesitler, adheziv kaplı lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond®) alındı. İşaretleme işlemi yapılmadan önce kesitler pap-pen ile çevrildi.

4. Kesitler fosfatlı tuz tamponu (PBS, pH: 7,4) ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

5. Non-spesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için protein blok (Novocastra™, katalog no: D01-125) ile 8 dakika inkübe edildi.

6. Kesitlerin üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı. Daha sonra % 0.1 Triton-X-100, % 0.5’lik sığır serum albumini içeren PBS içinde (PBS-BSA) 1/200 oranında sulandırılmış primer antikorlar (caspase-3 tavşandan elde edilmiş poliklonal IgG primer antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: sc-7148) damlatıldı. Negatif kontrol için ayrılan kesitlere ise primer antikor içermeyen % 0,5 PBS-BSA damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde +4 °C’de buzdolabında 16 saat inkübe edildi.

7. İnkübasyondan çıkarılan kesitler PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

8. Kesitlerin üzerine %0,5 PBS-BSA içinde 1/400 oranında sulandırılmış sekonder antikor (keçiden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge anti-tavşan IgG sekonder antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: sc-2012) damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi.

9. Kesitler PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

10. Son yıkamadan sonra lamalar dikkatlice kurulandı ve çekirdeklerin boyanması için kesitler, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içerikli kapatma medyumu (Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: 24941) ile kapatıldı. Lamellerin etrafı, kesitlerin hava almaması için tırnak cilası ile izole edildi.

3.11.3. Elektron Mikroskopik Doku Takibi Protokolü

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1mm³'lük parçalara bölündü ve % 2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda 4-6 saat tespit edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlandı.

1. %1'lik osmium tetraoksitte ikinci tespit	1 saat
2. PBS ile yıkama	3 kez 5'er dakika
3. % 50 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
4. % 60 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
5. % 70 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
6. % 80 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
7. % 96 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
8. % 100 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
9. % 100 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
10. %100 Etil alkol	25 °C'de 15 dakika
11. Propilen oksit	25 °C'de 15 dakika
12. Propilen oksit	25 °C'de 15 dakika
13. Propilen oksit + Epoksi rezin	25 °C'de 30 dakika
14. Propilen oksit + Epoksi rezin	25 °C'de 30 dakika
15. Epoksi rezin	25 °C'de 16-24 saat

Bu işlemlerden sonra dokular epoksi rezine (Electron Microscopy Sciences® katalog no:13940) gömülerek 60 °C'lik etüvde 24 saat süreyle polimerize edildi. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Leica® Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana) ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Kontrastlama işlemi için;

- Kesitler uranil asetatı 5 dakika bekletildi,
- Distile su ile yıkandı,
- Kurşun sitratta 5 dakika bekletildi,
- Distile suda yıkandı,
- Kurutma kâğıdı ile kurutuldu.

3.11.3.1. Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Boyanan kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Jeol® JEM1011, Tokyo, Japonya) ile incelendi ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflandı. Her grupta miyometrium tabakasında bulunan düz kas hücrelerinin ultrayapısı ayrıntılı olarak incelendi.

3.12. Biyofiziksel Verilerin Wavelet Dönüşümü ile Analizi

Spontan ritmik biyosinyallerin analizinde Fourier, Wavelet (Dalgacık) dönüşümü gibi analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan Fourier dönüşümü frekans bandında bilgi verirken Wavelet dönüşümü ise zaman ve frekans bandında bilgi verir.

Dalgacık dönüşümünün taban fonksiyonlarına “dalgacık” adı verilir. Dalgacık, ortalama değeri sıfır ve süresi sınırlı olan bir dalgadır. Wavelet dönüşümünde bir fonksiyonun dalgacık olmaya aday olması, $\psi(x)$ fonksiyonunun sürekli olması ve $x \rightarrow \infty$ için sıfıra gitmesi veya reel sayılar kümesinde bir bölüm haricinde değerinin sıfır olmasıyla mümkündür. Burada bahsedilen sıfır olmayan reel sayılar kümesi parçasına “dalgacığın desteği” denir.

Dalgacık dönüşümünün matematiksel karşılık bulan iki temel parametresi vardır. Bunlar “a: dilasyon (skala)” parametresidir. a parametresi bir fonksiyonu zaman skalasında sıkıştırır veya genişletir. a için büyük değerler, küçük frekans değerlerine, küçük değerler ise yüksek frekans değerlerine karşılık gelir. a ile frekans arasında ters orantı vardır. Diğer parametre ise “b: öteleme parametresidir” ki bu parametre de tanımlanan bir skala boyunca dalgacığın ötelenmesinden sorumludur. a ve b parametreleri sürekli veya kesikli olabilir. Sürekli olmalarında denklem 3.1.’deki gibi, kesikli olmasında ise denklem 3.2.’deki gibi ifade edilirler (51).

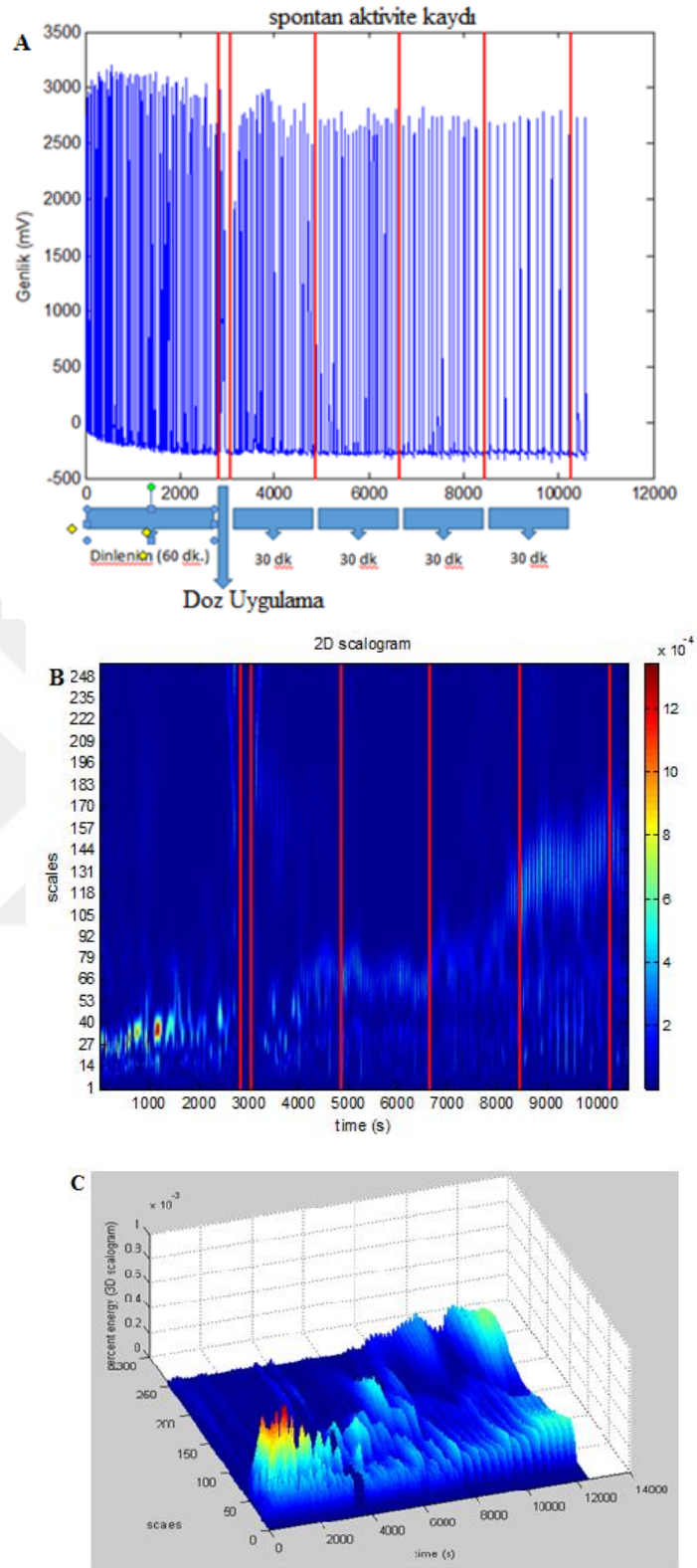
$$\Psi_{ab}(t) \triangleq \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (3.1)$$

$$\Psi_{jk}(t) = 2^{-j/2} \Psi(2^{-j}t - k) \quad (3.2)$$

Dalgacık dönüşümü kullanılarak zaman içerisinde frekansın yeri hakkında bilgi verir. Katsayıların büyüklüğünü dikdörtgenlerin renkleri ile ifade eden bir grafik çizimidir. Dikdörtgenlerin yeri ve boyutu katsayının zamanı ve frekansı hakkında bilgi verir.

Düşük değerlerde katsayılar, geniş zaman aralığı ve küçük frekansa sahip olduğunu belirtmek için geniş ve kısa kenarlı dikdörtgenle temsil edilirken tersine, yüksek değerlerde katsayılar, küçük zaman aralıkları ve büyük frekansa sahip olduğunu belirtmek için ince ve uzun kenarlı çizilir (52).

50 Hz örnekleme frekansında Biopac Lab. Pro 3.7.0-MP35 programı aracılığıyla alınan uterus düz kas spontan aktivite kayıtların Wavelet analizlerini yapmak üzere MATLAB Programına aktarıldı. Daha önceden “acq” formatında kayıtlanan verilerin “mat” dönüşümleri yapıldı. 50 Hz kayıt frekansının sağlayabileceği gürültü bileşenlerini uzaklaştırmak üzere kayıtların tamamı örnek seyreltme süzgecinden (decimation filter) geçirildi. Analizde öncelikle kayıtların MATLAB ortamında sürekli wavelet dönüşümleri (CWT) alındı. Elde edilen CWT katsayılarının karesi alınarak her bir dönüşüme karşılık gelen wavelet skalogramlarına, bir başka ifadeyle enerji fonksiyonlarına ulaşıldı. İki ve üç boyutlu skalogramlarda renk skalası referans alınarak yorum yapılır, lacivert renk düşük iken, kırmızı renk en yüksek enerjiyi gösterir (Şekil 3.6.). Her grup için bu fonksiyondan 30, 60, 90 ve 120. dakikalardaki genlik değerleri (genlik burada sinyalin toplam enerjisinin yüzde kaçının orada olduğunu temsil etmektedir) elde edildi.



Şekil 3.6. Sıçan uterus düz kas spontan aktivite grafikleri. A. Spontan aktivite kaydı, B. 2 boyutlu skalogram, C. 3 boyutlu skalogram.

3.13. İstatistiksel Değerlendirme

Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelendi. Dağılım varsayımı bütün gruplar için doğrulandı ve grupların normal dağılımda olduğu saptandı. Grup içi değerlendirmeler tekrarlayan ölçümlü varyans analizi ile, gruplar arasındaki farklılık ise ANOVA ile yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunnett ve Tukey testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığın sınırı $p < 0,05$ olarak belirlendi.



4. BULGULAR

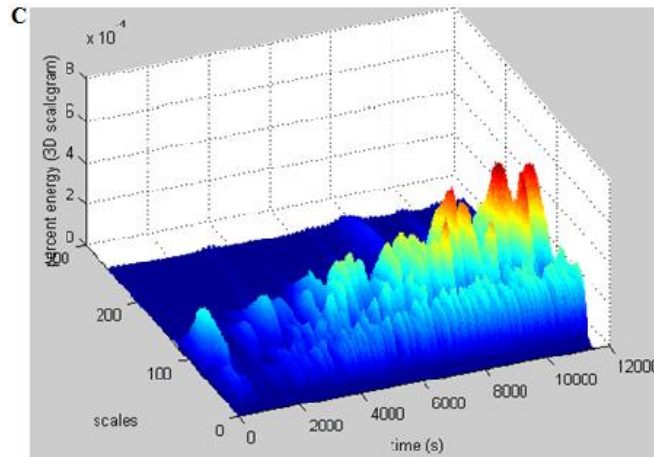
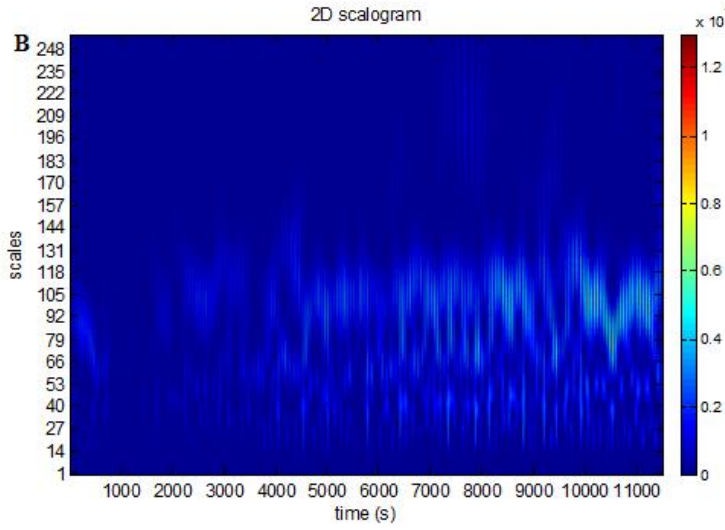
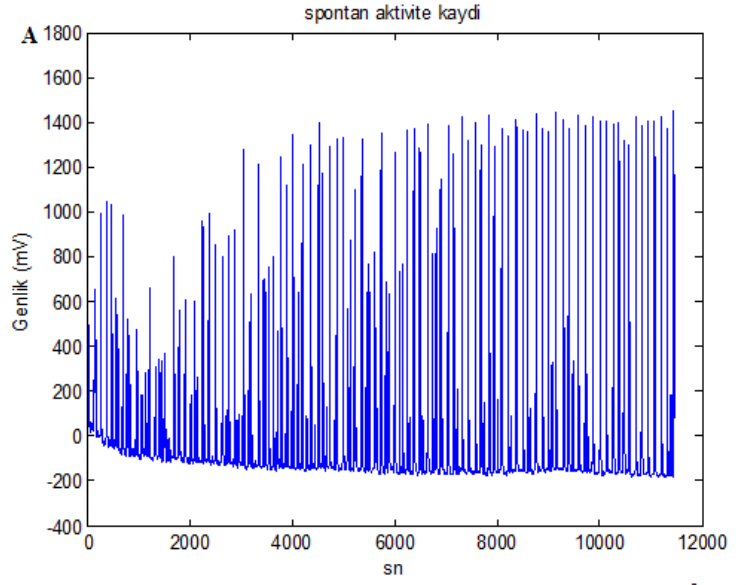
4.1. SiO₂ NP'nın Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Etkileri

SiO₂ NP'nın uterus düz kas spontan aktivitesi üzerine etkisine ilişkin kayıtlar kontrol, doz 1 doz 2 ve doz 3 için sırasıyla Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. Wavelet analiz parametreleri olan enerji ve frekans değişimleri biyokimyasal ve histolojik değerlendirmelerden farklı olarak hem doza hem de zaman bağlı olarak değerlendirilmiştir.

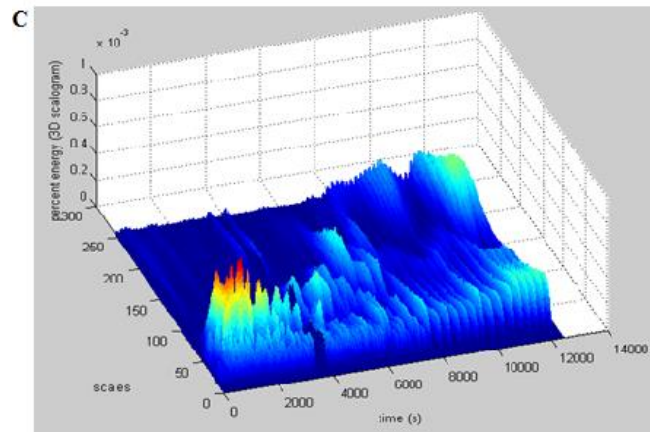
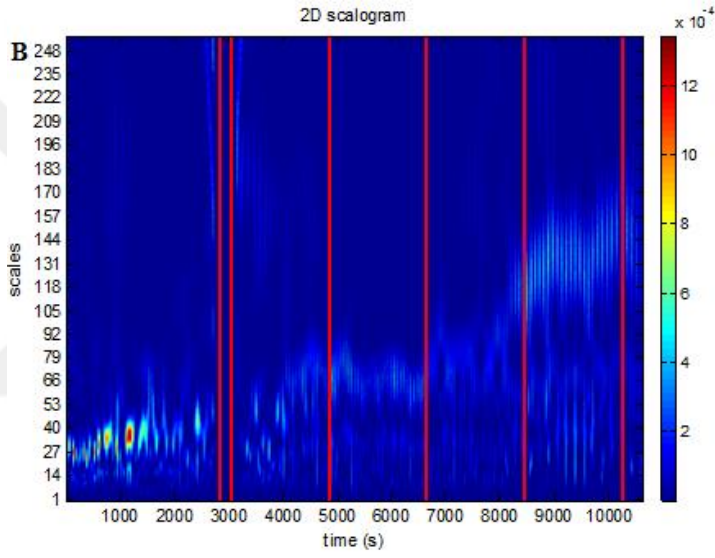
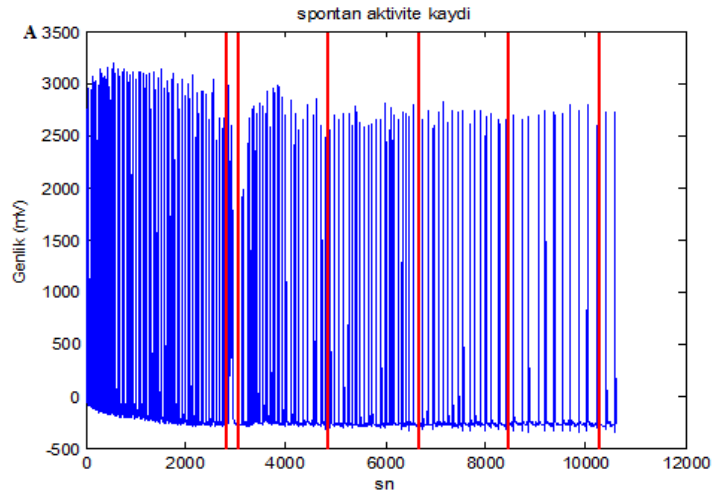
Wavelet skalogramlarında skala ile frekans ters orantılı olup enerji grafiği kenarında verilen renk skalası dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Yapılan wavelet analizi sonucunda elde edilen 2 ve 3 boyutlu wavelet skalogramlarında zamana bağlı olarak kasılmaların frekansı ve enerjileriyle ilgili bilgiler elde edilmiştir. Kontrol için olan skalogram grafikleri (Şekil 4.1.) incelendiğinde, tüm süre boyunca kasılmaların yaklaşık 80 skala değerinde olduğu, bunun da yaklaşık olarak 0.01 Hz'e karşılık geldiği tespit edilmiştir. Aynı grafiklerden, kayıt süresinin son 30 dakikalık kısmında enerji seviyesinin yaklaşık %100 oranında artış gösterdiği de gözlemlenmiştir. Bu enerji artışı sinyal analizi olarak incelendiğinde, kasılmaların genlikleri değişmezken zaman ilerledikçe kasılmanın başlamasıyla bitişi arasındaki sürenin arttığı, yani daha uzun süre kasılı kalan uterus kasının da daha fazla enerji sergilediği sonucuna ulaşılmıştır. Doz uygulamalı skalogram grafikleri incelendiğinde ise her bir dozun kendi kontrol (doz uygulama öncesi) süresi içinde sahip olduğu enerji seviyesinin doz uygulaması sonrasında düştüğü ancak doza bağlı olarak bu düşüşün farklı olmadığı tespit edilmiştir. Buna karşılık doz uygulamalı tüm 2 boyutlu skalogram haritalarındaki sağ üst köseye doğru seyreden yüksek enerji değerleri, kasılmaların skala değerlerinin arttığını, dolayısıyla da kasılma frekansının düştüğünü göstermiştir. Bu kayıtlar sinyal analizi yöntemleriyle incelendiğinde doz uygulama sonrasında geçen zamana bağlı olarak bazı durumlarda kasılma genliklerinde düşme olmasına karşın kasılı kalma sürelerindeki artış sebebiyle enerji değerlerinin değişmediği saptanmıştır. Doz uygulamalı sonuçlar, doz uygulanmayan kontrol

sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, doz uygulanmadığı durumda zaman ilerledikçe ortaya çıkan enerji artışının uygulanan doz tarafından ortadan kaldırıldığı, yani uygulanan SiO₂ NP'ların zaman ilerledikçe kasılma enerjisini de düşürdüğünü, ancak bu düşüşün uygulanan doza bağlı olmadığını söylemek mümkündür. Ayrıca tüm doz uygulamalarında uygulama sonrası kasılma frekansının düştüğünü, bu düşüşün 3. dozda daha hızlı olduğu da rahatlıkla söylenebilir.

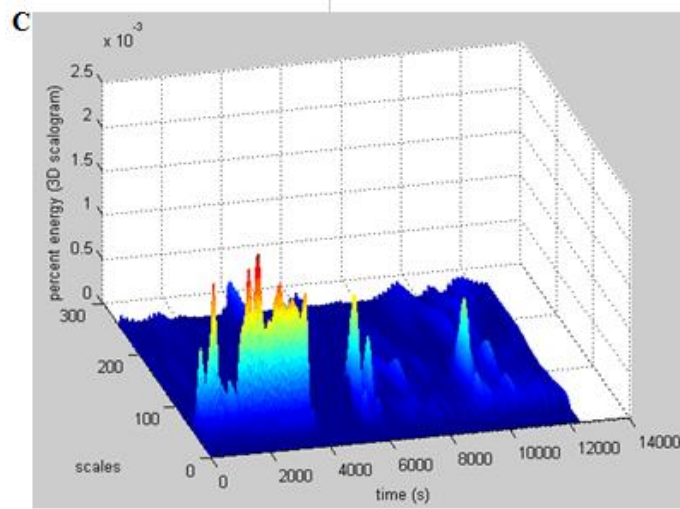
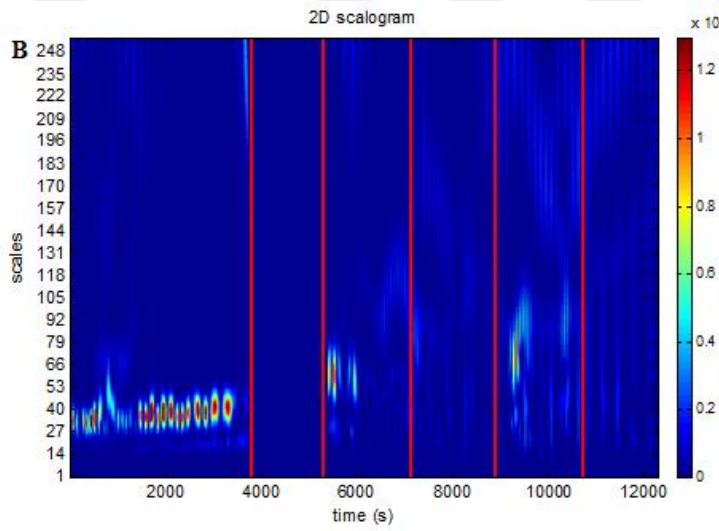
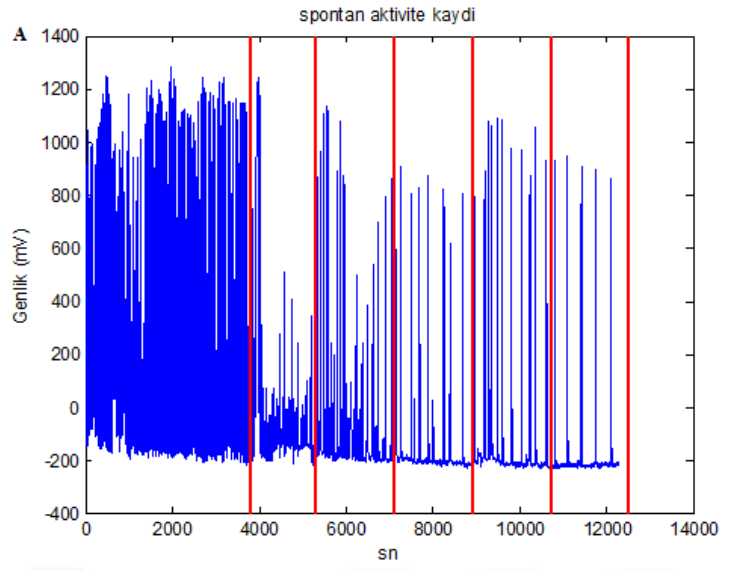
Wavelet dönüşümüyle uterus spontan aktivitesinin enerji ve frekans değerleri tüm dozlar ve uygulama süreleri için elde edilmiştir. Enerji değerleri açısından üç doz için kontrol ölçümüyle (0.dakika), 30, 60, 90 ve 120. dakika ölçümleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.5.). Frekans değeri her üç doz için 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol değerine göre (0. dk) azalmıştır ve bu azalma 60, 90 ve 120. dakikalar için istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). (Şekil 4.6.). Frekansta doza bağlı önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p>0.05$).



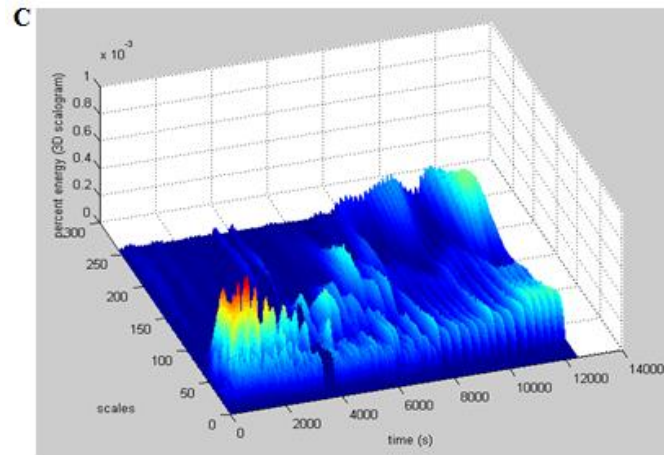
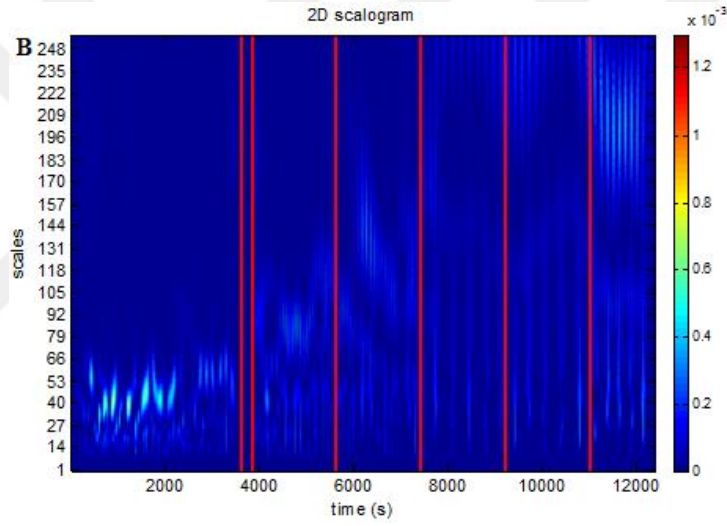
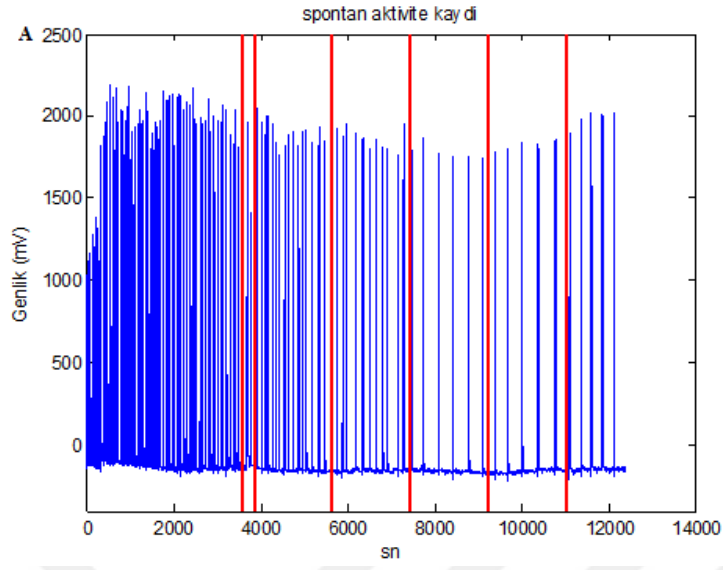
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait grafikler. A. Uterus düz kas spontan aktivite kaydı, B. 2 boyutlu skalogram, C. 3 boyutlu skalogram.



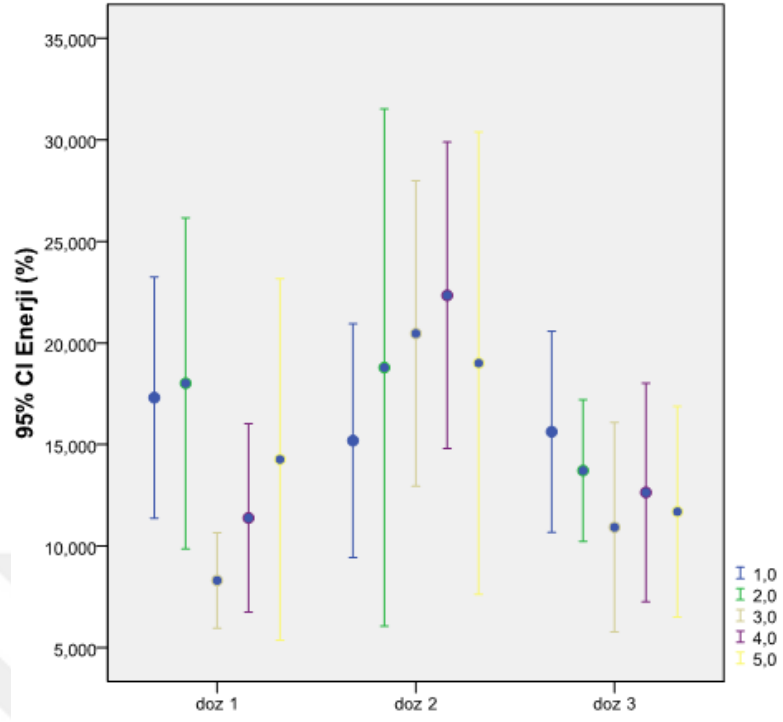
Şekil 4.2. Doz 1'e ait grafikler. A. Uterus düz kas spontan aktivite kaydı, B. 2 boyutlu skalogram, C. 3 boyutlu skalogram.



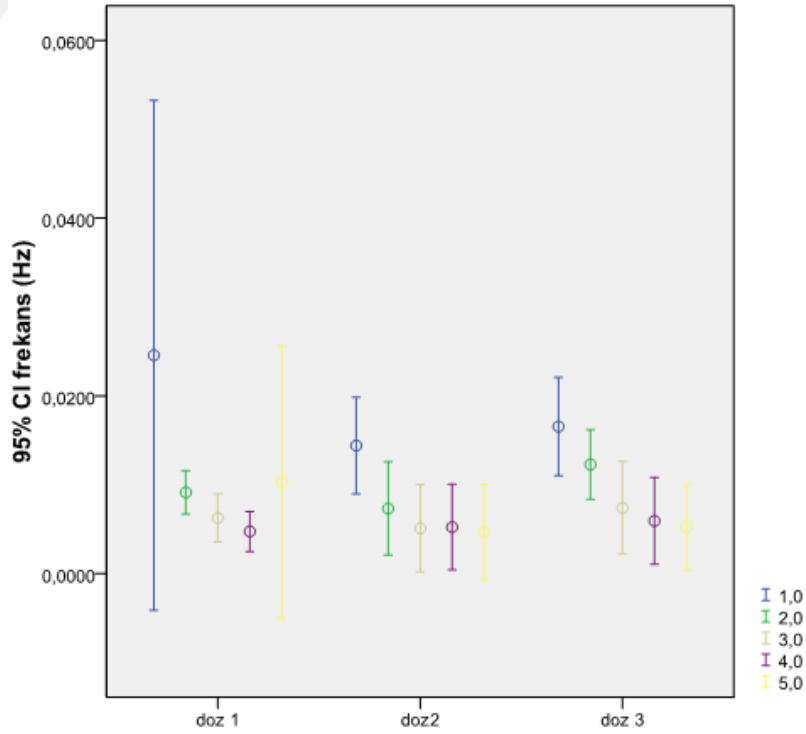
Şekil 4.3. Doz 2'ye ait grafikler. A.Uterus düz kas spontan aktivite kaydı, B. 2 boyutlu skalogram, C. 3 boyutlu skalogram.



Şekil 4.4. Doz 3'e ait grafikler. A. Uterus düz kas spontan aktivite kaydı, B. 2 boyutlu skalogram, C. 3 boyutlu skalogram.



Şekil 4.5. SiO₂ NP için enerji değerlerinin doza bağlı değişimi. Grafikte 1:0.dk, 2:30.dk, 3:60.dk, 4:90.dk, 5:120.dk'ya karşılık gelmektedir.



Şekil 4.6. SiO₂ NP için frekans değerlerinin doza bağlı değişimi. Grafikte 1:0.dk, 2:30.dk, 3:60.dk, 4:90.dk, 5:120.dk'ya karşılık gelmektedir.

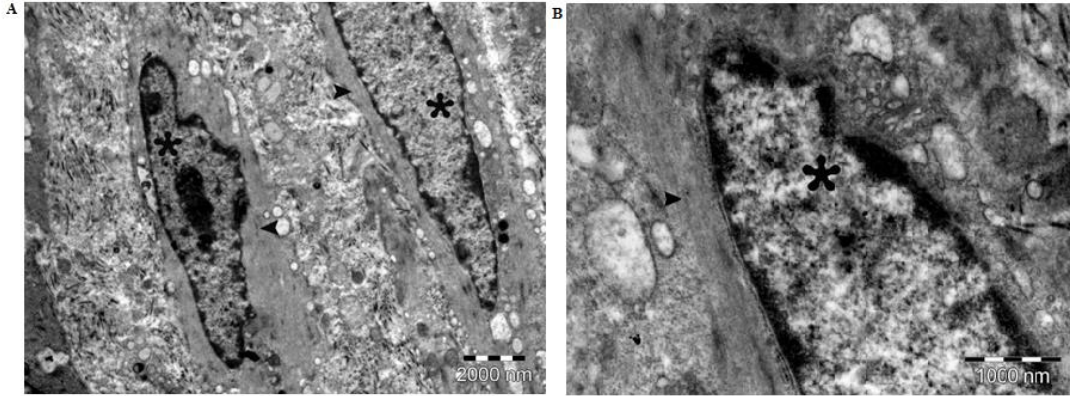
4.2. SiO₂ NP'nın Uterus Miyometriyum Tabakası Üzerine Etkilerinin Elektron Mikroskopik Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait uterus dokusu örneklerinde miyometriyum tabakasındaki düz kas hücrelerinin normal morfolojik özellikleri sahip oldukları görüldü. Miyometriyum hücrelerinin nükleus ve organelleri normal yapıda izlendi. Miyometriyum düz kas hücrelerinin sitoplazmasında bulunan intrasitoplazmik yoğun cisimciklerin de normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7.).

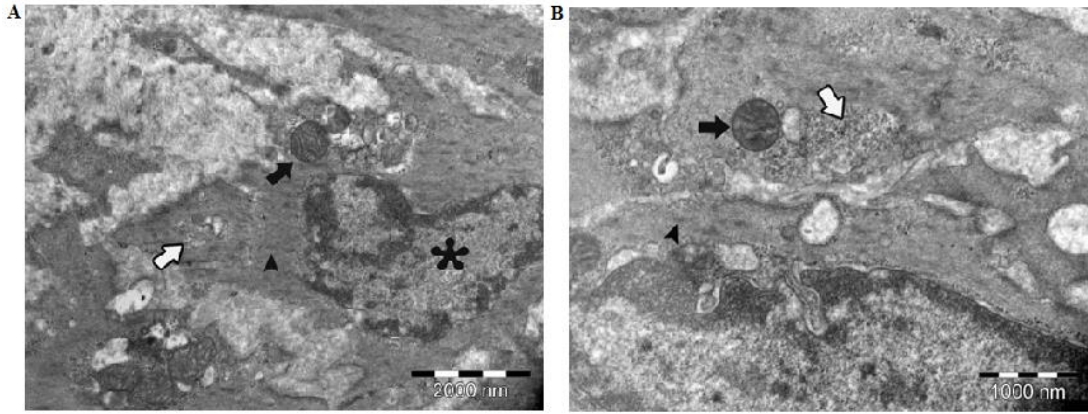
Doz 1 (Şekil 4.8.), doz 2 (Şekil 4.9.) ve doz 3 (Şekil 4.10.) gruplarına ait uterus dokusu örneklerinde miyometriyum tabakasındaki düz kas hücrelerinin kontrol grubuna benzer şekilde normal morfolojik özelliklere sahip oldukları saptandı.

Düz kas hücrelerinin nükleus, sitoplazmik organeller ve intrasitoplazmik yoğun cisimcikler normal yapısal özelliklere sahiptir.

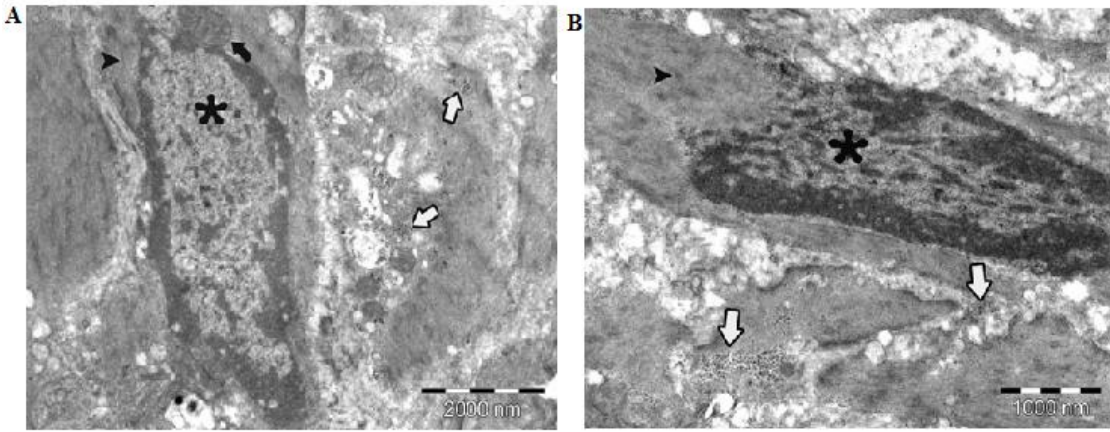
Ancak tüm deney gruplarında kontrol grubundan farklı olarak hem bağ dokusunda hem de miyometriyum tabakasındaki düz kas hücrelerinin sitoplazmalarında hücre membranına yakın lokalizasyonda elektron dens nanopartikül toplulukları saptandı (Şekil 4.11.).



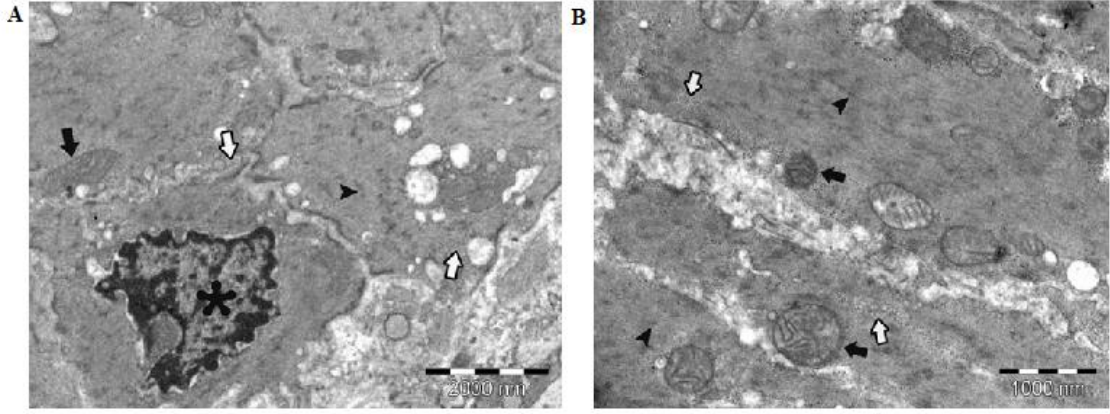
Şekil 4.7. A.,B. Kontrol grubu miyometriyum düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri. Nükleus (yıldız), intrasitoplazmik yoğun cisimcikler (ok başları). (Uranyl asetat-kurşun sitratA.- X7500 B- 25000).



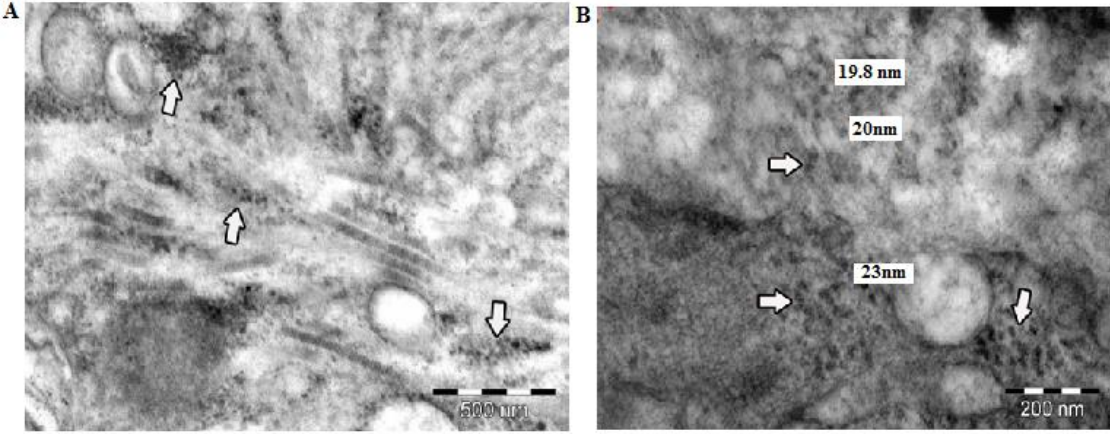
Şekil 4.8. Doz 1 miyometrium düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri. A., B. Nükleus (yıldız), mitokondriyonlar (oklar), intrasitoplazmik yoğun cisimcikler (ok başları), NP (beyaz oklar). (Uranil asetat-kurşun sitrat A. X15000 B. X25000).



Şekil 4.9. Doz 2 miyometrium düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri. A., B. Nükleus (yıldız), mitokondriyonlar (oklar), intrasitoplazmik yoğun cisimcikler (ok başları), nanopartiküller (beyaz oklar). (Uranil asetat-kurşun sitrat A. X15000 B. X25000).



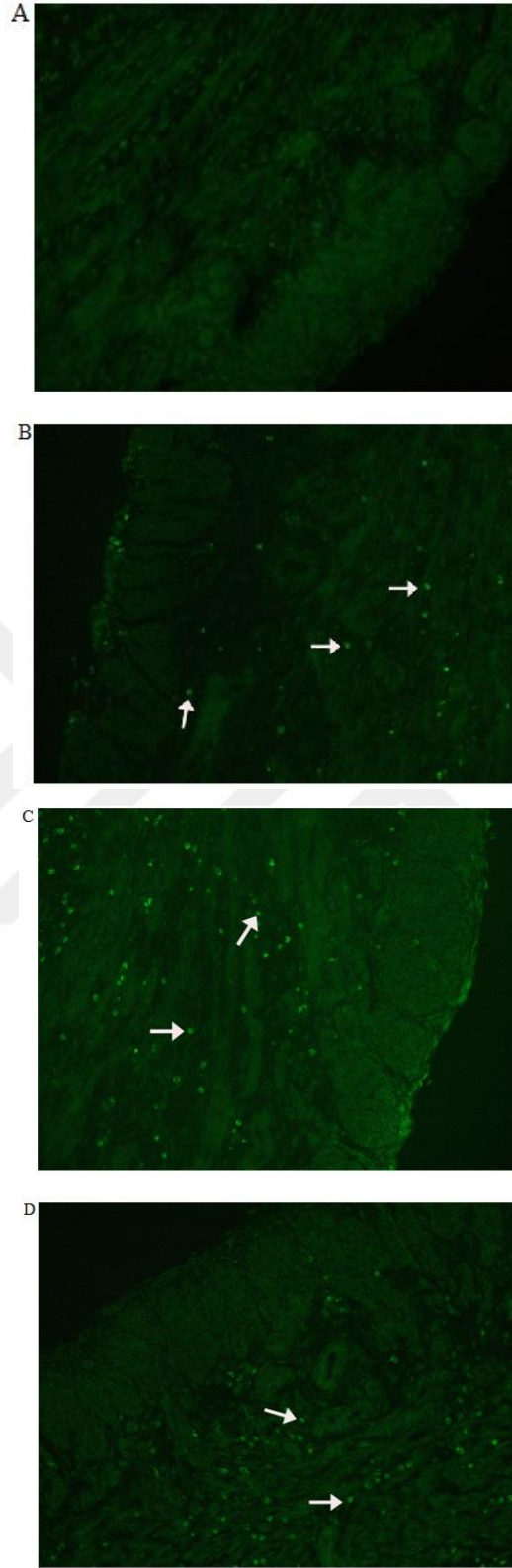
Şekil 4.10. Doz 3 miyometrium düz kas hücrelerine ait EM görüntüleri. A., B. Nükleus (yıldız), mitokondriyonlar (oklar), intrasitoplazmik yoğun cisimcikler (ok başları), nanopartiküller (beyaz oklar). (Uranil asetat-kurşun sitratA. X15000 B. X 25000).



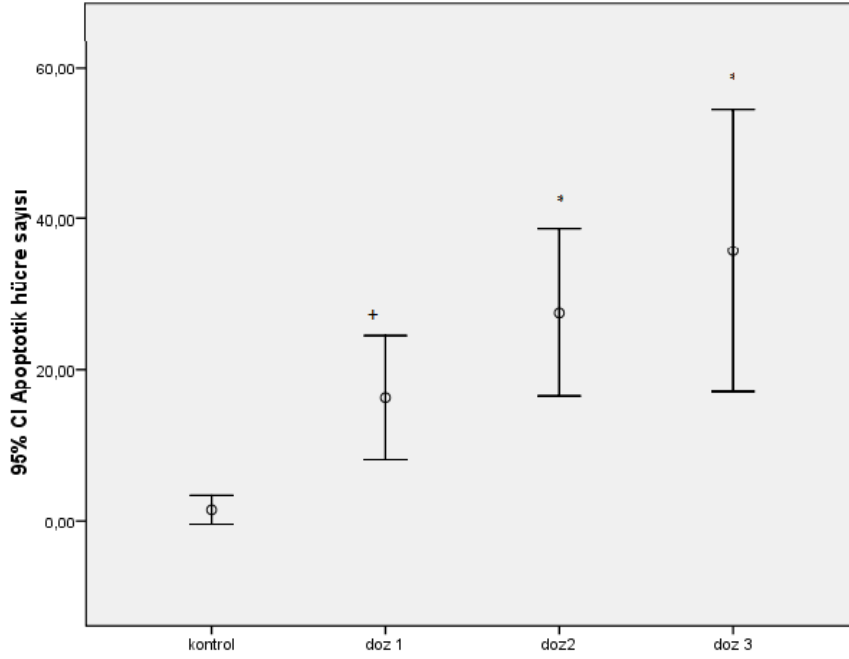
Şekil 4. 11. A. Deney gruplarında uterus miyometrium hücre sitoplazmalarında 20 nm boyutunda SiO₂ NP gösterimi (beyaz oklar), B. (Uranil asetat-kurşun sitrat, A. X60000, B. X120000)

4.3. SiO₂ NP'nın Uterus Miyometrium Tabakası Üzerine Etkilerinin İmmün Floresan Değerlendirilmesi

Floresan boyama yapılan kontrol, doz 1, doz 2 doz 3 gruplarına ait Caspase 3 pozitif işaretli olan bölgeler yani apoptoza uğramış hücreler Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada doz 2 ve doz 3 kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı iken doz 1'e ait caspase 3 pozitifliliğin doza göre istatistiksel anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.13.).



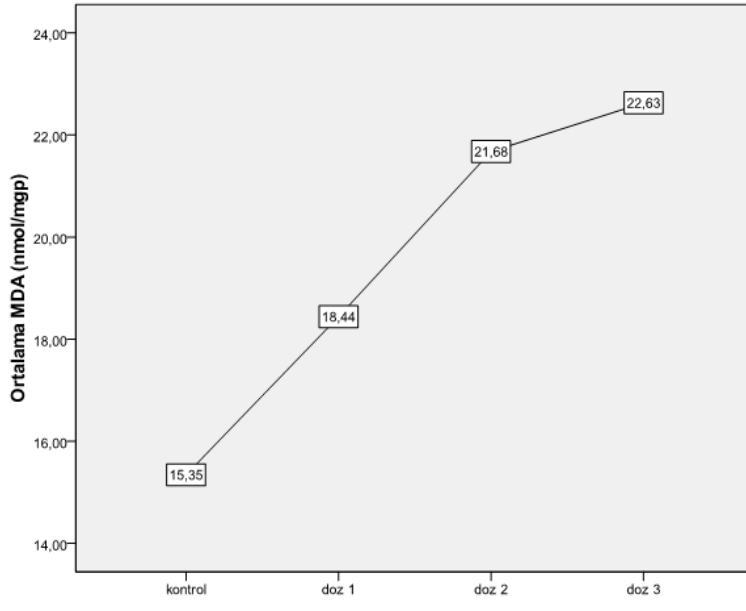
Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarında Caspase 3 immün işaretleme. Kontrol grubu A. Caspase 3 pozitif hücreler (oklar) Doz1 B., doz 2 C.,ve doz 3, D. (FITC X400).



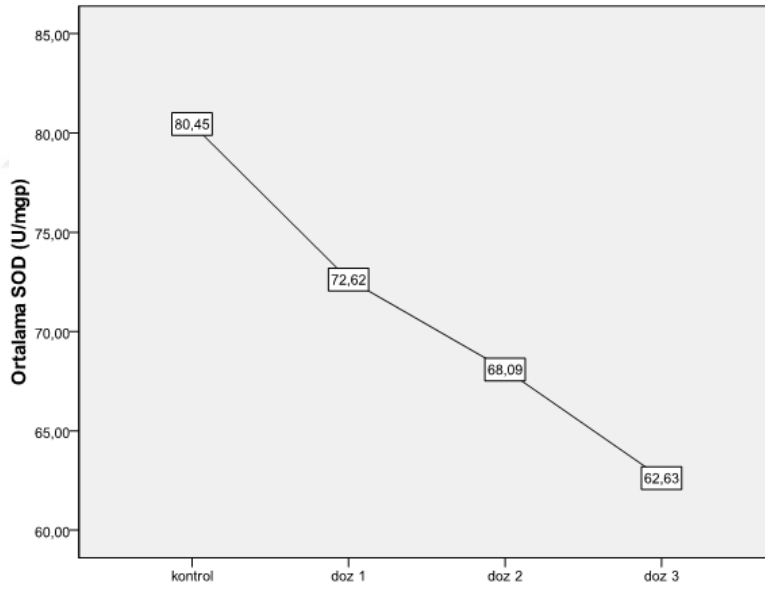
Şekil 4.13. Apoptotik hücre sayısının doza bağlı değişimi. * $p < 0.05$, karşılaştırmalar kontrole göre yapılmıştır. + $p < 0.05$, doz 3'e göre farklı olduğunu göstermektedir.

4.4. SiO₂ NP'nin Uterus Düz Kas Spontan Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Biyokimyasal Değerlendirilmesi

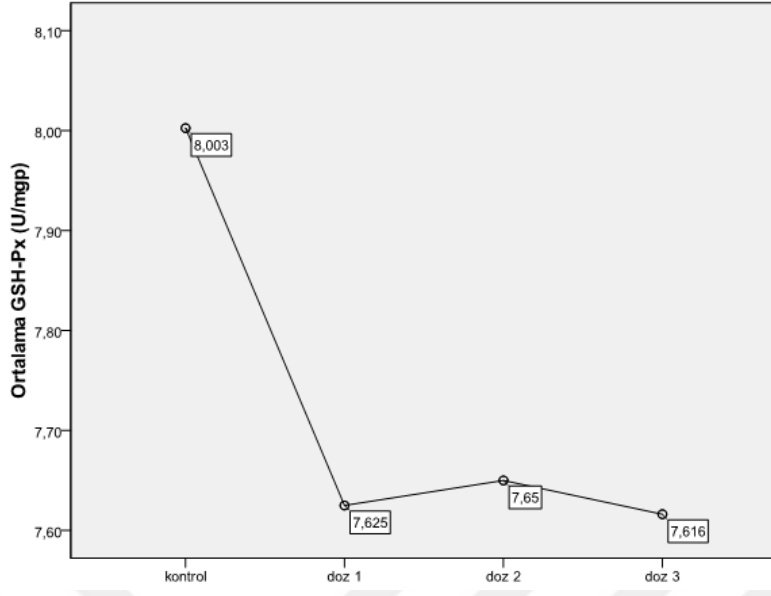
Dokuların lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) düzeylerine, antioksidan düzeylerini belirlemek için ise glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine bakıldı. Enzim aktivitelerinin U/mg protein olarak belirtebilmek için ise tüm dokuların protein düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyi açısından tüm doz gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$). Ayrıca doza bağlı artışlar da istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.14.). ($p < 0.05$). Uterus SOD ve GSH-Px düzeyi tüm doz gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 4.15., Şekil 4.16.). SOD aktivitesi doza bağlı olarak azalırken ve bu azalma istatistiksel olarak önemliyken ($p < 0.05$), GSH-Px değerlerinde doza bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4.14. Ortalama MDA düzeyinin doza bağlı değişimi.



Şekil 4.15. Ortalama SOD aktivitesinin doza bağlı değişimi.



Şekil 4.16. Ortalama GSH-Px düzeyinin doza bağlı değişimi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada SiO₂ NP'nin uterus düz kas spontan aktivitesi üzerine olası toksik etkileri biyofiziksel, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Araştırma sonucunda farklı doz ve süredeki SiO₂ NP'lerin uterus kontraksiyonlarının enerjisini etkilemediği ancak frekansının uygulama süresine bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Biyokimyasal incelemede antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px'in aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyinin ise arttığı bulunmuştur. Elektron mikroskopik incelemeler, SiO₂ NP uygulanmasının uterus ultrayapısında değişikliğe neden olmadığını gösterirken, immün floresan incelemeler SiO₂ NP'lerin doza bağlı olarak apoptozisi arttırdığını ortaya koymuştur.

Çalışmada kullanılan nanoparçacıkların boyutu ve dozlar daha önceki çalışmalara göre belirlenmiştir. Qingqing Chen ve arkadaşları 50-800 µg/mL gibi oldukça geniş bir konsantrasyon aralığı kullanmışlardır (53). Yine, Xin Liu ve arkadaşları parçacık konsantrasyonunun olası etkilerini gözlemlemek üzere 20 ve 25 nm boyutlarında 25-400 µg/mL aralığındaki konsantrasyon değerlerinde sahip SiO₂ ve Fe₃O₄ kullanarak genotoksik etki üzerine çalışmışlardır (54). Bir diğer çalışmada 10-640 µg/mL aralığında kullanılan SiO₂'in fare monosit makrofaj hücreleri üzerine immünotoksik etkilerine bakılmıştır (55). Battal ve arkadaşları sabit konsantrasyonda parçacık boyutu etkisini görmek üzere 6 nm, 20 nm, 50 nm, boyutunda 150 µg/mL konsantrasyonda boyuta bağlı genotoksik etkileri incelemişlerdir (56). Hücre kültürü çalışmasında kullanmak üzere Evans ve arkadaşları 25 nm boyutunda SiO₂ NP kullanmışlardır (57). Sergent ve arkadaşları 25 ve 100 nm boyutlarında SiO₂ kullanarak insan epitelyal intestinal HT-29 hücre gruplarında genotoksik ve toksiteyi incelemişlerdir (58). Shim ve arkadaşları ise 20 nm ve 100 nm boyutlarındaki nanoparçacıkların rat beyin ve kan plazmasındaki bağlanma protein düzeylerini analiz etmişlerdir (59). Nabeshi ve ark. bir fare çalışmasında 70 nm SiO₂ NP'nin fare derisinde stratum korneuma kadar ilerlediğini ve burada keratinosit ile Langerhans hücrelerine ulaştığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar bir sonraki çalışmalarında fare epidermal langerhans hücrelerinde 70, 300 ve 1000 nm boyutlarındaki SiO₂ NP'lerin sitotoksik etkisi olduğunu göstermişlerdir (60). Xie ve ark. SiO₂ NP'nin karaciğer,

dalak ve akciğerde biriktiğini ve karaciğerde makrofajların endositozu sonrasında karaciğer hasarına neden olabileceğini gösterdikleri çalışmalarında farelere, 20 nm ve 80 nm boyutlarında ve 1mg/mL dozunda SiO₂ NP uygulamışlardır (61).

Görüldüğü üzere literatürde kullanılan nanoparçacık boyutları 6-1000 nm aralığında, dozlar ise 10-2000 µg/mL aralığında değişmektedir. Bu çalışmada 20 nm boyutunda ve düşük 250 µg/mL, orta 500 µg/mL ve yüksek 1000 µg/mL olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda SiO₂ NP seçilmiştir.

Uterus spontan aktivitesini analiz etmek üzere wavelet analiz yöntemi kullanılmıştır.

Wavelet analizi frekans ve zaman bilgisi taşıyan biyosinyallerin analizinde kullanılan yöntemlerden biridir (62, 63). Bu analiz elektrokardiyografi, elektromiyografi, elektroensefalografi gibi biyolojik sinyallerin analizinde kullanılmaktadır. Yapılan literatür araştırmasında uterus spontan aktivite kayıtlarında wavelet analizini kullanan sınırlı sayıda çalışmanın olduğu gözlenmiştir (64, 65, 66). Bu çalışmalarda genellikle normal uterus kontraksiyonlarıyla patolojik uterus kontraksiyonları karşılaştırılmıştır. Wavelet analizi günlük yaşamda sıklıkla kullanılan NP'ların uterus spontan aktivitesi üzerine etkisini belirlemek üzere ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır.

Yapılan wavelet analizi sonucunda elde edilen 2 ve 3 boyutlu wavelet skalogramlarında frekans-zaman-enerji (genlik) bilgileri elde edilmiştir. Uygulanan doz ve süredeki SiO₂ NP'lari uterus kontraksiyonlarının enerjisini etkilemezken, frekansında uygulama süresine bağlı olarak azalmaya neden olmuştur. Uterus kasılma frekansındaki azalmayı, ilk GİS'de tanımlanan ve varlığı uterus, kalp, iskelet kası gibi farklı organlarda da saptanan, öncelikle ICC'ye benzerliğinden dolayı ICLC olarak isimlendirilen ancak daha sonra telosit olarak adlandırılan hücre grupları ile ilişkilendirilebilir. Telositler bir çekirdek ve küçük bir miktar sitoplazmadan oluşan oldukça küçük hücre gövdelerine sahip ve telepod olarak isimlendirilen oldukça uzun ve ince tübüler yapı ile karakterize hücrelerdir. Telositler mide, uterus düz kası gibi uyarılabilir hücrelerde biyoelektriksel modülasyonundan sorumludur ve bunu da enterik sinir stimülasyonu innervasyonu ile gerçekleştirirler (67) .

Miyometrial telositlerde elektrofizyolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda küçük iletkenlikli kalsiyumla aktive olan potasyum

kanalları (68), T-tipi kalsiyum kanalları (69) ve hiperpolarizasyonla aktive olan klorür kanallarının varlığı (70) gösterilmiştir. Telositlerde bu iyon kanallarının varlığı, potasyum, kalsiyum ve klor akımlarının spontan ritmik aktivitenin oluşumunda rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Küçük iletkenlikli kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları intrasellüler kalsiyum konsantrasyonuna duyarlıdır ve bu dışarı doğru olan bu akım zar potansiyelinin eşik değere ulaşmasında rol oynar. T-tipi kalsiyum kanalları hızlı aktive ve inaktive olan kalsiyum kanallarıdır. Kalpteki ve GİS'deki pacemaker hücrelerde de bulunurlar ve pacemaker potansiyellerin oluşumunda rol oynarlar. Kalsiyuma duyarlı ve hiperpolarizasyonla aktive olan klorür kanalları da içeri doğru klorür akımlarından sorumludur (70). Telositlerin pacemaker aktivite oluşturdukları konusu tartışmalı olsa da birçok araştırmada pacemaker aktivitenin varlığını gösteren bulgular elde edilmiştir. T-tipi kalsiyum kanal akımları ve küçük iletkenlikli kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının telositlerde depolarize edici akımları, klorür kanallarının ise repolarize edici akımları oluşturması olasıdır. Bu çalışmada uterus kontraksiyonlarının frekansının azalması SiO₂ NP'ların bu iyon akımlarını etkilemesiyle ilişkili olabilir. Kontraksiyonların enerjisinde (genliğinde) doza ve zamana bağlı bir değişiklik olmaması SiO₂'nin telositlerde T-tipi kalsiyum kanallarından ve küçük iletkenlikli kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarından çok içeri doğru klorür akımlarını etkilediğini ve içeri doğru klor akımını arttırdığını düşündürmüştür. Hiperpolarizasyon telositin daha geç depolarize olmasına, eşiğe daha geç ulaşmasına ve böylece ritmik kontraksiyonların daha yavaş oluşmasına yol açıyor olabilir. Bu çalışmada SiO₂'in iyon kanalları üzerine etkisi incelenmemiştir. Elde edilen bulguların desteklenmesi için SiO₂'in telositlerdeki iyon kanalları üzerine etkisinin incelenmesine ihtiyaç vardır.

Uterus spontan aktivitesinin pacemaker aktivitenin uterus düz kas hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşturması ve bunun kontraksiyonla sonuçlanmasıyla oluşur. Kontraksiyonun toplam enerjisi ise bireysel kas liflerinin katkılarıyla ilişkilidir. Bu çalışmada elektron mikroskopik bulgular değerlendirildiğinde farklı dozlardaki SiO₂ NP'ların 120 dakika uygulanmasının uterus miyofibrillerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu wavelet dönüşümü ile elde edilen kontraksiyon enerjisinde önemli bir değişiklik olmaması sonucuyla uyumludur.

Oksidatif stres, yüksek reaktif özellikte serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşması ile karakterizedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar nanopartiküllerin önemli bir oksidatif stres kaynağı olduğu konusunda ipuçları vermektedir. Parka ve arkadaşları 10, 20 ve 40 µg/mL dozlarındaki titanyum dioksit nanoparçacıklarının insan bronşial epitelyum hücrelerinde reaktif oksijen türlerini arttırarak ve antioksidan enzim düzeylerini değiştirerek oksidatif hasara yol açtığını bildirmişlerdir (71). Sun ve arkadaşları insan hepatosellüler karsinoma hücrelerinde yaptıkları çalışmada 43 nm boyutunda 0, 25, 50, 100 ve 200 g/mL konsantrasyonda SiO₂ NP'ları 3 ve 24 saat uygulamışlar ve uygulama sonucunda oksidatif stresin arttığını gözlemlemişlerdir (72). Parven ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 90 gün boyunca 10 ve 80 nm boyutlarında ve 150 µg konsantrasyondaki SiO₂ NP'lara maruz bırakılan sıçanlarda oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (73). Aynı çalışmada SOD, katalaz (CAT) ve GSH-X düzeyleri ölçülmüş ve lipid peroksidasyon düzeyinin arttığı, SOD, CAT ve GSH-X düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. Bizim 20 nm boyutunda ve 250, 500 ve 1000 µg/mL SiO₂ NP'ları uterus dokusuna 2 saat uygulayarak elde ettiğimiz bulgular diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde doza bağlı olarak MDA düzeyinin arttığını, SOD düzeyinin azaldığını, GSH-X düzeyinin ise her doz grubu için kontrol grubuna göre azaldığını göstermektedir. Bu bulgular SiO₂ NP'ların uterus dokusunda oksidatif stresi arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Apoptozisin azalması kanser oluşumuna, hızlanması ise çeşitli dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (74). Shi ve arkadaşları insan havayolu epitel hücrelerinde yaptıkları çalışmada titanyum dioksit nanoparçacıklarının doza bağlı olarak apoptotik aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir (75). Sun ve arkadaşları hepatik hücrelerde yaptıkları çalışmada farklı boyutlarda ve 150 µg/mL dozunda SiO₂ NP'ların oksidatif stresi arttırarak apoptozise neden olduğu sonucunu elde etmişlerdir (72). Apoptozisi tetikleyen en önemli nedenlerden birinin oksidatif stres artışı olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da uterus dokusunda doza bağlı olarak hem oksidatif stres hem de apoptozis artmıştır. Bu

sonuç uygulanan boyut, doz ve süredeki SiO₂ NP'ların oksidatif stresi arttırarak apoptozisi hızlandırdığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak 20 nm büyüklüğünde ve 250, 500 ve 1000 µg/mL dozundaki SiO₂ NP'ların izole uterus dokusuna uygulanması uterus spontan aktivitesinin frekansının azalmasına, oksidatif stresin artmasına ve apoptozisin hızlanmasına neden olmuştur. Bu bulgular SiO₂ NP'ların uterusu toksik etkilere yol açarak üreme fonksiyonunu bozabileceği konusunda ipuçları vermektedir. Bu etkinin mekanizmasını ayrıntılı olarak açıklayabilmek için iyon kanal fonksiyonları ve kanal ekspresyonunu da kapsayacak şekilde daha ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada nanoteknolojide yaygın olarak kullanılan SiO₂ NP'ların farklı dozlarının uterus düz kası üzerine etkilerini belirlemek için kullanılan deneysel sıçan modelinde uterus spontan aktivitesi wavelet dönüşümü ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda uterus kontraksiyonunun enerjisinde uygulama zamanı ve doza bağlı değişiklik gözlenmezken frekans her doz için uygulama süresine bağlı olarak azalmıştır. Bu sonucun SiO₂'in uterus kasında bulunan telositlerin pacemaker aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak bu ilişkinin mekanizmasını açıklayabilmek için telosit iyon kanallarındaki etkinin patch clamp tekniği ve gerçek zamanlı PCR teknikleriyle incelenmesi yararlı olacaktır.
2. SiO₂'in uterustaki etkisini araştırmak için MDA ve antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px düzeyleri ölçülmüş ve MDA'nın doza bağlı olarak arttığı, SOD'in ise doza bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. GSH-Px düzeyi tüm doz gruplarında kontrole göre azalmış ancak doza bağlı bir etki gözlenmemiştir. Bu sonuç SiO₂ NP'ların doku antioksidan savunma sistemini bozarak ve serbest radikal oluşumunu artırarak üreme işlevinde büyük öneme sahip uterusun bu fonksiyonu bozabileceğini düşündürmüştür.
3. Farklı dozlardaki SiO₂ NP'lar 120 dakikalık uygulama sonunda miyositlerin ultrayapısında herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Daha uzun süreli uygulamalar yapılarak uterus miyositlerinin ultrayapısı araştırılabilir. Ayrıca SiO₂'in telosit yapısı üzerine etkisinin incelenmesi önemli olabilir.
4. İmmünfloresan işaretleme yöntemi kullanılarak SiO₂ NP'ların uterusta apoptozise yol açtığı gösterilmiştir. Apoptozis miktarı doza bağlı olarak artmıştır. Apoptozis, antioksidan savunma sisteminin bozulmasıyla tetiklenmiş olabilir. Bu sonuç SiO₂ maruziyetinin uterusta dejenerasyon oluşturma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Roco MC.** Nanoparticles and nanotechnology research. *J Nanopart Res*, **1999**; (1): 1-6.
2. **AI J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, Zafari M, R Akbari H, Rad HG.** Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomed*, **2016**; 1117-1127.
3. **Özdoğan E, Demir A, Seventekin N.** Nanoteknoloji ve tekstil uygulamaları. *Tekstil ve konfeksiyon*, **2006**; (3): 159-168.
4. **Sawhney APS, Condon B, Singh KV, Pang SS, Li G, Hui D.** Modern applications of nanotechnology in textiles. *Text Res J*, **2008**; 78 (8): 731-739.
5. **Senjen R, Hontelez J.** Nanotechnologies in the 21st century-nanomaterials-health and environmental concern. *Wiley Vch*, **2009**; 2.
6. **Kupferschmidt N.** Toxicological and immunomodulatory properties of mesoporous silica particles. *Applications in life sciences*, **2013**; 1651-6214.
7. **Fischer HC, Chan CW.** Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*, **2007**; (18): 565-571.
8. **Jong WH, Roszek B, Geertsma RE, Rivm MPO, Bilthoven BA.** Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health. *Rivm Report*, **2005**.
9. **Casals E, Bastus N, Vázquez S, Varon M, Comenge J, Puentes V.** Inorganic nanoparticles and biolog. *Cont Scien*, **2008**; 4 (2): 171-176.
10. **Rahi A, Sattarahmady N, Heli H.** Toxicity of nanomaterials-physicochemical effects. *Austin J Nanomed Nanotechnol*, **2014**; 2 (6): 1034.
11. **Yongbo Y, Duan J, Li Y, Yu Y, Jin M, Li C, Wang Y, Sun Z.** Combined toxicity of amorphous silicananoparticles and methyl mercury to human lung epithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2015**; (12): 144-52.
12. **Mendoza A, Jose A, Hernandez T, Ault J. G, Lane P, Gao D, Lawrence D. A.** Silica nanoparticles induce oxidative stress and inflammation of human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Stress Chaperones*, **2014**; (19): 777-790.
13. **Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat CW, Chancellor MB, Fraser MO.** Identification of C-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *J Physiol Renal Physiol*, **2003**; 284-925.
14. **Otaibi MA.** The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. *Calcium signaling*, **2014**; 1168-2373.
15. **Junqueira LC, Carneiro J. Dişi Üreme Sistemi. Solakoglu S, Aytakin Y.** *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2005: 444-448.
16. **Greenwood IA, Tribe RM.** Kv7 and erg in myometrial regulation. *Exp Physiol*, **2014**; (99): 503-509.

17. **Bursztyn L, Eytan O, Jaffa AJ, Elad D.** Mathematical model of excitation-contraction in a uterine smooth muscle cell. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**; (292): 1816-1829.
18. **Richard A, Murphy, AB.** Myosin phosphorylation and crossbridge regulation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, **1982**; (4): 3-7.
19. **Popescu M, Ciontea MS, Cretoiu D.** Interstitial Cajal like cells in human uterus and fallopian tube. *J Biomech.* **2006**; 39 (1): 342.
20. **Imaizumi M, Hama K.** An electromicroscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love bird (*uroloncha domestica*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* **1969**; (97): 351-57.
21. **Yamamoto M.** Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat. *Arch Histol Jpn*, **1977**; (40): 171-201.
22. **Lang RJ, Klemm MF.** Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract. *J Cell Mol Med*, **2005**; 9 (3): 543-556.
23. **Hinescu ME, Popescu LM, Gherghiceanu M, Faussone-Pellegrini MS.** Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery: an ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med*, **2008**; 12 (1): 260-70.
24. **Junquera C, Martínez CC, Castiella T, Serrano P, Azanza MJ, Cajal JSR.** Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. presence of a single cilium. *J Cell Mol Med*, **2007**; 11 (4): 776-787.
25. **Eunlee S, Joon, WIS, Yong I, Jung C, Ahn KY, Bae CS, Kim BY, Park SS, Oh CS, Weninger WJ, Kwang IN.** Distribution and three-dimensional appearance of the interstitial cells of Cajal in the rat stomach and duodenum. *Microsc Res Tec*, **2009**; (72): 951-956.
26. **Hinescu ME. Popescu LM, Gherghiceanu M, Faussone-Pellegrini MS.** Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery: an ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med*, **2008**; 12 (1): 260-270.
27. **Junquera C, Martínez CC, Castiella T, Serran P, Azanza MJ, Cajal Santiago RYJ.** Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum presence of a single cilium. *J Cell Mol Med*, **2007**; 11 (4): 776-787.
28. **Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG.** Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol*, **2000**; 526.(2): 359-366.
29. **McCloskey KD, Hollywood MA, Thornbury KD, Ward SM, McHale NG.** Kit-like immunopositive cells in sheep mesenteric lymphatic vessels. *Cell Tissue Res*, **2002**; (310): 77-84.
30. **Maksym IH, Gordienko DV, Povstyan OV, Moss RF, Bolton TB.** Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res*, **2004**; (95): 619-626.
31. **Hashitani H, Suzuki H.** Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis. *Br J Clin Pharmacol*, **2004**; (141): 199-204.
32. **Lang RJ, Klemm MF.** Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract. *J Cell Mol Med*, **2005**; 9 (3): 543-556.

33. **Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, Ceausu M, Gherghiceanu M, Braga RI, Florina V, Zagrean L, Ardeleanu C.** Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cel Mol Med*, **2005**; 9 (2): 479-52.
34. **Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM.** Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cel Mol Med*, **2006**; 10 (1): 243-257.
35. **Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, Popescu A.C, Ardeleanu C, Mandache E.** Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *Biol Reprod*, **2008**; (79): 510-517.
36. **Noe D, Tired L, Panthie JJ, Bernex F.** Uterine contractions depend on kit-positive interstitial cells in the mouse: genetic and pharmacological evidence. *Biol Reprod*, **2008**; (79): 510-517.
37. **Johnston L, Woolsey S, Cunningham RMJ, O’Kane H, Duggan B, Keane P, McCloskey K.D.** Morphological expression of kit positive interstitial cells of Cajal in human bladder. *J Physiol*, **2000**; 526 (2): 359-366.
38. **Popescu L.M, Ciontea SM, Cretoiu D.** Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad*, **2007**; (1101): 139-165.
39. **Popescu LM, Pellegrini M.S.F.** Telocytes-a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via interstitial Cajal-like cells (ICLC) to telocytes. *J Cell Mol Med*, **2010**; 4 (14): 729-740.
40. **Sanders KM, Ward SM.** Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *Physiol*, **2006**; 576 (3): 721-726.
41. **Hatta H. K, Li M, Richard D. Weisel R.K.** Culture of rat endometrial telocytes. *J Cell Mol Med*, **2012**; 16 (7): 1392-1396. **41**
42. **Cretoiu SM, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Zagrean L.** C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal type) in human myometrium. *J Cell*, **2005**; 9 (2): 407-420.
43. **Xu Z, Chou L, Sun J.** Effects of SiO₂ nanoparticles on HFL-I activating RO-mediated apoptosis via p53 pathway. *J Appl Toxicol*, **2012**; (32): 358-36.
44. **Chen Q, Xue Y, Sun J.** Kupffer cell- mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*, **2013**; (8): 1129-1140.
45. **Stöber W, Fink A.** Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Inter Sci*, **1968**; 26-62.
46. **StoberW, Fink A, Bohn E.** Controlled growth of monodisperse silica spheres in micron size range. *J Colloid Inter Sci*, **1968**; 26:62–69.
47. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1951**; (193): 265-275.
48. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, **1967**; 70: 158-169.

49. **Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, **1988**; (34): 497-500.
50. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **1979**; (95): 351-358.
51. **Haşıoğlu A.** Dalgacık dönüşümü ve yapay sinir ağlar ile döndürmeye duyarsız doku analizi ve sınıflandırma. *Turk J Engin Environ Sci*, **2001**; (25): 405- 413.
52. **Chowdhury SK, Nimbarte AD, Jaridi M, Creese RC.** Discrete wavelet transform analysis of surface electromyography for the fatigue assessment of neck and shoulder muscles. *J Electro Myo Kinesiol*, **2013**; (23): 995-1003.
53. **Chen Q, Xue Y, Sun J.** Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*, **2013**; (8): 1129-1140.
54. **Liu X, Xue Y, Ding T, Sun J.** Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions particle and fibre. *Toxicology*, **2012**; 9 (1): 36.
55. **Kim JH, Kim CS, Ignacio RM. C, Kim D. Heui, Sajo ME. J, Ho ME, Qi XF, Park SE, Kim YR, Kim MK, Lee KJ, Kim SK.** Immunotoxicity of silicon dioxide nanoparticles with different sizes and electrostatic charge. *Int J Nanomed*, **2014**; (9): 183-193.
56. **Battal D, Celik A, Guler G, Aktas A, Yildirimcan S, Ocakoglu K, Comelekoglu U.** SiO₂ nanoparticule-induced size-dependent genotoxicity an in vitro study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay. *Drug Chem Toxicol*, **2014**; 1-9.
57. **Evans OO, Dybowska A, Jones EV, Cupitt J, Gierula M, Boobis AR, Edwards RJ.** Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *Plos One*, **2013**; 8-9.
58. **Aure J, Lien S, Paget V, Chevillard S.** Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal ht-29 cell line. *Ann Occup Hyg*, **2012**; 56 (5): 622-30.
59. **Shim KH, Hulme J, Maeng EH, Kim MK, An SS.** Analysis of SiO₂ nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate. *Int J Nano Med*, **2014**; 9 (2): 207-215.
60. **Yang J, Xiao K.** An analytic method of wavelet energy value to evaluate the contraction intensity of uterus. *Medline*, **2012**; 29 (1): 80-3.
61. **Travis WB, Terry JH, Glen OJ, Joseph PW, Joel TC, Jared WC, Moh HM.** Comparison of Fourier and wavelet transform procedures for examining the mechanomyographic and electromyographic frequency domain responses during fatiguing isokinetic muscle actions of the biceps brachii. *J Electro Myo Kinesiol*, **2005**; (15): 190-199.
62. **T. Vukova, M. Vydevska-Chichova, N. Radicheva.** Fatigue-induced changes in muscle fiber action potentials estimated by wavelet analysis. *J Electro Myo Kinesiol*, **2008**; (18): 397-409.,
63. **Suman KC, Ashish DN, Jaridi M, Robert CC.** Discrete wavelet transform analysis of surface electromyography for the fatigue assessment of neck and shoulder muscles. *J Electro Myo Kinesiol*, **2013**; (23): 995-1003.

64. **Oczeretko E, Swiatecka J, Kitlas A, Laudanski T, Pierzynski P.** Visualization of synchronization of the uterine contraction signals: Running cross-correlation and wavelet running cross-correlation methods. *Med Eng Phys*, **2006**; (28): 75-81.
65. **Kitlas A, Oczeretko E, Tecka JS, Borowska M, Laudanski T.** Uterine contraction signals application of the linear synchronization measures. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2009**; (144): 61-64.
66. **Oczeretko E, Swiatecka J, Laudanski T.** Uterine contractility signals an introduction to wavelet analysis. *Rocz Akad Med Bialymst Supl*, **2003**; 48.
67. **Edelstein L, Smythies J.** The role of telocytes in morpho genetic bioelectrical signaling:once more unto the breach. *Front. Mol. Neurosci*, **2014**; (41): 2.
68. **Parsons SP, Huizinga JD.** Transient outward potassium current in ICC. *APS*, **2011**; 7 (11): 1619-1625.
69. **Cretoiu SM, Radu BM, Banciu A, Banciu DD, Cretoiu D, Ceafalan LC, Popescu. LM.** Isolated human uterine telocytes: immunocytochemistry and electrophysiology of t-type calcium channels. *Histochem Cell Biol*, **2015**; (143): 83-94.
70. **Young RC, Bemis A.** Calcium-activated chloride currents prolongs the duration of contractions in pregnant rat myometrial tissue. *Reprod Sci*, **2009**; 16 734–739.
71. **Parka EJ, Yib J, Chung KH, Ryu DY, Choie J, Park K.** Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticle in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*, **2008**; (180): 222-229.
72. **Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, Guo C, Huang P, Sun Z.** Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicol Vitro*, **2011**; (25): 1619-1629.
73. **Parveen A, Rizvi SHM, Gupta A, Sing R, Ahmad I, Mahand F. A, Mahdi A.** NMR-based metabonomics study of sub-acute hepatotoxicity induced by silica nanoparticles in rats after intranasal exposure. *Cell Mol Biol*, **2012**; 58 (1): 196-203.
74. **Bauer AT, Strozyk EA, Gorzelanny C, Westerhausen C, Desch A, Schneider MF, Schneider SW.** Cytotoxicity of silica nanoparticles through exocytosis of von Willebrand factor and necrotic cell death in primary human endothelial cells. *Biomaterials*, **2011**; (32): 8385-8393.
75. **Shi Y, Feng W, Jibao H, Yadava S, Wanga H.** Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in beas-2b cells through thecaspase 8/t-bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*, **2010**; (196): 21-27.

EK 1.

```
closeall
clearall
clc
load deney4_banyo2.mat
data=deney4_banyo2;
Ts=20e-3;
dec_factor=50;
data_decimated=decimate(data,dec_factor);
Ts=Ts*dec_factor;
data_decimated_zm=data_decimated-mean(data_decimated);
figure; plot(data_decimated_zm);
xlabel('sn'); ylabel('Genlik (mV)'); title('spontan aktivite
kaydi');
%figure; plot(fftshift(abs(fft(data_decimated_zm))));
f=(0:length(data_decimated_zm)-1)./length(data_decimated_zm);
f=f.*(1/Ts);
fftdata_decimated_zm=abs(fft(data_decimated_zm));
fftdata_decimated_zm=2*fftdata_decimated_zm/length(fftdata_decimated
_zm);
figure;
plot(f(1:length(f)/2+1),fftdata_decimated_zm(1:length(f)/2+1));
gridon
xlim([-0.02 f(length(f)/2+1)]);
title('fft'); xlabel('frekans (Hz)');

figure(1);
control_son=(62-15)*60/Ts;
line([control_soncontrol_son],[-500
3500],'Color','r','LineWidth',2);

doz_baslangic=(66-15)*60/Ts;
line([doz_baslangicdoz_baslangic],[-500
3500],'Color','r','LineWidth',2);

dozlu_30=(96-15)*60/Ts;
line([dozlu_30 dozlu_30],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);

dozlu_60=(126-15)*60/Ts;
line([dozlu_60 dozlu_60],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);

dozlu_90=(156-15)*60/Ts;
line([dozlu_90 dozlu_90],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);

dozlu_120=(186-15)*60/Ts;
line([dozlu_120 dozlu_120],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);

COEFS = cwt(data_decimated_zm,1:256,'morl');
COEFS(:,control_son-110:doz_baslangic+70)=0;
figure; sc=wscalogram('image',COEFS);
line([control_soncontrol_son],[-500
3500],'Color','r','LineWidth',2);
line([doz_baslangicdoz_baslangic],[-500
3500],'Color','r','LineWidth',2);
line([dozlu_30 dozlu_30],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);
line([dozlu_60 dozlu_60],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);
line([dozlu_90 dozlu_90],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);
```

```
line([dozlu_120 dozlu_120],[-500 3500],'Color','r','LineWidth',2);  
xlabel('time (s)');  
ylabel ('scales')  
title('2D scalogram');
```

```
figure; mesh(sc);  
xlabel('time (s)')  
ylabel ('scales')  
zlabel('percentenergy (3D scalogram)');
```



ÖZGEÇMİŞ

02 Nisan 1981 yılında Göksun'da doğdu. İlkokulu Göksun Fatih İlkokulu'nda, ortaokulu Adana Sıtkı Kulak İlköğretim Okulu'nda ve lise eğitimini Adana Danişment Gazi Süper Lise ve Şehit Temel Cingöz Lisesinde tamamladı. 1999–2004 yılları arasında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Fizik lisans eğitimini aldı. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2009 yılında yüksek lisans programından mezun olup aynı yıl Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2014 Aralık ÖYP ataması ile K. Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalına yerleştirildi.

Halen aynı birimde çalışmakta olup, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.