

POLİSTİREN NANOPARTİKÜLLERİN SÜT İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF INTERACTION BETWEEN POLYSTYRENE NANOPARTICLES WITH MILK

BERFİN ECE ŞEN YEŞİLYURT

PROF. DR. Ümran UYGUN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

POLİSTİREN NANOPARTİKÜLLERİN SÜT İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

Berfin Ece ŞEN YEŞİLYURT

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ümran UYGUN

Temmuz 2022, 104 sayfa

Mikrometre düzeyindeki plastikler halen pek çok araştırmaya konu olmakla birlikte nanoplastiklerle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Nanoplastiklerin insanlar ve memeliler üzerindeki etkilerini bildiren çok az çalışma vardır.

Bu çalışmada, farklı çaptaki NPS'lerin gıda matrisi ile etkileşimden sonra etrafında oluşan korona yapısı, gıda matrisi varken ve yokken çözelti içindeki davranışları incelenmiştir. Gıda matrisiyle etkileşimden önce ve sonra partiküllerin karakterizasyonu için TEM ve ESEM görüntüleme ve hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde sindirimden sonra partiküllerin tek başlarına ve gıda matrisi etkisi ile korona oluşumlarına bakılmış ve çözelti içindeki agregasyon durumları gözlenmiştir. Sindirimin önce ve sonrası karşılaştırıldığında partiküllerin farklı sindirim ortamlarında farklı davranışlar gösterdiği saptanmıştır. Partiküllerin sindirim öncesi ve sonrası karakterizasyonu haricinde oluşturdukları protein koronanın floresans ölçümleri ve elektroforez ile nicel ve nitel analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde en çok protein bağlayan partikülün NPS-30 olduğu görülmüştür. Protein korona analizlerinin ardından partiküllerin sindirim enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Bu kapsamda amilaz, pepsin ve lipaz kullanılmıştır. Partiküllerin amilaz ve pepsin aktivitelerinde önemli etkilerinin olmadığı fakat bağırsak ortamında lipaz aktivitesini

önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Tezin son aşamasında ise partiküllerin bağırsak epitel hücrelerinin toksisitesi incelenmiştir. Bazı partiküllerde canlılıkta anlamlı azalma ve ROS üretiminde anlamlı artış gözlenmiştir. Tüm analizlerden elde edilen çıktılarla, literatürde polistiren nanopartiküllerin hala tam aydınlatılmamış gıda ile etkileşimi ve sonuçları hakkında önemli bir adım atılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarla partiküllerin çapa bağlı korona yapısı, çözelti içinde davranışları ve gıda matrisiyle etkileşimleri, sindirimden sonra ve sindirim boyunca vücutta geçirdikleri değişimler ve enzimlere etkileri hakkında önemli bulgular elde edilmiştir. Buradan elde edilen çıktılarla literatürde önemli bir boşluğun doldurulması ve yeni araştırmalar için kaynak oluşturması hedeflenmiştir. Sonraki aşamalarda farklı gıda matrisleri veya farklı özellikte nanoplastiklerle çalışılarak konuya önemli katkılar yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: Polistiren, nanopartikül, gıda matrisi, sindirim simülasyonu, enzim, toksisite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INTERACTION BETWEEN POLYSTYRENE NANOPARTICLES WITH MILK

Berfin Ece ŞEN YEŞİLYURT

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ümran UYGUN

July 2022, 104 pages

Although plastics at the micrometer level are still the subject of many researches, studies on nanoplastics are limited. There are few studies reporting the effects of nanoplastics on humans and mammals.

In this study, the corona structure of NPSs of different diameters formed around them after interaction with the food matrix, and their behavior in solution with and without the food matrix were investigated. TEM and ESEM imaging and hydrodynamic diameter and zeta potential measurements were performed for the characterization of the particles before and after interaction with the food matrix. Likewise, after digestion, corona formations of the particles alone and with the effect of the food matrix were examined and aggregation states in the solution were observed. When the before and after digestion were compared, it was determined that the particles behaved differently in different digestive environments. Apart from the pre- and post-digestion characterization of the particles, fluorescence measurements of the protein corona they formed and quantitative and qualitative analyzes were made by electrophoresis. NPS-30 was found to be the most protein-binding particle in these analyses. After protein corona analysis, the effects of

particles on the activities of digestive enzymes were examined. In this context, amylase, pepsin and lipase were used. It was observed that the particles did not have significant effects on amylase and pepsin activities, but significantly reduced lipase activity in the intestinal environment. In the last stage of the thesis, the toxicity of the particles to intestinal epithelial cells was investigated. A significant decrease in viability and a significant increase in ROS production were observed in some particles. With the outputs from all analyzes, an important step has been taken in the literature about the interaction and consequences of polystyrene nanoparticles with food, which is still not fully elucidated.

With the studies carried out within the scope of the thesis, important findings were obtained about the diameter-dependent corona structure of the particles, their behavior in solution and their interaction with the food matrix, the changes they undergo in the body after digestion and during digestion, and their effects on enzymes. With the outputs obtained from this, it is aimed to fill an important gap in the literature and to create a resource for new researches. In the next stages, important contributions can be made by working with different food matrices or nanoplastics with different properties.

Keywords: Polystyrene, nanoparticle, food matrix, digestion simulation, enzyme, toxicity.

TEŞEKKÜR

İlk olarak yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimini ve zamanını benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Ümran UYGUN’a, tecrübesi ve sabrı için teşekkür etmek istiyorum. Tez çalışmamın her aşamasında karşılaştığım sorunlarda yanımda olan değerli hocam Doç.Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER’e de bana kattığı yeni bakış açıları ve emeği için teşekkür etmek istiyorum. Her iki hocama da bu zamana kadar bana sağladıkları çalışma imkanları ile yoluma ışık tuttukları için kendilerine minnettarım.

Çalışma sürem boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, motivasyonumuz azaldığında birbirimize destek olduğumuz, her türlü ilgi ve yardımlarının yanında harika arkadaşlıklarından dolayı laboratuvar çalışma arkadaşlarım, FCD Lab. üyeleri Hafize ÖZ, Emine Merve ÇANGA, Nazım Sergen MISIRLI, Kamil URGUN ve Nurdan ERSÖZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tecrübelerini ve dostluklarını esirgemeyen sayın hocalarım Dr. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU ve Uz. Meltem ZENCİR’e çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün sayın öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve personellerine, sağladıkları bütün desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmamı yaptığım süre boyunca kendimi tükenmiş hissettiğim her an yanımda olan, aldığım kararlarda arkamda olan, sabrı ve sevgisi sonsuz eşim Recep Sarper YEŞİLYURT’a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her an ve her koşulunda yanımda olduklarını bildiğim, anlayış, sevgi ve şefkatleri olmadan asla başaramayacağım aileme, sevgili annem Zeliha ŞEN, babam Teoman Recep ŞEN, kardeşim Berkin Ege ŞEN’e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TÜBİTAK Uluslararası 2558 Tayland NSTDA işbirliğiyle 119N024 numaralı “Nanoplastik ve Gıda Matrisi Etkileşimlerinin İncelenmesi ve Toksisitesinin Belirlenmesi” adlı proje tarafından desteklenmiştir.

Berfin Ece ŞEN YEŞİLYURT

Temmuz 2022, Ankara.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoplastiklerin ve Polistirenin Genel Özellikleri.....	3
2.2. Nanopolistirenin Oluşumu.....	4
2.3. In Vitro Sindirim Simülasyonu Çalışmaları	10
2.3.1. Ağız Aşaması	11
2.3.2. Mide Aşaması	12
2.3.3. Bağırsak Aşaması.....	13
2.4. Toksikite Çalışmaları	16
2.5. NPL Karakterizasyonu.....	17
2.5.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope (TEM))	17
2.5.2. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM))	18
2.5.3. Dinamik Işık Saçılması (Dynamic Light Scattering (DLS)).....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	22
3.1.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope (TEM))	23
3.1.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM))	23
3.1.4. Zetasizer Nano Zs	23
3.1.5. Floresans Spektrofotometresi.....	24
3.2. Metot.....	24

3.2.1. Nanopartiküllerin Temini ve Karakterizasyonu	24
3.2.1.1. NPS'lerin ESEM ve TEM Görüntülemesi	24
3.2.1.2. NPS'lerin Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri	25
3.2.2. Gıda Matrisinin Temini ve Karakterizasyonu	25
3.2.3. Gıda Matrisi İçindeki NPS'lerin Karakterizasyonu.....	26
3.2.3.1. Gıda Matrisi İçindeki NPS'lerin ESEM ve TEM Görüntülemesi	26
3.2.3.2. Gıda matrisi-NPS Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri.....	26
3.2.4. Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu	27
3.2.4.1. Protein Sönümlendirme Oranı	27
3.2.4.2. Native-PAGE Elektrophorez.....	27
3.2.4.3. SDS-PAGE Elektrophorez	28
3.2.5. Nanopartiküllerin In-Vitro Sindirim Ortamlarındaki Davranışları	29
3.2.6. Nanopartiküllerin Sindirim Öncesi ve Sonrası Enzim Aktivitelerine Etkisi. 31	
3.2.6.1. Amilaz Aktivitesi.....	31
3.2.6.2. Pepsin Aktivitesi.....	32
3.2.6.3. Lipaz Aktivitesi	33
3.2.7. Toksikite Testleri	34
3.2.8. İstatistiksel Analiz	35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. NPS Karakterizasyonu	36
4.2. NPS-Gıda Matrisi Etkileşimi	39
4.2.1. NPS-30 ve Gıda Matrisi Etkileşimi	40
4.2.2. NPS-100 ve Gıda Matrisi Etkileşimi	43
4.2.3. NPS-450 ve Gıda Matrisi Etkileşimi	47
4.3. Protein Koronanın Nitel ve Nicel Analizi	52
4.3.1 Protein Sönümlendirme Oranları.....	52
4.3.2. Native-PAGE Elektrophorez.....	54
4.4. Sindirimden Sonra NPS Karakterizasyonu	56
4.4.1. NPS-30'un Sindirim Sonrası Karakterizasyonu	56
4.4.2. NPS-100'ün Sindirim Sonrası Karakterizasyonu	60
4.4.3. NPS-450'nin Sindirim Sonrası Karakterizasyonu	64
4.5. Sindirim Sonrası Protein Koronanın Analizi	68
4.6. Sindirim Öncesi ve Sonrası Enzim Aktivitelerindeki Değişimler	70
4.6.1. Amilaz Aktivitesi.....	71

4.6.2. Pepsin Aktivitesi	73
4.6.3. Lipaz Aktivitesi.....	75
4.7. Toksisite çalışmaları	78
5. YORUM	81
6. KAYNAKLAR.....	86



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4. 1. NPS-30'un TEM görüntüleri.....	36
Şekil 4. 2. NPS-30'un ESEM görüntüleri.....	36
Şekil 4. 3. NPS-100'ün TEM görüntüleri.....	4837
Şekil 4. 4. NPS-100'ün ESEM görüntüleri.....	36
Şekil 4. 5. NPS-450'nin TEM görüntüleri.....	38
Şekil 4. 6. NPS-450'nin ESEM görüntüleri	40
Şekil 4. 7. Yağlı sütün ESEM görüntüleri	39
Şekil 4. 8. Yağsız sütün ESEM görüntüleri.....	450
Şekil 4. 9. NPS-30'un yağlı sütle inkübasyondan önce ve sonraki TEM Görüntüleri ...	41
Şekil 4. 10. NPS-30'un yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM görüntüleri.....	42
Şekil 4. 11. NPS-100'ün yağlı sütle inkübasyondan önce ve sonraki TEM Görüntüleri ...	44
Şekil 4. 12. NPS-100'ün yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM görüntüleri.....	45
Şekil 4. 13. NPS-450'nin yağlı sütle inkübasyondan önce ve sonraki TEM Görüntüleri	48
Şekil 4. 14. NPS-450'nin yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM Görüntüleri.....	49
Şekil 4. 15. NPS'lerin % floresans yoğunluklarındaki değişimler.	53
Şekil 4. 16. NPS-30, NPS-100 ve NPS-450'nin gıda matrisi ile etkileşimi sonucu elde edilen Native-PAGE görüntüleri	575
Şekil 4. 17. NPS-30'un sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri.....	57
Şekil 4. 18. NPS-30'un sindirim sonrası TEM görüntüleri	58
Şekil 4. 19. NPS-30'un gıda matrisiyle sindirim sonrası TEM görüntüleri.....	58
Şekil 4. 20. NPS-100'ün sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri.....	70
Şekil 4. 21. NPS-100'ün sindirim sonrası TEM görüntüleri.	62
Şekil 4. 22. NPS-100'ün gıda matrisiyle sindirim sonrası TEM görüntüleri	62
Şekil 4. 23. NPS-450'nin sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri	74
Şekil 4. 24. NPS-450'nin sindirim sonrası TEM görüntüleri.	66
Şekil 4. 25. NPS-450'nin gıda matrisiyle sindirim sonrası TEM görüntüleri	66

Şekil 4. 26. Sindirim sonrası SDS-PAGE Jel Elektroforez görüntüleri.....	70
Şekil 4. 27. NPS'lerin α -amilaz aktivitesine etkisi	72
Şekil 4. 28. NPS'lerin pepsin aktivitesine etkisi	74
Şekil 4. 29. NPS'lerin lipaz aktivitesine etkisi.....	77
Şekil 4. 30. Caco-2 hücrelerinin canlılığı (%)......	79
Şekil 4. 31. Caco-2 hücrelerinin ürettiği ROS (%)	80



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Yağlı ve yağsız süt tozundan hazırlanan rekonstitüe süt örneklerinin bileşimi.....	26
Çizelge 3.2. %3.9'luk sıralama ve %12.18'lik yürütme jeli.....	268
Çizelge 3.3. Örnek yükleme çözeltisi	268
Çizelge 3.4. 4x yürütme tamponu.....	268
Çizelge 3.5. Jel boyama ve boya çıkarma çözeltisi	268
Çizelge 3.6. %5.3'lük sıralama ve %13'lük yürütme jeli.....	29
Çizelge 3.7. Örnek yükleme çözeltisi	30
Çizelge 3.8. 5x yürütme tamponu.....	30
Çizelge 3.9. Jel boyama ve boya çıkarma çözeltisi	30
Çizelge 3.10. Simüle edilmiş sindirim sıvılarının içerikleri	31
Çizelge 4.1. NPS'lere ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	38
Çizelge 4.2. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-30'a ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	43
Çizelge 4.3. Yağsız süttten (Y'S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-30'a ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	43
Çizelge 4.4. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-100'e ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	46
Çizelge 4.5. Yağsız süttten (Y'S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-100'e ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	46
Çizelge 4.6. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-450'ye ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	50
Çizelge 4.7. Yağsız süttten (Y'S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-450'ye ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.....	50
Çizelge 4.8. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-30'un sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.	60
Çizelge 4.9. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-100'ün sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.	63
Çizelge 4.10. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-450'nin sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ϕ ap değerleri.	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ζ	Zeta
μ	Mikro
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
h:h	Hacim/hacim

Kısaltmalar

NP	Nanopartikül
MP	Mikropartikül
NPL	Nanoplastik
NPS	Nanopolistiren
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
DLS	Dinamik ışık saçılımı
UV	Morötesi ışın
BSA	Sığır serum albümini
KM	Kuru madde
YKM	Yağsız kuru madde
PDI	Polidispersite indeksi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
Native-PAGE	Native jel elektroforezi
APS	Amonyum persülfat
DTT	Ditiyotreitol
TEMED	Tetrametiletildiamin
TCA	Trikloroasetik Asit

FBS	Fetal sığır serumu
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
HBSS	Hank's Balanced Tuz Çözeltisi
RIPA	Radyo-immünopresipitasyon Deney Tamponu
DCFH-DA	2',7'-Diklorodihidrofloresin diasetat
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
ROS	Reaktif oksijen türleri
ANOVA	Varyans analizi
YS	Yağlı süt
Y'S	Yağsız süt

1.GİRİŞ

Plastikler, her geçen gün tüketimin artmasıyla hem çevre hem de insan sağlığı için daha çok tartışılan bir konu haline gelmiştir. Gıda endüstrisinde de en başta paketleme olmak üzere pek çok alanda plastikler kullanılmaktadır. Tek kullanımlık yiyecek-içecek kaplarından, ısıtma-soğutma gibi alanlarda kullanılan ambalajlara kadar pek çok alanda plastikler kendine yer bulabilmektedir. Bu yaygın kullanım sonucunda atık oluşumu da kullanımla paralel olarak artmaktadır. Plastik polimerlerin doğada yok olmaması ve mikrobiyolojik olarak da parçalanamaması bu sorunu çözülemez hale getirmektedir. Çevrede biriken bu plastik atıklar, tamamen yok olmasa da, güneş ve rüzgar gibi dış etkenlerle daha kırılgan ve küçük parçalara ayrılmakta ve canlılar tarafından alınabilir boyutlara gelmektedir. Plastiklerin şu anda tespit edilebilen en küçük boyutu olan nanoplastikler (NPL), son yıllarda pek çok çalışmanın konusu olmuş, araştırmacıların daha fazla dikkatini çekmiştir.

NPL'lerin çevrede analiz yöntemleri henüz tam olarak gelişmemiştir. Bu analizler henüz daha çok mikro boyutlarda kalmaktadır. Buna rağmen gıdada analiz yöntemleri geliştirilerek bulaşlar takip edilmektedir. Bu bulaşların daha çok ambalaj ve proses kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, in vivo sindirim çalışmalarıyla düşük trofik seviyelerdeki canlılarda NPL maruziyeti ve vücutta birikimi incelenilmekte veya doğumla bir sonraki nesile ya da tüketimle canlılar arası aktarım uzun veya kısa süreli olarak gözlenebilmektedir. Etik kurallar, maliyet ve zaman kısıtlaması sebebiyle in vivo yöntemlere alternatif pek çok in vitro yöntem geliştirilmiş ve NPL'lerin canlılardaki etkilerine ve sonuçlarına bu yöntemlerle bakılarak sonuçlar literatüre sunulmuştur.

Gıdada NPL'lerin bulaşısı henüz tam aydınlatılmamış bir alan olarak görünmektedir. Farklı gıda matrisleriyle farklı makro bileşenlerin incelenmesi, hem tüketici hem de araştırmacılar için elzemdir. Şimdiye kadar en çok proteinlerle NPL'lerin etkileşimine bakılmış ve NPL'lerin etrafında korona adı verilen protein tabakası üzerinde durulmuştur. Vücutta en önemli makrobileşen olan proteinlerin bu tabakayı oluşturması hem doku ve organlardaki sonuçlarının daha önemli olmasından hem de korona oluştururken

proteinlerin denatüre olup biyoyararlanımının azalması nedeniyle incelemeye daha fazla konu olmaktadır.

Tez kapsamında gıda matrisi ile nanoplastiklerin etkileşimi ve toksisitesi araştırılmıştır. Nanoplastik olarak gıda endüstrisinde ambalaj ve proseste en çok kullanılan polistiren nanoplastikleri tercih edilmiştir. Boyutun etkisini gözlemlemek amacıyla 30, 100 ve 450 nm polistirenler kullanılmıştır. İlk olarak polistiren NPL'lerin karakterizasyonu, tek başlarına davranışları incelenmiş ve bununla birlikte gıda matrisi ile birlikte karakterizasyonu ve gıda matrisi ortamında davranışlarına bakılmış, bu sayede olası bulaşların gıdalarda etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın devamında in vitro sindirim simülasyonu oluşturulmuş; ağız, mide ve bağırsak ortamları taklit edilmiştir. NPL'ler ve gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPL'ler sindirime sokulmuş ve her ortamdaki davranışları ayrı ayrı incelenmiştir. Sindirim ortamlarındaki enzimlerin sindirime sokulmadan önceki ve sindirimden sonraki enzim aktivitelerine bakılmış, enzimlere farklı çap ve konsantrasyonlardaki NPL'lerin ve sindirimin etkisi karşılaştırılmıştır.

Son olarak sindirime sokulmuş NPL'lerin in vitro toksisitesine bakılmıştır. Bunun için Caco-2 hücre kültürü kullanılmış, hücrelerin canlılıkları ve reaktif oksijen üretim oranları kontrole göre karşılaştırılarak toksisitesi incelenmiştir.

Tez çalışmasının sonucunda gıda matrisi ile NPL'lerin etrafında oluşan korona yapısı kanıtlanmış, bu korona yapısının sindirim ortamlarında farklı davranışlar gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca enzim aktivitelerine olumsuz etkileri olduğu, özellikle bağırsak ortamında lipaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Tüm bu analizlerden elde edilen sonuçlar ayrı ayrı paylaşılarak, çapa ve konsantrasyona bağlı değişimler yorumlanmıştır. Buradan elde edilen çıktılarla, farklı gıda matrisleri veya farklı özellikte NPL'lerin davranışlarının incelenmesi mümkün olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoplastiklerin ve Polistirenin Genel Özellikleri

Plastik, Yunanca'da "biçimlendirilebilir" anlamına gelen "plastikos"tan gelmektedir ve sentetik ve insan yapımı polimerler için kullanılan popüler bir terimdir. Tarihte pek çok kimyager ve girişimci selüloz ve benzeri maddeler üretmeyi başararak bu sentetik malzemelere benzer ürünler üretmişlerdir. Son olarak ise 1907 yılında Leo Baekeland, formaldehit ve fenol kullanarak ilk sentetik plastiği geliştirmiş ve bu yıllarda ilk patentini de almıştır [1]. Plastiklerin ve sentetik organik polimerlerin seri üretime geçmesi 1950'lerde başlamıştır ve en yaygın kullanımı tek kullanımlık kaplara dönüşte yaşanmıştır [2]. Bu yaygın kullanım, küresel atık üretimini de büyük ölçüde artırmıştır. Son elli yılda sürekli büyüme gösteren atık üretimi, tarımsal alanlar, kentsel alanlar, plajlar gibi önemli ekosistemleri de kirletmektedir [3]. Plastik yapımında kullanılan monomerlerin büyük çoğunluğu fosil hidrokarbonlardan üretilmekte ve biyolojik olarak parçalanamamakta, bu yüzden atık olarak bulundukları alanlarda yok olmak yerine birikmektedirler [2]. Bu plastik parçacıkların ağırlığının %4'üne kadar kalıcı organik kirleticileri ve plastikleştirici katkı maddelerini içerdiği bilinmektedir [4].

Kullanışlı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile plastikler, çeşitli endüstrilerde ve günlük yaşam aktivitelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yılda artan üretimle birlikte bu miktar yılda 300 milyon tonu aşmaktadır [5]. Tek kullanımlık plastik ürünler tamamen veya kısmen plastikten yapılmakta ve tipik olarak atılmadan önce yalnızca bir kez veya kısa bir süre için kullanılması amaçlanmaktadır. AB'deki yeni kurallara göre, alternatifi olan bazı atılabilir plastik ürünler yasaklanmış ve belirli ürünlerin kullanımını azaltmak için de özel önlemler getirilmiştir [6,7]. Bu önlemlere göre, 3 Temmuz 2021'den itibaren AB pazarına sokulması yasak olacak tek kullanımlık plastik eşyalardan başlıcaları pamuk çubukları, çatal bıçak takımı, tabaklar, pipetler ve karıştırıcılar, balonlar ve balon çubukları, gıda kapları, içecekler için bardaklar, içecek kapları, sigara izmaritleri, plastik poşetler, paketler ve sarmalayıcılar, ıslak mendil ve tek kullanımlık temizlik ürünleridir [8].

Polistiren, en çok gıda endüstrisi alanında kendine yer bulmakta, tek kullanımlık ambalaj ürünlerinde ve paketlemelerde kullanılmaktadır. Bu plastik malzemeler geri dönüştürülmediğinde ya da uygun ortamlarda depolanmadığında birikerek çevre için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Çevre ortamında plastikler kendi boyutlarının haricinde çeşitli dış etkenlerle (mekanik etkiler, güneş, UV, sıcaklık vb.) parçalanarak mikroplastik (MP; <5 mm) ve nanoplastiklere (NP; <100 nm) dönüşmektedir [5].

Polistirenin monomeri olan stirenin potansiyel sağlık etkilerine ilişkin yapılan bilimsel çalışmalarla elde edilen kanıtlarla, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), stirenin kanserojenliğini 2002 yılında yeniden sınıflandırarak “insanlar için muhtemelen kanserojen” (Grup 2A) sınıfına almıştır. 2019’da ise “insanlar için olası kanserojen” (Grup 2B) olarak güncellenmiştir [9].

Stirenin vinil C=C çift bağı, polistiren homopolimerleri yapmak için polimerize edilebilmektedir. Polistiren polimerleri, tek kullanımlık gıda ambalajları veya dayanıklı ambalajlar için kullanılmaktadır. Örneğin yoğurt gibi ürünler için yüksek etkili polistiren kaplar, genel amaçlı polistiren ile karışımlardan yapılmış çatal-bıçak ve sofrta takımları, çorbalar gibi sıcak yiyecekler için tek kullanımlık tabaklar ve kaplar, sıcak katı gıdalar için tek kullanımlık ürünler, kahve veya çay gibi sıcak içecekler için bardaklar, balıkçılık, soğuk yiyecek veya bira için kutular vb. [9]. Görüldüğü gibi polistiren, gıdayla temas eden ürünler alanında geniş sıcaklık aralığında ve geniş depolama koşullarında kullanılmaktadır.

2.2. Nanopolistirenin Oluşumu

Günümüzde, nano ölçekli malzemeler elektronik, biyomedikal, farmasötik, kozmetik, enerji, gıda, çevre, gibi çeşitli alanlarda kullanılmakta veya burada kullanılan makro malzemelerin çeşitli dış etkenlerle parçalanması yoluyla oluşmakta ve çevreye salınmaktadır. Bu nano ölçekli malzemelerden son yıllarda en dikkate değer olanı ve üzerinde çok tartışılmaya başlanan partiküller nanoplastikler (NPL) olmuştur. İnsanlar nanoplastiklere (NPL), hava, toprak veya su yoluyla doğrudan veya NPL kalıntıları birikmiş bitkileri veya hayvanları tüketim yoluyla dolaylı olarak maruz

kalabilmektedirler [10–12]. Küçük boyutları (1-100 nm) göz önüne alındığında NPL'lerin biyolojik sistemlerdeki performansı dikkate değer olmaktadır [6]. Bu sebeple biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kendine son yıllarda inceleme alanı bulmaya başlamıştır. NPL'ler biyolojik sistemlerde başta proteinler olmak üzere biyolojik materyallerin yüzeyine adsorbe olarak korona yapıları oluşturmakta ve bu yapılar biyolojik materyallerin ve nanopartiküllerin boyutunu, yükünü ve yapısal özelliklerini değiştirerek karmaşık biyolojik sistemlerdeki davranışlarının farklılaşmasına neden olmaktadır. NP'ler ve özellikle proteinler arasındaki bu etkileşimin araştırılmasıyla önemli biyolojik süreçlerin işleyişlerindeki değişimler gözlemlenmiştir [13]. Bunun için de NPL'ler ile ilgili faktörler hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda dikkate alınmalıdır.

Polimer parçalanması, polimerin moleküler yapısındaki kimyasal değişimlerdir. Hidrolitik veya enzimatik reaksiyonlarda parçalanabilen biyolojik bozunabilir polimerler, omurgaları boyunca dağılmış O, N, S gibi heteroatomlara sahiptir. Bu da birkaç günden birkaç yıla kadar nispeten kısa bir zaman diliminde polimerin molekül ağırlığının azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Polimerin yapısı mikrobiyal düzeyde hücrelerin asimile edebileceği ve aerobik ya da anaerobik olarak kullanabileceği düşük moleküler ağırlıklı parçalara ayrılmaktadır. Bu şekilde biyobozunur polimerlere örnek olarak polilaktik asit, polikaprolakton ve polibütilenesüksinat gibi alifatik poliesterler, selüloz ve polihidroksialkanoatlar gibi doğal biyopolimerler bulunmaktadır [3]. Bunların aksine bazı polimerler ise bu tip bozunmalara duyarlı hale getirilmiştir. Çevreyi kirleten polimerlerin çoğu hidrolitik ve enzimatik bozunmaya dirençli karbon yapılarına sahiptirler. Polipropilen (PP), polietilen (PE), polistiren (PS), polivinilklorür (PVC) bu yapıya örnek bazı polimerlerdir [3]. Bu şekilde dirençli polimerlerin suda çözünme reaksiyonları göstermesi beklenmez fakat örneğin güneş ışığı gibi fiziksel etkenlerle yüzey dönüşümleri göstermeleri beklenir. Bu dönüşümler sonucunda nano ölçekte plastik malzemeler veya ileride daha küçük parçalara ayrışması muhtemel kırılğan mikro plastikler oluşur [14]. Ayrıca, bu plastiklerin yüzeyinden ayrılan NPL'ler de bir kirletici sınıfı olarak değerlendirilebilir ve önemli ölçüde heterojendir, yani makro boyuttaki plastikler gibi pek çok kimyasal bünyesinde barındırabilir [15]. Nanoplastiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin heterojenliği onların aktivitesini, doğal kolloidler ve organizmalarla ilişkilerini de belirler [15].

Plastiklerin doğada parçalanması sırasında oksidatif bozunmalar meydana gelebilir. Bu sırada plastik partiküllere anyonik veya polar gruplar girebilmekte ve bu da biyolojik bileşenlerle etkileşim için yeni yüzeyler yaratmaktadır. [13]. Burada karşılıklı gruplar arasındaki etkileşim biyolojik-fiziksel-kimyasal süreçleri içermektedir. Bozunma sırasında nano-parçacık oluşumu hakkında iki ana hipotez bulunmaktadır: (i) İlk önce, ana plastik parçadaki kırılma bölgelerinde dış etkenlerin de etkisiyle kusurlu bölgeler oluşur. Kusurlardaki artış, bu bölgelerden daha küçük parçacıkların ayrılmasına neden olur. (ii) Küçük NPL'ler ana parçadan salınır ve bunlar daha sonra stabilize olabilmek adına kendi aralarında kümelenmeye ve yeniden bir düzen oluşturmaya başlarlar. Bu tür bir bozulma, rastgele şekilli parçacıklar üretecektir. [16].

Son zamanlarda araştırmaların çoğu mikroplastiklere odaklanmıştır. Benzer bileşimleri ve kökenlerinin yanı sıra, nanoplastikler büyük ölçüde mikroplastiklerin bir uzantısı olarak ele alınmıştır. Ancak nanoplastiklerin boyuta bağlı özellikleri, taşıma özellikleri, kolloidlerle etkileşimleri, analitik zorluklar, biyoyararlanım, potansiyel toksisite ve katkı maddelerinin salınım süreleri açısından onları mikroplastiklerden ayırır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan araştırmalar, plastik parçacıkların bozunma sürecinin mikrometre düzeyinde kalmadığını ve nano düzeyde parçalanmaya devam ettiğini göstermiştir. Tek kullanımlık kahve fincanıyla yapılan çalışmada, UV ışınları ile makro boyuttaki plastiğin nano boyuta kadar parçalandığı kanıtlanmıştır [17], ayrıca su ortamında da nanoplastiklerin varlığı kanıtlanmıştır [16,18]. NPL'lerin çevrede bulunmasının sebepleri arasında makro plastiklerin parçalanması haricinde, kişisel bakım-kozmetik ürünlerine eklenen nano-mikro plastiklerin çevreye salınması da gösterilebilir [19]. Nano ölçekte plastiklerin varlığı, partikülün makro ölçekten nano ölçeğe doğru boyut değişimi ile açıklanabilmektedir. Makro ölçekte, sudaki partikül dağılımı esas olarak, yoğunlukları ve şekilleri (film veya küresel olmasıyla değişebilir) ile doğrudan ilişkili olan kaldırma kuvveti/sedimentasyon özellikleri tarafından yönetilmektedir [20]. Parçacıklar mikro ve nano ölçeğe ulaştığındaysa, kaldırma kuvvetlerini olumlu veya olumsuz yönde değiştirebilen mikroorganizmalar (bakteri, fitoplankton) ile veya biyolojik materyallerle etkileşime girebilmektedir [21,22] Parçacık boyutu nano ölçeğe ulaştığında, su molekülleri ve mevcut iyonik türlerle etkileşimler parçacığın çökmesini önleyebilir ya da tam tersi, iyonik kuvvetlerin de etkisiyle daha büyük agregatlara yol açabilir [23].

Nanoplastiklerin hem etkisi hem de davranışı ile ilgili çalışmalar, nano boyut aralığında ticari olarak bulunabilirliği nedeniyle şimdiye kadar çoğunlukla polistiren küresel partiküller kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu partiküller monodispers ve küresel olacak şekilde sentezlenir, boyut ve yüzey özellikleri bakımından nanoplastikleri taklit etmek ve deneysel çalışmaları takip edebilmek amaçlı özel olarak üretilen nanoplastiklerdir. Genellikle suda dağılmış işlemlerle elde edilir ve yüzey aktif maddeler ve koruyucular gibi katkı maddeleri ile formüle edilir. Sıklıkla Tween 20 ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik veya iyonik olmayan yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilirler ve/veya sentez sırasında karboksilat, amino veya sülfat grupları ile işlevselleştirilirler [25]. Sodyum azid gibi koruyucular genellikle antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılır.

Makro boyuttaki plastik filmlerle güneş ışığına ve deniz suyuna maruz kalmanın etkilerinin ölçüldüğü bir çalışmada [24], bu çevresel koşullarda plastik filmlerin stabilitesini kaybettiği ve yapısının bozulduğu yapılan ölçümlerle doğrulanmıştır. Deniz suyunda, güneş ışığına maruz kalınan ortamdan daha az bozulma gözlenmiş, bu da asıl mikropplastik kirliliğinin karasal alanlarda oluşabileceği sonucunu doğurmuştur. İncelenen plastik örnekleri içinde ise en fazla stabilite kaybı polistirende gerçekleşmiş, bu da en çok gıda ile temas eden ve en çok çevreye atılan plastik olarak ciddi sonuçlar doğurabileceğini göstermiştir. Çevrede artan plastik yoğunluğuyla bu partiküllerin besin zincirine girdiği bilinmektedir [13]. Farklı deniz bölgelerinden alınan örneklerle yapılan bir çalışma göstermiştir ki, Akdeniz, plastik kirliliği ve NPL yükü açısından en yoğun bölgelerden biridir. Bu bölge, aynı zamanda çok fazla bölgeden gelen suların birikimi olduğu ve çok fazla tür içerdiği için en riskli bölgelerden biri sayılabilir [25]. Bununla paralel olarak da şimdiye kadar örneklenen uzak dağ göllerinden Arktik deniz buzuna [26], [27] ve derin okyanus tabanına kadar [28] pek çok yerde NPL varlığı rapor edilmiştir. Bu önemine rağmen genellikle su ortamına odaklanan nanoplastik çalışmaları, insan sağlığı üzerindeki etkisinin ortaya konması için yeterli değildir.

Nanoplastiklerin çevre etmenleriyle ve canlılarla etkileşiminin net bir şekilde anlaşılması, beklenen sağlık tehlikelerini değerlendirmek için önemlidir, çünkü nanoplastiklerin verdikleri tepkiler, mikro ve makro boyuttaki plastiklerin verdikleri tepkilerden çok daha farklıdır ve bu konuda daha az bilgi bulunmaktadır [4]. Nanoplastikler, küçük yüzey

boyutları ve hidrofobik yapıları nedeniyle kendi aralarında ve çevreleri ile birleşme eğilimi göstererek aglomeratlara yol açmaktadırlar. Bu yapılar, yeni fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırmanın yanı sıra değişen yüzey-hacim oranıyla yeni biyolojik yapıların oluşumunu teşvik ederek sedimentasyon özelliklerinin ve biyolojik süreçlere girişinin değişmesine sebep olmaktadır [29].

Nanopartiküller ve biyolojik materyallerin etkileşimi üç bileşen içermektedir: i) nanopartiküllerin değişen yüzey özellikleri, ii) ortamdaki bileşenlerden etkilenen katı-sıvı arayüzeyi, iii) biyolojik materyalle temas yüzeyi. Kimyasal bileşim, yüzey hidrofobikliği veya hidrofiliği, kristallliği, gözenek yapısı, heterojenliği gibi özellikleri partikülün yüzey özelliklerini etkileyen başlıca özelliklerdir. Bunların haricinde zeta potansiyeli, partikülün agregasyon durumu, stabilitesi, çözünme durumu, iyonik yükü, pH, sıcaklık, büyük organik moleküllerin veya yüzey aktif maddelerin varlığı gibi diğer özellikler de ortamı etkilemektedir. Ortam etkileşimleri de, örneğin proteinlerin kendi içlerinde etkileşimleri, nanopartikülün çözünmesini, iyon dağılımını ya da aglomerasyon gibi önemli değişimleri tetikleyebilir [30]. Fiziksel stabilitenin bozulmasından öncelikle parçacıkların aglomerasyonu sorumludur. Bozulan stabilite, yüksek yüzey yükleri veya yüksek zeta potansiyelleri tarafından engellenebilir. Genel olarak, zeta potansiyeli parçacık yüzeylerinin kimyasal bileşimini tanımlamak için güçlü bir parametredir. [31].

Tipik bir biyolojik ortamda, birçok biyomolekül (kan plazması, proteinler vb.) sınırlı NPL yüzeyi için rekabet eder ve bu yüzeye moleküllerin bağlanmasına yol açar. Zamanla, ilk bağlanan protein, daha yüksek afiniteye sahip olanlar tarafından değiştirilir ve sonuçta ortaya çıkan ve sert korona olarak adlandırılan biyomolekül, nispeten hareketsiz bir katmanda sadece birkaç protein içerir. Sert korona oluşumu sırasında adsorbe edilen proteinlerde tam denatürasyona kadar önemli yapısal değişiklikler meydana gelebilir [32]. Bu sert tabakaya nispeten daha gevşek ve geri dönüşümlü bağlanan biyomoleküllerse yumuşak korona olarak adlandırılır. İnsan serum albüminiyle yapılan çalışmalarda sert ve yumuşak korona varlığı gösterilmiş, korona oluşumunun aynı zamanda partikülün yüzey ve yük özelliklerine göre değişebileceği de kanıtlanmıştır [33], [34]. Burada, koronanın bileşiminin, farklı materyaller için mevcut NPL yüzeyinin

proteine oranına bağı olabileceğı de unutulmamalıdır. Ortamdaki protein miktarı değıştikçe NPL'nin biyolojik kimliğı de önemli ölçüde değışebilir [29].

Biyolojik sıvılar, yüksek konsantrasyonlarda iyonlar içerebilen, çoğunlukla protein ve pek çok organik molekül de içeren sulu çözeltilerdir. Bu çözeltilerde protein korona yapısının oluşmasıyla nanopartiküllerin kolloidal stabilitesi önemli ölçüde değışebilir [35]. Çözeltideki protein içeriğı, hidrofilik ve zwitteriyonik yapısı sebebiyle stabiliteyi artırabilirken, iyonlar, NP'lerin stabilize edilmiş yüzey özelliklerinin değışmesi gibi sebeplerle de stabilite azalabilir ve aglomerasyon oluşabilir [35]. Ayrıca güçlü şekilde adsorbe edilen polipeptit zincirlerinin çapraz bağlanması da bu aglomerasyonu tetikler ve bu kümelenme de biyolojik uygulamalarda zararlı olabilir [32]

Biyolojik çözeltilerde proteinlere bağlanmanın yanı sıra hücre ve dokulara da NPL'lerin adsorbe olabildiğı düşünülmektedir. Su ortamında alglerle yapılan çalışmalarda *Scenedesmus*, *Chlorella* ve *Pseudokirchneriella subcapitata* gibi mikroalglerin hücre duvarına NPL'lerin adsorbe olduğu gözlenmiştir. Deneyler birkaç saatten birkaç güne kadar sürmüş ve sonuç olarak nanopolistirenlerin 100 mg/L konsantrasyona kadar algler için öldürücü olmadıkları, fakat alglerin yüzeyinin plastikle kaplanmasıyla hareketsiz bir hale geldiğı ve su bulanıklığının artmasıyla fotosentezin inhibe olduğu görülmüştür [21,36]

NPL'ler, şimdiye kadar genellikle sudaki canlılar ve sulu ortamda varlığının incelenmesiyle araştırma konusu olmuşken, gıda matrisi gibi karışık içerikli ortamlarda analitik zorluklar sebebiyle nispeten daha az araştırılmıştır. Bu alana ışık tutan birkaç çalışmada; gıdalarda bal, şeker [37], birada [12,38], farklı marka ve çeşitlerde tuzlarda [12,39], pirinçte [40], poşet çaylarda [41], havuç, marul, lahana gibi sebzelerde [42], konserve balık ürünlerinde [43] ve soğuk içeceklerde [44] çoğunluğu lif ve parçacıklar olmak üzere çeşitli plastik türleri bulunmuş, bunların büyük bir kısmının proses sırasında ekipman ve filtrelerden, kullanılan sudan, hatta tekstil ürünlerinden ve havadan geçebildiğı görülmüştür. Çin'de tuzlarla yapılan çalışmada asıl yoğunluğun deniz tuzlarında bulunduğu, göl ve kayadan elde edilen tuzlarda yoğunluğun nispeten daha az

olduğu ve böylece asıl kirlenmenin de denizlerde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır [39]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından şişelenmiş sulardaki mikroplastik içeriğinin birkaç on ila birkaç yüz parçacık düzeyinde olduğunun bildirilmesinin ardından, bazı araştırmacılar içme suyundaki potansiyel riskler hakkında bir çalışma başlatmışlardır [45]. Bununla paralel olarak Tayland'da şişelenmiş farklı özellikteki içme sularıyla yapılan çalışmada ise plastik ambalajlı şişelerde, cam ambalajlı şişelere göre çok daha yüksek miktarda mikroplastik içeriği bulunmuş olmasına rağmen, cam ambalajlı şişelerdeki sularda da az da olsa mikroplastik içeriğine rastlanması, proses kaynaklı bulaşı teorisini güçlendirmektedir [46].

Gıdada ve çeşitli ortamlarda bulunması ile ilgili ve sudaki canlılar üzerindeki çalışmalara ek olarak, insan vücudunda NPL'lerin davranışını anlayabilmek ve insan vücuduna etkilerini gözlemleyebilmek için in vivo ve in vitro sindirim ve toksisite çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarla insanda NPL'lerin etkileri ile ilgili detaylı bilgi edinilebilmektedir.

2.3. In Vitro Sindirim Simülasyonu Çalışmaları

Nanopartiküllerin özellikleri boyutlarına göre değişmekle birlikte, çevreleriyle de ilişkili olması açısından önemlidir. Örneğin, gıda ile tüketilen NPL'ler, sindirim sisteminden geçebilmekte ve çevreyle olan etkileşiminden dolayı bağırsak mikrobiyomunun bileşimini değiştirebilmektedirler [47]. Bu yüzden nanopartiküllerin olumsuz etkileri sindirim sisteminin kendisinde veya emilimden sonra vücuttaki diğer organ ve dokularda ortaya çıkabilmektedir. Sindirim sistemindeki nanopartiküllerin işlevi üzerinde gıda matrisinin etkilerinin önemi gittikçe artmaktadır. Gıda matrisinde nanopartiküllerle etkileşime girebilen ve sindirimin işleyişini değiştirebilen çok çeşitli etken bulunmaktadır [48].

Bir gıdanın içinde bulunan nanopartiküllerin ortamı, gıda matrisi gastrointestinal sistemde ilerledikçe değişmektedir. Öncelikle gıda ağız, mide ve bağırsak ortamlarının sıvılarıyla seyrelir ve bunun sonucunda gıda ortamının pH'sı ve iyonik yükü etkilenmektedir. Ardından, sindirim enzimleri, gıdada bulunan makro besin elementlerini

parçalayıp yeni mikro elementlerin açığa çıkmasını sağlayarak kimyasal yapıyı değiştirmektedir. Diğer bir konu, yağ asitleri, proteinler, safra tuzları, mûsin, fosfolipitler gibi yapılar ya da gıdadan ve sindirim ortamlarından salgılanan başka yapılar nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olarak onların da yüzey aktif özelliklerini değiştirmektedir [34]. Sonuç olarak gıdanın içeriği, miktarı ve etkileşimleri nanopartiküllerin sistemden geçerken maruz kaldıkları ortamı büyük ölçüde değiştirmektedir [49]. In vitro intestinal modeller polistiren NPL'ler gibi model partiküller kullanılarak uygulanabilmektedir. Nanopartiküller protein yapılarını ve dolaylı olarak enzimin bağlanma noktasını etkileyerek sindirim enzimlerinin aktivitesini değiştirebilmektedir [50]. Örneğin sindirim sisteminde polistiren NPL'lerin etkisinin incelendiği bir çalışmada, enzimlere NPL bağlanmasıyla son ürün oluşumunun azalmasıyla sindirimin olumsuz yönde etkilendiği, bununla sınırlı olmayıp substratın da NPL çevresinde agregat oluşturmasıyla enzimin bağlanacağı bölgeyi sınırladığı görülmüştür [51].

Nanoplastiklerin karakteristik özelliklerinin sindirim sürecinde değişimini konu alan çalışmalarda çoğunlukla in-vitro sindirim modelleri kullanılmıştır. Hayvan ya da insanları kullanan in vivo beslenme yöntemleri genellikle en doğru sonuçları sağlamakta fakat bu deneyler zaman alıcı ve maliyetli olmasının yanı sıra etik yönden ve yasal düzenlemeler ile pek çok kısıtlamaya tabii olmaktadır [52]. Bu sebeple in vivo yöntemlere alternatif olarak, daha kısa zamanda doğru sonuçlar verebilen in vitro yöntemler geliştirilmiştir [53,54]. Bu tarz in vitro yöntemler, gıda bileşenleri ve sindirim ortamlarının benzerlerinin oluşturulmasıyla hayvan ve insan modellerine faydalı alternatif oluşturmuştur. In-vitro sindirim modelleri çoğunlukla ağız, mide ve bağırsak aşamalarını içermektedir [55].

2.3.1. Ağız Aşaması

Nişasta, insan beslenmesindeki en önemli sindirilebilir polisakkarittir ve genellikle toplam enerji alımının %20-50'sini oluşturmaktadır [56]. Ağız boşluğunda nişasta sindirimi, maltoz, maltotrioz ve dekstrinlerin olduğu, amiloz ve amilopektinin glikozidik bağlarını hidrolize etmeye başlayan tükürük α -amilazı tarafından başlatılmaktadır. Nişasta, büyük granül boyutu ile amilazın bağlanması için birçok alan içermektedir. Bu avantaja rağmen, bozulmamış granüllerin tamamen parçalanması

oldukça yavaş bir işlemdir. Nişastanın kristal yapısı enzimlerin bağlanması için elverişsizdir ve bunun yanında granüller, enzim-substrat bağlanmasını engelleyebilen değişken miktarlarda protein ve lipid molekülleri de içerebilmektedir [57].

Tükürük salgısı, parotis, dil altı ve submandibular bezler tarafından üretilen, pH, yüzey gerilimini ve viskozite gibi parametrelerini etkileyen kompleks bir sıvıdır. Tükürük sıvısı, %99.5 su, %0.3 protein (immünoglobulin A (IgA), α -amilaz (ptyalin), lizozim, laktoferrin ve mukozal glikoproteinler (müsinler)), çeşitli elektrolitler (sodium, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfat ve bikarbonat vb.), üre gibi azotlu ürünleri içermektedir. Tükürüğün normal pH değeri 6.0-7.0 arasındadır, fakat akışta bu değerler 5.3 ile 7.8 arasında değişebilmektedir [56]. α -amilaz, pH 6.8'de tükürük içinde optimum pH değerindedir. Aktivitesi ağız boşluğu ve erken mide sindirimi ile sınırlıdır. Alınan gıdayla birlikte mideye indiğinde yüksek asidik pH ve yüksek proteolitik aktivite nedeniyle aktivitesi son bulmaktadır. Çok kısa bir süre aktivite göstermesine rağmen bazı çalışmalarda gösterildiği üzere 20-30 saniyelik oral fazda bile ekmekteki nişastanın %50'sini, makarnadaki nişastanın ise %25'ini hidrolize edebilmiştir [58].

In vitro çalışmalarda genellikle model sistemler için 5 ya da 2 dakikalık oral sindirim süresi önerilmektedir [48,52,53]. Bunun yanında in vivo oral faz süresi çok daha kısadır fakat daha kısa inkübasyon süresi kullanılması durumunda laboratuvar koşullarında doğruluk ve tekrarlanabilirlik tehlikeye girebilir. Çoğu in vitro sistem denemelerinde oral faz kısmı, özellikle sıvı numunelerde çok kısa kalma süreleri nedeniyle atlanabilir [52].

2.3.2. Mide Aşaması

Midede besinler, salgılanan enzimler ve hidroklorik asit ile karıştırılarak sindirilir, gastrik hareketlerle öğütülür ve kademeli olarak duodenuma gönderilir. Pepsin, midedeki ana proteolitik enzim olup, yaklaşık 35 kDa ağırlığında ve 326 aminoasitten oluşmaktadır. Pepsin, asit proteazlar enzim grubunun bir üyesidir. Güçlü hidroklorik asitte maksimum verimde çalışmasının yanı sıra, aktif bölgesi bir su molekülüyle aktive olan ve onu protein zincirlerini parçalamak için kullanan iki aspartat aminoasit kalıntısı içerir. Pepsin, midenin asidik ortamında sindirim için optimize olmuş bir asit proteazdır [59]. Pepsinin

büyük polar olmayan boşluğu, aspartik asitten (Asp) oluşan iki aktif bölge içeren iki benzer alandan oluşur. Asidik koşullar altında (pH 1-4), bu aktif pepsin oluşu, protein zincirlerini küçük parçalara ayırır, daha sonra bu proteinler, normal fizyolojik aktiviteler için son derece önemli olan diğer proteazlar tarafından tamamen parçalanır [60]. Pepsin, protein parçalama reaksiyonunu gerçekleştirmek için oksijen atomları içeren çift aspartat kalıntısını kullanır. Hidroksil grubu ise bölünme reaksiyonu sırasında suyun tutunduğu yeri taklit eder [59].

Katı öğünlerin mideden boşalması, yaklaşık bir saatlik homojenleşme aşamasıyla birlikte yaklaşık 3-4 saat sürer. Bunun aksine sıvıların sindirimi çok daha kısa sürelerde gerçekleşir [52]. Örneğin 300 mL suyun boşaltılması için 1 saat gerekirken, düşük protein içerikli sıvılar için yaklaşık 30 dakika gibi daha kısa geçiş süreleri olduğu bildirilmiştir [61]. Sıvı matrisine protein, lipit, karbonhidrat eklenmesi, midenin günden güne farklı pH'ı gibi etkenler geçiş süresini doğrudan etkilemektedir. [52]. İn-vitro sindirim modellerinde mide aşaması genellikle 2 saat olarak kabul edilmektedir [53]. İnsan ve domuz pepsinleri arasında %84'e kadar yüksek homoloji mevcuttur bu yüzden pepsin aktivitesi deneylerinde çoğunlukla domuz pepsini kullanılır. Bunun yanında domuz pepsininin düşük maliyeti de kullanımı desteklemektedir [52].

2.3.3. Bağırsak Aşaması

Bağırsakta pek çok gıda bileşeninin sindirimi ve emilimi olmasına rağmen en çok lipit sindirimi üzerinde durulmaktadır. İşlenmiş gıdalardaki lipitlerin önemli bir kısmı emülsiyonlar şeklinde tüketilmektedir. Ayrıca, diyetteki serbest yağlar, ağızda ve midede mekanik etki ve biyosüpfaktanlarla karışım yoluyla gastrointestinal sistem boyunca emülsiyon haline getirilir. Yağ sindirimi, lipolitik enzimlerin emülsifiye yağ damlacıklarının yüzeyine adsorpsiyonuna bağlı bir arayüzey sürecidir [62]. Lipit hidrolizinin gerçekleşmesi için bu lipazların önce yağ/yağ damlacıklarının yüzeyine bağlanması gerekir. Bu nedenle, adsorbe edilmiş tabaka ve lipazın etkileşimleri, lipit hidroliz hızının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, damlacık boyutu tarafından belirlenen emülsiyonun başlangıç ara yüzey alanının, lipaz bağlanması ve aktivitesi üzerinde bir etkisi olması beklenir [63].

Kolipazın görevi, lipaza bağlanarak, lipazın yağ-su arayüzeyine adsorbe olmasını sağlamaktır [64]. Kolipaz varlığında lipazın substrata bağlanması kolaylaşarak lipoliz hızı artar. Fosfolipitler ve safra tuzları gibi biyo-yüzey aktif maddeler lipaz aktivitesini inhibe eder. Bu inhibisyon, 9.4 kDa'lık bir kofaktör protein olan kolipazın varlığı ile aşılr [65].

Lipit sindirimi sırasında yağ-su arayüzünü oluşturan bir diğer önemli bileşen de safra tuzlarıdır [52]. Safra tuzlarının protonlanması onları asit formlarına dönüştürür. Tuz formu fizyolojik pH'da daha yaygındır [66]. Yağ sindirimi sırasında, safra tuzu adsorpsiyonu, kolipaz-lipaz komplekslerinin adsorpsiyonunu ve dolayısıyla yağ hidrolizinin hızı ve kapsamını kontrol eder; bu nedenle safra tuzu adsorpsiyonunun hafifletilmesi, yağ sindiriminin rasyonel kontrolüne yönelik yollar sunar [62]. Fizyolojik koşullar altında, safra tuzları, lümen den alımlarını sağlamak için bağırsakta lipofilik molekülleri çözündürebilir. Kritik bir misel konsantrasyonunun üzerinde, kendiliğinden toplanma meydana gelir ve miseller oluşur. Kolesterol, fosfolipitler ve monogliseritler gibi hidrofobik moleküllerin bu karışık safra tuzu misellerine bağlanması, ince bağırsakta lipitlerin ve yağda çözünen vitaminlerin emilimini artırır [66].

Lipazlar (EC.3.1.1.3), triağılgiserol hidrolaz grubunun bir üyesi olup biyoteknolojik olarak gıda endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahiptir. Ayrıca trigliseritleri serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen gliserol ester hidrolizat olarak da tanımlanır. Lipazlar, trigliseridler üzerindeki hidrolitik aktiviteye ek olarak esterifikasyon, ara esterleşme, asidoliz, alkoliz ve aminolizi katalize eder [67]. Lipazlar en çok mikrobiyolojik olarak üretilir, bakteriyel ve fungal lipazlara genel kullanımda çokça rastlanır. Taksonomik olarak yakın suşlar, birbirinden farklı lipazlar üretebilirler. Birçok mikroorganizmanın ürettiği lipazlar bilinmektedir. *Alcaligenes*'in ürettiği lipazın yüksek alkalofilik ve termofilik özellikleri olduğu bildirilmiştir [68]. Farklı *Pseudomonas* suşlarının da, çok düşük sıcaklıklara adapte olabilen lipaz üretebildiği bulunmuştur [69]. pH, sıcaklık, metal iyonlarının etkisi, organik çözücüler, deterjanlar / yüzey aktif maddeler ve diğer inhibitörler gibi faktörler lipazların aktivitesini artırabilir veya baskılayabilir [70].

Lipit sindirimi en az üç ardışık adımdan oluşuyor olarak görülebilir. İlk adım, midede meydana gelen diyet lipitinin ince emülsiyon parçacıklarına dağılmasını içerir. Bu, suda çözünen lipazlar ile bunların çözünmeyen substratları arasındaki etkileşime izin veren bir lipit-su arayüzü oluşturur. İkinci adım, emülsiyon-su ara yüzeyinde spesifik lipazlar tarafından trigliseritlerin enzimatik hidrolizini içerir. Kısmen hidrolize emülsiyon haline getirilmiş lipit daha sonra ince bağırsak lümenine 0.5 µm'den daha küçük çaplı ince damlacıklar halinde girer. Safra ve pankreas suyunun birleşik etkisi, lipit emülsiyonunun fiziko-kimyasal formunda belirgin bir değişiklik meydana getirir. Pankreatik lipaz, 2-monoasçilgliserol ve yağ asitleri oluşturmak üzere trigliseritleri hidrolize ettiği duodenuma salgılanır. Pankreatik lipaz, safra tuzlarının ve fosfolipitlerin inhibitör etkilerini atlatmak için kolipazın varlığını gerektirir. Bu heterojen kataliz koşulları altında, emülsiyon-su arayüzünün konsantrasyonunun ve fiziko-kimyasal özelliklerinin, emülsiyon yüzeyine enzim bağlanmasının derecesini ve bunun sonucunda lipolizi belirlediği söylenebilir. Son aşama ise çözünmeyen lipitin emilebilir bir forma desorpsiyon ve dispersiyonudur. Sindirilen lipitler, bağırsak lümeninde fosfolipitlerden oluşan safra tuzu miselleri ve tek lamelli veziküller tarafından emilebilir hale getirilir. Bu partiküller sindirilmiş lipitleri sulu-enterosit membran arayüzüne iletir ve lipit molekülleri daha sonra ya enterosit plazma zarının fosfolipit çift tabakası yoluyla pasif difüzyonla ya da enterosit zarındaki spesifik proteinleri içeren aktif taşıma yoluyla emilir [63].

İnce bağırsaktan geçiş süresini etkileyen pek çok faktör vardır. İn vitro sindirim simülasyonu çalışmalarında lipit sindirimi için ince bağırsak süresi genellikle 2 saat olarak normalize edilmiştir [52]. Mide ortamından çıkan karışımın nötralize edilmesi duodenal pH, gıdanın içeriği ve midenin boşalma hızı gibi faktörlere de bağlı olarak yaklaşık 6.5 değerine ulaşır. Bağırsakta ilerledikçe 7.5 civarına kadar yükselir. Bu yüzden in vitro deneylerde de pH 7 civarı bağırsak ortamını simüle edebilmek için en uygun değerdir [53]. Simüle edilmiş bağırsak sindirimindeki en önemli bileşenler enzimler ve safradır [52]. Diaçilgliseroller, monoasçilgliseroller ve serbest yağ asitleri dahil olmak üzere ilave yüzey aktif bileşikler, lipazlar tarafından emülsiyon damlacıklarının hidrolizi sırasında üretilir [63].

2.4. Toksisite Çalışmaları

Mikro ve nanoplastiklerin vücuttaki davranışını ve etkilerini in vivo olarak kontrol etmek için pek çok çalışma yapılmış, biyolojik bileşenlerle etkileşimleri ve canlı vücuduna etkileri araştırılmıştır [71–74]. Fakat bunlar çoğunlukla düşük seviyelerdeki canlılarla sınırlı kalmıştır. Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen birkaç çalışmada, *Daphnia magna*, zebra balığı, midye, karides, plankton ve alg gibi düşük trofik düzeydeki canlıların NPL'leri yutabildiği, yüzey veya organlarına adsorbe edebildiği ve besin ağı aracılığıyla birbirlerine transferlerinin mümkün olabileceği; bu partiküllerin solungaç, karaciğer ve bağırsakta birikebildiği kanıtlanmıştır [19,36,75–78]. Daha yüksek trofik seviyelerde de NPL'lerin sindirim sisteminde, kafa bölgesinde ve solungaçlarda olabileceği sonucuna varılmış [79] fakat dokulara geçmesi hakkında yeterli bilgiye ulaşılamamıştır. Fakat *Daphnia magna*'da NPL'lerle yapılan çalışmalarda 52 nm ve altındaki plastik parçacıkların beyin dokularına ulaşabildiği ve DNA hasarı bırakabildiği gözlenmiştir [80,81]. Aynı şekilde fagositik hücrelerle etkileşime girip hücreye girebilme yetenekleri de kanıtlanmıştır [82]. Kabuklular ve deniz canlılarında toplam mikroplastik sayısına bakılan çalışmalarda, 2.1 ila 10.5 parça/g (ıslak ağırlık) ve 4.3 ila 57.2 parça/birey arasında [83] ya da 0.03-1.92 parça/g arasında [79] değiştiği görülmüş, fakat nanoplastikler için henüz yeterince tayin yöntemi geliştirilemediği için kesin bir sayı verilen çalışmalara rastlanmamıştır.

Bugüne kadar, plastik atıkların ve makroplastik parçacıkların, pek çok canlı için hem doğrudan hem de dolaylı yutma yoluyla tehdit oluşturabileceği belgelenmiştir [79,84]. Ek olarak, plastik parçacıkların, hidrofobik kirleticileri deniz suyundan deniz organizması dokusuna adsorbe ettiği, konsantre ettiği ve taşıdığı bulunmuştur. Aynı şekilde plastiklerin deniz bitkilerine ve bileşenlerine adsorbe olabildiği de bulunmuş [36] ve bu da karasal düzeyde daha çok araştırma yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Toksisite mekanizmalarını anlamanın anahtarı, nanoparçacık özellikleri ile biyolojik sonuçlar (örneğin, hücresel yanıt ve immünolojik yanıt) arasındaki nedensel ilişkileri belirlemektir [85].

NPL'lerin boyut aralığı, endositoz benzeri mekanizmalar yoluyla gastrointestinal membranlardan transferlerini kolaylaştırabilmekte ve böylece bu partiküller farklı doku

ve organlara dağılabilmektedir. Trofik ağ yoluyla biyolojik olarak birikebildiğinden, insanlar deniz organizmalarının tüketimiyle nanoplastiklere maruz kalmaktadır [86]. Bununla birlikte, kentsel alanların havasında mikro ve nanoplastiklerin mevcudiyeti nedeniyle soluma dahil olmak üzere birden fazla maruz kalma kaynağı ve yolu öngörülmektedir. Yutma, insanlar için en fazla maruz kalma yollarından biri olarak kabul edildiğinden, insan bağırsak bariyeri arasındaki potansiyel etkileşimlerin değerlendirilmesi gereklidir. Bu doğrultuda, in-vitro toksisitenin hücre kültürü teknikleriyle belirlenmesi sıkça kullanılan yöntemlerdendir. Bu amaçla, Caco-2 bağırsak hücrelerinin kullanımına dayanan in vitro bağırsak modelleri kullanılmaktadır. [86–88]. Ek olarak, insan bağırsağının karmaşık, çok hücreli ortamını daha iyi simüle etmek için Caco-2 ve HT29 hücrelerinin ortak kültürü gibi farklı modifikasyonlar da kullanılmaktadır [89].

PS NP'ler, hızlı sentez, düşük maliyet ve yüzey modifikasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve tıbbi uygulamalarda çokça kullanılmaktadır. Hedeflenen uygulama için partikül özelliklerinin yanı sıra sitotoksitenin de belirlenmesi gerekir ve bunun için katyonik ve anyonik PS NP'ler ile memeli hücreleri arasındaki etkileşimler üzerine bir takım çalışmalar yapılmıştır. Özellikle PS-NH₂ gibi katyonik partiküller, anyonik partiküllerden daha fazla olumsuz etki göstermiştir [90–92]. Katyonik bir yüzey, proteinlere benzer moleküler yapıları nedeniyle partikülün hücre zarı ile daha kolay etkileşime girmesini sağlayarak NPL'lerin hücreye girişini kolaylaştırmaktadır [30]. Örneğin, insan makrofajlarında PS-NH₂, inflamatuvar yanıtı hızlandırmakta ve ardından proinflamatuvar sitokin olarak bilinen kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarmakta, lizozomal membran destabilizasyonunu ve lizozomal enzimlerin salınımını ve ayrıca reaktif oksijen türlerinin üretimini indüklemektedir [93]. İnsan beyin ve sinir hücrelerinde, PS-NH₂ ayrıca lizozomal hasarı ve hücre ölümünü indüklemiştir [91,92] Aynı şekilde midyelerde de membrandaki lizozomal stabilite azalmış ve bunun sonucu olarak lizozim salınımı indüklenmiştir ve hücrelerde reaktif oksijen üretimi, nitrit birikimi artmıştır [94]. Önemli bir organel olarak lizozom, sindiremediği öz olmayan materyalleri biriktirebilir ve bozabilir. NPL'lere maruz kalmanın ardından Caco-2 hücrelerinde artan lizozom sayısı ve bazı NPL'lerin lizozomlarda lokalize olabildiği gözlenmiştir [95].

Bugüne kadar, memelilerde NPL'lerin toksisite değerlendirmesine ilişkin çalışmalar nispeten nadirdir. Yapılan bir çalışmada floresans işaretli polistiren nanopartiküller, farelerin mide, ileum, kolon, karaciğer, dalak, akciğer, böbrek, testis ve beyinde görüntülenmiş ve nispeten yüksek trofik canlılarda da organlara ulaşabildiği kanıtlanmıştır [95]. Aynı şekilde yine farelerde NPL'lere maruz kalmanın etkilerinin gözlemlendiği bir çalışmayla karaciğer ve üreme bozukluklarının yavrulara da aktarılabilceği kanıtlanmıştır [96].

2.5. NPL Karakterizasyonu

NPL'lerin bulundukları ortamda davranışlarını incelemek, onların olası etkilerini gözlemleyebilmek için oldukça önemlidir. NPL'lerin boyutunu, korona yapısını, çözelti içindeki davranışlarını ve çeşitli diğer özelliklerini karakterize etmek için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bazı durumlarda, birden fazla teknikte değerlendirilebilecek fiziksel özellikler vardır. Her tekniğin farklı güçlü ve eksik yönleri bulunduğu için, en uygun yöntemin seçimi konusunda genellikle birden çok yöntem birlikte kullanılması en uygunudur.

2.5.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope (TEM))

TEM, bir elektron ışını (genellikle 60-300 kV aralığında) ve örnek arasındaki etkileşimden yararlanan bir mikroskopi tekniğidir. Elektron ışını örneğe ulaştığında, elektronların bir kısmı iletilir, geri kalanı ise saçılır [97]. TEM ölçümünde hazırlanan örnek, ölçümden önce bir plaka üzerine damlatılıp kurutulur. Elde edilen son görüntü, kurutulmuş örneğe gönderilen ışınlardan örneğe ulaşp, buradan iletilen elektronlardan elde edilen bilgilerle oluşturulur [98]. TEM, NPL boyutunu ve şeklini analiz etmek için yaygın bir tekniktir, çünkü yalnızca örneğin doğrudan görüntülerini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda NPL homojenliğinin de en doğru tahminini sağlar [97]. TEM ile aynı zamanda NPL yüzeyine adsorplanan proteinlerle korona yapısı da karakterize edilebilmektedir. Adsorplanan proteinler, TEM ile doğrudan görüntülenebilir. Bu şekilde NPL yüzeyine adsorbe edilmiş proteinlerin varlığı doğrulanabilirken, bu yöntem nicel analiz için uygun değildir [99]. Bununla birlikte, bu tekniği kullanırken, serbest proteinler veya örneğin kurutulması sırasında oluşan problemler sonucundaki yanıltıcı görüntüler

gibi bazı sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, TEM genellikle daha fazla sayıda partikülü ölçebilen Dinamik ışık saçılması (DLS) gibi diğer tekniklerle birlikte kullanılmakta ve sonuçlar doğrulanmaktadır. NPL'lerin karakterizasyonunda bugüne kadar pek çok çalışmada TEM başlıca karakterizasyon metodu olarak kullanılmıştır [88,100].

2.5.2. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM))

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), NPL'leri karakterize etmek için, yüzey yapısı hakkında bilgi sağlayabilen ve yüzeylerin yüksek çözünürlüklü görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SEM, görüntüleme için elektronları kullanmaktadır [97]. Ayrıca, EDS (Energy Dispersive X-ray-Spectroscopy) dedektörü de bulunduğundan örneklerin ve örneklerin çevresindeki proteinlerin kimyasal bileşimi hakkında veri sağlayabilmektedir [98]. Birincil elektronlar örneğe nüfuz ederek saçılma süreçleri üretilir ve farklı sinyaller, bir görüntü oluşturmak için farklı dedektör sistemleri tarafından toplanmaktadır [101]. İkincil elektronlar, nesnelerin morfolojisini anlamaya yardımcı olan ayrıntılı bir görüntü sağlarken, örnekten geri saçılan elektronlar, atom numarasına dayalı olarak malzemenin ayrıntıları hakkında bilgi sağlayan artan bir yoğunluk üretmektedir. Daha yüksek atom numarasından oluşan elementlere sahip örnekler, daha düşük olanlara göre daha fazla elektron saçmaktadır. Bu süreç, örneklerin bileşimindeki farklılıkları ayırt etmek için yarar sağlamaktadır [98]. EDS analizi çoğunlukla NPL'lerin yüzeyine adsorbe olmuş proteinleri tanımlamakta kullanılmaktadır. Böylece NPL'nin korona yapısı hakkında bilgi sağlamaktadır.

SEM örnekleri, örneği analiz etmek için kullanılan bir SEM plakası üzerine damlatılıp kurutulmaktadır. Ek olarak, yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek için örnek yüzeyine altın veya karbon kaplama kullanılmaktadır [98]. NPL'ler, klasik TEM'e özgü yüksek enerji ve voltaj olmadan görselleştirilebilmektedir [102]. SEM görüntüleme, pek çok çalışmada, diğer analizlerle birlikte hem çözelti içindeki hem de tek başlarına NPL'leri karakterize etmede kullanılmaktadır [103,104].

2.5.3. Dinamik Işıık Saçılması (Dynamic Light Scattering (DLS))

Dinamik ışık saçılımı (DLS), çözelti içindeki NPL'lerin boyutunu bulmak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. DLS, çözeltideki NPL hidrodinamik çapını (yani NPL'nin çapını ve çözeltideki moleküllerle etkileşimi sonucu oluşan yeni oluşumları) belirlemek için kullanılan Stokes-Einstein varsayımıyla ışık saçılımını ölçmektedir [23]. DLS'de, yanlış sonuçlardan kaçınmak için nispeten düşük NPL konsantrasyonu gereklidir. DLS ile TEM ve SEM gibi diğer tekniklerden elde edilen sonuçlar arasında bir karşılaştırma yapılmakta ve boyutlandırmadaki herhangi bir tutarsızlığın kökenleri karşılaştırılabilmektedir [105]. Genel olarak, NPL'lerin DLS tarafından analizi, oluşan parçacık kümelerinin boyutunu nicel olarak ölçtüğünden, bunların kümelenme süreçleri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. DLS'nin avantajları arasında hızlı, kolay ve kesin olması yer almaktadır. Dispers ve homojen örnekler için oldukça hassas ve tekrarlanabilir. DLS'nin bir dezavantajı, büyük parçacıkların çok daha fazla ışık saçması ve az sayıda büyük parçacığın bile daha küçük parçacıklar için engelleyici olabilmesidir. Bu nedenle, heterojen örnekler için güvenilirliği azalabilmektedir. DLS bazen düzgün şekilli olmayan nanoyapıları ölçebilse de, genellikle küresel şekilli parçacıkları daha doğru ölçebilmektedir [97].

DLS analizi, bugüne kadar pek çok çalışmada NPL'leri karakterize etmek için kullanılmıştır. Bunlardan bazılarında protein korona yapısı başta olmak üzere farklı yapılar da karakterize edilmiştir [106]. Hem NPL'lerin hem de NPL-protein komplekslerinin hidrodinamik çapları ölçülerek analizler için örnekler karakterize edilmiştir.

NPL kullanılarak yapılan karakterizasyon ve sindirim çalışmaları şimdiye kadar sadece NPL'lerin etkilerini incelemek için gıda matrisi kullanılmadan yapılmıştır. Protein korona çalışmalarında ise daha çok BSA (sığıır serum albümini) gibi tek tip proteinler kullanılmıştır. Bu tez kapsamında karmaşık bir ortam içeren yağlı ve yağsız süt gıda matrisi olarak kullanılmış ve NPL'ler ile birlikte hem gıda matrisine hem de sindirim sırasında enzimlere ve sindirim ortamlarına etkileri incelenmiştir. Bu açıdan gıda matrisiyle birlikte NPL'lerin etkilerini ve sonuçları izlemek önemlidir, çünkü NPL'ler gıdalarla birlikte yutulur ve tükürük proteinleri, sindirim enzimleri ve bağırsaktan önce

kısmen sindirilmiş gıda bileşenleri ile etkileşime girer. Bu nedenle, NPL'lerin yüzeyinde yoğun bir protein korona yapısına yol açan gerçek bir gıda örneği kullanılması uygun görülmüştür. Tez kapsamında, ağız, mide ve ince bağırsak koşullarını taklit eden simülasyon altında gıda matrisi ile sindirilen NPL'lerin değişimi incelenmiştir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Deneylerde kullanılan saf su Puris-Expe RO Water System (Expe-RO Ele10-M) cihazından elde edilmiştir. Tez kapsamında model gıda matrisi olarak süt örneği seçilmiş olup, tüm aşamalarda standart bir matris sağlamak amacıyla süt örnekleri süt tozundan rekonstitüye edilerek hazırlanmıştır. Bu amaçla yağlı ve yağsız süt tozları Enka Süt ve Gıda Mam. San. Tic. A.Ş. (Konya, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Süt ortamını simüle etmek için bazı analizlerde NPS'ler saf su yerine tampon (0.02 M Tris bazı, 0.05 M NaCl, 0.003 M CaCl₂, pH 6.8) ortamında çözölmüş veya seyreltilmiş, burada kullanılan malzemeler de; Tris bazı Sigma-Aldrich Co. (St Louis, ABD) firmasından, NaCl ve CaCl₂ Tekkim Kimya (İstanbul, Türkiye) firmasından alınmıştır. Analizlerin tümünde kullanılan NPS'ler farklı konsantrasyonlarda sıvı çözeltiler olarak temin edilmiştir. NPS-30 (30 nm nanopartiköl) Magsphere Inc. (Pasadena, CA, ABD) firmasından alınmış, NPS-100 ve NPS-450 (100 nm ve 450 nm nanopartiköl) proje ortağı NANOTEC (NSTDA, Tayland) grubu tarafından sentezlenmiştir.

Akrilamit (%40), Bisakrilamit (%2), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Amonyum Persülfat (APS), Tetrametiletilediamin (TEMED) Bio-Rad Laboratories (Hercules, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Fluorescamine, α -amilaz enzimi, sodyum fosfat dibasic (Na₂HPO₄), pepsin enzimi, Trikloroasetik Asit (TCA), hemoglobin, lipaz enzimi, Üre, Glukuronik asit, D-Glukozamin hidroklorit, Potasyum tiyosiyanat (KSCN), Sodyum fosfat monobasic monohidrat (NaH₂PO₄•H₂O), Sodyum sülfat (Na₂SO₄), Ürik asit, Sığır Serum Albümini (BSA), Pankreatin, Safra, Magnezyum klorür heksahidrat (MgCl₂•6H₂O), Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO), nişasta, D-Glukoz, Potasyum klorür (KCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Amonyum klorür (NH₄Cl) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Potasyum iyodür (KI), İyot, Hidroklorik asit (HCl), Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl₂•2H₂O) Riedel-deHaën firmasından temin edilmiştir. Sodyum fosfat monobasic (NaH₂PO₄), Potasyum fosfat monobasic (KH₂PO₄) J.T.Baker firmasından temin edilmiştir. Lipaz aktivitesi tayininde kullanılan lipaz kiti (MAK046) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, ABD)'den temin edilmiştir.

3.1.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope (TEM))

Sindirim öncesi ve sonrası NPS'lerin morfolojik durumlarını ve gıda matrisi ile olan etkileşimi sonucu oluşan korona yapısını incelemek amacıyla elde edilen görüntüler, FEI Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN (FEI Company, Hillsboro, ABD) cihazı ile görüntülenmiştir. Hazırlanan örneklerin TEM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM))

Sindirim öncesi ve sonrası NPS'lerin agregasyon oluşumunu, gıda matrisi olmadan ve gıda matrisi içindeki davranışlarını incelemek amacıyla elde edilen görüntüler, FEIQuanta 200 FEG (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, ABD) cihazı ile elde edilmiştir. Analiz öncesi, sindirime girmemiş, gıda matrisiyle inkübe edilen ve edilmeyen NPS'ler ve sindirime uğramış, her ortamdan tek tek alınan örnekler karbon bant kullanılarak SEM plakaları üzerinde kurutulmuştur. Örneklerde iletken bir yüzey sağlamak amacıyla püskürtmeli bir kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc., Pleasanton, ABD) kullanılarak, numuneler 5 nm altın-paladyum kaplanmıştır. Hazırlanan örneklerin ESEM analizleri Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. Zetasizer Nano Zs

Hidrodinamik çap ve zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano Zs (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Birleşik Krallık) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu doğrultuda öncelikle NPS'lerin zeta potansiyellerinde, polidispersite indeksi (polydispersity index, PDI) ve hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hidrodinamik çap tek kullanımlık küvetlere 500 µL ve zeta potansiyel ölçümleri kapiler zeta ölçüm küvetine her örnekten 700 µL yüklenerek yapılmıştır. Ölçümler 25 °C'de gerçekleştirilmiş olup 10 farklı yürütmenin ortalaması 1 ölçümü yansıtacak şekilde 3 farklı ölçüm alınmıştır. Hazırlanan örneklerin zeta potansiyeli ve hidrodinamik çap ölçümleri Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Floresans Spektrofotometresi

Toksisite çalışmaları, enzim aktivitesi çalışmaları ve protein sönümlendirme çalışmalarında kullanılan Floresans plaka okuyucusu, Synergy H1 (BioTek Instruments, Winooski, ABD) firmasından temin edilmiştir. Cihazın çalkalama özelliği ve sıcaklık kontrolü de deneylerin kontrollü yürütülmesinde fayda sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar BioTek Gen5 Data Analysis Software yazılımı ile elde edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Nanopartiküllerin Temini ve Karakterizasyonu

3 farklı çaptaki NPS'ler, saf su veya tampon çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek analizler için hazır hale getirilmiştir. Her NPS çapı için stok çözeltiler tampon çözelti ile hazırlanmış (süt tozundan hazırlanan gıda matrisini temsil eden; 0.02 M Tris bazı, 0.05 M NaCl, 0.003 M CaCl₂, pH 6.8) [107] ve 15 dakika boyunca ultrason banyosunda tutulmuştur. Stok çözeltiler daha sonra 1 saat boyunca 25°C'de karıştırılmalı etüvde inkübe edilmiştir. NPS örnekleri farklı analizler için in-situ veya ex-situ olarak hazırlanmıştır. (In-situ hazırlık durumunda NPS'ler, farklı teknikler kullanılarak bir matris içinde hazırlanarak, öngörülen bir amaç için doğrudan kullanılacak bir örnek elde edilebilir. Ex situ yaklaşımda ise, NPS'ler önce matris içinde hazırlanır ve ardından kimyasal ya da fiziksel teknikler kullanılarak, partikül bu matris ortamından ayrılır. [108].) In-situ hazırlanan örnekler inkübasyon aşamasından sonra direkt analize alınırken, ex-situ örnekler 13000xg'de 20 dakika santrifüj işlemi uygulanarak ve süpernatant atılıp, pellet saf suda tekrar çözülerek 2 kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. NPS'lerin ESEM ve TEM Görüntülemesi

NPS'leri karakterize etmek amacıyla morfolojileri ve agregasyon durumlarını incelemek için ESEM ve TEM ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla, NPS'ler 1 mg/mL konsantrasyonda saf suda hazırlanmış ve 15 dakika boyunca ultrason banyosunda tutulmuştur. Tampon içinde hazırlanmış örnekler, iyonların ölçüm ortamında oluşturacağı karmaşıklık sebebiyle görüntülenmemiştir. Saf suda hazırlanan NPS çözeltileri ESEM plakalarına damlatılmış, kurutulmuş, altın-paladyum ile kaplanmış ve sonrasında ESEM görüntüleri elde edilmiştir. NPS'i karakterizasyonu için bir diğer yöntem olarak TEM kullanılmıştır.

Aynı yöntemle hazırlanan örnekler TEM plakalarında kurutulmuş ve ölçüm için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiştir.

3.2.1.2. NPS'lerin Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

NPS'lerin hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçümleri Zetasizer Nano Zs cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla NPS'ler saf su çözeltisinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanıp 15 dakika boyunca ultrason banyosunda tutulmuştur. İki paralel olarak hazırlanmış NPS'lerin her bir paraleli ayrı ayrı ölçülmüştür. Sonuçlar paralellerin ortalaması olarak verilmiştir.

3.2.2. Gıda Matrisinin Temini ve Karakterizasyonu

Gıda matrisi olarak kullanılan yağlı ve yağsız sütler rekonstitüe olarak hazırlanmıştır. Yağlı süt örnekleri için 12.20 ± 0.03 kuru maddeye sahip yağlı süt tozu, yağsız süt örnekleri için ise 8.27 ± 0.02 yağsız kuru maddeye sahip yağsız süt tozu kullanılmıştır. Süt tozları saf su içerisinde çözündükten sonra 45 °C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında homojenizatörde 3200 rpm'de 5 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Hazırlanan yağlı ve yağsız rekonstitüe süt örneklerinde, standartlara uygunluğu incelemek amacı ile kuru madde (KM), protein, yağ, % asitlik (laktik asit cinsinden), pH ve yoğunluk analizleri yapılmıştır. Süt örneklerinin protein içeriği Bradford metodu ile belirlenmiştir [109]. Yağsız kuru madde (YKM) miktarı, toplam kuru madde miktarından yağ içeriği çıkarılarak belirlenmiştir.

Yağlı ve yağsız rekonstitüe sütler ile yapılan kompozisyon analizi sonuçları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Analiz sonuçlarına göre her iki rekonstitüe süt örneğinde de, yağsız kuru madde, % asitlik, protein, yağ ve yoğunluk değerlerinin Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği'ne (Tebliğ No: 2019/12) [110] uygun olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Yağlı ve yağsız süt tozundan hazırlanan rekonstitüe süt örneklerinin bileşimi.

Analizler	Yağlı rekonstitüe süt	Yağsız rekonstitüe süt
KM (%)	12.20±0.03	8.27±0.02
YKM (%)	8.85±0.02	8.17±0.02
Protein (g/100 mL)	3.18±0.04	2.95±0.05
Yağ (%)	3.4±0.05	0.1±0.03
% asitlik (laktik asit cinsinden)	0.171	0.164
Yoğunluk (g/cm ³)	1.032±0.01	1.034±0.01
pH	6.72±0.03	6.70±0.04

3.2.3. Gıda Matrisi İçindeki NPS'lerin Karakterizasyonu

Gıda matrisi ile inkübe edilen NPS'lerin yapılarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bunun için gıda matrisi:NPS oranı 2:1 (h:h) olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltiler inkübasyona gireceği ortamlarda 1 saat boyunca 25 °C'de karıştırılarak inkübe edilmiştir.

3.2.3.1. Gıda Matrisi İçindeki NPS'lerin ESEM ve TEM Görüntülemesi

Gıda matrisi ile inkübe edilen NPS'lerin morfolojik karakterizasyonu için ESEM görüntüleri alınmıştır. Bu doğrultuda, gıda matrisi ile inkübe edilmiş farklı çaplardaki NPS'lerin morfolojileri in-situ olarak incelenmiştir. Gıda matrisi-NPS kompleksleri plakalara damlatılmış, kurutulmuş, kaplanmış ve ESEM görüntüleri elde edilmiştir. Görüntülerin elde edilmesinde kullanılan cihazın voltajı 10-30 kV arasında değişmektedir. Partikül çapı küçüldükçe voltaj artmaktadır. NPS'lerdeki korona yapılarını tespit edebilmek amacıyla TEM kullanılmıştır. Aynı yöntemle hazırlanan örnekler TEM plakalarında kurutulmuş ve ölçüm için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Burada yapılan ölçümlerde cihaz 20-120 kV arasında çalışmakta ve çap küçüldükçe voltaj artmaktadır.

3.2.3.2. Gıda matrisi-NPS Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Gıda matrisi ile etkileşimden sonraki NPS'lerin yapısının, gıda matrisiyle etkileşimden önceki haliyle karşılaştırılması amacıyla hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Burada gıda matrisine NPS'ler eklendikten sonra, 25°C'de 1 saat

çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Süt örnekleri ölçümdeki zorluk ve hatalara sebep olmaması için NPS-30 ve 100’de 1/45 oranında, NPS-450’de 1/15 oranında seyreltme yapılmıştır. Ölçümler üç paralelde yapılmıştır.

3.2.4. Protein Korona Yapısının Karakterizasyonu

3.2.4.1. Protein Sönümlendirme Oranı

Yağlı ve yağsız süt örneklerinin, farklı çap ve konsantrasyonlardaki NPS’ler (30, 100 ve 450 nm çapları için 0.05, 0.25 ve 1 mg/mL) ile etkileşimi incelenmiştir. NPS’ler gıda matrisi ile 25 °C’ de 1 saat çalkalamalı olarak inkübe edildikten sonra ölçüm işlemi için bu örnekten şeffaf tabanlı siyah mikro plakalara üç paralel olacak şekilde 200 µL yüklenmiştir. Daha sonra mikrolakalardan 280 nm uyarma ve 340 nm emisyon dalga boylarında floresans plaka okuyucusu kullanılarak ölçüm alınmıştır. Kontrol amaçlı olarak aynı işlemler NPS eklenmemiş örnekler için de yapılmıştır. Burada mevcut dalga boylarında triptofan bölgelerinin verdiği ışığa takip edilmekte, proteinlerin bağlanmasıyla da triptofan bölgeleri aktifliğini kaybedip floresans azalması gerçekleştiği için bağlanan protein hakkında yorum yapılmaktadır [106].

3.2.4.2. Native-PAGE Elektroforez

Elektroforezde kullanılan jellerin kompozisyonları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Protein tanımlaması için %3.9’luk sıralama jeli ve %12.18’lik yürütme jeli kullanılmıştır. %10’luk APS 0.1 g tozun 1 mL saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan ayırım jeli dikey jel kasetine döküldükten ve polimerleştikten sonra sıralama jeli dökülmüş ve üzerine kuyucukların oluşması için tarak oturtularak jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Jel hazırlama süreci bittikten sonra hazırlanan örneklerin her biri Çizelge 3.3’te detayları verilen örnek yükleme çözeltisiyle karıştırılarak farklı kuyulara yüklenmiş ve jel kasedi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank Çizelge 3.4’te verilen 4x yürütme tamponunun seyreltilmesiyle elde edilen 1x tamponla doldurulmuş ve sistem sabit akımda (20 mV) yürütülmüştür. İzlenen boya, jel kasedinin tabanına ulaştıktan sonra sistem durdurulmuş ve jel kasetten çıkarılarak saf su ile yıkanmış ve Çizelge 3.5’te verilen jel boyama çözeltisi içerisine aktararak çalkalayıcıda boyamaya bırakılmış ve

sonrasında boya çıkarma çözeltisinde bekletilmiştir. En son olarak Agfa Foto Look (Agfa-Geavert N.V., Belçika) programı kullanılarak jellerin görüntüsü elde edilmiştir.

Çizelge 3.2. %3.9'luk sıralama ve %12.18'lik yürütme jeli.

%3.9'luk sıralama jeli		%12.18'lik yürütme jeli	
Akrilamit-Bisakrilamit (7:3) (h:h)	1 mL	Akrilamit-Bisakrilamit (7:3) (h:h)	3.25 mL
0.5 M Tris Tamponu (6.8 pH)	2.5 mL	3 M Tris Tamponu (8.8 pH)	1 mL
Saf su	6.5 mL	Saf su	3.75 mL
APS	60 µL	APS	50 µL
TEMED	6 µL	TEMED	5 µL

Çizelge 3.3. Örnek yükleme çözeltisi.

0.5M Tris tamponu (pH 6.8)	2 ml
%0.5 Bromfenol mavisi	0.2 ml
Gliserol	2.5 ml
Saf su	5.3 ml

Çizelge 3.4. 4x yürütme tamponu.*

Tris Bazı	3.775 g
Glisin	7.125 g
Saf su	250 ml

*pH 8.3'e ayarlanır.

Çizelge 3.5. Jel boyama ve boya çıkarma çözeltisi.

Jel boyama çözeltisi		Boya çıkarma çözeltisi	
Commassie Blue R	0.1 g	2-propanol	10 ml
2-propanol	25 ml	Asetik asit	10 ml
Asetik asit	10 ml	Saf su	80 ml
Saf su	65 ml		

3.2.4.3. SDS-PAGE Elektroforez

Sindirimden sonraki NPS'lerin protein korona yapısının belirlenmesi amacı ile elektroforez analizleri yürütülmüştür. NPS'lerin sindirim öncesi gıda matrisi içerisinde

dispers ve stabil yapıda olması ex-situ analizini engellemiştir. Bu nedenle sadece sindirim sonrasında ex-situ analizi gerçekleştirilmiş örnekler SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) uygulanmıştır. SDS-PAGE, Ulrich K. Laemmli tarafından geliştirilen [111] ve moleküler kütleleri 5 ile 250 kDa arasında olan proteinleri ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir elektroforetik sistemdir. Gıda matrisi ile veya gıda matrisi olmadan sindirim simülasyonundan elde edilen örnekler SDS-PAGE uygulanmıştır. Jel kompozisyonları Çizelge 3.6’da verilmiş ve %5.3’lük sıralama jeli ve %13’lük yürütme jeli kullanılmıştır. %10’luk APS ve SDS 0.1 g toz hallerinin 1 mL saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan ayırım jeli dikey jel kasetine döküldükten ve polimerleştikten sonra sıralama jeli dökülmüş ve üzerine kuyucukların oluşması için tarak kısmı oturtularak jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında ise 4800 µL’lik örneklerin 13000xg’de 20 dakikalık santrifüjle çöktürülmesi ve saf suda tekrar çözündürülerek yıkanmasıyla elde edilen en son pellet halleri, Çizelge 3.7’deki örnek yükleme çözeltisiyle 9,6 µL’de çözülerek 500 kat konsantre hale getirilmiştir. Ardından 95 °C’de 5 dakika protein denatürasyonu ile kuyulara yüklenmeye hazır hale gelmiştir. Örnekler jellere yüklendikten sonra jel kasedi elektroforez tankına yerleştirilerek tank Çizelge 3.8’de içeriği verilen 5x yürütme tamponundan elde edilen 1x tamponla doldurulmuş ve sistem sabit akımda (20 mV) yürütülmüştür. İzlenen boya jel kasedinin tabanına ulaştıktan sonra sistem durdurulmuş ve jel kasetten çıkarılarak saf su ile yıkanmış ve Çizelge 3.9’da jel boyama çözeltisi içerisine aktarılarak çalkalayıcıda boyamaya bırakılmış ve sonrasında boya çıkarma çözeltisinde bekletilmiştir. En son olarak Agfa Foto Look (Agfa-Geavert N.V., Belçika) programı kullanılarak jellerin görüntüsü elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. %5.3’lük sıralama ve %13’lük yürütme jeli.

%5.3’lük sıralama jeli		%13’lük yürütme jeli	
Akrilamit-Bisakrilamit (7:3) (h:h)	0.95 mL	Akrilamit-Bisakrilamit (7:3) (h:h)	5.50 mL
0.5 M Tris Tamponu (8.6 pH)	1.25 mL	1.5 M Tris Tamponu (8.6 pH)	3 mL
Saf su	2.72 mL	Saf su	3.285 mL
SDS (%10)	0.05 mL	SDS (%10)	0.12 mL
APS (%10)	25 µL	APS (%10)	90 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL

Çizelge 3.7. Örnek yükleme çözeltisi.

1 M Tris-Cl (6.8 pH)	2.5 mL
Gliserol	4.5 mL
SDS (%10)	1 g
Bromfenol mavisi	20 mg
Saf su	2.5 mL
DTT*	0.25 M

*Örnek yüklenmeden önce DTT'siz tampon ve DTT 1:1 (h:h) oranında karıştırılır ve bu karışım örnekle belirli oranda karıştırılarak denatürasyon aşamasına geçilir.

Çizelge 3.8. 5x yürütme tamponu.

Glisin	94 g
Tris-bazı	15.1 g
SDS (%10)	50 mL
Saf su	1 L

Çizelge 3.9. Jel boyama ve boya çıkarma çözeltisi.

Jel boyama çözeltisi		Boya çıkarma çözeltisi	
Commasie Mavisi G-250	2 g	Metanol	300 mL
Metanol	300 mL	Asetik asit	100 mL
Asetik asit	100 mL	Saf su	600 mL
Saf su	600 mL		

3.2.5. Nanopartiküllerin In-Vitro Sindirim Ortamlarındaki Davranışları

Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS'lerin sindirim sırasında yapısal özelliklerindeki değişimlerin incelenmesi amacıyla in vitro sindirim simülasyonu uygulanmıştır. Bu doğrultuda öncelikle ağız, mide ve bağırsak ortamlarını simüle eden sıvılar Sohal ve ark.'na ait çalışmada anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.10). Organik ve inorganik sıvılar 1:1 (h:h) karıştırılmıştır. Simüle bağırsak sıvısının hazırlanması için oniki parmak bağırsağı sıvısı ve safra sıvısı 2:1 (h:h) oranda karıştırılmış ve kaba filtreden geçirilmiştir. Bu aşamaların ardından ağız 6.5 ± 0.1 , mide 1.0 ± 0.05 ve bağırsak sıvısı 12.35 ± 0.01 pH'ya ayarlanmıştır. Böylece ağız ortamıyla mide ortamı karıştığında son pH 1.4 ± 0.1 , mide ortamından çıkan çözeltiyle bağırsak ortamı karışınca son pH 8.1 ± 0.1 olmaktadır [112]. Enzimler ve aktif maddeler (Safra, BSA vb.) hazırlanan bu sıvılara günlük olarak eklenerek analize hazır hale gelmiştir. Farklı

çaplardaki NPS'ler, üç farklı konsantrasyonda (0.05-0.25-1 mg/mL) gıda matrisine eklenmiş ve örnekler 25 °C'de karıştırılmalı olarak 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler 1:1 (h:h) oranında ağız ortamı ile karıştırılmış ve 5 dakika süresince inkübe edilmiştir. Sonrasında ağız ortamından alınan sıvı tekrar 1:1 (h:h) oranında mide sıvısıyla karıştırılmış ve 2 saat inkübe edilmiştir. Son olarak mide ortamından alınan sıvı 1:1 (h:h) oranında bağırsak sıvısı ile karıştırılmış ve 2 saat inkübe edilmiştir [52]. Ayrıca sindirimin her aşamasında analiz için örnekler toplanmış, alınan örnekler in-situ veya ex-situ olarak gerekli analizlere hazır hale getirilmiştir. Ortamlardan alınan örneklerde ESEM ve TEM görüntüleri alınmış, hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri ölçülmüş, enzim aktivitelerine bakılmış ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.10. Simüle edilmiş sindirim sıvılarının içerikleri.

Ağız sıvısı	Mide sıvısı	Oniki parmak bağırsağı sıvısı	Safra sıvısı
Organik bileşen (50 mL için)			
20 mg Üre	8.5 mg Üre 65 mg D-Glukoz 2 mg Glukuronik asit 33 mg D-glokozamin hidroklorür	10 mg Üre	25 mg Üre
İnorganik bileşen (50 mL için)			
89.6 mg KCl 20 mg KSCN 90.7 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O 57 mg Na ₂ SO ₄ 29.8 mg NaCl 0.18 mL 1N NaOH	30.6 mg NH ₄ Cl 40 mg CaCl ₂ •2H ₂ O 10.13 mg 1N HCl 82.4 mg KCl 275.2 mg NaCl 30.6 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.22 mL 1N HCl 5 mg MgCl ₂ •6H ₂ O 56.4 mg KCl 8 mg KH ₂ PO ₄ 338.8 mg NaHCO ₃ 701.2 mg NaCl	0.24 mL 1N HCl 37.6 mg KCl 578.5 mg NaHCO ₃ 525.9 mg NaCl
Enzimler ve Aktif Maddeler (100 mL için)			
1.6 mg Ürik asit 14.5 mg α-amilaz	100 mg BSA 100 mg Pepsin	20 mg Pankreatin 50 mg Lipaz 100 mg BSA 20 mg CaCl ₂ •2H ₂ O	600 mg Safra 180 mg BSA 22.2 mg CaCl ₂ •2H ₂ O

3.2.6. Nanopartiküllerin Sindirim Öncesi ve Sonrası Enzim Aktivitelerine Etkisi

3.2.6.1. Amilaz Aktivitesi

Her bir çap için üç farklı konsantrasyonda (0.05-0.25-1 mg/mL) NPS'ler tampon çözeltide ve gıda matrisi (yağlı süt) içerisinde hazırlanmış ve 1 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Bu örnekler fosfat tamponu (0.05777 M Na₂HPO₄, 0.04223 M NaH₂PO₄) içerisinde 2 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan amilaz çözeltisi ile 1:4 (h:h)

oranında karıştırılmış ve NPS'in enzime bağlanabilmesi için yaklaşık 30 dakika inkübe edilmiştir. Tampon çözelti ve gıda matrisi içinde hazırlanan NPS örneklerine eklenecek enzim miktarını belirlemek için, hazırlanan farklı enzim konsantrasyonlarının sabit substrata karşı elde edilen aktivitenin kalibrasyon grafiği çizilmiştir ve grafikten aktivitenin maksimum olduğu noktadaki konsantrasyon (2 µg/mL) seçilmiştir. Kontrol olarak NPS içermeyen, tampon çözelti ve gıda matrisi ile hazırlanan örnekler kullanılmıştır. Her bir örneğin enzim aktivitesi kontrolün enzim aktivitesiyle karşılaştırılmıştır.

Enzim aktivitesi tayini için literatürdeki nişasta-iyot yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır [113]. Sabit enzim konsantrasyonunda, substrat olarak kullanılan nişastanın farklı konsantrasyonlarına karşı elde edilen aktivitenin kalibrasyon grafiği çizilmiştir ve grafikten aktivitenin maksimum olduğu noktadaki konsantrasyon (1.5 mg/mL) seçilmiştir. Her örnek için enzim içermeyen kör örnek hazırlanmıştır ve bunun için enzim yerine eşit hacimde fosfat tamponu eklenmiştir. Bu karışımlar substrat olarak saf suda hazırlanan 1.5 mg/mL nişasta çözeltisiyle 1:1 (h:h) oranında karıştırılmış ve 37 °C'de 10 dakika çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. 10. dakika sonunda reaksiyonu durdurmak için 1 M HCl ve iyot çözeltisi eklenmiştir. Bu aşamadan sonra 580 nm'de absorbans ölçümleri alınmış ve enzim aktiviteleri kontrole göre % azalış olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde eşitlik (1) kullanılmıştır. Er örneğin amilaz aktivitesi kör örneklerle göre hesaplanmış ve en son NPS içermeyen kontrollere göre % olarak normalize edilmiştir.

$$\text{Amilaz aktivitesi (U/mL)} = \frac{(\text{A580 Kontrol} - \text{A580 Örnek})}{(\text{A580/mg nişasta}) \times (10 \text{ dakika}) \times (0.05 \text{ mL})} \quad (1)$$

3.2.6.2. Pepsin Aktivitesi

Tampon çözelti ve gıda matrisi (yağlı süt) içerisinde hazırlanmış NPS'ler 1 saat boyunca 25 °C'de çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Çözeltilerin son halleri 10 mM HCl çözeltisi içerisinde 0.1 mg/mL (250 IU/mL) konsantrasyonda hazırlanan pepsin çözeltisi ile 1:4 (h:h) oranında karıştırılmış ve NPS'in enzime bağlanabilmesi için yaklaşık 30 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol olarak NPS içermeyen örnekler hazırlanmış ve örneklerin her biri bu örneğin enzim aktivitesiyle karşılaştırılmıştır.

Gıda matrisi ile inkübe edilmiş ve edilmemiş NPS'lerin pepsin aktivitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla en çok kullanılan ve standart bir prosedür olan Anson yöntemi kullanılmıştır [114]. Substrat olarak kullanılan hemoglobin çözeltisini hazırlamak için toz haldeki hemoglobin 25 mg/mL hazırlanmış, 10 dakika 37 °C'de bekletilmiş ve pH'ı 2'ye ayarlandıktan sonra saf su ile konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde hacmi ayarlanmıştır. Enzim-NPS inkübasyonundan sonra 0.5 ml, 20 mg/mL konsantrasyonda hemoglobin ve 0.1 mL enzim-NPS karışımı 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 1 mL %5'lik TCA çözeltisi eklenmiş, 5 dakika sonra 4000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatanttan örnek alınmış ve 280 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Her örneğin kör örneği olarak enzimin substratla tepkimeye girmesine izin verilmeden TCA çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Elde edilen sonuçlar örnekten kör örnek çıkarılarak aşağıdaki eşitliğe (2) göre hesaplama yapılmış, NPS içermeyen kontroller %100 aktivite gösterdiği varsayılarak diğer NPS'lerin bulunduğu örneklerin pepsin aktiviteleri de buna göre normalize edilmiştir.

$$\text{Pepsin aktivitesi (U/mL)} = \frac{(\text{A280 Örnek} - \text{A280 Kör}) \times (\text{Seyreltme faktörü})}{(10) \times (1.0) \times (0.001)} \quad (2)$$

3.2.6.3. Lipaz Aktivitesi

Gıda matrisi (yağlı süt) ile inkübe edilmiş ve edilmemiş NPS'lerin sindirim enzimlerinden lipaz aktivitesi üzerine etkilerini incelemek için ticari olarak temin edilen lipaz aktivite analiz kiti (MAK046) kullanılmıştır. Bunun için öncelikle kitten elde edilen lipaz analiz tamponunda 0.5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan enzim, NPS-30, 100 ve 450, tampon çözeltide ve gıda matrisi içerisinde hazırlanan karışımlar ile 4:1 (h:h) oranında karıştırılmış ve yarım saat inkübe edilmiştir. Sonrasında çalışılan enzim konsantrasyonunu daha önce kit için kullanılan enzim konsantrasyona çekmek [115] ve çözeltideki yanlış ölçüme sebep olacak bulanıklıktan kurtulmak için enzim-NPS karışımı 10 kat seyreltilmiştir. Ölçümden önce kit protokolünde kör ve örnek için belirtilen hacimlerde kimyasallar karıştırılmış ve daha önce inkübe edilen enzim-NPS karışımı bu kimyasallara eklenerek belirli zaman aralıklarında 570 nm'de absorbans ölçümü alınmıştır. Kit protokolünde belirtilen gliserol standardıyla yapılan kalibrasyona göre elde edilen eşitlik (3) kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş ve NPS içermeyen kontrollere göre her örneğin yüzdelik lipaz aktiviteleri uyarlanmıştır.

$$\text{Lipaz aktivitesi (miliU/mL)} = \frac{B \times \text{Seyreltme faktörü}}{\text{Reaksiyon süresi} \times \text{Hacim}} \quad (3)$$

B: Başlangıç ve bitiş arasında üretilen gliserol miktarı (nmol).

3.2.7. Toksisite Testleri

İnsan kolon adenokarsinom hücre dizisi Caco-2 (An 1), Şap Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) satın alınmış ve Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilen %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100 U/mL penisilin/streptomisin ve 2.5 mM L-glutamin içeren yüksek glukozlu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ortamında büyütülmüştür. Deneyler için hücreler, 5×10^4 hücre/kuyu yoğunluğunda 96 oyuklu plakalara ekilmiş ve gece boyunca 37 °C'de (% 95 nem, %5 CO₂) bırakılmıştır. Caco-2 hücreleri, haftada bir pasajlama sırasında %0.25 EDTA içeren tripsin ile inkübe edilmiştir. İşlem için ortam, gıda matrisi ile inkübe edilmiş ve edilmemiş NPS'lerin sindirim sonrası ortamını içeren taze hücre kültürü ortamı ile değiştirilmiştir. Analizlerde daha önce de en yüksek konsantrasyon olarak kullanılan 200 µg/mL ve konsantrasyon etkisini karşılaştırmak amacıyla 2 µg/mL konsantrasyonlarda NPS kullanılmıştır [116].

NPS'lerin hücrel canlılık üzerindeki etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT) tahlili kullanılarak incelenmiştir. Caco-2 hücreleri, 24 saat boyunca 96 oyuklu plakalarda büyütülmüş ve 24 saat boyunca NPS-30, 100 ve 450'nin 2 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra her kuyucuğa 10 µL MTT (5 mg/mL, Trevigen) eklenmiş ve hücreler CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 4 saat daha inkübe edilmiştir. Ortam, hücreleri rahatsız etmeden her kuyudan dikkatlice çıkarılmıştır. Bundan sonra, 100 µL DMSO eklenmiş ve MTT'nin mitokondriyal indirgenmesiyle oluşan formazan kristallerini çözündürmek için yukarı ve aşağı pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. DMSO ile 30 dakika inkübasyondan sonra kültür ortamı, 550 nm'de absorbans Biotek-H1 Synergy (BioTek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, ABD) mikroparka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. NPS içermeyen hücreler, sitotoksosite yüzdesini elde etmek için kontrol olarak alınmıştır.

ROS seviyesi, hücre geçirgen olan ve floresan 2',7'-diklorofloresin (DCFH) probuna hidrolize edilebilen 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak değerlendirilmiştir [117]. Caco-2 hücreleri, 24 saat boyunca 96 oyuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat boyunca NPS'ler (2 ve 200 µg/mL) ile inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra besiyeri atılmış ve her kuyucuğa 10 µM DCFH-DA içeren 100 µl önceden ısıtılmış Hank's tamponlu tuz solüsyonu (HBSS) tamponu eklenmiştir. 30 dakika inkübasyon sonrasında DCFH-DA çalışma solüsyonu uzaklaştırılmıştır ve 100 µL radyoimmünopresipitasyon deneyi tamponu (RIPA; 50mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 2mM EDTA, %0.1 SDS, 1mM DTT) lizis hücrelerine eklenmiştir. Buzda 5 dakika inkübasyondan sonra uyarma dalga boyu 485 nm ve emisyon dalga boyu 535 nm olacak şekilde Biotek-H1 Synergy floresan mikropilaka okuyucusu ile ölçülmüştür.

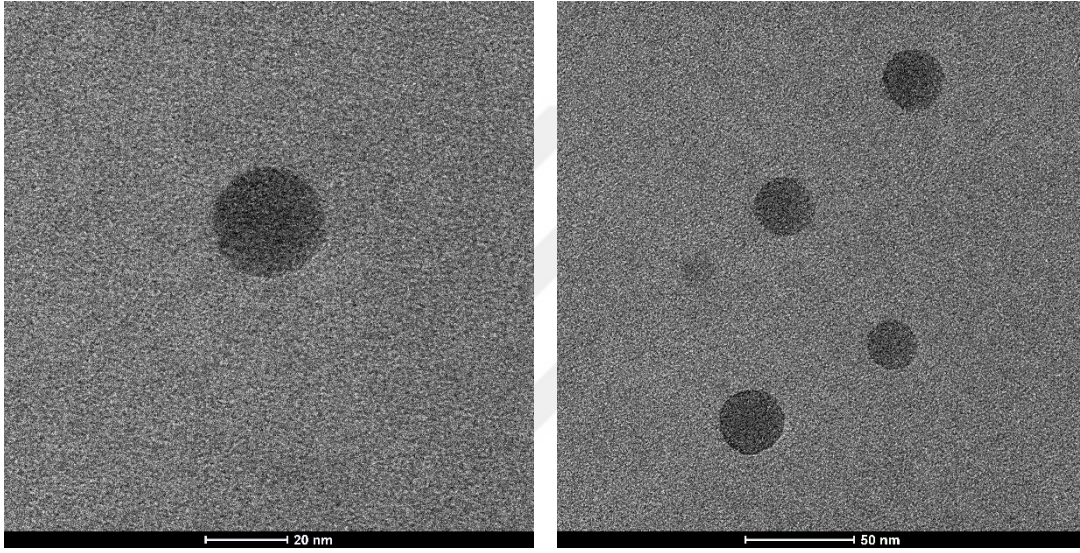
3.2.8. İstatistiksel Analiz

Protein söndürme oranı, sindirim öncesi ve sonrası hidrodinamik çap değişimleri, enzim aktivitelerindeki değişimler ve toksisite deneyi sonuçları, değişkenlerin etkilerinin incelenmesi amacıyla istatistiksel analize tabi tutulmuş, bu analizler sonucunda aralarında anlamlı fark içeren veriler belirtilmiştir. İstatistiksel analiz için SPSS (IBM, Armonk, ABD) yazılımı aracılığıyla Tukey'in Dürüstçe Anlamlı Fark (Tukey Honestly Significant Difference (HSD)) çoklu karşılaştırma testleri ile birlikte tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Bazı verilerin analizi ve kontrolü için de Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, ABD)'de t-testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

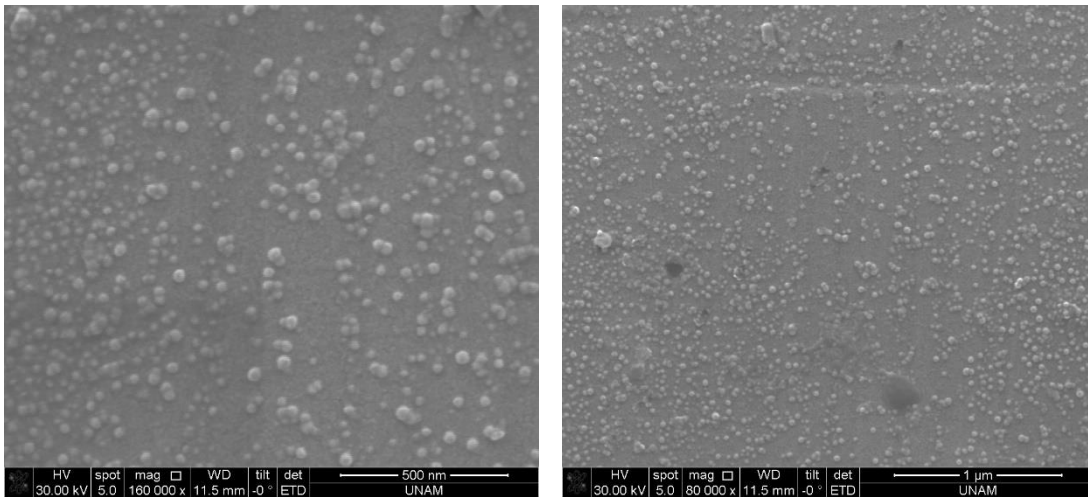
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. NPS Karakterizasyonu

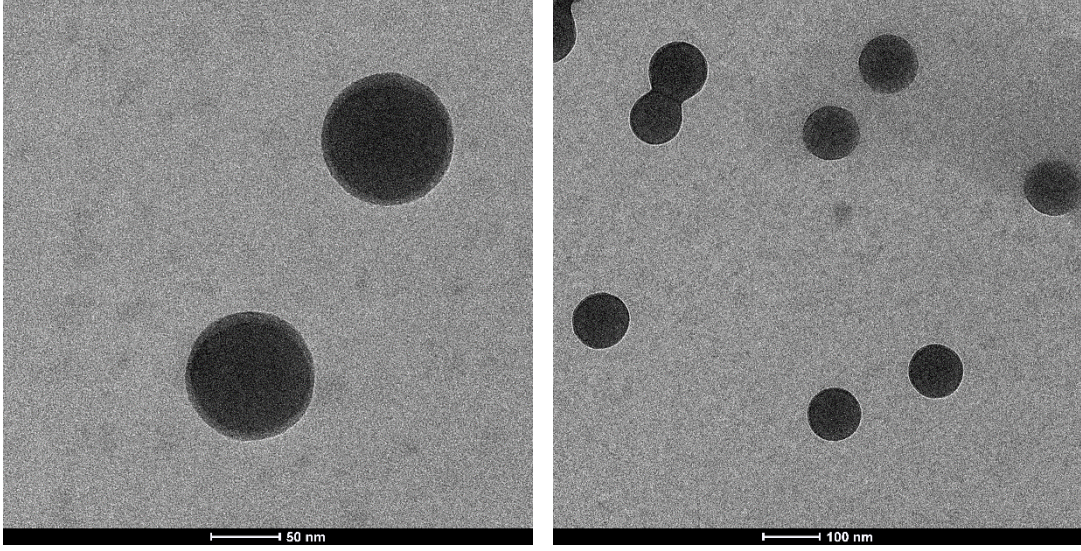
NPS'lerin agregasyon durumlarının belirlenmesi için ESEM ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi için TEM görüntü analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca partiküllere ait hidrodinamik çap ve zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir. NPS-30'a ait TEM ve ESEM görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2'de, NPS-100'e ait görüntüler Şekil 4.3 ve 4.4 ve NPS-450'ye ait görüntüler ise Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. Partiküllere ait hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçümleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.



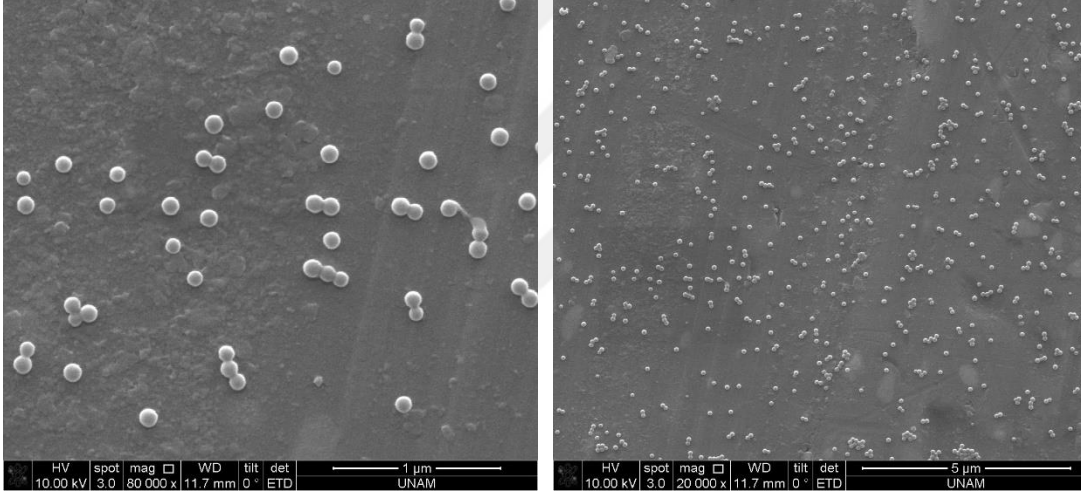
Şekil 4. 1. NPS-30'un TEM görüntüleri.



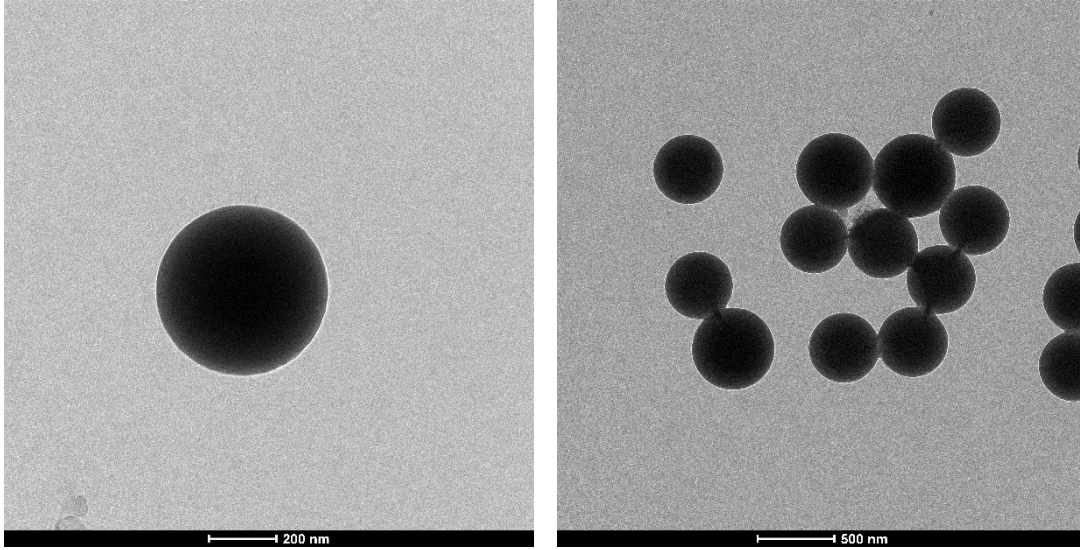
Şekil 4. 2. NPS-30'un ESEM görüntüleri. (160000x büyütme (solda), 80000x büyütme (sağda))



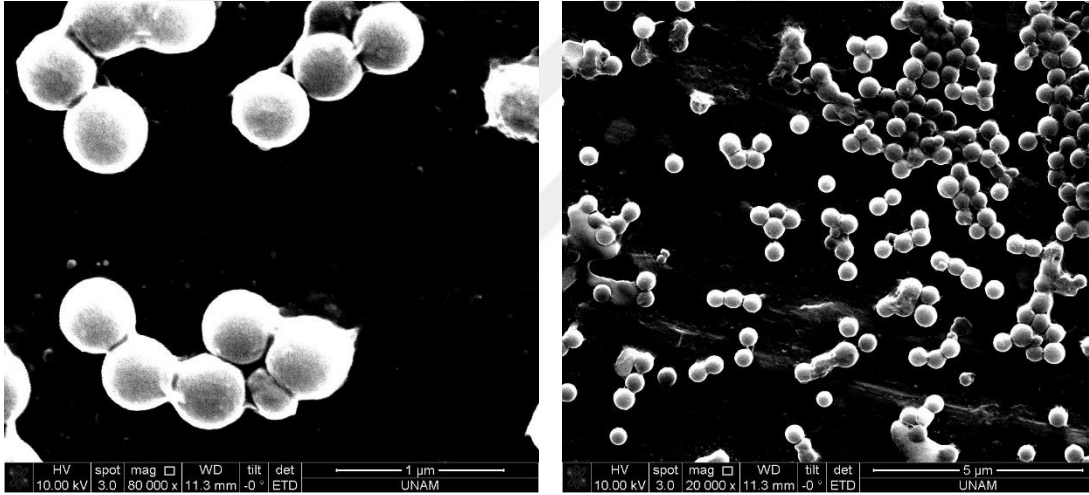
Şekil 4. 3. NPS-100'ün TEM görüntüleri.



Şekil 4. 4. NPS-100'ün ESEM görüntüleri. (80000x büyütme (solda), 20000x büyütme (sağda))



Şekil 4. 5. NPS-450'nin TEM görüntüleri.



Şekil 4. 6. NPS-450'nin ESEM görüntüleri. (80000x büyütme (solda), 20000x büyütme (sağda))

Çizelge 4.1. NPS'lere ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik χ ap değerleri.

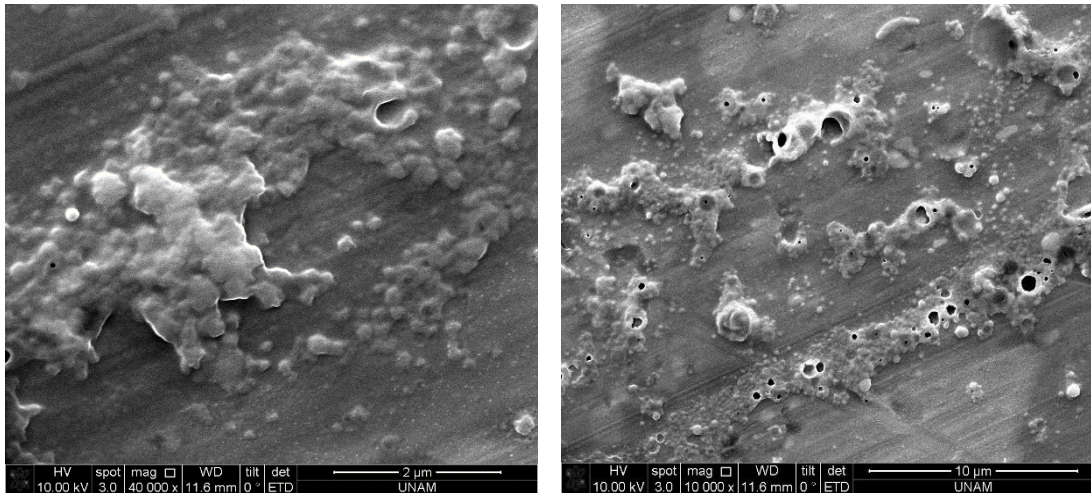
Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik χ ap (nm)
NPS-30 (1 mg/mL)	-35.4 $\pm$ 4.60	0.125	35.3 $\pm$ 0.80
NPS-100 (1 mg/mL)	-51.2 $\pm$ 1.10	0.031	106.8 $\pm$ 1.40
NPS-450 (1 mg/mL)	-52.5 $\pm$ 1.10	0.476	2042.0 $\pm$ 445.70

TEM görüntülerinde partiküllerin küresel ve pürüzsüz şekilli oldukları göze çarpmaktadır. Yüzeylerinde herhangi bir deformasyon ve yapısal farklılığa

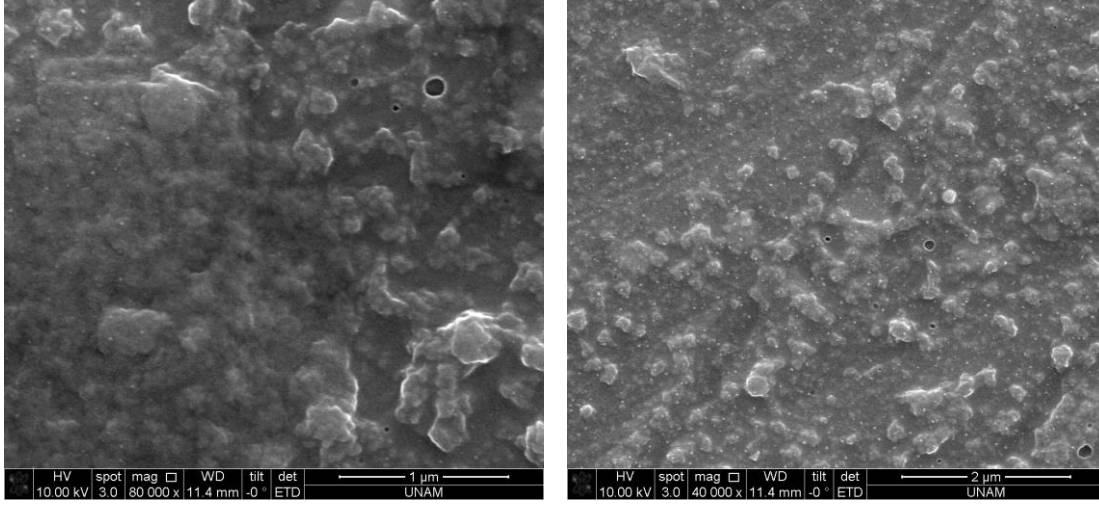
rastlanmamıştır. ESEM görüntülerinde NPS-30 ve NPS-100'ün çözelti içinde dispers halde bulunduğu ve agregasyon eğiliminde bulunmadığı görülmektedir. NPS-450'de ise birkaç partikülün bir arada bulunduğu kümeler gözlenmiştir. NPS-450'nin gıda matrisi olmadan, diğer partiküllere kıyasla daha fazla agregasyon eğiliminde olduğu görülmektedir. Hidrodinamik çap ölçümlerinde de görüntülerden elde edilen sonuçlar doğrulanmaktadır. NPS-30 ve NPS-100 partiküllerinin ortalama hidrodinamik çaplarının sırasıyla 35.3 ± 0.80 ve 106.8 ± 1.40 nm olarak bulunması bu partiküllerin su içerisinde dispers yapıda olduklarını gösterirken, NPS-450 için ortalama hidrodinamik çap değeri 2042.0 ± 445.70 nm olarak bulunmuştur. PDI (Polydispersity Index) değerinin NPS-450 için 0.3 değerinin üzerinde çıkması ise agregasyonu doğrulamaktadır [119]. Tüm partikül çözeltilerine ait zeta potansiyel değerleri negatif olarak ölçülmüş ve mutlak 30 değerinin üstünde çıkmıştır, yani çözeltiler çoğunlukla stabil kalmıştır [118,119].

4.2. NPS-Gıda Matrisi Etkileşimi

Bu çalışma, üç farklı NPS'nin tek konsantrasyonunda (1 mg/mL) yağlı ve yağsız süt gıda matrisi ile gerçekleştirilmiştir. Bu etkileşimden sonra partiküllerin stabilitesini ve agregasyonunu incelemek için ESEM ve korona yapısını gözlemek için TEM görüntüleri alınmıştır. Bunun için öncelikle çalışılan gıda matrislerine ait ESEM görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Hem yağlı hem de yağsız süt örneklerinde yaklaşık 200 nm boyutunda kazein miselleri dikkat çekmektedir. Bunun dışında gıda matrislerinde düzenli bir yapıya rastlanmamıştır.



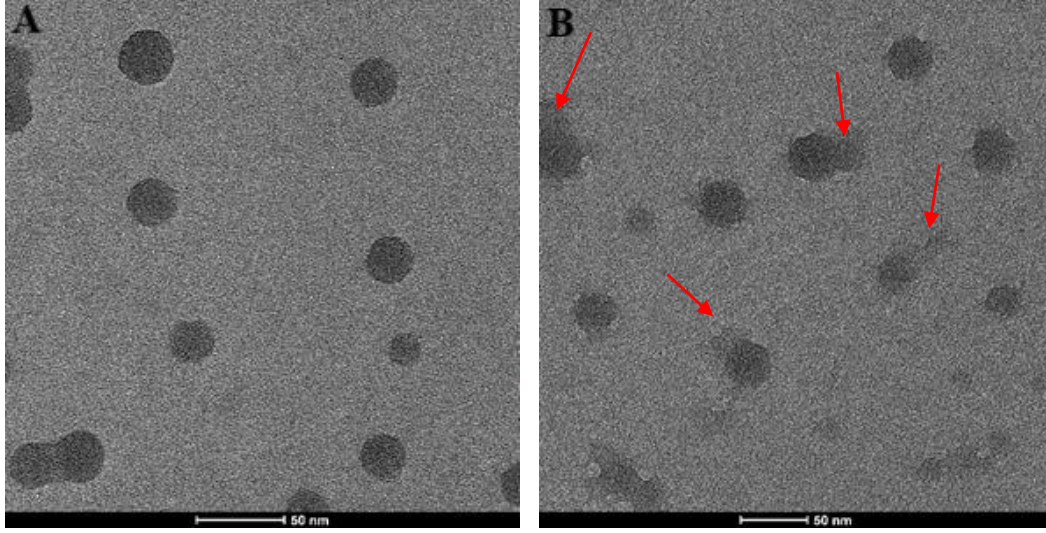
Şekil 4. 7. Yağlı sütün ESEM görüntüleri (40000x büyütme (solda), 10000x büyütme (sağda))



Şekil 4. 8. Yağsız sütün ESEM görüntüleri (80000x büyütme (solda), 40000x büyütme (sağda))

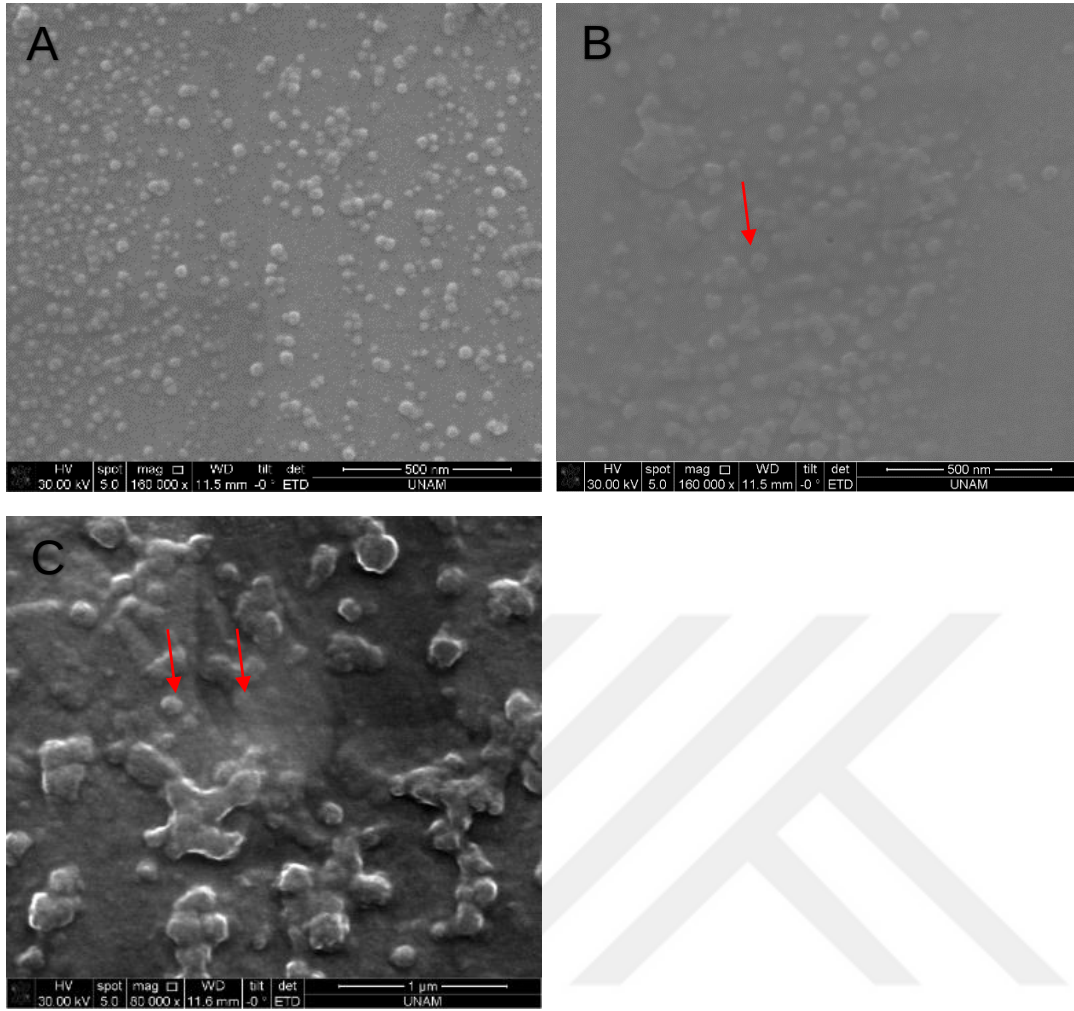
4.2.1. NPS-30 ve Gıda Matrisi Etkileşimi

Gıda matrisiyle (yağlı süt) etkileşimden önce ve sonra NPS-30'a ait TEM görüntüleri Şekil 4.9'da paylaşılmıştır. TEM görüntülerinde gıda matrisi ile etkileşimlerde korona yapısı rahatça gözlenmektedir. NPS'lerin çevresindeki bulutsu ve bulanık yapı burada proteinlerin oluşturduğu koronayı temsil etmektedir. NPS-30 için partikülün çevresindeki protein yapıları Şekil 4.9-B'de kırmızı oklarla gösterilmiştir. Burada bağlanan proteinlerin NPS etrafında yeni bir katman oluşturduğu ve bazen de bölgesel bağlandığı dikkati çekmektedir. Fakat NPS-30'un küçük çapı sebebiyle fazla yakından görüntülenemediği ve net görüntü alınamadığı göz önüne alınmalıdır. Gıda matrisi öncesi ve sonrası görüntülerdeki partikül çapları ImageJ yazılımı ile analiz edildiğinde; gıda matrisi yokken çapların ortalaması 25.7 ± 4.4 nm, gıda matrisi ile etkileşimden sonra ise 32.84 ± 5.15 nm olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar gıda matrisi ile etkileşimden önce 2 görüntü ve 198 partikül, gıda matrisiyle etkileşimden sonra 2 görüntü ve 42 partikül üzerinden yapılmıştır. Burada görülen boyut artışıyla korona oluşumu doğrulanmaktadır.



Şekil 4. 9. NPS-30'un yağlı sütle inkübasyondan önce (A) ve sonraki (B) TEM görüntüleri.

Şekil 4.10'da sırasıyla NPS-30'un yağlı ve yağsız sütle etkileşimi sonucu elde edilen ESEM görüntüleri, gıda matrisiyle etkileşimden önceki görüntülerle karşılaştırılarak paylaşılmıştır. Yağlı sütün yer aldığı görüntülerde, yağdan kaynaklı olduğu düşünülen bulutsu bir yapı, görüntünün tamamını kaplamakla birlikte, partiküllerin homojen bir dağılımda olduğu seçilebilmektedir. Yağsız sütle hazırlanan örneklerdeki görüntülerde daha çok süt bileşenleri öne çıkmaktadır. Ancak şekil 4.10-B ve C'de NPS'lere ait görüntüler işaretlenerek takip edilebilmiştir. Bu görüntülerden yağlı ve yağsız sütün partiküle bağlanması hakkında yorum yapılması güç olmakla birlikte, iki gıda ortamında da agregasyon olmadığı rahatça gözlenmiştir.



Şekil 4. 10. NPS-30'un yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM görüntüleri. A) NPS-30 B) NPS-30+yağlı süt C) NPS-30+yağsız süt

ESEM görüntüleri korona yapısı hakkında tek başına kesin bir doğrulama sağlamadığı için DLS analiziyle hidrodinamik çap ölçümleri yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3'te paylaşılmıştır. NPS-30 için ortalama çap 35.29 ± 0.80 iken NPS (1 mg/mL) katılan gıda matrisi örneklerinde; yağlı sütle çapı 220.5 ± 14.30 nm'ye, yağsız sütle ise 180.5 ± 5.83 nm'ye çıkmıştır. Bu sonuçlara göre, yağlı ve yağsız sütle hazırlanan gıda matrislerinin NPS-30'un ortalama çapına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yağlı sütün bulunduğu ortamlardaki çap artışının sebebi protein korona yapısı ve ortamdaki lipid varlığı olabileceği gibi, partikülün küçük boyutu sebebiyle sütün sterik etkisiyle partikülün ölçümünü engellemesi olarak da düşünülmektedir. TEM görüntüleri üzerinden alınan ölçümlerde gıda matrisi eklendikten sonra görülen boyut artışının DLS

ölçümlerindekine kıyasla çok daha az olması, DLS sonuçlarında heterojen süt ortamının ölçümlerde NPS-30'a baskın geldiğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.2 ve 4.3'te aynı zamanda NPS-30'a ait zeta potansiyellerindeki değişimler de paylaşılmıştır. NPS-30 ile yapılan ölçümlerde her iki gıda matrisinin bulunduğu ortamda partikülün yüzey yükü sütlerin yüzey yüküne yaklaşmıştır. Gıda matrisindeki proteinlerin bir kısmı partiküle bağlanmış olmakla birlikte hala bağlanmayan proteinler varlığını sürdürmektedir. Bağlanmayan süt proteinlerinin varlığı ortamda baskın gelmiş ve partikülle etkileşen sütün yüzey yükünün değişmemesine sebep olmuştur. Yağlı ve yağsız süt ortamları arasındaki farklar incelendiğinde ise iki ortam arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Yağsız sütün mutlak düşük zeta potansiyeli sonucu verdiği görülmektedir. Pek çok çalışmada da yağsız sütün mutlak olarak daha düşük zeta potansiyeli verdiği raporlanmıştır [120,121].

Çizelge 4. 2. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-30'a ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ζ ap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-30 (1 mg/mL)	-35.4±4.60	0.125	35.3±0.80 ^a
YS	-25.9±0.70	0.193	234.8±26.30
YS + NPS (1 mg/mL)	-26.3±0.40	0.244	220.5±14.30 ^b

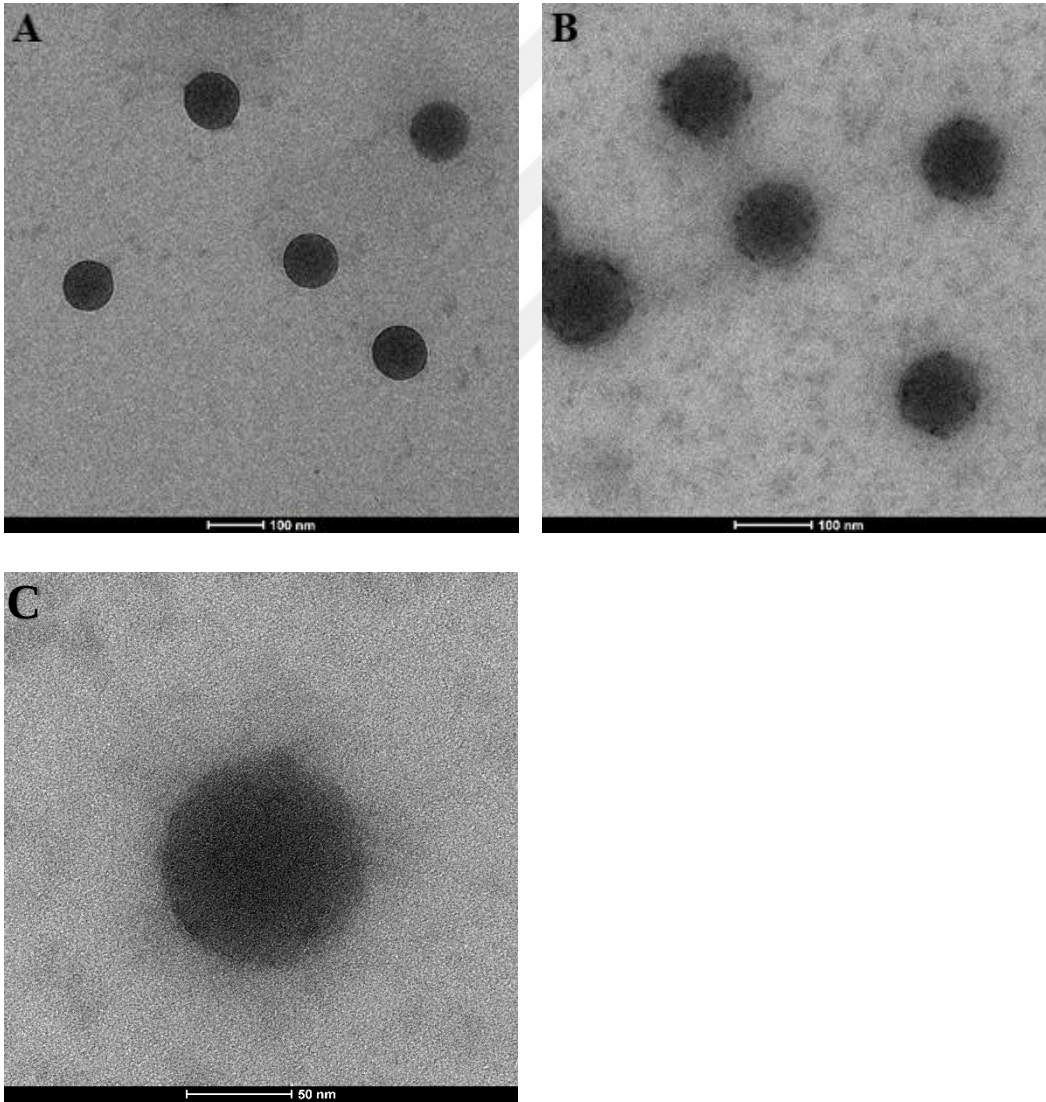
Çizelge 4. 3. Yağsız süttten (Y'S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-30'a ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ζ ap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS (1 mg/mL)	-35.4±4.60	0.125	35.3±0.80 ^a
Y'S	-22.0±0.48	0.088	174.0±8.03
Y'S + NPS (1 mg/mL)	-23.0±0.94	0.123	180.5±5.83 ^b

4.2.2. NPS-100 ve Gıda Matrisi Etkileşimi

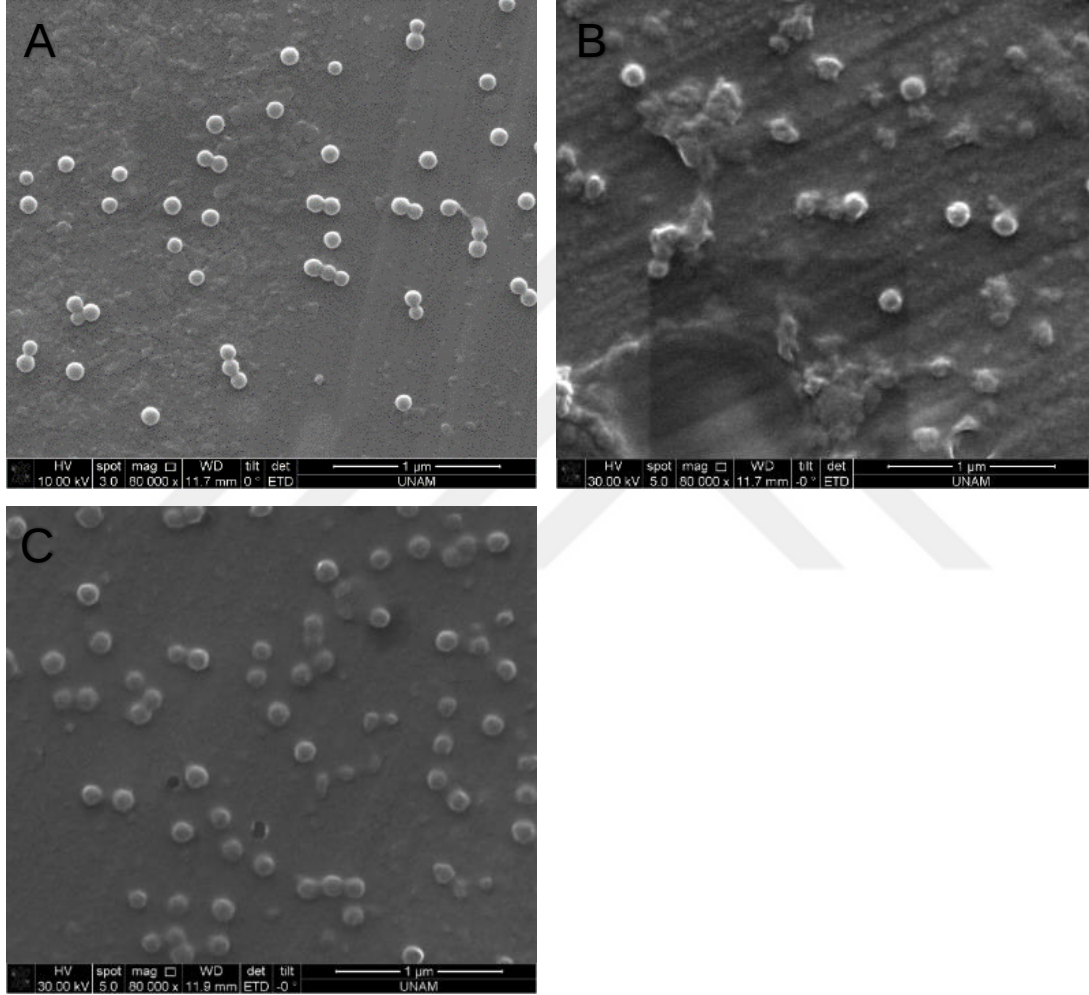
Gıda matrisiyle etkileşimden önce ve sonra NPS-100'e ait TEM görüntüleri Şekil 4.11'de paylaşılmıştır. TEM görüntülerinde partikülün gıda matrisi (yağlı süt) ile etkileşimlerinde

korona yapısı rahatça gözlenmiştir. Bu görüntüde bulutsu ve bulanık yapı koronayı temsil etmekte ve belirli bir çap artışı da görülmektedir. Gıda matrisi öncesi ve sonrası görüntülerdeki partikül çapları ImageJ yazılımı ile analiz edildiğinde; gıda matrisi yokken çapların ortalaması 97.5 ± 6.05 nm, gıda matrisi ile etkileşimden sonra ise 121.5 ± 6.05 nm olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar gıda matrisi ile etkileşimden önce 6 görüntü ve 41 partikül, gıda matrisiyle etkileşimden sonra 7 görüntü ve 43 partikül üzerinden yapılmıştır. Bu çap artışı partikül çevresinde korona yapısının oluşumunu açıkça göstermekle birlikte iki görüntüdeki çap ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.



Şekil 4. 11. NPS-100'ün yağlı sütle inkübasyondan önce(A) ve sonraki (B,C) TEM görüntüleri.

Şekil 4.12’de sırasıyla NPS-100’un yağlı ve yağsız sütle etkileşimi sonucu elde edilen görüntüleri, gıda matrisiyle etkileşimden önceki görüntülerle karşılaştırılarak paylaşılmıştır. Gıda matrisi ile etkileşimden önce partiküllerin saf su içinde homojen olarak dağıldığı görülmektedir. Yağlı ve yağsız sütle hazırlanan gıda matrisleriyle etkileşimden sonra partiküllerin çözelti içindeki davranışı değişmemiş, agregasyon görülmemiş ve partiküller çözeltide dispers halde kalmaya devam etmişlerdir.



Şekil 4. 12. NPS-100’ün yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM görüntüleri. A) NPS-100 B) NPS-100+yağlı süt C) NPS-100+yağsız süt

Partiküllerin korona yapıları sadece görüntülerle belirlenmemiş, aynı zamanda DLS ölçümleriyle de doğrulanmıştır. NPS-100’ün sırasıyla yağlı ve yağsız süttten elde edilen hidrokinamik çap değışimleri Çizelge 4.4 ve 4.5’te paylaşılmıştır. Partiküllerin hidrokinamik çapları, gıda ile etkileşimden sonra istatistiksel açıdan anlamlı olarak

artmıştır. Ortalama çaplar, TEM görüntülerindeki çap ölçümleriyle tutarlıdır. Partiküllerin çap değişikliklerine bakıldığında, yağlı ve yağsız sütün bulunduğu ortamlarda matrisin çap üzerine çok büyük bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Agregasyon ve korona oluşumuna gıda matrisinin içeriğinin büyük bir etkisi olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.4 ve 4.5'te aynı zamanda NPS-100'e ait zeta potansiyellerindeki değişimler paylaşılmıştır. Her iki gıda matrisinin bulunduğu ortamda da partikülün yüzey yükü sütlerin yüzey yüküne yakın tespit edilmiştir. Yağlı ve yağsız süt ortamlarının arasındaki farklar incelendiğinde yağsız sütün bulunduğu gıda matrisine ait yüzey yükleri daha yüksek (daha düşük mutlak değerde) çıkmıştır. Burada ortamdaki yağın etkisinden söz edilebilir. Daha önce de bahsedildiği gibi, yağsız sütün mutlak olarak daha düşük zeta potansiyeli vermesi beklenen bir sonuçtur.

Çizelge 4. 4. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-100'e ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik çap değerleri.

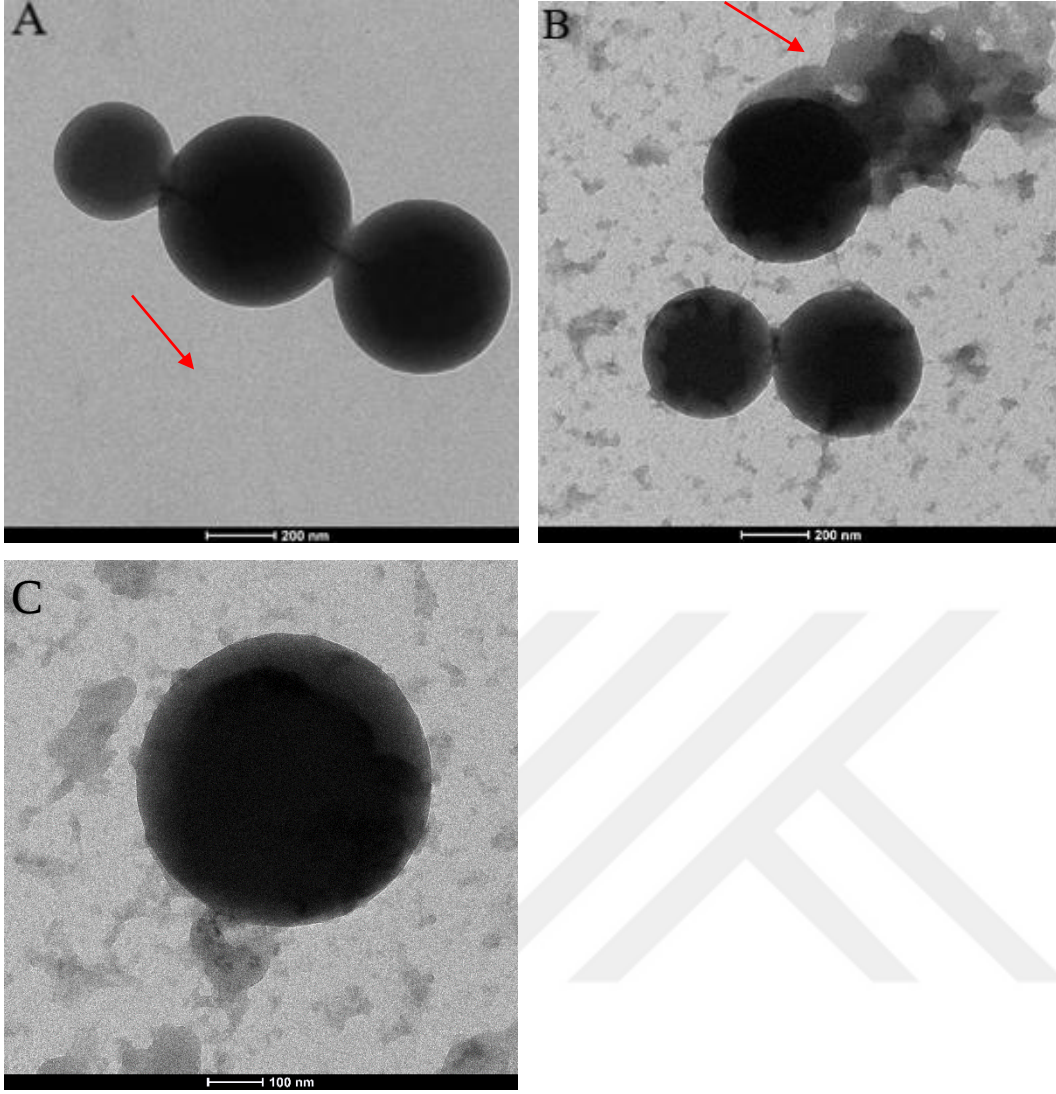
Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-100 (1 mg/mL)	-51.2±1.10	0.031	106.8±1.40 ^a
YS	-25.9±0.70	0.193	234.8±26.30
YS + NPS (1 mg/mL)	-26.3±0.50	0.146	128.8±2.60 ^b

Çizelge 4. 5. Yağsız süttten (Y'S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-100'e ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik çap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-100 (1 mg/mL)	-51.2±1.10	0.031	106.8±1.40 ^a
Y'S	-18.4±0.78	0.116	170.7±3.47
Y'S + NPS (1 mg/mL)	-22.0±0.68	0.025	116.6±1.05 ^b

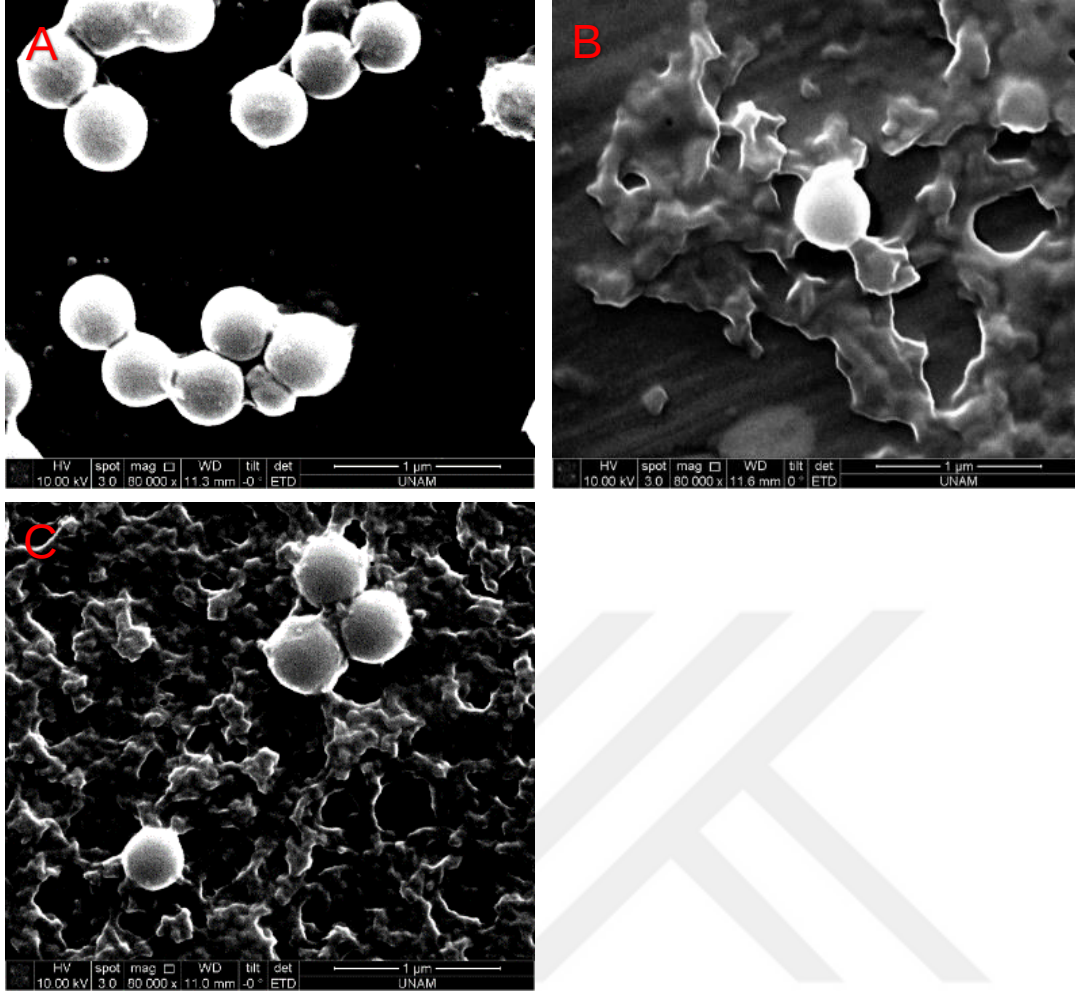
4.2.3. NPS-450 ve Gıda Matrisi Etkileşimi

Gıda matrisiyle etkileşimden önce ve sonra NPS-450'ye ait TEM görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir. Buradaki TEM görüntülerinde partiküller, bağlanan protein ve partikül üzerinde oluşan korona yapısı görülmektedir. Şekil 4.13-B'de okla gösterilen bulanık yapı partikülün korona yapısıdır. Protein, yine partikülün çevresini tümüyle sarmadan belirli bölgelerden daha fazla bağlanarak korona yapısını oluşturmuştur. Şekil 4.13-C'deki görüntü ise NPS-450'nin tek bir partikülün yakından görüntüsüdür. Burada da yine partiküle belli yerlerinden bağlanan ve çevresini saran bulanık protein korona yapısı çok daha iyi görülmektedir. Gıda matrisi öncesi ve sonrası görüntülerdeki partikül çapları ImageJ yazılımı ile analiz edildiğinde; gıda matrisi yokken çapların ortalaması 439.35 ± 56.4 nm, gıda matrisi ile etkileşimden sonra ise 443.04 ± 44.54 nm olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar gıda matrisi ile etkileşimden önce 7 görüntü ve 50 partikül, gıda matrisiyle etkileşimden sonra 6 görüntü ve 31 partikül üzerinden yapılmıştır. Burada görülen boyut artışı, diğer partiküllere kıyasla daha az gerçekleşmiştir.



Şekil 4. 13. NPS-450'nin yağlı sütle inkübasyondan önce(A) ve sonraki (B,C) TEM görüntüleri.

Şekil 4.14'te sırasıyla NPS-450'nin yağlı ve yağsız sütle etkileşimi sonucu elde edilen görüntüleri, gıda matrisiyle etkileşimden önceki görüntülerle karşılaştırılarak paylaşılmıştır. Çözelti içinde partiküllerin kısmen agregasyon eğiliminde olma durumu gıda matrisi eklendikten sonra da aynı kalmıştır.



Şekil 4. 14. NPS-450'nin yağlı ve yağsız sütle inkübasyondan önce ve sonraki ESEM görüntüleri. A) NPS-450 B) NPS-450+yağlı süt C) NPS-450+yağsız süt

NPS-450'ye ait hidrodinamik çap ölçümleri, sırasıyla yağlı ve yağsız süt ortamlarıyla birlikte Çizelge 4.6 ve 4.7'de paylaşılmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonda 2042.0 ± 445.70 nm ölçülen ortalama çap, yağlı ve yağsız sütle hazırlanan gıda matrislerinde sırasıyla 2267.0 ± 355.40 ve 2344.0 ± 152.50 nm çıkmıştır. Farklı ortamlar arasında çaptaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar ESEM görüntülerindeki agregasyon durumunu doğrulamaktadır. Hidrodinamik çap ölçümleri, partikül agregatlarının çapı olarak ölçüldüğünden korona yapısının çapı ne kadar artırdığı DLS ölçümlerinden net olarak anlaşılamamaktadır. Ancak TEM görüntülerinde partikülün etrafındaki korona yapısı ve ESEM ile de çözelti özellikleri çok rahat izlenebilmektedir.

Çizelge 4.5 ve 4.6’da aynı zamanda NPS-450’ye ait zeta potansiyellerindeki değişimler de paylaşılmıştır. Yağlı ve yağsız süt ortamlarının arasındaki farklar incelendiğinde burada farklı olarak her iki ortamdaki değerler birbirine yakın çıkmıştır. Partikül boyutunun artmasıyla, sütün partikül üzerindeki etkisinin azaldığına bir kanıt olarak ortamlar arasında fark görülmemesidir. PDI değerlerine bakıldığında genel olarak sonuçların 0.3’ün üzerinde bulunması farklı ortamlardaki agregasyon oluşumunu düşündürmektedir.

Çizelge 4. 6. Yağlı süttten (YS) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-450’ye ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ζ ap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-450 (1 mg/mL)	-52.5±1.10	0.476	2042.0±445.70 ^a
YS	-31.9±0.70	0.154	299.0±15.40
YS + NPS (1 mg/mL)	-38.5±1.10	0.449	2267.0±355.40 ^a

Çizelge 4. 7. Yağsız süttten (Y’S) (1/45) elde edilen gıda matrisi ile inkübe edilmiş NPS-450’ye ait ζ -potansiyeli ve hidrodinamik ζ ap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-450 (1 mg/mL)	-52.5±1.10	0.476	2042.0.0±445.70 ^a
Y’S	-26.3±0.99	0.076	209.2±6.49
Y’S + NPS (1 mg/mL)	-42.2±1.40	0.314	2344.0±152.50 ^a

NPS’lerin karakterizasyon sonuçlarına genel olarak bakıldığında TEM görüntülerinde süt proteinlerine bağlanma ile gözlenen korona yapısı, görüntülerin ImageJ yazılımı aracılığıyla ölçülmesi sonucu görülen ζ ap değişimi ile doğrulanmaktadır. NPS-30 ve NPS-100 partiküllerindeki dispers halde bulunma durumu, gıda matrisi ortamında da bu durumun korunmasıyla devam etmiştir. NPS-450’de ise gıda matrisine alınmadan önce gözlenen kısmi agregasyonla bu durum değişmemiş ve süt ortamlarında yine kısmen agregat oluşumu gözlenmiştir. ESEM görüntüleri NPS’e bağlanan protein miktarı hakkında nicel bir bilgi sağlamamakta, çözelti morfolojisi ve agregasyon-dispersiyon davranışı hakkında yorum sunmaktadır. Bu görüntülerle partiküller arası ve NPS-gıda

matrisi arası etkileşimler genel hatlarıyla görünmektedir. Gıda matrisi-NPS arasındaki etkileşim ve NPS morfolojisinin detaylı görüntüsü ise TEM analizleriyle yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar da partiküllerin gıda matrisi bileşenleriyle etkileşime girdiğini göstermektedir. Yağlı ve yağsız sütün bulunduğu gıda matrisleri arasındaki farka bakılmış, fakat NPS'ler ve gıda matrisi arasında farklı bir etkileşim ve toplanma durumu görülmemiştir. Buradan da gıda matrisinin içerdiği yağın agregasyona etkisinin olmadığı sonucuna varılmaktadır. Ayrıca görüntülerde genel olarak çap küçüldükçe partikülü görüntüleyebilmek zorlaşmaktadır.

Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7'de NPS-30, NPS-100 ve NPS-450'nin yağlı ve yağsız gıda matrisi ortamına alınmadan önce ve alındıktan sonra ölçülen hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri verilmiştir. Buradaki sonuçlara genel olarak bakıldığında daha önce ESEM görüntülerinde elde edilen sonuçlarla paralel olduğu gözlenmiştir. NPS-30 ve 100 kendi çaplarında ölçülmüş ve görüntülerde de agregasyon durumuna rastlanmamıştır. NPS-450 ise görüntülerdeki agregasyon durumu ile paralel olarak çapı kendi çapından daha fazla ölçülmüştür. Görüntülerdeki agregatların çapları ImageJ yazılımı ile ölçüldüğünde de 1684.67 ± 556.42 nm olduğu görülmüştür. Bu da DLS ölçümlerinde agregatların ölçülmesi durumunu doğrulamaktadır. Gıda matrisi ortamlarına girdiğinde ise NPS-30'da çap artışı gözlenmiştir. Burada NPS-30'un heterojen gıda matrisi ortamında ölçülmesindeki zorluk sebebiyle yalnızca elektron mikroskoplarındaki görüntüler değil, hidrodinamik çap ölçümleri de yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca süt partiküllerinin büyüklüğü, 30 nm gibi küçük partikül boyutunda ölçümde süt partiküllerinin sterik etkiyle baskın gelmesine ve okumada süt bileşenlerinin görünerek yanıltıcı sonuçlar vermesine yol açabilir. NPS-100'deki değişime bakıldığında ise çapta gıda matrisi ortamlarına girdikten sonra bir miktar değişim olduğu görülmüş fakat burada da sütün heterojen ortamının yanıltıcı sonuçlar verebileceği düşünülmüştür. Son olarak NPS-450'deki değişime bakıldığında agregasyon durumunun gıda matrisi ortamlarında değişmediği görülmüştür. NPS-450'nin PDI değerinin 0.3 ve üzerinde çıkması da bu ortamlarda agregasyon oluştuğunu kanıtlar niteliktedir [119].

NPS'ler sindirimden önce dispers yapı göstermiştir. Mikro boyutta yapılan bazı çalışmalar da partiküllerin çoğunlukla dispers yapıda olduğunu doğrular niteliktedir [122]. Bununla birlikte çap küçüldükçe dispersiyon ve çözelti kararlılığı artmaktadır ve bu durum ESEM görüntülerinde görüldüğü gibi hidrodinamik çaplarının ölçümleriyle de doğrulanmıştır. Oluşan protein tabakasının üstünde lipit tabakası da bağlanarak korona yapısı oluşturabilmektedir. Özellikle lipitlere özgü fosfat gibi grupların olduğu bölgelere lipitler bağlanabilmektedir [123]

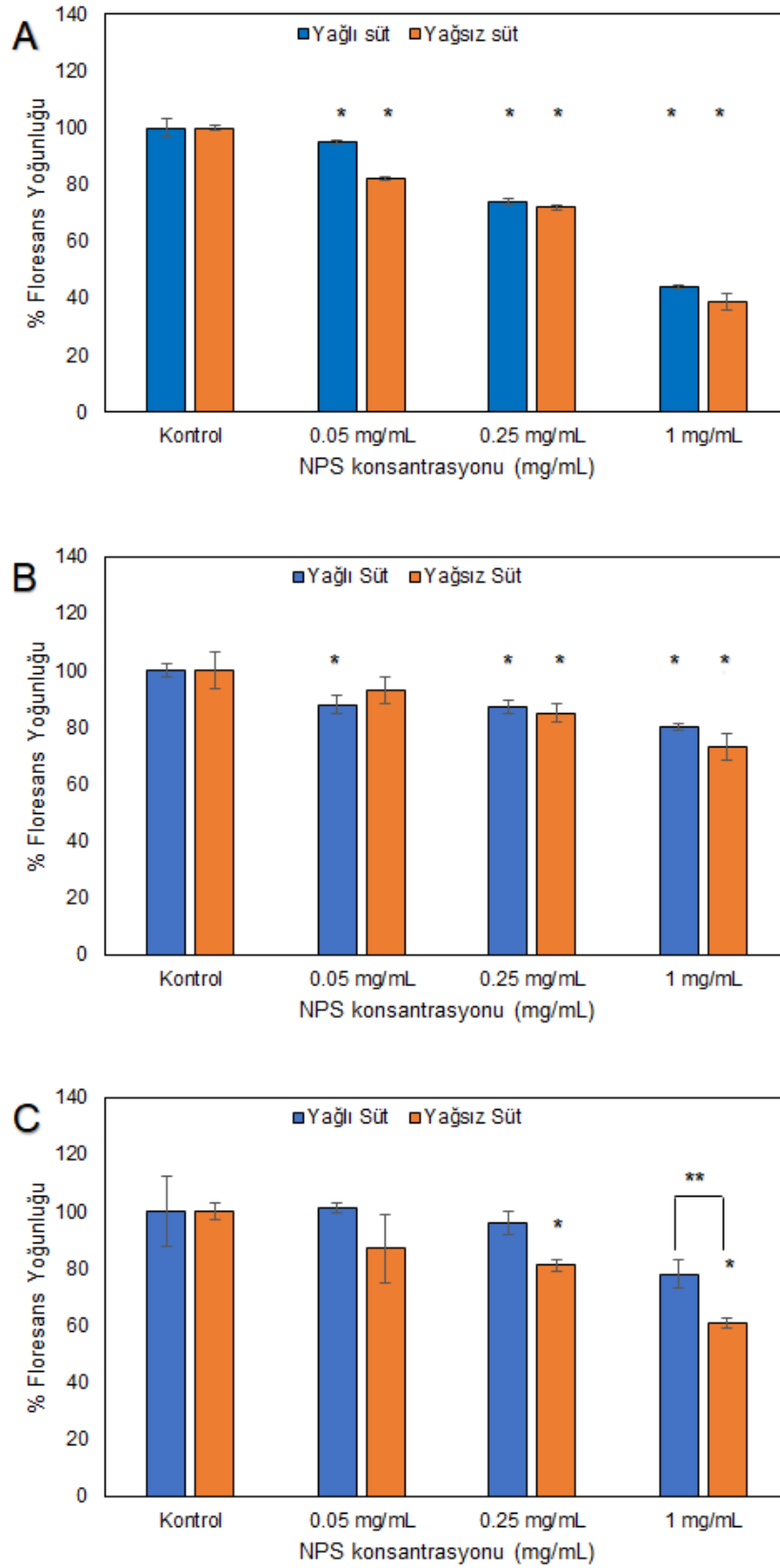
NPS-30, NPS-100 ve NPS-450'nin yüzey yükleri tampon ortamında sırasıyla -35.4 ± 4.6 , -51.2 ± 1.1 ve -52.5 ± 1.1 iken, gıda matrisi ortamına girdiklerinde sütün yüzey yüküne yaklaşmışlardır. Bu durum NPS'lerin gıda matrisinin karakteristik özelliklerini çok az etkileyebildiğini göstermiştir. Yüzey yüklerine bakıldığında bütün partiküller gıda matrisiyle etkileşimden önce mutlak 30 değerinden büyük çıkmış, yani elektrostatik olarak stabil bölgede kalmıştır [118,119].

4.3. Protein Koronanın Nitel ve Nicel Analizi

NPS'lere bağlanan proteinlerin nicel ve nitel ölçümleri için analizler floresans cihazında ve elektroforez ile yapılmıştır. Süt örneklerine NPS'ler ilave edildikten sonra protein sönümlene oranları Şekil 4.15'te paylaşılmıştır. NPS'lere bağlanan protein yapıları için sindirim öncesinde Native-PAGE elektroforez uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da paylaşılmıştır.

4.3.1 Protein Sönümlendirme Oranları

NPS'lerin yüksek stabiliteleri nedeni ile analizler in-situ olarak gerçekleştirilmiştir. NPS'lerin yüzeyinde gözlenen protein korona yapısının, nicel olarak belirlenebilmesi amacıyla protein sönümlenmesi analizi gerçekleştirilmiştir. Floresan spektroskopisi, triptofanın ~ 340 nm'de söndürülmesini izleyerek bağlanan protein miktarı hakkında kantitatif bilgi vermektedir. Bu floresanstaki azalma proteinlerin NPS'lere bağlandığına işaret etmektedir. [106].



Şekil 4. 15. NPS'lerin % floresans yoğunluklarındaki değişimler. A) NPS-30 B) NPS-100 C) NPS-450.

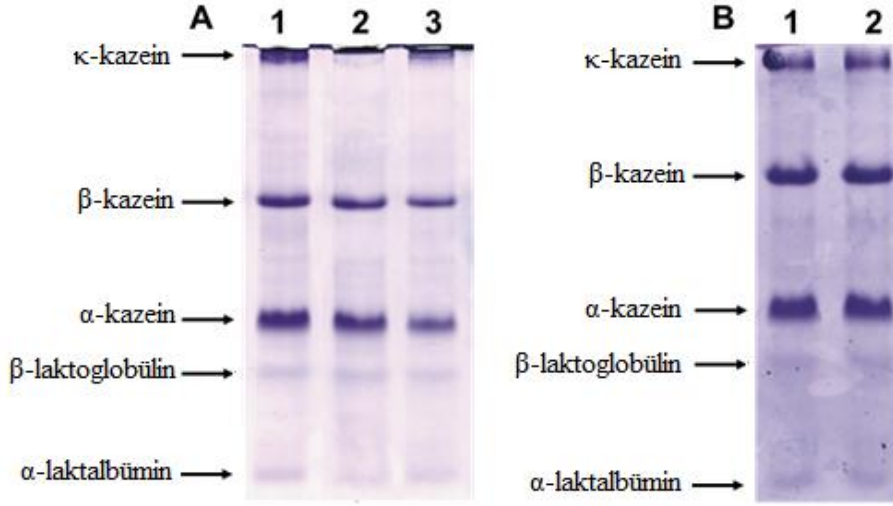
Floresans yoğunluklarında meydana gelen değişimler NPS ve gıda matrisinde bulunan süt proteinleri arasındaki etkileşimlerin, proteinlerin NPS'lere bağlanması sonucu serbest protein miktarındaki azalma ve bağlanan proteinin artması sonucu ile oluşmaktadır. Burada kontrol olarak NPS eklenmemiş örnekler kullanılmış ve süt örneklerindeki floresans azalması kontrollerin yüzdesi olarak verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi, NPS konsantrasyonu arttıkça protein söndürme oranı artmaktadır, yani bu da partikül konsantrasyonunun artmasıyla daha fazla proteinin bağlandığını göstermektedir. Yağlı ve yağsız gıda matrisleri arasında floresans yoğunluklarında NPS-30 ve NPS-100'de istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmezken, NPS-450'de bu fark anlamlı bulunmuştur. Genel olarak her üç çapta da, proteinlerin bağlanması yağsız sütte yağlı süte göre çok daha fazla olmuştur. Ortama bağlı bu değişim tamamen yağ içeriği ile açıklanabilir. Ortamda yağ bulunması ile protein korona yapılarının değişebileceğine dair kanıtlar literatürde de mevcuttur [124].

Partikül boyutu açısından değerlendirildiğinde, NPS-30'daki bağlanmanın daha yüksek olması yüzey alanının artmasından kaynaklandığı kabul edilebilir. NPS boyutunun küçülmesiyle proteinin bağlanacağı yüzey alanının daha fazla olduğu daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir [104,125,126]. NPS-30'un yüzey/hacim oranı diğer NPS'lere kıyasla daha fazla olduğu için, bu bilgiler doğrultusunda daha fazla protein bağlaması beklenen bir durumdur.

4.3.2. Native-PAGE Elektroforez

Gıda matrisi ile inkübe edilen NPS'lerin sindirim öncesi protein korona yapısının belirlenmesi amacı ile elektroforez analizleri yürütülmüştür. Bu çalışma sadece yağlı süt gıda matrisi, üç farklı NPS ile tek konsantrasyonda (1 mg/mL) gerçekleştirilmiştir. NPS'lerin gıda matrisi içerisinde dispers kalması sebebiyle ex-situ analiz gerçekleştirilemeyeceği için elektroforez çalışmaları da in-situ olarak yapılmıştır. Bu amaçla, native poliakrilamid jel elektroforez (Native-PAGE) yöntemi [127] uygulanmıştır. Bu yöntemde, NPS'lere bağlanan proteinlerin bant uzaklıklarında değişim görülmesi veya NPS'e bağlanan proteinlerin jelde yürümemesi sonucu bant yoğunluklarında değişim görülmesi ile bağlanma yorumlanabilmektedir [128,129]. Literatürde farklı tür nanopartikül ile yapılan çalışmada (13 nm altın nanopartikülü)

nanopartiküle bağlanan proteinlerin jelde yürümediği, yalnızca bağlı olmayan proteinlerin yürüyerek bant yoğunluğunda kontrole göre azalış gösterdiği rapor edilmiştir [128].



Şekil 4. 16. NPS-30, NPS-100 ve NPS-450'nin gıda matrisi ile etkileşimi sonucu elde edilen Native-PAGE görüntüleri. A jeli: 1) Yağlı süt, 2) Yağlı süt+NPS-30, 3) Yağlı süt+NPS-100; B jeli: 1) Yağlı süt, 2) Yağlı süt+NPS-450

Gıda matrisi ile inkübe edilen NPS'lerin Şekil 4.16'daki Native-PAGE jel görüntüleri incelendiğinde bant yoğunluklarında değişimler görülmüştür ve proteinlerin NPS-30 ve 100'e bağlanması sonucu protein yoğunluğunda azalma olduğu söylenebilir. NPS-30'da α- ve β-kazein bant yoğunluklarında hafif bir azalış görülürken κ-kazein bandının yoğunluğu belirgin bir biçimde azalmıştır. Kazein misellerinin NPS-30'a daha fazla bağlandığı, özellikle miselin dışında yer alan ve daha hidrofilik özellikte olan k-kazeinin daha fazla bağlandığı düşünülmektedir [130]. NPS-100'de ise kazeine ait tüm bantların yoğunluklarında azalış olduğu görülmektedir. Bu durum, farklı çaplardaki NPS'lerin gıda matrisi ile farklı şekilde etkileşime girdiklerini ortaya koymaktadır [131]. NPS-450'de ise süt ile karşılaştırıldığında bant yoğunluklarında gözle görülür bir değişiklik saptanmamıştır. Çap büyüdükçe NPS'lerin daha az miktarda proteinle etkileşmesi protein sönümlendirme çalışmasından elde edilen sonuçlarla da uyumludur.

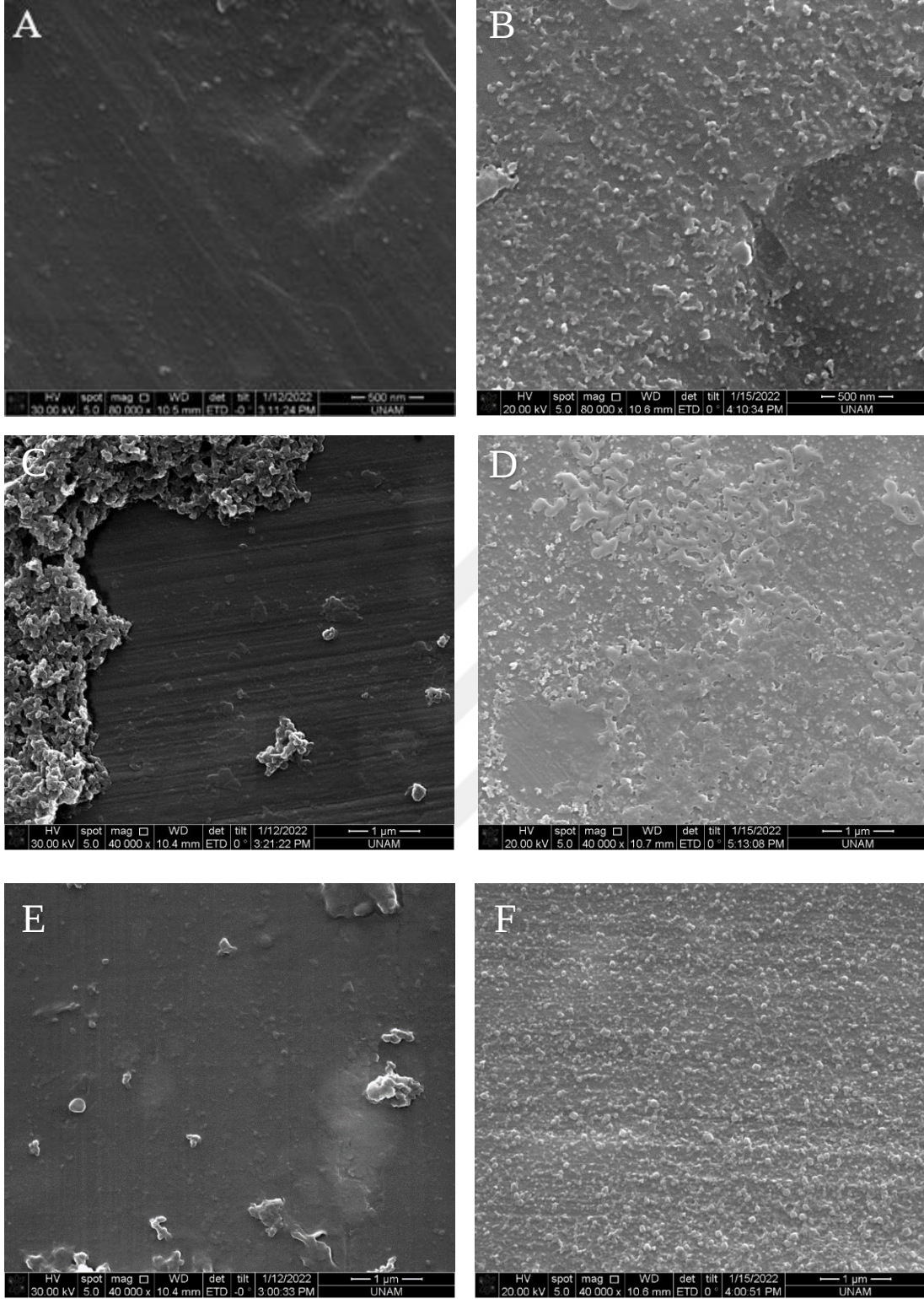
4.4. Sindirimden Sonra NPS Karakterizasyonu

Ağız, mide ve bağırsak ortamlarını simüle eden bir sindirim modeli kullanılmıştır. Bu sistemde ağızda amilaz, midede pepsin, bağırsakta lipaz ve pankreatin enzimleri ve çeşitli inorganik bileşenler kullanılmıştır. NPS'lerin sindirim ortamıyla etkileşimden sonra TEM ya da ESEM görüntü analizi yapılabilmesi için yoğun iyon içeren sistemden çöktürülerek ayrılması gerekir.

4.4.1. NPS-30'un Sindirim Sonrası Karakterizasyonu

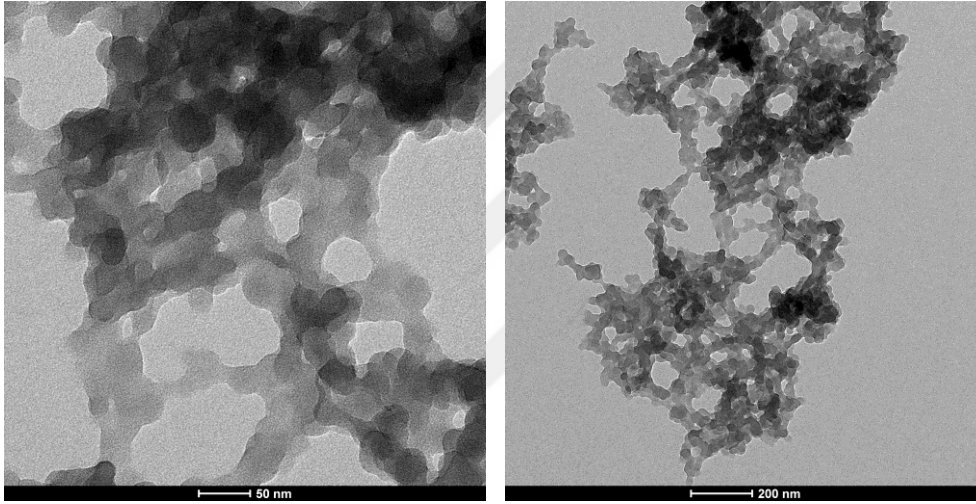
Karakterizasyon için sindirimden önce olduğu gibi sindirimden sonra da partiküllerde TEM, ESEM görüntüleri alınmış ve hidrodinamik çap ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17'de NPS-30'a ait ağız, mide ve bağırsak sindirim ortamlarından alınan örneklerin ESEM görüntüleri paylaşılmıştır. Sindirim öncesi olduğu gibi, sindirimden sonraki görüntülerde de NPS-30'u görüntülemek küçük çapı sebebiyle zor olmuştur. Şekilde 4.17-A'da partikülün yakından görüntüsü alınamamış, 4.17-B'de ise ortamdaki yoğunluğun çoğunlukla gıda matrisi kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Ağızda sütün çok az seyredildiği ve en çok protein kalıntısının burada olduğu düşünülürse, görülen protein yoğunluğu beklenen bir sonuçtur. Ortamlara göre görüntülere bakıldığında, en yoğun agregasyonun midede olduğu fakat gıda matrisi etkisiyle agregatların küçüldüğü gözlenmektedir (4.17-C-D). Şekil 4.17 E ve F'de ise çözeltide herhangi bir agregasyon yapısı gözlenmemiştir.

ESEM görüntülemeye NPS-30'da partikülün boyutuna bağlı olarak bağımsız yapılar çok rahat izlenememekle beraber, dispersiyon-agregasyon durumları gözlenmiştir. Özellikle midede oluşan ve gıda matrisiyle küçülen agregatlar net bir şekilde izlenmiştir. Gıda matrisi ile etkileşimden sonraki görüntülerde sindirimden sonra ağızdan bağırsağa geçildikçe proteinlerin azaldığı da gözlenmiştir. Bağırsakta protein kalıntıları olmakla birlikte proteinin partiküle bağlandığı TEM görüntülerinden daha iyi anlaşılmaktadır.

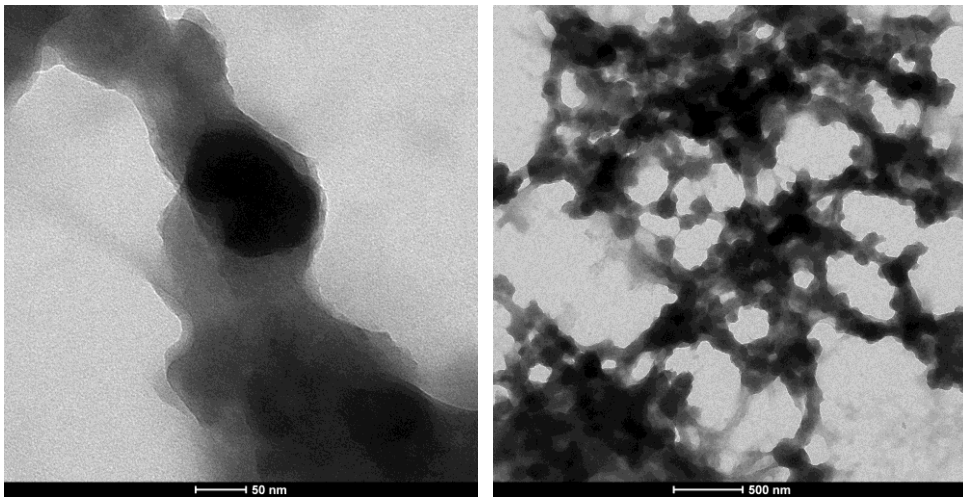


Şekil 4. 17. NPS-30'un sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri. A) ağız ortamı (NPS) B) ağız ortamı (gıda matrisi+NPS) C) mide ortamı (NPS) D) mide ortamı (gıda matrisi+NPS) E) bağırsak ortamı (NPS) F) bağırsak ortamı (gıda matrisi+NPS)

Şekil 4.18’de NPS-30’un bağırsak modelindeki TEM görüntülerine yer verilmiştir. Şekil 4.19’da ise gıda matrisi (yağlı süt) içindeki NPS’lerin sindirim sonrası bağırsak ortamındaki TEM görüntülerine yer verilmiştir. Partiküllerin sindirimden önceki bağımsız yapılarının (Şekil 4.1) sindirimden sonra bozulduğu (Şekil 4.18), NPS’lerin agrege olduğu ve ağsı bir yapı oluşturduğu gözlenmektedir. NPS’lerin gıda matrisiyle birlikte sindirime sokulmasıyla bu ağsı yapı fazlasıyla artmaktadır (Şekil 4.19), bu da sindirimden sonra bile hala partiküle bağlı protein kalabileceği anlamını taşımaktadır. Ağsı yapının ağızda 6.5 ± 0.1 , midede 1.4 ± 0.1 , bağırsakta 8.1 ± 0.1 olarak değişen pH koşullarından ve yoğun tuz konsantrasyonundan etkilendiği düşünülmektedir.



Şekil 4. 18. NPS-30’un sindirim sonrası TEM görüntüleri.



Şekil 4. 19. NPS-30’un gıda matrisi ile sindirim sonrası TEM görüntüleri.

ESEM görüntüleri ile elde edilen agregasyonlar hidrodinamik çap ve zeta-potansiyeli ölçümleriyle de doğrulanmıştır. Burada da partiküllerde düşük konsantrasyonlarda anlamlı sonuçlar alınamadığı için yüksek konsantrasyon (1 mg/mL) NPS'ye ait sonuçlar paylaşılmıştır. NPS-30'a ait hidrodinamik çap değişimleri ve zeta potansiyellerindeki değişimler Çizelge 4.8'de paylaşılmıştır. Buradaki değişimler incelendiğinde, gıda matrisi eklendiğinde ağızdaki partiküllerin çap değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmektedir. Burada protein kalıntısının en yüksek olduğu düşünülürse, proteinlerin partiküle bağlı protein anlamına gelmediği ve ölçümlerde serbest proteinlerin de yanıltıcı sonuçlara yol açabileceği bilinmektedir.

Midede ise gıda matrisi eklendikten sonra partikül çapındaki değişim anlamlı bulunmamıştır. ESEM görüntülerinde de midede görülen agregat küçülmesi, ortalama hidrodinamik çaptaki azalmayla doğru orantılıdır. Bağırsakta ise gıda matrisi etkisiyle ortalama hidrodinamik çap değişimlerinde anlamlı fark gözlenmiştir. TEM'den elde edilen görüntülerde bağırsakta hala protein ya da yağ varlığı düşünülürse, gıda matrisi eklendikten sonra çapların artışı sindirim sonrasında partiküle bağlanan proteinlerin oluşturduğu korona yapısının korunduğunu ve büyüdüğünü göstermektedir.

NPS-30'a ait zeta potansiyellerindeki değişimler incelendiğinde, agregasyon görülen mide ortamındaki değerlerin, stabil olmayan -30;+30 aralığında kaldığı, ağız ve bağırsak ortamındaki değerlerin ise kararlı bölgede yer aldıkları görülmektedir. Bu da midedeki agregat oluşumunu desteklemektedir.

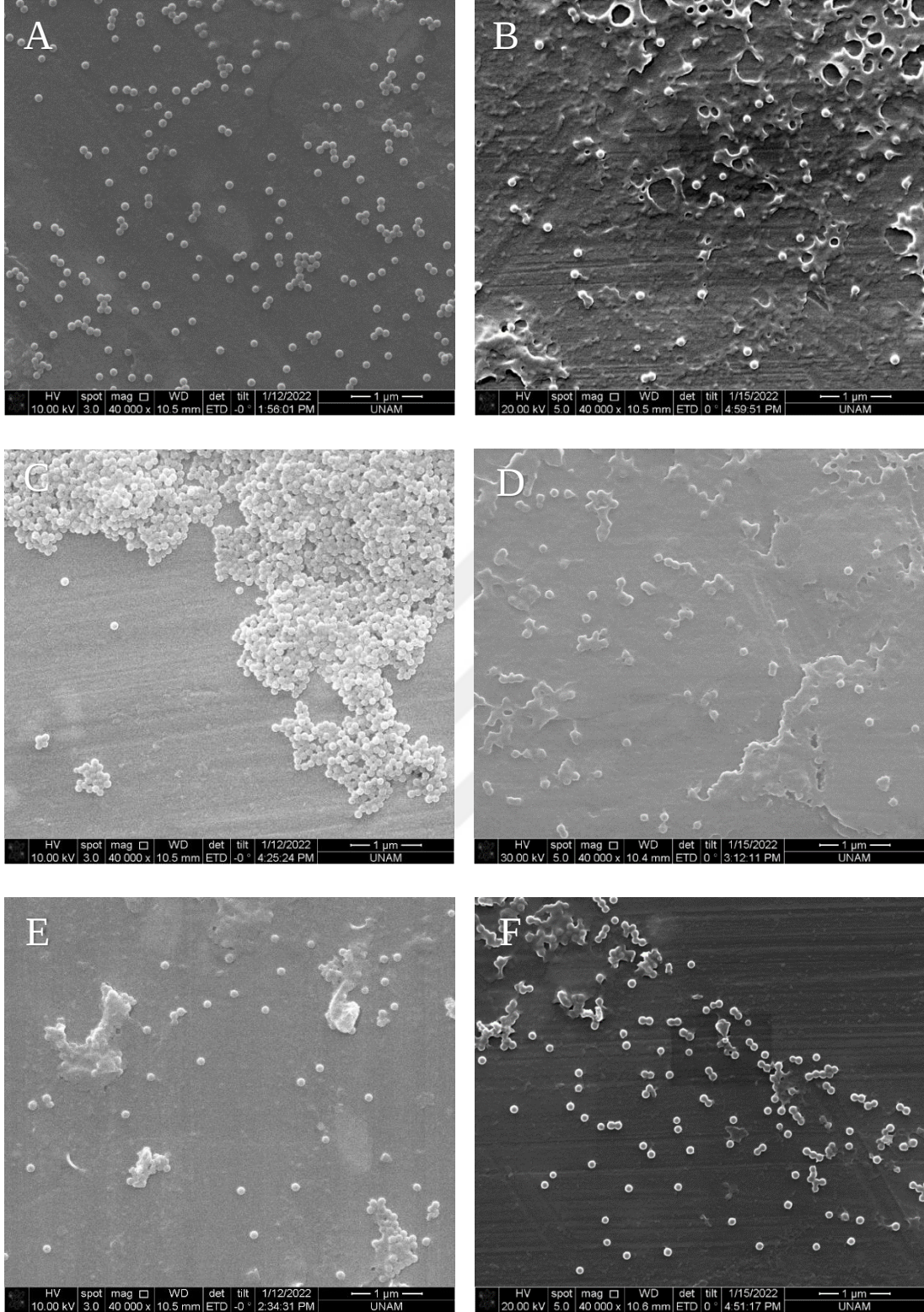
Çizelge 4. 8. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-30'un sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik χ ap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik χ ap (nm)
NPS-30 (Ağız)	-5.93±0.67	0.061	39.46±0.33 ^{a1}
Ağız Ortamı+Süt	9.73±0.59	0.281	2239.00±423.60
NPS-30+Süt (Ağız)	-27.30±1.01	0.377	375.70±15.70 ^{b1}
NPS-30 (Mide)	1.45±0.44	0.299	3506.00±295.60 ^{a2}
Mide Ortamı+Süt	6.45±1.06	0.126	1012.00±42.89
NPS-30+Süt (Mide)	4.80±0.70	0.702	3135.00±152.40 ^{a2}
NPS-30 (Bağırsak)	-34.20±4.12	0.406	75.15±1.49 ^{a3}
Bağırsak Ortamı+Süt	-33.80±3.03	0.229	294.40±16.63
NPS-30+Süt (Bağırsak)	-33.20±3.58	0.493	273.90±9.75 ^{b3}

Her bir kontrol grubundan istatistiksel olarak süt içermeyen ortamlara göre anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) “a ve b” ile belirtilmiştir. Her kontrol grubunun sonundaki sayılara göre kendi aralarında değerlendirilmiştir.

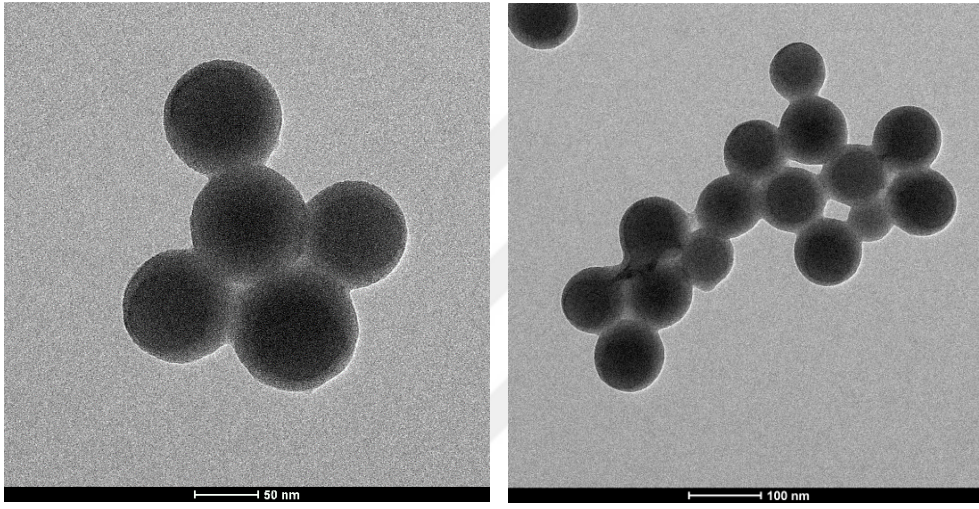
4.4.2. NPS-100'ün Sindirim Sonrası Karakterizasyonu

Farklı sindirim ortamlarından alınan NPS-100'e ait örneklerin ESEM görüntüleri Şekil 4.20'de paylaşılmıştır. Genel olarak ağızdan bağırsağı doğru azalan protein miktarına bağılı olarak Şekil 4.20-B-D-F'de görüntünün giderek netleştii söylenebilir. Şekil 4.230-C ve D'de midede gıda matrisiyle etkileşimden önce ve sonra agregasyon gözlenmiştir. Bu agregat oluşumunun mide pH'sından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarla da pH 3'ün altında polistiren partiküllerinin tek ve çift değerlikli anyon ve kanyonlar varlığında stabilitesini kaybederek agregatlar oluşturduğu kanıtlanmıştır [132]. Aynı şekilde kazein misellerinin en dışında bulunan κ -kazeinin normalde parçacıklar arası iyon köprülerine direnerek sterik stabilizasyon sağladığı fakat asitliğin artmasıyla miseller arası itmenin gerçekleşemeyerek kazein misellerinin toplandığı görülmüştür [134]. Buna rağmen BSA konsantrasyonunun artmasıyla iyon varlığında bile çözelti stabilitesi sağlanmış ve agregat küçülmesi gerçekleşmiştir [119]. Burada süt ilave edilen örneklerde kısmen agregatların parçaladığı görülürken, süt eklenmeyen örneklerde agregatlar kararlılığını sürdürmüştür. Süt proteinlerinin emülsifiye edici özelliğı etkisiyle midede agregat küçülmesi gerçekleşmiş olabilir. Büyüyen partikül χ apıyla genel olarak görüntüleme daha kolay olmuştur.

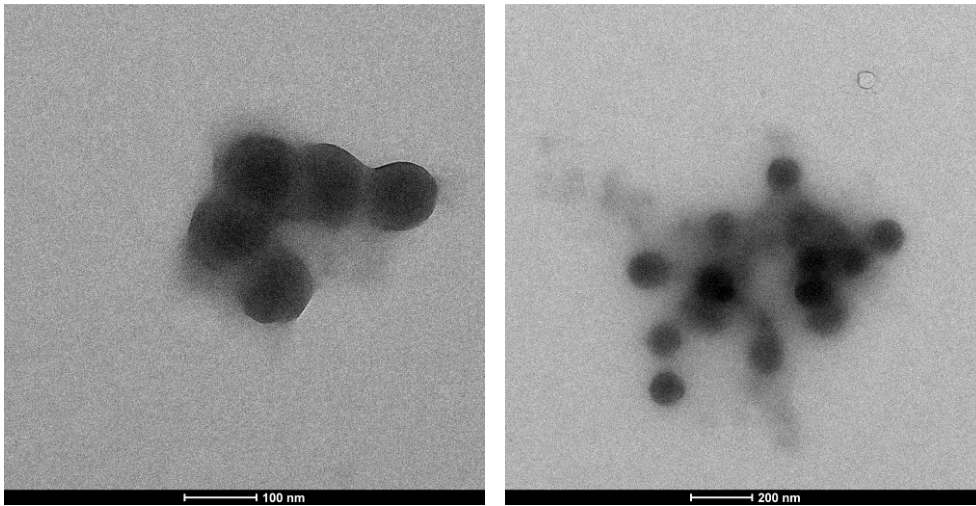


Şekil 4. 20. NPS-100'ün sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri. A) ağız ortamı (NPS) B) ağız ortamı (gıda matrisi+NPS) C) mide ortamı (NPS) D) mide ortamı (gıda matrisi+NPS) E) bağırsak ortamı (NPS) F) bağırsak ortamı (gıda matrisi+NPS)

Şekil 4.21 ve 4.22’de NPS-100’e ait sindirim sonrası TEM görüntüleri paylaşılmıştır. Partiküllerin bağırsak sindirim ortamındaki görüntülerinin (Şekil 4.21), saf su içindeki görüntüleriyle (Şekil 4.3) karşılaştırıldığında, agregasyon oluşturduğu gözlenmiştir. Bu da sindirim ortamındaki BSA proteinleri ile partikülün etkileşiminden kaynaklı olabileceği gibi, ortamdaki çift değerlikli iyonların, yük dengesini değiştirerek partiküllerin elektrostatik çekim kuvvetleriyle bir araya geldiği düşünülmektedir. Gıda matrisiyle sindirimden sonra (Şekil 4.22) korona yapıları devam etmekte olup görüntünün bulanıklaşması yoğun yağ ve protein varlığına bağlanabilir.



Şekil 4. 21. NPS-100’ün sindirim sonrası TEM görüntüleri.



Şekil 4. 22. NPS-100’ün gıda matrisi ile sindirim sonrası TEM görüntüleri.

Elde edilen görüntülerin doğrulanması amacıyla hidrodinamik çap ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.9’da paylaşılmıştır. NPS-100’ün hidrodinamik çap değişimleri incelendiğinde, gıda matrisi eklendiğinde ağızdaki çap değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ve sindirim sırasındaki ağızda kalan proteinlerin fazlalığı burada da ana etmendir. Midede ise hidrodinamik çap anlamlı olarak azalmış yani agregatlar küçülmüştür. ESEM görüntülerinde midede görülen agregat küçülmesi burada da ortalama çap küçülmesiyle belli olmaktadır. Bağırsakta gıda matrisi etkisiyle anlamlı fark gözlenmemiştir. TEM görüntülerinde de NPS-100 için bağırsaktan sonra protein korona katmanının yoğun olarak kalmadığı göz önüne alınırsa, bu aşamada anlamlı fark görülmemesi beklenen bir sonuçtur.

NPS-100’e ait zeta potansiyellerindeki değişimler incelendiğinde, agregasyon görülen mide ortamındaki değerlerin, stabil olmayan -30;+30 aralığında kaldığı, ağız ve bağırsak ortamındaki değerlerin ise bu bölge dışında veya sınırında kaldığı görülmektedir. Bu da kararsız olan bölgelerin yüzey yükünü doğrulayan bir durumdur.

Çizelge 4. 9. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-100’ün sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik çap değerleri.

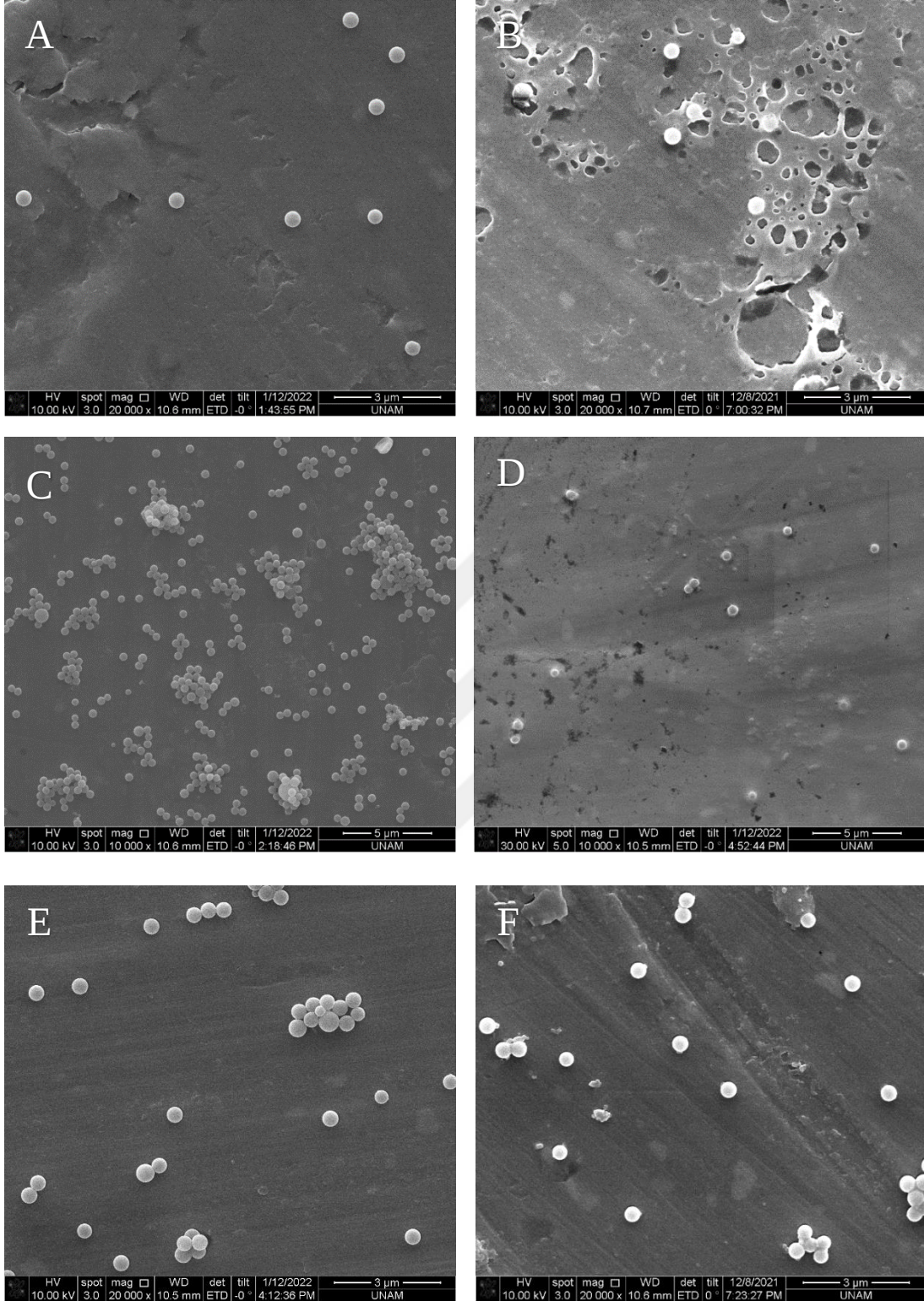
Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-100 (Ağız)	-29.7±24.8	0.039	121.9±2.412 ^{a1}
Ağız Ortamı+Süt	9.73±0.590	0.281	2239.0±423.6
NPS-100+Süt (Ağız)	-29.5±0.981	0.109	160.1±3.869 ^{b1}
NPS-100 (Mide)	15.7±1.11	0.208	1886±76.10 ^{a2}
Mide Ortamı+Süt	6.45±1.06	0.126	1012±42.89
NPS-100+Süt (Mide)	16.4±1.23	0.403	782.0±13.29 ^{b2}
NPS-100 (Bağırsak)	-30.3±3.01	0.096	175.3±3.3805 ^{a3}
Bağırsak Ortamı+Süt	-33.8±3.03	0.229	294.4±16.63
NPS-100+Süt (Bağırsak)	-32.5±3.89	0.174	199.1±12.59 ^{a3}

Farklar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi ile belirlendi. Her bir kontrol grubundan (ağız, mide ve bağırsak) istatistiksel olarak süt içermeyen ortamlara göre anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) “a ve b” ile belirtilmiştir. Her kontrol grubunun sonundaki sayılara göre kendi aralarında değerlendirilmiştir.

4.4.3. NPS-450'nin Sindirim Sonrası Karakterizasyonu

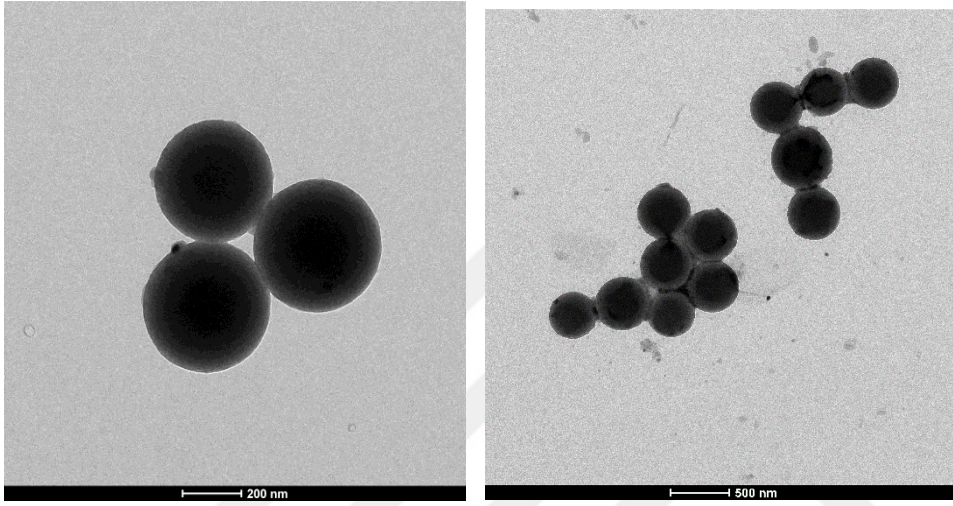
Şekil 4.23'te görülen ESEM sonuçları NPS-450'nin farklı sindirim ortamlarından alındıktan sonraki görüntüleridir. Sindirim öncesi görüntülerde olduğu gibi burada da NPS-450'yi görüntülemek diğer partiküllere kıyasla daha kolay olmuştur. Görüntüler ortamlara göre değerlendirildiğinde NPS'lerin gıda matrisi ile etkileşimden önce ağız ortamında çözelti içinde dispers halde bulunduğu görülmüştür. Bu dispersiyon midede bozulmuş ve agregasyon oluşmuştur. Bağırsakta ise tekrar bir dispersiyon söz konusudur. NPS'lerin gıda matrisi ile etkileşiminden sonraki sindirimi sonucu elde edilen görüntülere bakıldığında ağız ve bağırsakta bulunan dispersiyon devam etmiş, midede ise agregat küçülmesi olduğu görülmüştür.



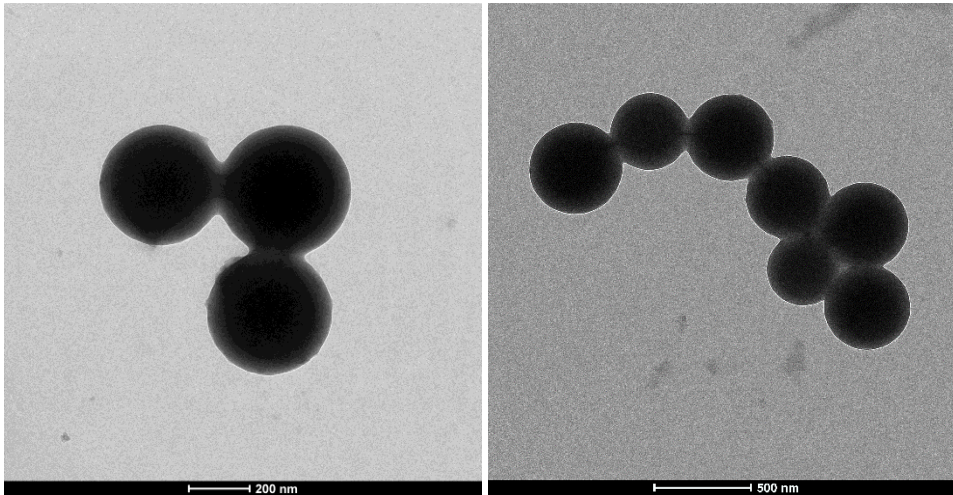


Şekil 4. 23. NPS-450'nin sindirim ortamındaki ESEM görüntüleri. A) ağız ortamı (NPS) B) ağız ortamı (gıda matrisi+NPS) C) mide ortamı (NPS) D) mide ortamı (gıda matrisi+NPS) E) bağırsak ortamı (NPS) F) bağırsak ortamı (gıda matrisi+NPS)

Şekil 4.24 ve 4.25'te NPS-450'ye ait sindirim sonrası TEM görüntüleri paylaşılmıştır. Partiküller, sindirim öncesinde olduğu durumunu burada da korumuştur. Sindirim öncesinde (Şekil 4.5) partiküllerin kısmen bir arada durma eğilimi gösterdiği bilinmekte ve bu durum Şekil 4.24'te de görülmektedir. Gıda matrisiyle sindirimden sonra (Şekil 4.25) korona yapıları devam etmekte olup görüntünün bulanıklaşması yoğun yağ ve protein varlığına bağlanabilir.



Şekil 4. 24. NPS-450'nin sindirim sonrası TEM görüntüleri.



Şekil 4. 25. NPS-450'nin gıda matrisi ile sindirim sonrası TEM görüntüleri.

Çizelge 4.10’da verilen NPS-450’nin hidrodinamik çap değişimleri incelendiğinde, ağızdaki çap değişimlerinin gıda matrisi eklendiğinde anlamlı fark içermediği görülmektedir. Ağızda kalan proteinin en fazla olduğu göz önünde bulundurulduğunda, NPS-30 ve 100’e kıyasla NPS-450’nin daha az protein bağladığı yorumu yapılabilir. Sindirim öncesi çalışmalarda da NPS-450’nin en az protein bağladığı ve anlamlı farklar içermediği görülmektedir. Midede ve bağırsakta ise anlamlı değişimler söz konusudur. Mide ve bağırsakta gıda matrisi eklenmesiyle agregat küçülmesi gözlenmektedir.

NPS-450’ye ait zeta potansiyellerindeki değişimler incelendiğinde, agregasyon görülen mide ortamındaki değerlerin, stabil olmayan -30;+30 aralığında kaldığı, ağız ve bağırsak ortamındaki değerlerin ise bu bölge dışında veya sınırında kaldığı görülmektedir. Bu da kararsız olan bölgelerin yüzey yükünü doğrulayan bir durumdur.

Çizelge 4. 10. Gıda matrisi ile inkübe edilen ve edilmeyen NPS-450’nin sindirim ortamlarında ζ -potansiyeli ve hidrodinamik çap değerleri.

Örnek	ζ -Potansiyeli (mV)	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)
NPS-450 (Ağız)	-55.1±2.46	0.074	521.9±33.85 ^{a1}
Ağız Ortamı+Süt	9.73±0.590	0.24	412.4±58.53
NPS-450+Süt (Ağız)	-17.0±0.265	0.1	519.2±34.64 ^{a1}
NPS-450 (Mide)	3.83±0.552	0.095	2296.0±87.07 ^{a2}
Mide Ortamı+Süt	6.45±1.06	0.126	1012±42.89
NPS-450+Süt (Mide)	6.63±0.419	0.16	891.0±89.56 ^{b2}
NPS-450 (Bağırsak)	-24.4±3.28	0.251	961.7±112.4 ^{a3}
Bağırsak Ortamı+Süt	-33.8±3.03	0.229	294.4±16.63
NPS-450+Süt (Bağırsak)	-25.5±2.11	0.333	453.5±47.66 ^{b3}

Farklar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi ile belirlendi. Her bir kontrol grubundan (ağız, mide ve bağırsak) istatistiksel olarak süt içermeyen ortamlara göre anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) “a ve b” ile belirtilmiştir. Her kontrol grubunun sonundaki sayılara göre kendi aralarında değerlendirilmiştir.

NPS-30, 100 ve 450’nin zeta potansiyellerine bakıldığında (Çizelge 4.8, 4.9, 4.10), ağız ve bağırsakta genellikle -30;+30 aralığı dışında olan elektrostatik olarak stabil bölgede ya da stabil bölgeye yakın sonuçlar alındığı, bunun aksine midede ise stabil olmayan bölgede

sonuçlar alındığı görülmektedir. Zeta potansiyeli değerleri partikül yüküne bağlı olmanın yanı sıra yüzey ve zlti arayüz etkileşimine de bağlı olmaktadır [31]. zltinin iyonik yükünün değişmesiyle birlikte stabilitenin değişmesi zeta potansiyelindeki değişime neden olmaktadır. İyonik yük ağızdan bağırsağa gidildikçe artsa da, midedeki düşük pH'ın etkisi zeta potansiyelindeki stabilitenin bozulmasında göz ardı edilememektedir. Zeta potansiyelinin pH ile olan ilişkisi, NPS'lerin yüzey gruplarının protonlanması/deprotonasyonu ile açıklanabilir [105]. Ortamda hem anyon hem de katyonların artması agregasyonu artırmakta, bu da zeta potansiyelinde kararsızlığa sebep olmaktadır. İyon varlığı da, özellikle pH düşmesiyle zlti kararlılığını olumsuz etkileyen bir durum oluşturmaktadır [132].

Literatürde yer alan çalışmalarda, NPS'lerin yüzey yükü zelliklerinin NPS boyutuna ve konsantrasyonuna bağlı olabileceği ortaya konulmuş; NPS'nin çok düşük konsantrasyonlarında, sinyal-gürültü oranının ciddi şekilde bozularak gürültülü ve tutarsız sonuçlar görülmesine neden olduğu açıklanmıştır [105]. Bu tez kapsamında da NPS ile sadece yüksek konsantrasyonda analize girildiğinde anlamlı sonuçlar alınabilirken, orta ve düşük konsantrasyonlarda çoğunlukla gürültülü ve anlamsız zeta potansiyeli ve hidrodinamik çap pikleri elde edilmiş, bazen de hiç pik alınamayarak sonuca ulaşılamamıştır. Ölçümlerde, konsantrasyon azaldıkça ölçümlerin doğruluğu azalmıştır. Yapılan seyreltmelerin artmasıyla NPS zeta potansiyellerinde kayma olduğu başka çalışmalarda da gösterilmiştir [135]. Konsantrasyon azalmasıyla azalan doğruluk, ortamlarda hiç NPS yokken, yani sadece iyonun ölçüldüğü ortamlarda zltilerin girişim yapmasıyla anlamsız sonuçlar alınmasına sebep olmuştur. Bu yüzden karşılaştırmalar sadece NPS ve gıda matrisi içeren ortamlar arasında yapılıp, ikisini de içermeyen ortam sonuçları dikkate alınmamıştır.

4.5. Sindirim Sonrası Oluşan Protein Korona Yapısının Elektroferez Analizi

NPS'lere bağlanan protein yapıları için sindirim sonrasında SDS-PAGE elektroferez uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.26'da paylaşılmıştır.

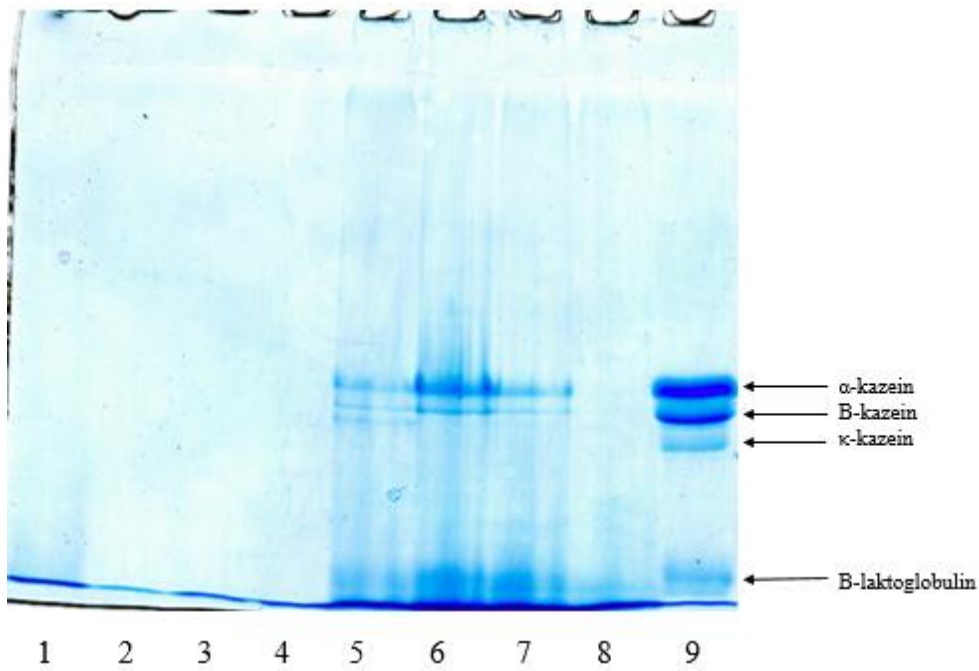
Sodyum dodesil sülfatla (SDS) negatif yüklenen proteinlerin elektroforezdeki hareketliliği, denatüre protein zincirlerinin kütle/yük oranı ile belirlenmektedir [129]. SDS-PAGE, Sodyum dodesil sülfat ve poliakrilamid jelin birlikte kullanımı, yapı ve yükün etkisini ortadan kaldırmaya izin vermekte ve proteinler yalnızca moleküler ağırlıklarındaki farklılıklar temelinde ayrılmaktadır. Jelin boyanmasıyla birlikte de bağlanan proteinler tanımlanabilmektedir.

Gıda matrisi ile inkübe edilen NPS'lerin sindirim sonrası protein korona yapısının belirlenmesi amacı ile elektroforez analizleri yürütülmüştür. Bu çalışma sadece yağlı süt gıda matrisi, üç farklı NPS ile tek konsantrasyonda (1 mg/mL) gerçekleştirilmiştir. Sindirim sonrasında NPS'lerin ex-situ çalışmasına olanak sağlayan santrifüj normunda (13000xg, 20 dakika) çöktüğü görülmüştür. Bunun nedeninin sindirim ortamındaki tuzların, özellikle Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi çift değerlikli iyonların etkisi olabileceği düşünülmüştür. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda da iyonların çöktürmede etkili olabileceği belirtilmektedir [132,133].

SDS-PAGE'den elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.26'da verilmektedir. 1 nolu sütunda NPS içermeyen, sindirim ortamı kontrol grubunu oluşturmaktadır. 2, 3 ve 4. sütunlar sırasıyla 30, 100 ve 450 nm çapındaki partikülleri sindirim ortamını temsil etmektedir. Şekildeki 1,2,3,4. sütunlarda bir bant yoğunluğu gözlenmemiştir. Sindirimden sonra NPS'lerin bağladığı protein miktarı, örnekler SDS-PAGE'e yüklenirken 500 kat deriştirildiği halde analizde tespit edilemeyecek kadar az bulunduğu için bir bant yoğunluğu elde edilememiştir. Daha önce ESEM ve TEM görüntülerinde az da olsa proteinin bağlandığı bir korona yapısı görülmüş olmakla birlikte elektroforezde tanımlanabilecek bir protein bant yoğunluğu tespit edilememiştir.

5 nolu kuyuya, gıda matrisinin sindirime uğradığı ve NPS içermeyen kontrol grubu yüklenmiştir. 6, 7 ve 8. kuyulara sırasıyla 30, 100 ve 450 nm çapındaki partiküllerin gıda matrisiyle inkübe edilip sindirildikten sonraki ortamı yüklenmiştir. 9 nolu kuyuda ise hiçbir işlem uygulanmamış yağlı süt bulunmaktadır. 5, 6, 7, 8 ve 9 aynı protein bantlarını vermiştir. Bu bantların süt proteinlerinden kaynakladığı kabul edilmektedir. Partikül

içermeyen kuyuyla (5), partikül içeren kuyular (6-7-8) karşılaştırıldığında, en yoğun bant NPS-30'un yer aldığı örnekte (6), en az yoğunluk ise NPS-450'nin olduğu örnekte saptanmıştır (8). Bu sonuçlar tezin tamamında protein korona yapısı için elde edilen tüm sonuçlarla uyumlu olup, NPS çapı küçüldükçe protein bağlama oranının arttığı gözlenmiştir. Sindirimden sonra (5) süt proteinlerinde bant yoğunlukları sindirimin etkisiyle azalmıştır. Ancak, tüm bantlarda bant yoğunluğu 30 ve 100 nm partikülleri ile önemli bir artışa uğramıştır. Bu da proteinin partiküller üzerinde bir korona yapısı oluşturduğunu bir kez daha doğrulamaktadır.



Şekil 4. 26. Sindirim Sonrası SDS-PAGE Jel Elektroforez Görüntüleri. 1) Sindirim Ortamı 2) Sindirim Ortamı+NPS-30 3) Sindirim Ortamı+NPS-100 4) Sindirim Ortamı+NPS-450 5) Sindirim Ortamı+Süt 6) Sindirim Ortamı+NPS-30+Süt 7) Sindirim Ortamı+NPS-100+Süt 8) Sindirim Ortamı+NPS-450+Süt 9) Süt

4.6. Sindirim Öncesi ve Sonrası Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

Sindirim ortamlarını temsilen ağız için amilaz, mide için pepsin, bağırsak için lipaz kullanılmıştır. NPS ve enzimlerin inkübasyona sokulacağı konsantrasyonlar sindirim simülasyonu modifiye edilerek ön denemelerle belirlenmiş ve bu konsantrasyonlara bağlı kalınmıştır. Sindirim ortamı etkisi olmadan serbest enzim aktivitelerine ve sindirim

ortamından çıkan örneklerin enzim aktivitelerine birlikte bakılmış, her enzime ait sonuçlar Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29’da paylaşılmıştır.

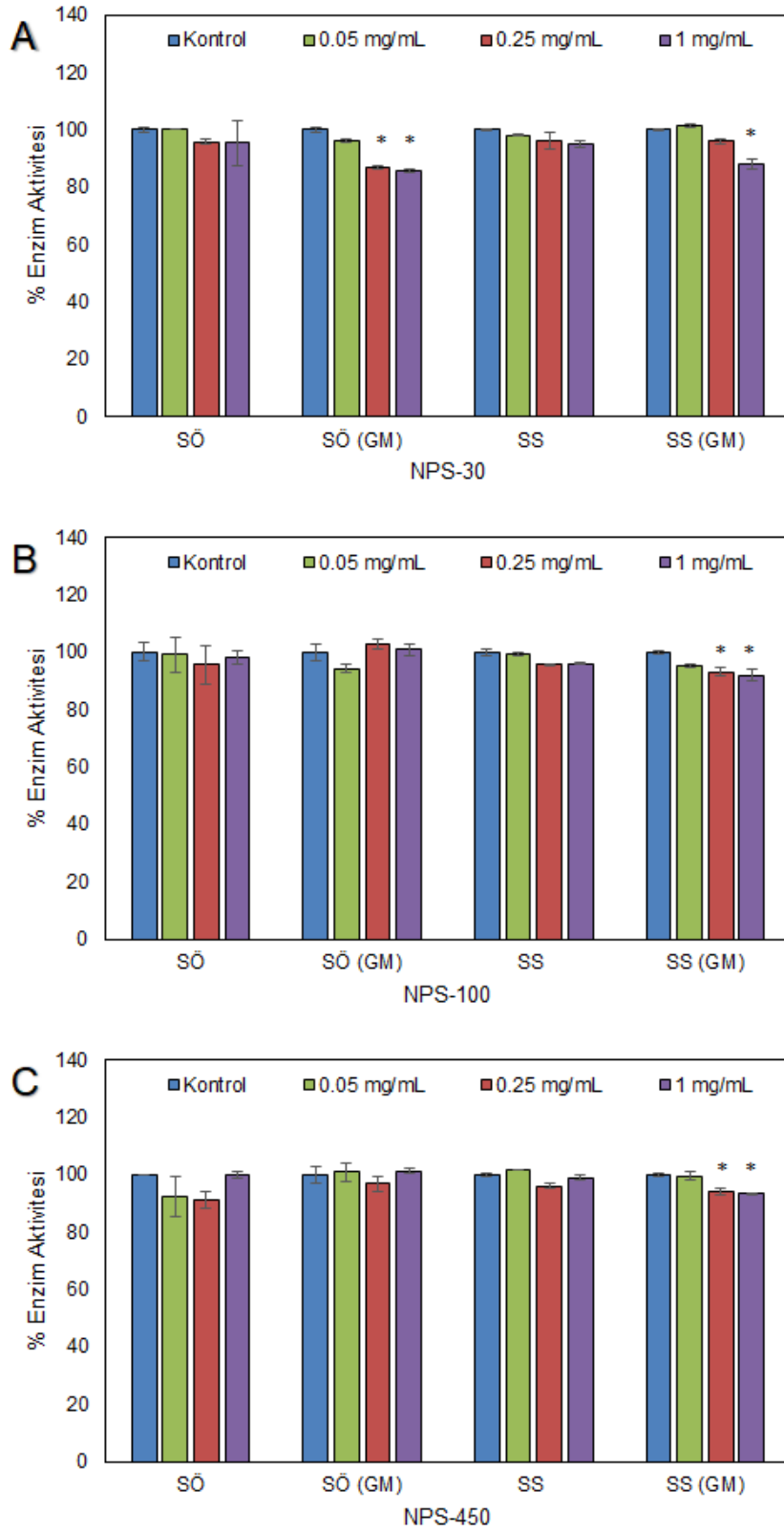
4.6.1. Amilaz Aktivitesi

NPS’lerin amilaz aktivitesi üzerindeki etkilerini daha net bir şekilde görebilmek için çalışmada sindirim simülasyonunda belirtilenden daha düşük enzim konsantrasyonu (2 µg/mL) çalışılmıştır. Şekil 4.27’de NPS’lerin amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri, NPS içermeyen kontrole göre % değişim olarak grafiğe geçirilmiştir. Amilaz aktivitesindeki genel değişime bakıldığında gıda matrisi ile sindirime uğramış ortamlarda inhibisyonun arttığı gözlenmiştir.

NPS-30’un orta ve yüksek konsantrasyonlarıyla (1 ve 0.25 mg/mL) hazırlanan gıda matrisinin (yağlı süt) sindirim öncesi ve sindirim sonrasındaki örneklerinde amilaz aktivitesindeki azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Burada sindirimden bağımsız olarak gıda matrisinin etkisinden söz etmek mümkündür.

NPS-100 ve NPS-450’nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gıda matrisi ile sindirime sokulan örneklerde amilaz aktivitesinde kontrole göre yine anlamlı bir azalma görülmüştür. Ancak bu azalma 30 nm çaplı örneklerde daha belirgindir. Çap büyüdükçe, partikülün enzim üzerindeki inhibisyon etkisinin azaldığı gözlenmiştir.

Amilaz enzim aktivitelerinden elde edilen sonuçlar, protein sönümlendirme deneyinden elde edilen verilerle ve hidrodinamik çap ölçümlerindeki değişimlerle uyumludur. NPS-30’un daha fazla protein bağlaması nedeniyle enzim aktivitesinde daha fazla azalma olması beklenen bir sonuçtur.

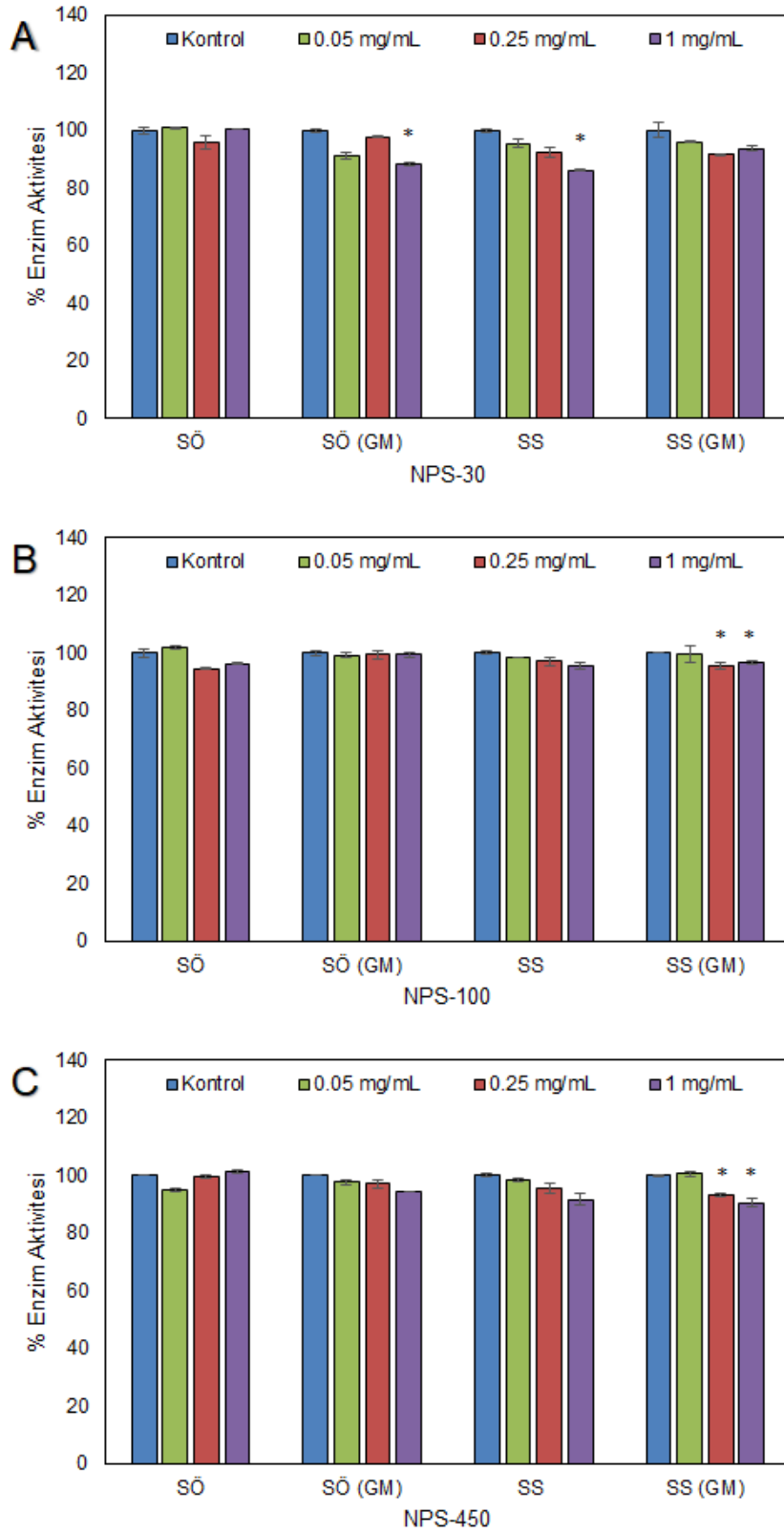


Şekil 4. 27. NPS'lerin α -amilaz aktivitesine etkisi. A) NPS-30 B) NPS-100 C) NPS-450 (SÖ:Sindirim öncesi, SS: Sindirim sonrası, GM: Gıda matrisi ile birlikte).

4.6.2. Pepsin Aktivitesi

Gıda matrisi (yağlı süt) ile inkübe edilmiş ve edilmemiş NPS'lerin pepsin aktivitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla en çok kullanılan ve standart bir prosedür olan Anson yöntemi kullanılmıştır [114]. Şekil 4.28'de NPS'lerin pepsin enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri, NPS içermeyen kontrole göre % değişim olarak grafiğe geçirilmiştir. NPS-30'un yüksek konsantrasyonuyla hazırlanan gıda matrisinin sindirim öncesi örneğinde ve tampon içinde hazırlanmış sindirim sonrası örnekte pepsin aktivitesindeki azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Diğer çaplarda da orta ve yüksek konsantrasyonlarda NPS'lerin gıda matrisi ile etkileşimden ve sindirimden sonra enzimin aktivitesi üzerine önemli bir etkisi gözlenmiştir. Bu durum, gıda matrisi ile etkileşim sonrasında NPS yüzeyinde oluşan korona yapısının pepsin aktivitesini etkilemediği, fakat sindirim ortamındaki korona yapısının etkilediği şeklinde yorumlanabilir.

NPS'lerin pepsin aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, partiküllerin enzim moleküllerine bağlandığı doğrulanmış, buna rağmen pepsin aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelmediği rapor edilmiştir [51]. Pepsin aktivitesi üzerine farklı nanoyapıların etkisinin araştırıldığı bazı çalışmalarda da enzimin ikincil yapısında değişim gözlenirse de aktivitenin değişmediği bildirilmiştir [136,137].



Şekil 4. 28. NPS'lerin pepsin aktivitesine etkisi. A) NPS-30 B) NPS-100 C) NPS-450 (SÖ:Sindirim öncesi, SS: Sindirim sonrası GM: Gıda matrisi ile birlikte).

4.6.3. Lipaz Aktivitesi

Şekil 4.29 A, B ve C’de NPS’lerin lipaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri, NPS içermeyen kontrole göre % değişim olarak grafiklerde verilmiştir. NPS’lerin amilaz ve pepsin aktivitesini önemli oranda azaltmazken lipaz aktivitesi üzerine önemli etkisi olduğu görülmektedir. Genel duruma bakıldığında NPS-450’nin bulunduğu örneklerdeki inhibisyon, NPS-30 ve 100’ü içeren örneklere oranla daha az olmuştur. NPS-450’nin daha az protein bağlaması ve korona yapısının daha az olması nedeniyle aktivitede önemli bir kayıp olmadığı düşünülmektedir.

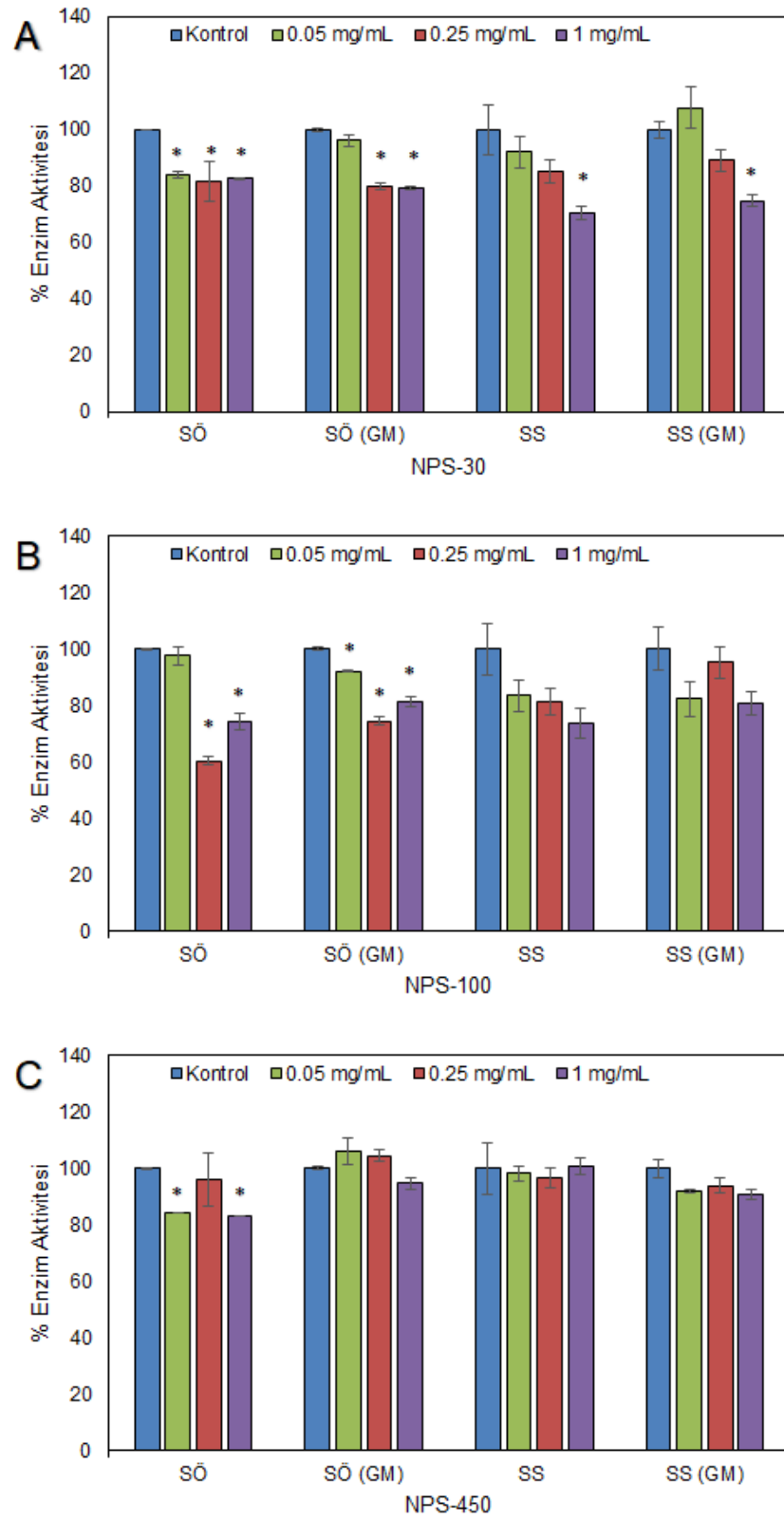
NPS-30 ve NPS-100’ün bulunduğu örneklerdeki aktivitelerde ise anlamlı değişimler meydana gelmiştir. NPS-30’un sindirim öncesi örneklerde, aktiviteye konsantrasyona bağlı bir etkisi olmamış, aktivite bütün konsantrasyonlarda %16-19 oranında azalmıştır. Ortama gıda matrisi girdiğinde ise orta ve yüksek konsantrasyonlarda aktivite %21 oranında azalmıştır. Sindirimden sonraki örneklerde ise ortamda gıda matrisi olduğunda ve olmadığında aktivitede konsantrasyona göre bir azalma gerçekleşmiştir. NPS-100’ün bulunduğu örneklerde yine konsantrasyona bağlı aktivite değişikliği görülmektedir. Genel olarak sindirimin aktivitede önemli etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Partikül çapı küçüldükçe enzimin daha fazla bağlanarak inhibisyonunun arttığı görülmüştür. Aynı şekilde çap küçüldükçe gıda matrisi ve sindirimin enzim aktivitesi üzerine gösterdiği etki de artmıştır.

Bu tez kapsamında elde edilen lipaz inhibisyonu, farklı biyolojik matrisler ve nano/mikro malzemelerle yapılan bir çalışmada doğrulanmıştır. Farklı plastik türleriyle çalışılan araştırmada en hidrofobik yapıdaki polistiren partikülün en yüksek lipaz inhibisyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Partikül boyutuna göre aktivitenin etkilenmediği ancak konsantrasyonun artmasıyla inhibisyonun önemli oranda arttığı bildirilmiştir [51]. Bu çalışmada ise partikül çapının inhibisyonu etkilediği belirlenmiş ve çapp büyüdükçe inhibisyon etkisi azalmıştır. Bu da NPS’lerde çapın artmasıyla daha az protein bağlanmasıyla ilişkilendirilebilir [104]. Tan ve ark. (2020)’nın yaptığı çalışmada polistirenlerin etrafında lipit agregatları oluştuğu ve bu agregatların da substratın yüzey alanını azaltarak enzimin bağlanmasını olumsuz yönde etkilediği rapor edilmektedir [51].

Bu tez kapsamında substrat incelenmediği için substratın enzim bağlanmasına etkisi hakkında yorum yapılamamaktadır.

Tan ve ark. (2020)'nın yaptığı çalışmada ayrıca polistiren partiküllerin çözelti içindeki pepsin ve lipaz konsantrasyonlarına etkileri de karşılaştırılmış ve sindirimden sonra pepsin aktivitesinde önemli bir azalma saptanmamışken, lipazda gözlenen değişim kayda değer bulunmuştur. Çözelti içindeki enzim aktivitesindeki azalma, partikül yüzeyine enzimin adsorplanmasıyla enzimin bağlanma noktalarının inaktive olması şeklinde yorumlanmıştır. Partikül yüzeyine adsorblanan lipaz bu şekilde lipit damlacıkları ile temas edememekte veya aktivitesini kaybetmektedir. Benzer şekilde partikül yüzeyine lipit damlacıklarının agregatlar oluşturarak adsorpsiyonu da sindirim yüzey alanını azalmaktadır. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri ortamdan uzaklaşamadıkça yenilerinin oluşması engellenmekte ve daha fazla sindirim ürünü oluşamamaktadır.

Düşük trofik seviyelerdeki canlıların NPS tüketiminden sonra enerji seviyelerine bakıldığında, lipit depolarının hızla azaldığı veya gıda tüketiminin arttığı görülmüştür [138,139]. Bu canlılarda, bağırsakta NPS'in neden olduğu lipit yıkımına karşın artan gıda tüketimiyle enerji alımı ayarlanmaktadır.



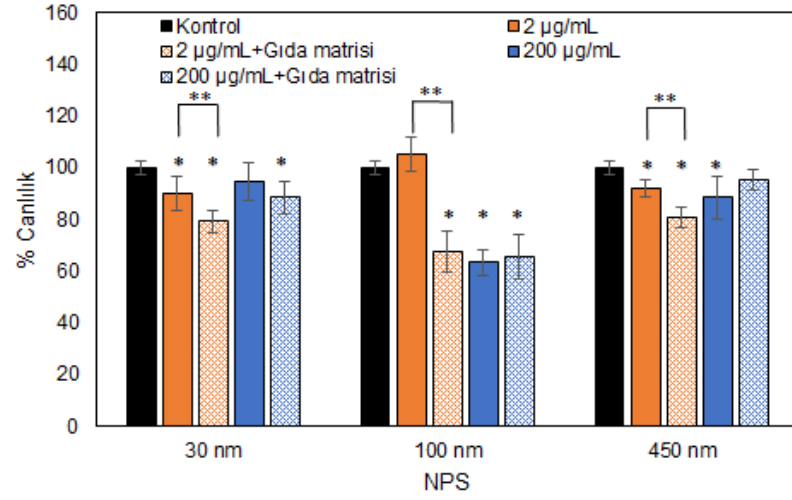
Şekil 4. 29. NPS'lerin lipaz aktivitesine etkisi. A) NPS-30 B) NPS-100 C) NPS-450 (SÖ:Sindirim öncesi, SS: Sindirim sonrası GM: Gıda matrisi ile birlikte).

4.7. Toksisite çalışmaları

Gıda matrisi ve gıda matrisi olmadan inkübe edilen örnekler, sindirim sonunda kolon epitel hücre hattı ile (Caco-2) muamele edilmiştir. Bunun için Caco-2 hücreleri her analizden önce pasajlanarak, hücrelerin çoğalması ve canlılıklarını kaybetmemeleri sağlanmıştır. Pasaj hücreleri olarak da adlandırılan alt kültürleme, besiyerinin çıkarılması ve hücrelerin önceki kültürden taze büyüme ortamına aktarılmasıdır; bu, hücre hattının veya hücre süşunun daha fazla yayılmasını sağlayan bir prosedürdür [140]. NPS'ler 2 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda kullanılmıştır. NPS'lerin sitotoksik etkisinin ölçülmesi için hücre canlılığı testi yapılmış ve hücrelerin ürettiği reaktif oksijen (ROS) ölçülmüştür.

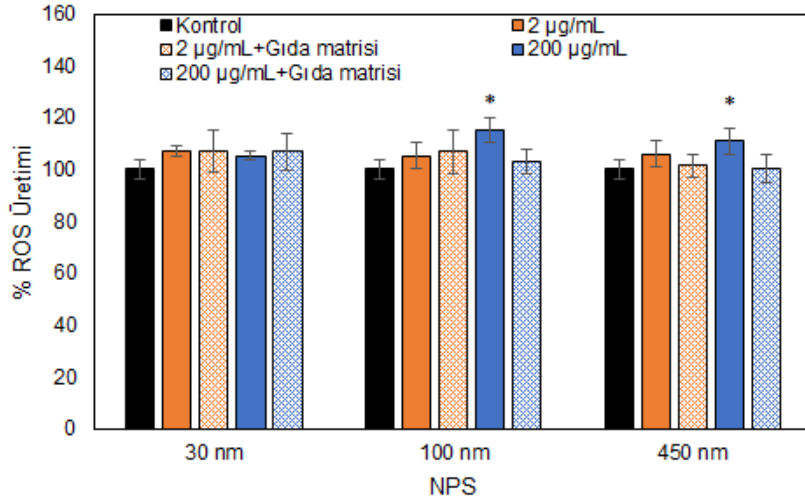
Hücrelerin canlılıkları MTT analizi kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol olarak partikül içermeyen örnekler kullanılmıştır. MTT hücre canlılığı testinden sonra ölçülen % canlılıklar Şekil 4.30'daki grafikte paylaşılmıştır. Hücre canlılığı, kontrole kıyasla gıda matrisi ile inkübe edildiğinde genel olarak azalmıştır. Özellikle NPS-100'de hem konsantrasyona göre hem de gıda matrisi eklenmesiyle canlılığın kontrole göre önemli ölçüde düştüğü görülmektedir. Buna rağmen, NPS-30 ve NPS-450'de yalnızca gıda matrisiyle kontrole göre düşüş görülmekte, konsantrasyonun etkisi görülmemektedir. Özellikle NPS-450'de yüksek konsantrasyonda gıda matrisi eklendikten sonra, eklenmemiş haline göre düşüş görülmemekte, arada istatistiksel fark bulunmamaktadır, yani NPS-450 için yüksek konsantrasyonda gıda matrisinin etkisi yoktur yorumu yapılabilmektedir, buna rağmen düşük konsantrasyonda gıda matrisi canlılıkta anlamlı bir düşüş göstermektedir. Aynı şekilde diğer NPS'lerde de yüksek konsantrasyonda gıda matrisi eklenmesiyle anlamlı fark oluşmamış, bu fark yalnızca düşük konsantrasyonda görülmüştür. Bu sonuçlar, 200 µg/mL NPS konsantrasyonuna kadar toksisite etkilerinin görülmediği ve daha yüksek konsantrasyonlara çıkılması gerektiğinin tartışıldığı literatürdeki sonuçlarla çelişmektedir [116]. Buna rağmen elde edilen sonuçlardan literatürdeki sonuçların aksine 2 µg/mL NPS konsantrasyonunun toksisite için yeterli olduğu ve NPS-30 ve NPS-450 gibi bazı partiküllerin daha yüksek konsantrasyonların daha fazla olumsuz etkisinin olmadığı yorumu yapılabilmektedir. Canlılık her çap ve her konsantrasyonda azalmasına rağmen bu partiküllerde konsantrasyon arttıkça anlamlı değişim gözlenmemiştir. Aynı şekilde gıda matrisi etkisi de bu partiküllerde

görülmemiştir. NPS-100’de ise bunların aksine 2 µg/mL konsantrasyonda gıda matrisi eklenmesiyle ve konsantrasyon artmasıyla canlılıkta düşüş gözlenmiştir. Yalnızca bu sonuçlara bakıldığında NPS-100’ün hücrelerin toksisitesinde diğer partiküllerden farklı davrandığı düşünülebilir.



Şekil 4. 30. Caco-2 hücrelerinin canlılığı (%).

NPS’lerin sindirimden sonra toksik özelliklerindeki değişim hakkında bilgi edinebilmek amacıyla ROS oluşumu incelenmiştir. NPS’lerin toksisitesini değerlendirmek için bilinen en iyi yöntem, ROS oluşumu ve NPS’ler tarafından oksidatif stresin indüklenmesi için yapılan çalışmalardır. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar, Şekil 4.31’de paylaşılmıştır.



Şekil 4. 31. Caco-2 hücrelerinin ürettiği ROS (%).

Caco-2 hücrelerinin yalnızca NPS-100 ve 450'nin bulunduğu yüksek konsantrasyon NPS ile ROS üretiminde anlamlı değişim gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, NPS ve özellikle NPS-30, mevcut deneysel koşullar altında insan kolorektal Caco-2 hücreleri üzerinde oksidatif stres üretmiyor gibi görünmektedir. Buradan elde edilen sonuçlara göre daha önce yapılan çalışmalarda da 200 µg/mL'ye kadar NPS maruziyetinde ROS üretimi görülmeyen benzer sonuçlara rastlanmıştır [116,141]. NPS-100 ve NPS-450'nin yalnızca yüksek konsantrasyonlarının bulunduğu örneklerdeki ROS üretiminin anlamlı artış göstermiş olması literatürdeki sonuçlarla paraleldir. Sindirim uygulamasının Caco-2 hücrelerinde hücre hasarını ve fonksiyon bozukluğunu azalttığı Liu ve ark. (2020)'nin yaptığı bir çalışmada kanıtlanmıştır [88]. Bu çalışmada ROS üretimindeki azalmanın sindirimden kaynaklı korona yapısı olabileceği düşünülmüş, tez kapsamında elde edilen sonuçlarda da korona yapısı gıda matrisiyle sindirime sokulmuş örneklerde ROS üretimini azaltan etken olmuştur.

5. YORUM

Plastiklerin çevreye ve insan sağlığına zararları çok uzun zamandır bilinmektedir. Plastiklerin atıklar halinde çevresel alanlarda birikmesiyle büyük plastik kirlilikleri oluşmaktadır. Bu alanlarda UV, rüzgâr ve çeşitli fiziksel-kimyasal etkenlerle plastikler daha küçük makro, mikro ve nanometre boyutlarında parçalara ayrışabilmektedir. Nano boyuttaki partiküller makro boyuttakilere göre farklı fiziko-kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip olabilir ve hücrelere farklı yollarla erişebilirler. Bu nedenle, yapıları ne doğal olarak toksik ne de doğal olarak güvenilirdir. Toksisite daha çok moleküler yapıya, biyolojik çevreye, maruz kalma derecesine ve konakçı duyarlılığına dayanır. Nanopartiküllerin proteinlerle kaplandığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Nanoparçacık yüzeylerinin protein ile kaplanması korona yapısı olarak adlandırılmakta ve bu oluşum parçacığın doğal ortamında gerçekleşmektedir.

Protein NPL yüzeyine adsorbe olduktan sonra, NPL'lerin hidrodinamik çapındaki değişiklikler, dinamik ışık saçılması (DLS) ile belirlenebilmektedir. NPL'lerin boyutu, yüzeylerine protein bağlandıkça artmaktadır. DLS analizi NPL'ler üzerinde adsorbe edilen tabakanın hidrodinamik kalınlığını göstermekle birlikte protein miktarı hakkında kesin bilgi veremez. Tarama ve transmisyon elektron mikroskobu (SEM/ESEM, STEM/TEM) veya atomik kuvvet mikroskobu gibi mikroskobik teknikler ile de NPL'lerin protein kaplamasını doğrulayabilir [128]. Çap ölçümü ve mikroskobik görüntülerden elde edilen verilerle protein bağlanması, agregasyon/dispersiyon gibi durumlar eş zamanlı olarak ölçülüp doğrulanmaktadır.

Tez kapsamında hidrodinamik çaplardaki değişimler DLS ile ölçülerek, protein korona yapıları ESEM ve TEM kullanılarak doğrulanmıştır. Bu ölçümlerin tümünde çap büyüdükçe hem elektroskobik olarak görüntü almak hem de çözeltinin içindeki partikülün çapını ölçmek kolaylaşmıştır. ESEM görüntülemeye küçük çaplı partikülde yaşanan zorluk, TEM görüntülerinde yaşanmamış, partiküller ve korona yapıları yakından ve net bir şekilde gözlenmiştir. TEM ölçümünde daha yüksek voltajlara çıkılabildiği için partikülün daha yakından görüntüsü alınabilmektedir. TEM görüntüleme, daha çok korona yapısının gözlenmesi amacıyla, ESEM ise partiküllerin birbirleriyle ve ortamlarla etkileşimlerini incelemek için kullanılmıştır. Partiküllerin sindirime girmeden önce

genellikle dispers olduğu, sadece NPS-450’de çok az agrege olma eğilimi gösterdiği sonuçlardan anlaşılmaktadır. Çap küçüldükçe bağlanan proteinin artması ve çap büyüdükçe NPS’lerin kendi aralarında toplanma eğilimi gösterdiği literatürde [88] de yer almaktadır.

Sıvı içindeki küçük parçacıkların yüzey yükünü belirlemek için yaygın uygulama, bir parçacığın elektrik potansiyelini parçacık yüzeyinden uzakta, dağınık katmanda bir ortamda belirlemektir. Bu ortamda ölçülen potansiyel, süspansiyondaki kolloidler veya nanopartiküller için çok önemli bir parametre olan zeta potansiyeli olarak adlandırılır. Değeri, süspansiyon stabilitesi ve partikül yüzey morfolojisi ile yakından ilişkilidir [142]. Zeta potansiyeli ölçümlerinde çoğu durumda çeşitli deneysel zorluklarla karşılaşmaktadır. Çünkü her ölçüm tekniğinin partikül boyutu ve konsantrasyonu ile ilgili belirli limitleri vardır. Ayrıca süspansiyonların kararsızlığı deneysel sonuçları önemli ölçüde etkileyebilir. Elektrokinetik ölçümler genellikle orijinal parçacık konsantrasyonu ile gerçekleştirilemez, seyreltilmesi gerekebilir. Bu seyreltme arayüzey özelliklerini ve katı-sıvı etkileşimleri gibi yüzey özelliklerini değiştirmemelidir [31].

Tez kapsamında yapılan analizlerde gıda matrisi olarak kullanılan süt, ölçümde zorluklar yarattığı için belirli oranda seyreltilmiştir. NPS’lerde çalışılabilecek en düşük konsantrasyon 1 mg/mL olarak ölçülmüş, daha düşük konsantrasyonlarda hatalı sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle hidrodinamik çap ölçümleri ve zeta potansiyelleri yalnızca bu konsantrasyonda alınmıştır. Zeta potansiyelleri partiküller saf su ortamlarındayken mutlak 30 değerinden büyük çıkarak stabil bölgede kalmış, ortama yağlı ve yağsız süt girdiğinde ise partiküllerin yüzey yükü sütün yüzey yüküne yaklaşmıştır. Bu durum, partikülün, süt gibi heterojen bir ortamın yüzey yükünü çok fazla etkileyemediğini göstermektedir.

NPS’lerin sindirim sonrası görüntü analizleri ve DLS ölçümleri yapılmıştır. Her sindirim ortamından alınan örnekler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Genel olarak gıda matrisi ortama girdiğinde ağız ve bağırsakta agregatlar ve dolayısıyla hidrodinamik çaplar artmakta, midede ise tam tersi gıda matrisi ortama girdiğinde agregat küçülmesi

görülmektedir. Gıda matrisi yokken midede oluşan agregasyon pH'ın 3'ün altına düşmesiyle iyonların (özellikle çift değerlikli iyonlar) partiküllerin elektrostatik itmesini engellemesi sonucu oluşmuştur. Mide pH'ında ortamda gıda matrisi varken agregatların küçüldüğü ve parçalandığı görülmekte, bunun sebebi olarak da yoğun iyon varlığında bile sütte bulunan BSA'nın stabilize edici etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Sindirilmiş NPS'lerin sindirime girmemiş NPS'lere göre, ortama bağlı olarak zeta potansiyellerinde değişim görülmekle birlikte pH'ın düşmesiyle zeta potansiyellerinde bir artış olduğu, bunun sonucu olarak NPS'ler arasındaki elektrostatik itmenin azaldığı ve agregasyonun kolaylaştığı belirtilmektedir [88]. Bu tez kapsamında da sindirim ortamlarına göre yapılan ölçümlerde, NPS'lerin mide ortamında pH'ın 2'nin altına düşmesiyle birlikte artan ortalama hidrodinamik çap ve agregat boyutu ve yükselen zeta potansiyeli literatürle uyumlu bulunmuştur. Gastrointestinal sistemde, midenin asidik pH'ı, enzimler ve proteinlerin varlığı sebebiyle NPL'lerin yüzeyi pek çok molekülü adsorbe edebilmektedir. Hatta buradaki dinamik süreç sebebiyle adsorbe olan moleküller kendi aralarında da değişim göstererek yeni agregatlar oluşturabilmektedir. Bağırsak ortamı daha az asidik olmasına rağmen, yoğun protein içeriği sebebiyle burada da korona oluşturması muhtemeldir. Elde edilen sonuçlarda, sindirimden sonra bağırsak ortamında yoğun ve büyük agregatlar oluşmadığı, fakat korona yapısının sindirimden sonra da korunduğu görülmüştür. Özellikle NPS-30'un TEM görüntülerine bakıldığında bağırsak ortamından alınan örneklerde ağsı yapının devam ettiği ve partiküllerin etrafındaki korona yapısının korunduğu görülmektedir.

Protein korona yapısının varlığını ve miktarını ölçmek için floresans sönümleme ve elektroforez analizleri yürütülmüştür. Sindirimden önce protein korona için yapılan analizlerde en çok protein bağlayan 30 nm çapındaki partikül olduğu görülmekte, 450 nm çapındaki partikülün ise proteini en az bağladığı görülmüştür. Çap küçüldükçe yüzey alanının artması ve daha çok protein bağlaması literatürde de yer aldığı gibi burada da gözlenmiştir.

Partiküllerin sindirim sisteminde yer alan enzimler üzerindeki etkisini incelemek üzere amilaz, pepsin ve lipaz ile çalışılmıştır. Protein yapıdaki enzimlerin partiküle bağlanması ve enzim aktivitesindeki inhibisyon, partikül çapının küçülmesiyle artmaktadır. NPS-30 ve NPS-100'de enzim inhibisyonu her enzim için daha yüksek bulunurken, NPS-450'de genel olarak inhibisyon daha az gerçekleşmiştir. Enzimler karşılaştırıldığında ise en fazla aktivite kaybı lipazda gözlenmiştir. Lipazın çalışma prensibi diğer enzimlerden daha farklıdır. Lipaz, substratına diğer enzimler gibi direkt bağlanmak yerine, ortamda safra tuzları gibi emülgatörlere ihtiyaç duymaktadır. Polistirenlerin etrafında lipit agregatlarının oluşması ve bu agregatların da substratın yüzey alanını azaltarak enzimin bağlanmasını olumsuz yönde etkilediği, bu nedenle enzimin aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesinde azalma gözlenmesiyle yağ asidi oluşumu da azalmaktadır, bu da insan vücudunda sindirimi olumsuz yönde etkileyecektir. Yağ asidi metabolizmasının bozulması aynı zamanda gıdalardan enerji alımının azalmasına işaret eder [143]. Sindirim sırasında oluşan agregatlara bakıldığında en yüksek agregasyonun midede görülmesiyle en fazla aktivite kaybının pepsinde görülmesi beklense de, burada enzimin aktif bölgelerinin partiküle bağlanmamış olabileceği ve substrat-enzim kompleksini etkileyecek bir durum oluşturmadığı düşünülmüştür.

Boyut, zeta potansiyel değeri ve korona bileşimi dahil olmak üzere NPS'lerin fizikokimyasal özellikleri, sindirimden sonraki toksisiteyi etkilemesi beklenmektedir. Sindirim sırasında meydana gelen değişiklikler ve gıda matrisi varlığının nanopartiküllerin özelliklerini değiştirdiği ve bu nedenle orijinal hallerinden farklı bir yapıya dönüştükleri tespit edilmiştir. Literatürde gıda matrisi varlığında, hücre kültürü kullanılarak nanopartiküllerin toksisitesi üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında gıda matrisinin ve sindirimin partikülün oluşturduğu korona yapısı ile toksisiteyi nasıl etkilediği konusunda yeni bir yaklaşımda bulunulmuştur. Caco-2 hücre modeli kullanılarak yapılan toksisite çalışmalarında NPS'lerin hücreler üzerinde önemli bir toksik etki gözlenmemiştir. Bu sonuç, NPS'lerin toksisitesinin araştırıldığı diğer çalışmalarla uyumludur [116,141]. Bununla birlikte yalnızca NPS-100 ile yapılan çalışmalarda canlılıkta konsantrasyona bağlı olarak azalma gerçekleşmiştir. ROS üretiminde ise NPS-100 ve NPS-450'de istatistiksel olarak bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak en fazla toksik etkinin gözlemlendiği partikül boyutunun 100 nm olduğu söylenebilir. Sindirimden sonra oluşan korona yapısının toksik

etkileri azalttığı görülmekte ve benzer sonuçlara literatürde de yer verilmektedir. Gıda matrisi olmadığında da NPS-30'da korona yapısı görülmesi burada toksisitenin azalmasını açıklayabilir. Gerçek toksisitenin kronik maruziyetten sonra görülmesi beklenir. Bu çalışma kapsamında kronik toksisite konusunda herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Vücutta birikimin toksisiteyi nasıl etkileyeceği düşük trofik seviyelerdeki canlılarda bakılsa da in vivo veya in vitro olarak memeli hücrelerinde incelenmelidir. İnsanlarda asıl tüketim ve maruziyetin oral yolla ve sindirim sistemi aracılığıyla olduğu ve nanoplastiklerin de oral yoldan gıdalarla birlikte alındığı göz önüne alınırsa, sindirim sistemindeki ve gıdalarla birlikte etkileri daha çok araştırmaya konu olmalıdır. Etik kurallar ve zaman, maliyet gibi sınırlamalar sebebiyle bu çalışmalar in vitro olarak yapılmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- [1] V. Powers, A National Historic Chemical Landmark The Bakelizer, Am. Chem. Soc. Natl. Hist. Chem. Landmarks. (1993) 1–2.
- [2] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, Sci. Adv. 3 (2017) 3–8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- [3] E.L. Ng, E. Huerta Lwanga, S.M. Eldridge, P. Johnston, H.W. Hu, V. Geissen, D. Chen, An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems, Sci. Total Environ. 627 (2018) 1377–1388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.341>.
- [4] H. Bouwmeester, P.C.H. Hollman, R.J.B. Peters, Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 8932–8947. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090>.
- [5] C. González-Fernández, F. Le Grand, A. Bideau, A. Huvet, I. Paul-Pont, P. Soudant, Nanoplastics exposure modulate lipid and pigment compositions in diatoms, Environ. Pollut. 262 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114274>.
- [6] B. Nowack, T.D. Bucheli, Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment, Environ. Pollut. 150 (2007) 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>.
- [7] L. Asprey, M. Middleton, Implementation Planning, Integr. Doc. Content Manag. (2011) 461–480. <https://doi.org/10.4018/978-1-59140-055-4.ch021>.
- [8] E. Commission, P. Juncker, A EUROPEAN STRATEGY FOR PLASTICS Single-use plastics: New measures to reduce marine litter Fishing gear, (2017). http://ec.europa.eu/environment/waste/pdf/single-use_plastics_factsheet.pdf.
- [9] V. Silano, J.M. Barat Baviera, C. Bolognesi, A. Chesson, P.S. Cocconcelli, R. Crebelli, D.M. Gott, K. Grob, C. Lambré, E. Lampi, M. Mengelers, A. Mortensen, I.L. Steffensen, C. Tlustos, H. Van Loveren, L. Vernis, H. Zorn, L. Castle, E. Di Consiglio, R. Franz, N. Hellwig, M.R. Milana, K. Pfaff, M. Carfi, E. Van Haver, G. Rivière, Assessment of the impact of the IARC Monograph Vol. 121 on the

- safety of the substance styrene (FCM No 193) for its use in plastic food contact materials, *EFSA J.* 18 (2020). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6247>.
- [10] A. Vianello, R.L. Jensen, L. Liu, J. Vollertsen, Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45054-w>.
 - [11] Q. Zhang, Y. Zhao, F. Du, H. Cai, G. Wang, H. Shi, Microplastic Fallout in Different Indoor Environments, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 6530–6539. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00087>.
 - [12] M. Kosuth, S.A. Mason, E. V. Wattenberg, Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt, *PLoS One.* 13 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>.
 - [13] R. Lehner, C. Weder, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health, *Environ. Sci. Technol.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>.
 - [14] A. Praetorius, S. Wagner, T. Hofmann, Microplastic Exposure Assessment in Aquatic Environments: Learning from Similarities and Differences to Engineered Nanoparticles, (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04054>.
 - [15] J. Gigault, H. El Hadri, B. Nguyen, B. Grassl, L. Rowenczyk, N. Tufenkji, S. Feng, M. Wiesner, Nanoplastics are neither microplastics nor engineered nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 16 (2021) 501–507. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00886-4>.
 - [16] J. Gigault, B. Pedrono, B. Maxit, A. Ter Halle, Marine plastic litter: The unanalyzed nano-fraction, *Environ. Sci. Nano.* 3 (2016) 346–350. <https://doi.org/10.1039/c6en00008h>.
 - [17] S. Lambert, M. Wagner, Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene, *Chemosphere.* 145 (2016) 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.078>.
 - [18] A. Ter Halle, L. Ladirat, X. Gendre, D. Goudouneche, C. Pusineri, C. Routaboul, C. Tenailleau, B. Duployer, E. Perez, Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 5668–5675.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00594>.

- [19] E. Besseling, B. Wang, M. Lüring, A.A. Koelmans, Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12336–12343. <https://doi.org/10.1021/es503001d>.
- [20] J. Gigault, A. ter Halle, M. Baudrimont, P.Y. Pascal, F. Gauffre, T.L. Phi, H. El Hadri, B. Grassl, S. Reynaud, Current opinion: What is a nanoplastic?, *Environ. Pollut.* 235 (2018) 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.
- [21] T.M. Nolte, N.B. Hartmann, J.M. Kleijn, J. Garnæs, D. van de Meent, A. Jan Hendriks, A. Baun, The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption, *Aquat. Toxicol.* 183 (2017) 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.005>.
- [22] M. Long, B. Moriceau, M. Gallinari, C. Lambert, A. Huvet, J. Raffray, P. Soudant, Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates, *Mar. Chem.* 175 (2015) 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003>.
- [23] P.A. Hassan, S. Rana, G. Verma, Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering, *Langmuir*. 31 (2015) 3–12. <https://doi.org/10.1021/la501789z>.
- [24] N.F.A. Biber, A. Foggo, R.C. Thompson, Characterising the deterioration of different plastics in air and seawater, *Mar. Pollut. Bull.* 141 (2019) 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.068>.
- [25] G. Suaria, C.G. Avio, A. Mineo, G.L. Lattin, M.G. Magaldi, G. Belmonte, C.J. Moore, F. Regoli, S. Aliani, The Mediterranean Plastic Soup: Synthetic polymers in Mediterranean surface waters, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep37551>.
- [26] A.L. Lusher, V. Tirelli, I. O'Connor, R. Officer, Microplastics in Arctic polar waters: The first reported values of particles in surface and sub-surface samples, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep14947>.
- [27] M. Bergmann, S. Mützel, S. Primpke, M.B. Tekman, J. Trachsel, G. Gerdt, White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic, *Sci.*

- Adv. 5 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1157>.
- [28] M. Bergmann, V. Wirzberger, T. Krumpfen, C. Lorenz, S. Primpke, M.B. Tekman, G. Gerdt, High Quantities of Microplastic in Arctic Deep-Sea Sediments from the HAUSGARTEN Observatory, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 11000–11010. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03331>.
- [29] M.P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, K.A. Dawson, Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 2525–2534. <https://doi.org/10.1021/ja107583h>.
- [30] A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat. Mater.* 8 (2009) 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- [31] R.R. Retamal Marín, F. Babick, L. Hillemann, Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 532 (2017) 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.010>.
- [32] H. Wang, R. Ma, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, Formation of a Monolayer Protein Corona around Polystyrene Nanoparticles and Implications for Nanoparticle Agglomeration, *Small.* 15 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1002/smll.201900974>.
- [33] S. Kihara, N.J. Van Der Heijden, C.K. Seal, J.P. Mata, A.E. Whitten, I. Köper, D.J. McGillivray, Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 1067–1076. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00015>.
- [34] S. Winzen, J.C. Schwabacher, J. Müller, K. Landfester, K. Mohr, Small Surfactant Concentration Differences Influence Adsorption of Human Serum Albumin on Polystyrene Nanoparticles, *Biomacromolecules.* 17 (2016) 3845–3851. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01503>.
- [35] S. Dominguez-Medina, L. Kisley, L.J. Tauzin, A. Hoggard, B. Shuang, A.S. D. S. Indrasekara, S. Chen, L.Y. Wang, P.J. Derry, A. Liopo, E.R. Zubarev, C.F. Landes, S. Link, Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle

- Aggregation, ACS Nano. 10 (2016) 2103–2112. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06439>.
- [36] P. Bhattacharya, S. Lin, J.P. Turner, P.C. Ke, Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis, (2010) 16556–16561.
- [37] G. Liebezeit, E. Liebezeit, Synthetic particles as contaminants in German beers, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 31 (2014) 1574–1578. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.945099>.
- [38] G. Liebezeit, E. Liebezeit, Non-pollen particulates in honey and sugar, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 30 (2013) 2136–2140. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.843025>.
- [39] D. Yang, H. Shi, L. Li, J. Li, K. Jabeen, P. Kolandhasamy, Microplastic Pollution in Table Salts from China, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 13622–13627. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03163>.
- [40] C. Dessì, E.D. Okoffo, J.W. O'Brien, M. Gallen, S. Samanipour, S. Kaserzon, C. Rauert, X. Wang, K. V. Thomas, Plastics contamination of store-bought rice, J. Hazard. Mater. 416 (2021) 125778. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125778>.
- [41] L.M. Hernandez, E.G. Xu, H.C.E. Larsson, R. Tahara, V.B. Maisuria, N. Tufenkji, Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea, Environ. Sci. Technol. 53 (2019) 12300–12310. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02540>.
- [42] G. Oliveri Conti, M. Ferrante, M. Banni, C. Favara, I. Nicolosi, A. Cristaldi, M. Fiore, P. Zuccarello, Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population, Environ. Res. 187 (2020) 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>.
- [43] A. Karami, A. Golieskardi, C.K. Choo, V. Larat, S. Karbalaei, B. Salamatina, Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats, Sci. Total Environ. 612 (2018) 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.005>.
- [44] V.C. Shruti, F. Pérez-Guevara, I. Elizalde-Martínez, G. Kutralam-Muniasamy,

- First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations, *Sci. Total Environ.* 726 (2020) 138580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138580>.
- [45] S.A. Mason, V.G. Welch, J. Neratko, Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water, *Front. Chem.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00407>.
- [46] D. Kankanige, S. Babel, Smaller-sized micro-plastics (MPs) contamination in single-use PET-bottled water in Thailand, *Sci. Total Environ.* 717 (2020) 137232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137232>.
- [47] D.J. McClements, H. Xiao, Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles, *Npj Sci. Food.* 1 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>.
- [48] Z. Zhang, R. Zhang, H. Xiao, K. Bhattacharya, D. Bitounis, P. Demokritou, D.J. McClements, Development of a standardized food model for studying the impact of food matrix effects on the gastrointestinal fate and toxicity of ingested nanomaterials, *NanoImpact.* 13 (2019) 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.11.002>.
- [49] D.J. McClements, G. DeLoid, G. Pyrgiotakis, J.A. Shatkin, H. Xiao, P. Demokritou, The role of the food matrix and gastrointestinal tract in the assessment of biological properties of ingested engineered nanomaterials (iENMs): State of the science and knowledge gaps, *NanoImpact.* 3–4 (2016) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2016.10.002>.
- [50] A.P. Walczak, E. Kramer, P.J.M. Hendriksen, R. Helsdingen, M. Van Der Zande, I.M.C.M. Rietjens, H. Bouwmeester, In vitro gastrointestinal digestion increases the translocation of polystyrene nanoparticles in an in vitro intestinal co-culture model, *Nanotoxicology.* 9 (2015) 886–894. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.988664>.
- [51] H. Tan, T. Yue, Y. Xu, J. Zhao, B. Xing, Microplastics Reduce Lipid Digestion in Simulated Human Gastrointestinal System, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 12285–12294. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02608>.
- [52] M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F.

- Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. MacIerzanka, A. MacKie, S. Marze, D.J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C.N. Santos, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S.J. Wickham, W. Weitschies, A. Brodkorb, A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus, *Food Funct.* 5 (2014) 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- [53] A. Brodkorb, L. Egger, M. Alminger, P. Alvito, R. Assunção, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carrière, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A.R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D.J. McClements, O. Ménard, M. Minekus, R. Portmann, C.N. Santos, I. Souchon, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S.J. Wickham, W. Weitschies, I. Recio, INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nat. Protoc.* 14 (2019) 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- [54] Y. Wang, M. Li, X. Xu, W. Tang, L. Xiong, Q. Sun, Formation of Protein Corona on Nanoparticles with Digestive Enzymes in Simulated Gastrointestinal Fluids, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 2296–2306. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05702>.
- [55] T. Bohn, F. Carriere, L. Day, A. Deglaire, L. Egger, D. Freitas, M. Golding, S. Le, A. Macierzanka, O. Menard, B. Miralles, A. Moscovici, R. Portmann, I. Recio, D. Rémond, T.J. Wooster, U. Lesmes, D. Dupont, F. Carriere, L. Day, A. Deglaire, L. Egger, D. Freitas, M. Golding, D. Rémond, T.J. Wooster, U. Lesmes, A.R. Mackie, D. Dupont, Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion . What can we predict with static in vitro digestion models ?, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0 (2018) 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>.
- [56] Humphrey, R.T. Williamson, A review of saliva Normal composition, flow, and function. Humphrey, Williamson. 2001. *Journal of Prosthetic Dentistry.pdf*, *J. Prosthet. Dent.* 85 (2001) 162–169.
- [57] P.J. Butterworth, F.J. Warren, P.R. Ellis, Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage, *Starch/Staerke.* 63 (2011) 395–405. <https://doi.org/10.1002/star.201000150>.

- [58] C. Hoebler, A. Karinthe, M.F. Devaux, F. Guillon, D.J.G. Gallant, B. Bouchet, C. Melegari, J.L. Barry, Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects, *Br. J. Nutr.* 80 (1998) 429–436. <https://doi.org/10.1017/s0007114598001494>.
- [59] J.B. Cooper, G. Khan, G. Taylor, I.J. Tickle, T.L. Blundell, X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 199–222. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90156-G](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90156-G).
- [60] S. Sakuma, Y. Ishida, R. Sudo, N. Suzuki, H. Kikuchi, K.I. Hiwatari, A. Kishida, M. Akashi, M. Hayashi, Stabilization of salmon calcitonin by polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains, against enzymatic degradation, *Int. J. Pharm.* 159 (1997) 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00284-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00284-6).
- [61] C. Prather, R.S. Fisher, J.H. Meyer, R.W. Summers, M. Pimentel, R.W. McCallum, L.M.A. Akkermans, V. Loening-baucke, Measurement of Gastrointestinal Transit, 50 (2005) 989–1004. <https://doi.org/10.1007/s10620-005-2694-6>.
- [62] J. Maldonado-Valderrama, A.P. Gunning, P.J. Wilde, V.J. Morris, In vitro gastric digestion of interfacial protein structures: Visualisation by AFM, *Soft Matter*. 6 (2010) 4908–4915. <https://doi.org/10.1039/c0sm00300j>.
- [63] H. Singh, A. Ye, D. Horne, Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.12.001>.
- [64] Y. Gargouri, G. Piéroni, C. Rivière, L. Sarda, R. Verger, Inhibition of lipases by proteins: A binding study using dicaprin monolayers, *Biochemistry*. 25 (1986) 1733–1738. <https://doi.org/10.1021/bi00355a043>.
- [65] M. Dahim, H. Brockman, How colipase-fatty acid interactions mediate adsorption of pancreatic lipase to interfaces, *Biochemistry*. 37 (1998) 8369–8377. <https://doi.org/10.1021/bi973015r>.
- [66] L.M. de Buy Wenniger, T. Püsl, U. Beuers, *Bile Salts*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00031-1>.

- [67] B. Joseph, P.W. Ramteke, G. Thomas, Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.003>.
- [68] Y. Kokusho, H. Machida, S. Iwasaki, Production and properties of alkaline lipase from *alcaligenes* sp. Strain no. 679, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1743–1750. <https://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865342>.
- [69] T. Nishio, T. Chikano, M. Kamimura, Purification and some properties of lipase produced by *pseudomonas fragi* 22.39 b, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 181–186. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10867979>.
- [70] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 782–798. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>.
- [71] I. Brandts, M. Teles, A.P. Gonçalves, A. Barreto, L. Franco-Martinez, A. Tvarijonaviciute, M.A. Martins, A.M.V.M. Soares, L. Tort, M. Oliveira, Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine, *Sci. Total Environ.* 643 (2018) 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.257>.
- [72] V. Stock, L. Böhmert, E. Lisicki, R. Block, J. Cara-Carmona, L.K. Pack, R. Selb, D. Lichtenstein, L. Voss, C.J. Henderson, E. Zabinsky, H. Sieg, A. Braeuning, A. Lampen, Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo, *Arch. Toxicol.* 93 (2019) 1817–1833. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>.
- [73] J.A. Pitt, J.S. Kozal, N. Jayasundara, A. Massarsky, R. Trevisan, N. Geitner, M. Wiesner, E.D. Levin, R.T. Di Giulio, Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat. Toxicol.* 194 (2018) 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.017>.
- [74] R. Zhang, M.R. Silic, A. Schaber, O. Wasel, J.L. Freeman, M.S. Sepúlveda, Exposure route affects the distribution and toxicity of polystyrene nanoplastics in zebrafish, *Sci. Total Environ.* 724 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138065>.
- [75] Y. Lu, Y. Zhang, Y. Deng, W. Jiang, Y. Zhao, J. Geng, L. Ding, H. Ren, Uptake

- and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 4054–4060. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>.
- [76] O. Setälä, V. Fleming-Lehtinen, M. Lehtiniemi, Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web, *Environ. Pollut.* 185 (2014) 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013>.
- [77] J.E. Ward, D.J. Kach, Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves, *Mar. Environ. Res.* 68 (2009) 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>.
- [78] A.M. Booth, B.H. Hansen, M. Frenzel, H. Johnsen, D. Altin, Uptake and toxicity of methylmethacrylate-based nanoplastic particles in aquatic organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 1641–1649. <https://doi.org/10.1002/etc.3076>.
- [79] L.I. Devriese, M.D. van der Meulen, T. Maes, K. Bekaert, I. Paul-Pont, L. Frère, J. Robbens, A.D. Vethaak, Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area, *Mar. Pollut. Bull.* 98 (2015) 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.051>.
- [80] T.Ö. Sökmen, E. Sulukan, M. Türkoğlu, A. Baran, M. Özkara, S.B. Ceyhan, Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*), *Neurotoxicology* 77 (2020) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.010>.
- [81] K. Mattsson, E. V. Johnson, A. Malmendal, S. Linse, L.A. Hansson, T. Cedervall, Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10813-0>.
- [82] A.C. Greven, T. Merk, F. Karagöz, K. Mohr, M. Klapper, B. Jovanović, D. Palić, Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 3093–3100. <https://doi.org/10.1002/etc.3501>.
- [83] J. Li, D. Yang, L. Li, K. Jabeen, H. Shi, Microplastics in commercial bivalves from China, *Environ. Pollut.* 207 (2015) 190–195.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.018>.

- [84] D. Neves, P. Sobral, J.L. Ferreira, T. Pereira, Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast, *Mar. Pollut. Bull.* 101 (2015) 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.008>.
- [85] S. Ghosh, Structure of soft and hard protein corona around polystyrene nanoplastics — Particle size and protein types Structure of soft and hard protein corona around polystyrene nanoplastics — Particle size and protein types, 051002 (2021). <https://doi.org/10.1116/6.0000404>.
- [86] J. Domenech, A. Hernández, L. Rubio, R. Marcos, C. Cortés, Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier, *Arch. Toxicol.* 94 (2020) 2997–3012. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02805-3>.
- [87] B. Wu, X. Wu, S. Liu, Z. Wang, L. Chen, Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells, *Chemosphere.* 221 (2019) 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.056>.
- [88] S. Liu, X. Wu, W. Gu, J. Yu, B. Wu, Influence of the digestive process on intestinal toxicity of polystyrene microplastics as determined by in vitro Caco-2 models, *Chemosphere.* 256 (2020) 127204. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127204>.
- [89] N. Hussain, V. Jaitley, A.T. Florence, Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50 (2001) 107–142. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00152-1).
- [90] C. Della Torre, E. Bergami, A. Salvati, C. Faleri, P. Cirino, K.A. Dawson, I. Corsi, Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12302–12311. <https://doi.org/10.1021/es502569w>.
- [91] M.G. Bexiga, J.A. Varela, F. Wang, F. Fenaroli, A. Salvati, I. Lynch, J.C. Simpson, K.A. Dawson, Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7-and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line, *Nanotoxicology.* 5 (2011) 557–567. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.539713>.

- [92] F. Wang, M.G. Bexiga, S. Anguissola, P. Boya, J.C. Simpson, A. Salvati, K.A. Dawson, Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles, *Nanoscale*. 5 (2013) 10868–10876. <https://doi.org/10.1039/c3nr03249c>.
- [93] O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, G.U. Nienhaus, V. Mailänder, K. Landfester, M. Rouis, T. Simmet, Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages, *ACS Nano*. 5 (2011) 9648–9657. <https://doi.org/10.1021/nn203596e>.
- [94] L. Canesi, C. Ciacci, E. Bergami, M.P. Monopoli, K.A. Dawson, S. Papa, B. Canonico, I. Corsi, Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*, *Mar. Environ. Res.* 111 (2015) 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>.
- [95] D. Xu, Y. Ma, X. Han, Y. Chen, Systematic toxicity evaluation of polystyrene nanoplastics on mice and molecular mechanism investigation about their internalization into, *J. Hazard. Mater.* 417 (2021) 126092. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126092>.
- [96] T. Huang, W. Zhang, T. Lin, S. Liu, Z. Sun, F. Liu, Y. Yuan, X. Xiang, H. Kuang, B. Yang, D. Zhang, Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring, *Food Chem. Toxicol.* 160 (2022) 112803. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112803>.
- [97] S. Mourdikoudis, R.M. Pallares, N.T.K. Thanh, Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*. 10 (2018) 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>.
- [98] S. Mariano, S. Tacconi, M. Fidaleo, M. Rossi, L. Dini, Micro and Nanoplastics Identification: Classic Methods and Innovative Detection Techniques, *Front. Toxicol.* 3 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.636640>.
- [99] C. Carrillo-Carrion, M. Carril, W.J. Parak, Techniques for the experimental investigation of the protein corona, *Curr. Opin. Biotechnol.* 46 (2017) 106–113.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.009>.

- [100] Y. Yang, H. Shao, Q. Wu, D. Wang, Lipid metabolic response to polystyrene particles in nematode, *Environ. Pollut.* 256 (2020) 113439. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113439>.
- [101] A. Bogner, P.H. Jouneau, G. Thollet, D. Basset, C. Gauthier, A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging, *Micron.* 38 (2007) 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.06.008>.
- [102] D.M. Mitrano, A. Beltzung, S. Frehland, M. Schmiedgruber, A. Cingolani, F. Schmidt, Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems, *Nat. Nanotechnol.* 14 (2019) 362–368. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0360-3>.
- [103] H. El Hadri, J. Gigault, B. Maxit, B. Grassl, S. Reynaud, Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments, *NanoImpact.* 17 (2020) 100206. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100206>.
- [104] B. Liang, Y. Zhong, Y. Huang, X. Lin, J. Liu, L. Lin, M. Hu, J. Jiang, M. Dai, B. Wang, B. Zhang, H. Meng, J.J.J. Lelaka, H. Sui, X. Yang, Z. Huang, Underestimated health risks: polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis, *Part. Fibre Toxicol.* 18 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00414-1>.
- [105] N. Wang, C. Hsu, L. Zhu, S. Tseng, J.P. Hsu, Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential, *J. Colloid Interface Sci.* 407 (2013) 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.05.058>.
- [106] C.C. Fleischer, C.K. Payne, Secondary Structure of Corona Proteins Determines the Cell Surface Receptors Used by Nanoparticles, (2014).
- [107] D.Z. Liu, M.G. Weeks, D.E. Dunstan, G.J.O. Martin, Alterations to the composition of casein micelles and retentate serum during ultrafiltration of skim milk at 10 and 40°C, *Int. Dairy J.* 35 (2014) 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.017>.
- [108] A. Alonso, J. Macanás, G.L. Davies, Y.K. Gun, Environmentally-safe polymer-

- metal nanocomposites with most favorable distribution of catalytically active and biocide nanoparticles, *Adv. Nanocomposite Technol.* (2011) 176–200. <http://www.intechopen.com/books/advances-in-nanocomposite-technology/environmentally-safe-catalytically-active-and-biocide-polymer-metal-nanocomposites-with-enhanced-str%5CnInTech>.
- [109] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [110] Tarım ve Orman Bakanlığı, TÜRK GIDA KODEKSİ İÇME SÜTLERİ TEBLİĞİ (TEBLİĞ NO: 2019/12), Turkey, 2019. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/02/20190227-5.htm>.
- [111] U.K. Laemmli, 227680a0, *Nature*. 227 (1970) 680–685.
- [112] I.S. Sohal, Y.K. Cho, K.S. O’Fallon, P. Gaines, P. Demokritou, D. Bello, Dissolution behavior and biodurability of ingested engineered nanomaterials in the gastrointestinal environment, *ACS Nano*. 12 (2018) 8115–8128. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02978>.
- [113] R. Storms, Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang, A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities and glucoamylase activities, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.036>.
- [114] B.Y.M.L. Anson, The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin, (1938).
- [115] X. Wu, Y. Feng, Y. Lu, Y. Li, L. Fan, L. Liu, K. Wu, X. Wang, B. Zhang, Z. He, Effect of phenolic hydroxyl groups on inhibitory activities of phenylpropanoid glycosides against lipase, *J. Funct. Foods*. 38 (2017) 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.022>.
- [116] C. Cortés, J. Domenech, M. Salazar, S. Pastor, R. Marcos, A. Hernández, Nanoplastics as a potential environmental health factor: Effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells, *Environ. Sci. Nano*. 7 (2020) 272–285. <https://doi.org/10.1039/c9en00523d>.
- [117] H. Kim, X. Xue, Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by

- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining, *J. Vis. Exp.* 2020 (2020) 1–5.
<https://doi.org/10.3791/60682>.
- [118] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 255–264.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.
- [119] X. Li, E. He, K. Jiang, W.J.G.M. Peijnenburg, H. Qiu, The crucial role of a protein corona in determining the aggregation kinetics and colloidal stability of polystyrene nanoplastics, *Water Res.* 190 (2021) 116742.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116742>.
- [120] H. Gao, C. Cheng, S. Fang, D.J. McClements, L. Ma, X. Chen, L. Zou, R. Liang, W. Liu, Study on curcumin encapsulated in whole nutritional food model milk: Effect of fat content, and partitioning situation, *J. Funct. Foods.* 90 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104990>.
- [121] J. Luo, Z. Wang, Y. Li, C. Chen, F. Ren, H. Guo, The simulated in vitro infant gastrointestinal digestion of droplets covered with milk fat globule membrane polar lipids concentrate, *J. Dairy Sci.* 102 (2019) 2879–2889.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15044>.
- [122] V. Stock, C. Fahrenson, A. Thuenemann, M.H. Dönmez, L. Voss, L. Böhmert, A. Braeuning, A. Lampen, H. Sieg, Impact of artificial digestion on the sizes and shapes of microplastic particles, *Food Chem. Toxicol.* 135 (2020) 111010.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111010>.
- [123] L.L. Olenick, J.M. Troiano, A. Vartanian, E.S. Melby, A.C. Mensch, L. Zhang, J. Hong, O. Mesele, T. Qiu, J. Bozich, S. Lohse, X. Zhang, T.R. Kuech, A. Millevolte, I. Gunsolus, A.C. McGeachy, M. Doğangün, T. Li, D. Hu, S.R. Walter, A. Mohaimani, A. Schmoldt, M.D. Torelli, K.R. Hurley, J. Dalluge, G. Chong, Z.V. Feng, C.L. Haynes, R.J. Hamers, J.A. Pedersen, Q. Cui, R. Hernandez, R. Klaper, G. Orr, C.J. Murphy, F.M. Geiger, Lipid Corona Formation from Nanoparticle Interactions with Bilayers, *Chem.* 4 (2018) 2709–2723.
<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.09.018>.
- [124] R. Coreas, X. Cao, G.M. Deloid, P. Demokritou, simulated gastrointestinal digestion, (2021) 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100272>.Lipid.

- [125] V.K. Sharma, Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment — A Review Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment — A Review, 4529 (2009). <https://doi.org/10.1080/10934520903263231>.
- [126] M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, J. Zheng, J.D. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, B.W. Neun, J.B. Hall, S.E. Mcneil, Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood : effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5 (2009) 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.08.001>.
- [127] M. Pesic, M. Barac, M. Vrvic, N. Ristic, O. Macej, S. Stanojevic, Author ' s personal copy Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE, (n.d.). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.045>.
- [128] K. Ranoszek-soliwoda, E. Czechowska, E. Tomaszewska, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* Catalase-modified gold nanoparticles : Determination of the degree of protein adsorption by gel electrophoresis, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 159 (2017) 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.019>.
- [129] S. Wang, N. Mamedova, N.A. Kotov, W. Chen, J. Studer, *Antigen / Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates*, (2002).
- [130] D.S. Horne, Casein micelle structure: Models and muddles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2006) 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
- [131] M. Mahmoudi, S. Sheibani, A.S. Milani, F. Rezaee, M. Gauberti, R. Dinarvand, H. Vali, Crucial role of the protein corona for the specific targeting of nanoparticles, *Nanomedicine.* 10 (2015) 215–226. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.69>.
- [132] S. Lu, K. Zhu, W. Song, G. Song, D. Chen, T. Hayat, N.S. Alharbi, C. Chen, Y. Sun, Impact of water chemistry on surface charge and aggregation of polystyrene microspheres suspensions, *Sci. Total Environ.* 630 (2018) 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.296>.
- [133] S. Li, H. Liu, R. Gao, A. Abdurahman, J. Dai, F. Zeng, Aggregation kinetics of

- microplastics in aquatic environment: Complex roles of electrolytes, pH, and natural organic matter, *Environ. Pollut.* 237 (2018) 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.042>.
- [134] T. Huppertz, L.W. Chia, Milk protein coagulation under gastric conditions: A review, *Int. Dairy J.* 113 (2021) 104882. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104882>.
- [135] R. Tantra, P. Schulze, P. Quincey, Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility, *Particuology*. 8 (2010) 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.01.003>.
- [136] Y.Q. Wang, H.M. Zhang, Comparative studies of the binding of six phthalate plasticizers to pepsin by multispectroscopic approach and molecular modeling, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 11191–11200. <https://doi.org/10.1021/jf404177b>.
- [137] Y. Wang, L. Zhou, Y. Sun, H. Mu, X. Li, Y. Wang, Q. Sun, Formation of Protein Corona on Interaction of Pepsin with Chitin Nanowhiskers in Simulated Gastric Fluid, *Food Chem.* (2022) 132393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132393>.
- [138] S.L. Wright, D. Rowe, R.C. Thompson, Correspondences Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms, *CURBIO*. 23 (n.d.) R1031–R1033. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.068>.
- [139] R. Sussarellu, M. Suquet, Y. Thomas, C. Lambert, C. Fabioux, M.E.J. Pernet, N. Le Goïc, V. Quillien, C. Mingant, Y. Epelboin, C. Corporeau, J. Guyomarch, J. Robbens, I. Paul-Pont, P. Soudant, A. Huvet, Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 2430–2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>.
- [140] J.R. Masters, G.N. Stacey, Changing medium and passaging cell lines, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2276–2284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>.
- [141] J. Hwang, D. Choi, S. Han, S.Y. Jung, J. Choi, J. Hong, Potential toxicity of polystyrene microplastic particles, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9>.
- [142] R. Xu, Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential

measurement, *Particuology*. 6 (2008) 112–115.
<https://doi.org/10.1016/j.partic.2007.12.002>.

- [143] M.E. Laboratories, Phenotypic Flexibility and Physiological Tradeoffs in the Feeding and Growth of, 432 (2006) 425–432.

