

**NANOPARTİKÜLLERİN FARE TESTİS
DOKUSUNDA MİTOKONDİRİ STRESİ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİ**

Nazlı Pınar ARSLAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ

Yüksek Lisans Tezi-2015

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOPARTİKÜLLERİN FARE TESTİS DOKUSUNDA
MİTOKONDİRİ STRESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Nazlı Pınar ARSLAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ**

**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NANOPARTİKÜLLERİN FARE TESTİS DOKUSUNDA
MİTOKONDİRİ STRESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Nazlı Pınar ARSLAN

Tez Savunma Tarihi : 06.07.2015

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Bünyami ÜNAL

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Selina AKSAK KARAMEŞE

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM – 2015**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.2. Mitokondriyal Fizyon ve Füzyon	7
2.2.1. Füzyon Proteinleri.....	8
2.2.2. Fizyon Proteinleri	11
2.3. İnfertilite	13
2.3.1. Erkek İnfertilitesi ve Sebepleri	14
2.4. Nanopartiküller ve Uygulama Alanları.....	16
2.4.1. Nanopartikül Çeşitleri.....	16
2.4.2. Metalik Nanopartiküller ve Uygulama Alanları	17
2.4.2.1. Altın Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları	19
2.4.2.2. Gümüş Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları	21
2.4.2.3. Titanyum Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları	22
2.4.3. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri ve İnfertilite İle İlişkisi	22
2.4.4. Nanopartikül Toksisitesi ve Mitokondriyal Fizyon ve Füzyonla İlişkisi	25
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-Pcr).....	26
2.5.1. PCR'nin Bileşenleri ve Temel Aşamaları.....	26

2.5.2. Real Time PCR	30
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları	33
3.1.1. Etik Kurul Onayı.....	33
3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri	33
3.1.3. Çalışmanın Deney Grupları	33
3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Farelere Uygulanması	34
3.4. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Uygulamalar	35
3.4.1. Test Nanopartiküllerin ICP İle Testis Dokusundaki Varlığının Tespit Edilmesi .	35
3.4.3. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	38
3.4.3.1. RNA İzolasyonu	38
3.4.3.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü	39
3.4.3.3. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması	39
GEREKLİ KİMYASALLAR	39
YÖNTEM	39
3.4.3.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR).....	40
3.4.3.5. PCR Protokolü	41
3.4.3.6. Real-Time PCR programı	41
3.4.3.7. Real-Time PCR Sonuçların Değerlendirilmesi.....	42
3.4.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. TESTİSTE AG VE ANATASE TiO2 NANOPARTİKÜLLERİNİN VARLIĞININ BELİRLENMESİ.....	43
4.2. Real-Time PCR Uygulamasından Elde Edilen Bulgular	47

5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	64
EKLER	78
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	78
EK 2. ETİK KURUL FORMU	79

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman desteklerini hissettiğim çok değerli Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Bünyami ÜNAL'a sahip oldukları bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e şükran ve minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince dokulardaki nanopartikül analizi için Prof. Dr. Serdar BİLEN'e, cerrahi uygulamalar sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Orhan AKMAN ve teknisyen Yunus AKTÜRK'e, real-time PCR analizlerindeki yardımlarından dolayı doktora öğrencisi Nurdan GÖNÜL ve yüksek lisans öğrencisi Şeydanur ÇAKIR'a, Real-time PCR sonuçlarının yorumlanmasındaki katkılarından dolayıda Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a, zaman zaman bilgilerinden faydalandığım Arş. Gör. Elif POLAT, Arş. Gör. Erdem TOKTAY ve Arş. Gör. Tuğba BAL'a teşekkürlerimi sunarım. Bahsi geçen süreçte aynı çalışma ortamını paylaştığım, ilgi ve dostluklarını her zaman hissettiğim değerli asistan arkadaşlarım Hilal ATILAY ve Özlem Özgül ABUÇ'a tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Nazlı Pınar ARSLAN

ÖZET

Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Mitokondri Stresi Üzerine Olan Etkileri

Amaç: Gerçekleştirilen çalışmalar Ag (gümüş) ve anataz TiO₂ (tityanyum dioksit) nanopartiküllerinin faydalı yönlerinin aksine akciğer, karaciğer, böbrek, beyin ve kalp gibi organlarda toksik etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, iki nanopartikül tarafından testiste oluşturulan olası mitokondri stresini araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Mevcut çalışma, Ag and anatase TiO₂ nanopartikülleri tarafından testiste oluşturulabilecek olan olası hücre ve mitokondri toksisitesini belirlemek için gerçekleştirildi.

Materyal ve Metot: Deneyler in vivo olarak fareler üzerinde gerçekleştirildi. Toksik etkinin ortaya çıkarılması için spermatolojik parametreler analiz edildi. Mitokondriyal füzyon ve fizyon mekanizmaları üzerindeki olası toksik etkiyi belirlemek için, mitokondriyal fizyon (Drp1) ve füzyon (Mfn1, Mfn2 ve OPA1) ile ilişkili proteinlerin mRNA seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak analiz edildi. Uygulama sonrası nanopartiküllerin testislerdeki varlığı ICP OES spektrofotometre kullanarak belirlendi.

Bulgular: ICP OES spektrofotometresinden elde edilen sonuçlar intravenouz olarak uygulanan nanopartiküllerin testislere geçtiğini gösterdi. Gerçek-zamanlı PCR sonuçları mitokondriyal fizyon ve füzyon genlerinin mRNA seviyelerinin kontrollere oranla yüksek doz Ag (10 mg/kg doku) ve anatase TiO₂ (5 mg/kg doku) uygulanmış gruplarda değiştiğini ortaya çıkardı. Ag gruplarının sperm parametreleri üzerine bir toksik etki yapmamasına rağmen, anatase TiO₂ grubunun sperm hareketini ve velositesini azalttığı görüldü.

Sonuç: Ag ve anatase TiO₂ nanopartikülleri tarafından oluşturulan toksik etkinin mitokondriyal füzyon ve fizyon mekanizmalarını etkileyebileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, mitokondri, nanopartikül, testis, toksik etki

ABSTRACT

Effects of Nanoparticles on Mitochondrial Stress in Mouse Testis Tissue

Aim: The performed studies have shown that Ag (silver) and anatase TiO₂ (titanium dioxide) nanoparticles can cause significant toxic effect in various organs such as liver, lung, kidney, brain and heart in contrast to their beneficial effects. However, there is no study on the possible mitochondria stress in testes caused by these two nanoparticles. The present study was performed to determine the possible cell and mitochondria stress in testis, which may be caused by Ag and anatase TiO₂ nanoparticles.

Materials and Methods: Experiments was performed on mice models in vivo. For the revealing of toxic effect, spermatological parameters were analyzed. To determine a possible toxic effect on mitochondrial fusion and fission mechanisms, mRNA levels of the mitochondrial fission (Drp1) and fusion (Mfn1, Mfn2, OPA1)-related proteins were analysed by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The presence of the nanoparticles in the testes was determined by using ICP OES spectrophotometer.

Results: The results from ICP OES spectrophotometer showed that intravenously-applied nanoparticles passed into testes. The real time-PCR results elucidated that mRNA levels of mitochondrial fusion and fission genes changed at high dose Ag (10 mg/kg tissue) and anatase TiO₂ (5 mg/kg tissue)-treated groups compared to the controls. Although Ag groups did not cause a toxic effect on sperm parameters, it was observed that TiO₂ group decreased the sperm motility and velocity compared to the control. **Conclusion:** It was shown that Ag and anatase TiO₂ NPs-induced toxic effect might affect mitochondrial fusion and fission mechanisms.

Key Words: Gene expression, mitochondria, nanoparticles, testis, toxic effect

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ag	: Gümüş
ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
ATP	: Adenozin trifosfat
cDNA	: Complementer Deoksiribonükleik Asit
CytC	: Sitokrom C
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ICP	: Inductively Couple Plasma spectrophotometer
Drp	: Dinamin ilişkili protein
ER	: Endoplazmik retikulum
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
mff	: Mitokondrial fizyon faktörü
Mfn	: Mitofüzyon
Ni	: Nikel
NPs	: Nanopartiküller
OPA	: Optik atrofi
PCR	: Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen glikol
PIGF	: Plasenta büyüme faktörü
Pt	: Platin
RT-PCR	: Real Time PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TiO₂	: Titanyum Dioksit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör
ZnO	: Çinko oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin temel bileşenleri.	10
Şekil 2.2. Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin mitokondri zarlarında yerleşimi.	11
Şekil 2.3. Mitokondriyal fizyonda Drp1' in yerleşimi.	13
Şekil 2.4. PCR'ın 3 temel aşaması.	30
Şekil 4.1. Ag NPs (Düşük Doz)' nin Mfn1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	48
Şekil 4.2. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin Mfn1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	49
Şekil 4.3. Ag NPs (Düşük Doz)' nin Mfn2' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	49
Şekil 4.4. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin Mfn2' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	50
Şekil 4.5. Ag NPs (Düşük Doz)' nin OPA 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	50
Şekil 4.6. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin OPA 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	51
Şekil 4.7. Ag NPs (Düşük Doz)' nin Drp1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	51
Şekil 4.8. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin Drp1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	52
Şekil 4.9. Anatase TiO ₂ NPs grubunun Mfn1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.....	52

Şekil 4.10. Anatase TiO ₂ NPs grubunun Mfn2' in ekspresyon seviyesi üzerine	
olan etkisi.....	53
Şekil 4.11. Anatase TiO ₂ NPs grubunun OPA1' in ekspresyon seviyesi üzerine	
olan etkisi.....	53
Şekil 4.12. Anatase TiO ₂ NPs grubunun Drp1' in ekspresyon seviyesi üzerine	
olan etkisi.....	54

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Multipleks Real-Time PCR karışımı (25 µl için)	41
Tablo 3.2. Real-Time PCR programında kullanılan sıcaklık döngüsü	41
Tablo 4.1. Fare testis dokusundaki Ag ve TiO ₂ NPs (mg/kg doku) miktarı	43
Tablo 4.2. Ag NPs (Düşük Doz) grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi	45
Tablo 4.3. Ag NPs (Yüksek Doz) grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi	46
Tablo 4.4. Anatase TiO ₂ NPs grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi	47

1. GİRİŞ

Nanopartiküller günümüzde biyoloji ve tıp alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin tıp alanında kullanılmasına nanotıp adı verilmektedir. Metalik nanopartiküllerin en önemlilerini Au (altın), Ag (gümüş), Ni (nikel), Pt (platinyum) ve Ti (titanyum) teşkil etmektedir.^{1,2}

Tıp alanında nanopartiküller duyarlı analizler sağlamak amacıyla biyomarkır tabanlı proteomik ve genomik teknolojilerde, manyetik rezonans, ultrason, floresan, nükleer ve bilgisayarlı tomografi gibi radyolojik alanlarda moleküler görüntüleme amacıyla, ilaç geliştirme sistemleri, hedefe yönelik tedavi, aşı geliştirilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır.³

Nanopartiküllerin tıp alanında kullanımının esas çıkış noktasını ilaçların yada diğer moleküllerin nanopartiküllere bağlanarak belirli hedef doku yada hücrelere taşınması oluşturmaktadır. Tedavi sırasında ilacın sadece hedef organa yönlendirilmesi ve bu sayede diğer organlarda istenmeyen ilaç kaynaklı yan etkilerinin ortadan kaldırılması sağlık açısından çok önem arz etmektedir. Nanopartiküllerde bağlanmış oldukları ilaçları hedef organlara taşıdıklarından dolayı hastalık tedavilerinde daha iyi sonuçlar sağlamaktadır. Bu durum özellikle dokudaki kanserli hücrelere ilaçların spesifik olarak yönlendirilmesinde çok önem arz etmektedir.^{4,5}

Kanser çalışmalarında kullanılan önemli metalik nanopartiküllere altın ve titanyum partikülleri örnek verilebilir.⁶ Altın nanopartikülleri gibi gümüş nanopartikülleride tıbbi çalışmalarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Antibakteriyel özelliğinden dolayı, gümüş nanopartikülleri günümüzde tıbbi aletlerin, evsel eşyaların ve içme sularının dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Yine antibakteriyel özelliğinden dolayı, gümüş nanopartikülleri tekstil endüstrisi tarafından giysiler içerisine yerleştirilmektedir. Diğer taraftan, gümüş nanopartikülleri hızlı sonuç alınması gereken

reaksiyonlar için nanosensör hazırlanmasında kullanılmaktadır.⁷ Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, gümüş nanopartiküllerinin HIV-I enfeksiyonunu da engellediği belirtilmektedir.⁸

Altın ve gümüş nanopartiküllerinde olduğu gibi titanyum nanopartiküllerinin özellikle titanyum dioksit (TiO₂)' in günümüzde çok farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Bu madde gıdalara, boyalara, mürekkeplere, kağıtlara ve diş macunlarına onların renklerini parlaticı olarak eklenmektedir. Diğer bir ifadeyle, renklerin parlaticısı olarak kullanılmaktadır. Bu madde hatta nanopartikül boyutunda kullanıldığında deriyi UV ışınlarına karşı koruma özelliği taşımaktadır. Bu yüzden TiO₂ nanopartikülleri kremlere yada deri tedavisinde kullanılan ilaçlara katılmaktadır.⁹ Hava ve su ortamlarında kirleticilerin remediasyonunda, fotoaktivasyon ve serbest radikal oluşturma özelliği sayesinde de mikroorganizmaların öldürülmesinde kullanılmaktadır.¹⁰ Diğer nanaopartiküllerde olduğu gibi TiO₂' ninde kanser tedavilerinde kullanılan ilaçları (örneğin paklitaksel) hedeflerine başarıyla taşıdıkları belirtilmektedir.¹¹

İnsanlar metalik nanaopartiküllere, onların üretimi, endüstride (besin, kimya v.b) kullanımı, tıbbi çalışmalarda hayvan yada insan modellerine uygulanması sırasında maruz kalabilmektedir. Bu metalik nanopartiküller ise solumum, deri ve kan gibi yolları izleyerek insan vücuduna giriş yaptıktan sonra farklı organ ve dokulara yerleşebilmektedir.¹² Yerleşmeyi takiben, metalik nanopartiküller molekül özellikleri nedeniyle organlarda, dokularda, hücrelerde, organellerde ve enzimler üzerinde istenmeyen toksik etkiler oluşturabilmektedir. Toksik etkiye bağlı olarakta solunum sistemi, kan, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, üreme sistemine ait doku ve organlarda ve cilt üzerinde hasarlar meydana getirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda

metalik nanopartiküllerinin toksik etkisinde onların şeklinin, büyüklüğünün, yüzey yapısının ve yükünün etkili olduğu belirtilmektedir.¹³

Doku yada hücrelerde ortaya çıkan toksik etkiler nukleusun yanısıra mitokondri ve endoplazmik gibi organelleride etkilemektedir. Mitokondri enerji üretimi, hücre farklılaşması ve hücre apoptozisinde görev almaktadır.¹⁴ Hücrede bir çok fonksiyonu yerine getiren, mitokondri dışardan hücreye giren bir çok maddenin olumsuz etkisine son derece duyarlı durumdadır. Özellikle, hücreye giren nanopartiküller oluşturdukları oksidatif stress nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROS) üretmekte ve üretilen ROS' da mitokondri hasarına neden olmaktadır. Dolayısıyla, ROS üretimi nanopartikül stresinin ve mitokondri hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Nanopartikül toksisitesi ROS üretiminin yanısıra mitokondri iç zarında bulunan sitokrom C proteinlerinin salınımında neden olmaktadır. Sitokrom C' de hücrede apoptozisini uyarmaktadır. Apoptos içinde, sitokrom C apoptozda görev alan apoptozom kompleksinin yapısına katılmakta ve kaspaz-9 aktivasyonunu sağlamaktadır. Dolayısıyla, mitokondri hasarına bağlı olarak ROS üretiminin yanısıra apoptozda görev alan Bcl-2, Bax, sitokrom C (CytC), kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin seviyelerinde artış olmaktadır.¹⁴

Yapılan literatür taramasında Ag ve TiO₂ nanopartiküllerinin fare testislerinde toksik etki oluşturduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, bu nanopartiküllerin testislerde oluşturduğu mitokondri stresine ilgili literatürlerde herhangi bir bilgi yer almamaktadır. Bu çalışmanın amacı; iki metalik nanopartikül olan Ag ve TiO₂' in fare testis dokusunda oluşturması muhtemel mitokondri stresini spermatolojik incelemelerin yanısıra Real-Time PCR analizleriyle ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Histolojisi ve Anatomisi

Memelilerde erkek üreme sistemi genital kanallar, yardımcı bezler, iki adet testis ve penisten meydana gelmektedir. Testisin başlıca görevi erkek seks hormonları ve spermatozoa üretmektir.¹⁵

Testisler karın boşluğunun dışında ve skrotum içinde oblik pozisyonda asılı olarak duran bir çift organdır. Ovoid şekilli bu organlar yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda ve 2.5-3.5 cm genişliğinde olup ortalama 20-30 gr ağırlığındadır. Büyüklükleri yaklaşık olarak aynı olsa da sağ testisin ağırlığı sol testisinkinden % 10 kadar daha fazladır. Genellikle sol testis sağa göre 1 cm daha aşağıdadır. Testislerin sıcaklıkları ise vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür. Testisleri en dıştan saran skrotumun kıvrımlı bir kese görünümündedir. Bu kese skrotal septum (septum scrotum) ile iç kısımda iki ayrı bölüme ayrılmakta ve her bölümde bir testis yer almaktadır.^{16,17}

Testislerin facies medialis ve facies lateralis adı verilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior adı verilen iki ucu vardır. Testisin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup periton ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla kaplıdır.^{16,18}

Testisler, embriyolojik gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişir. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle her bir testis kendisiyle birlikte peritonu, tunika vaginalis adı verilen seröz bir kese şeklinde skrotum içine sürükler. Tunika vaginalis dışta parietal, içte visseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albugineayı örter.¹⁷

Testis dıştan içe; tunika vaginalis' in lamina visceralis' i (epiorchium), tunika albuginea ve tunika vasculosa olarak üç tabaka ile sarılıdır. Kalın bir kollajen bağ dokusu özelliğindeki T. albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. T. albuginea ile bağlantılı fibröz septumlar organın derinlerine ilerleyerek bezi yaklaşık 250 piramidal parçaya böler, her bir parçaya testis lobülü adı verilir. Lobüller arasında çoğunlukla iletişim vardır.^{17,19}

Her lobülde 1-4 adet her testiste ise yaklaşık olarak 250-1000 seminifer tübül bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin herbirinin çapı yaklaşık 150-250 µm ve uzunluğu ise yaklaşık 30-80 cm dir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu ise yaklaşık olarak 250 m dir. Testisteki seminifer tübüller ya kör uçludur yada dallara ayrılırlar. Her bir tübül sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller veya tubuli rekti adıyla bilinen kısa kanalcıklar halinde sürer. Bütün lobuluslardan gelen bu kanalcıklar mediastinum'a sokulur ve burada rete testis (Haller ağı) denilen yapıyı oluşturur. Rete testis, 10-20 duktuli efferentes ile epididimin bas kısmına bağlanmıştır. Lobuli testislerde yapılan spermiumlar rete testisten ducctili efferentes testis adı verilen kanallar aracılığıyla epididimise gelir.^{15,19,20}

Seminifer tübüllerin arasındaki boşluğu kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten hücre grupları olan interstisyel (Leydig) hücreleri doldurur. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların üretiminden sorumlu iken leyding hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretmektedir. Leydig hücreleri; yuvarlak, poligonal, merkezi bir çekirdeği bulunan eozinofilik sitoplazmalı ve küçük lipid taneciklerinden zengin hücrelerdir. Tunika albugineanın altında damardan zengin gevşek bir bağ dokusu olan tunika vasküloza yer alır. Tunika vasküloza, tunika albugineanın testis içindeki uzantılarının iç yüzeyini örter ve tunika vasküloza bütün

tübülleri dıştan sarar.^{15,17}

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal membran ve karmaşık bir seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz bağ doku (tunica propria) birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal membrana yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Spermatozoon ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden duktus epididimise ulaşması miyoid hücrelerin ritmik kasılma hareketi ile peristaltik hareketin sağlanması ile gerçekleşir.¹⁷

Seminifer tübül epiteli destek hücreleri (Sertoli hücreleri) ve spermatogenik seri hücrelerinden meydana gelmektedir. Spermatogenik hücreler, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduran 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler, belirli sayıda bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoayı oluşturmaya başlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerini temsil eder. Başlangıçtan bitişe kadar bu olaya spermatogenez adı verilir.¹⁵ Sertoli hücreleri; spermatogenez serisindeki hücreleri saran, bazal membrandan seminifer tübül lümenine doğru uzanan uzun, piramidal hücreler olup, tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yapar.¹⁷

Sertoli hücreleri testiste aşağıda belirtilen görevleri üstlenmektedir.¹⁵

1. Gelişen spermatozoanın desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin ayarlanması.

2. Artık cisimlerin fagositozu

3. Salgı (Protein sentezi, androjen bağlayıcı protein, steroidler, inhibitörler)

4. Antimüllerien hormon yapımı

5. Kan testis bariyeri ve bunun kontrolü

6. Leydig hücreleri ve peritübüler hücrelerin fonksiyonunda parakrin kontrol

7. Germ hücrelerinin lümene doğru pasif hareketlerinin sağlanması (spermiasyon)

8. Spermatogenezin parakrin kontrolü

2.2. Mitokondriyal Fizyon ve Füzyon

Mitokondriler çift zarlı bir yapı özelliğindedir. Dış zarın ortalama olarak yarısını lipidler diğer yarısını ise proteinler meydana getirmektedir. Dış zardaki proteinlerin bir kısmını ise porinler oluşturmaktadır. Kanal görevi gören bu moleküller 10.000 dalton kadar büyüklüğe sahip olan moleküllerin geçişine izin vermektedir. Mitokondrilerin dış zarı gram negatif bakterilerin dış zarına benzerlik göstermektedir. İç zar dış zara oranla çok daha az geçirgen olup, yapısını %20 lipid ve %80 protein oluşturmaktadır. İç zar ayrıca çok sayıda kıvrılma ve katlanma yaparak zar yüzeyinin artmasını sağlamaktadır. Bu katlanmış kıvrımlı yapılara krista adı verilmektedir.²¹

Mitokondri solunum, substrat oksidasyonu, ATP üretimi, apoptozis ve kalsiyum dengesi gibi olaylarda görev alan hücre organelidir.^{21,22} Mitokondrinin bölünmesi olarak ifade edilen fragmentasyon (fizyon) ve iki mitokondrinin birleşmesi anlamına gelen füzyon mitokondri dinamiğinin korunmasını sağlayan iki farklı antognistik olaydır. Hücrelerde mitokondriyal morfoloji, mitokondri dağılımı ve aktivitesi bu olaylarla kontrol edilmektedir. Özellikle mitokondrilerin uzunluğunun, şeklinin, hacminin, hareketinin ve sayısının kontrol edilmesinde fizyon ve füzyon olayları son derece etkin rol üstlenmektedir. Maya ve memeliler üzerinde yapılan çalışmalar yüksek füzyon:fizyon oranına sahip hücrelerin bir kaç tane mitokondri içerdiğini ve bu mitokondrilerinde uzun ve birbirleriyle bağlantılı olduğunu, tam tersine, düşük füzyon:fizyon oranına sahip hücrelerin ise çok sayıda ve küresel yada kısa çubuk şeklinde mitokondrilere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır.²²

Mitokondriyal hareket hücrede mitokondri dağılımı için gereklidir. Çoğu hücrede mitokondri hareketi hücre iskeletindeki yollar üzerinde gerçekleşmektedir. Mayalarda mitokondriyal hareket hücre iskeletindeki aktin filamentler, memelilerde ise hücre iskeletindeki hem aktin filamentler hemde mikrotübüller üzerinde gerçekleşmektedir. Bu yollar üzerinde hareket eden mitokondriler birbirleriyle karşılaştıklarında birleşmekte ve füzyonu meydana getirmektedirler. Mitokondri dağılımında bu yollar önemli iken, mitokondri füzyonunda ve şeklinde her zaman gerekli değildir.^{22,23} Bu iki olayın herhangi birisindeki eksiklik yada anormallik mitokondri hareketini engellemekte yada verimsiz hale getirmektedir. Sinir hücrelerinde mitokondriler hücre gövdesinden daha uzak bölgelere hareket ettiğinden, bu iki olayın gerçekleşmesi özellikle sinir hücrelerinde son derece önemlidir.²⁴

Mitokondriyal füzyon molekülleri ise mitokondri dış zarında yer alan Fis1 ve stoplazmada bulunan Drp1 proteinleridir.²⁵ Son zamanlarda yapılan bir çalışmada memeli mitokondri dış zarında yer alan Mff proteininde füzyon olayında görev aldığını belirtilmiştir.²⁶

2.2.1. Füzyon Proteinleri

Mitokondriyal füzyonda görev alan moleküler mitofusin-1 ve 2 (Mfn1 ve Mfn2) ve OPA1 proteinleridir. Bu moleküllerden Mfn1 ve Mfn2 mitokondri dış zarında, OPA1 ise mitokondri iç zarında yer almaktadır. Memelilerde mitokondriyal dış zarlar arasındaki füzyon genellikle Mfn1 ve Mfn2 ile iç zarlar arasındaki füzyon ise OPA1 ile yürütülmektedir.²⁷

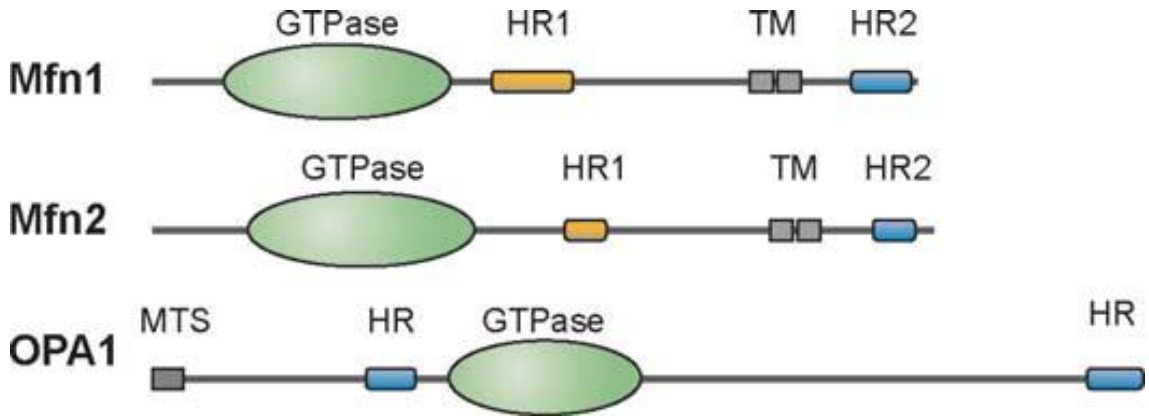
Mfn2 ayrıca endoplazmik retikulumda (ER) da bulunmakta ve büyük ihtimalle ER morfolijisinin kontrolünde ve mitokondri ile bağlantı kurmasında görev almaktadır.²⁸ Mfn1 741, Mfn2 ise 757 aminoasitten meydana gelmektedir. İnsanlarda birbirleriyle ilişkili olan bu iki homolog protein %63 oranında benzerlik göstermekte ve

aynı fonksiyonel domainleri içermektedir. Bu iki protein ortak olarak GTPaz, HR1, HR2 ve TM domainlerini içermektedir. Mfn1' den farklı olarak Mfn2' de prolin aminoasidi bakımından zengin bir domainde bulunmaktadır. Bu proteinler sahip oldukları TM domainleri sayesinde mitokondri dış zarına tutunmaktadırlar. TM domainleri ilk önce dış zara giriş yapmakta daha sonrada U şeklinde dönüş yaparak zardan stoplazmaya doğru uzanmaktadır. Dolayısıyla, bu proteinler her ne kadar mitokondri dış zarında bulunsada dışarı doğru (hücre stoplazmasına) uzantı yapmaktadırlar. Örneğin, bu proteinlerin mitokondri dış zarından dışarı doğru uzanan HR2 domaini birbirine yaklaşmış olan iki mitkondrinin dış zarlarının birbirleriyle bağlantı kurmasını sağlamaktadır. Mfn1 ve Mfn2' nin füzyondaki rolü ise esas olarak GTPAZ domainleriyle açıklanmaktadır. GTPaz domainindeki mutasyonların füzyonu engellediği belirtilmektedir. Mfn1 ve Mfn2' nin memelilerde görevi farelerde gerçekleştirilen hedef mutasyonlarla belirlenmektedir. Mfn1 ve Mfn2' nin eksikliğinde mitokondrial tübül oluşumu ve füzyon gerçekleşmemektedir. Tam tersine, bu iki proteinin aşırı ekspresyonunda da füzyon oluşumunu engellemektedir. Birbirlerine homolog olan bu moleküllerinin herhangi birinin eksikliğinde diğeri füzyon olayını gerçekleştirebilmektedir. Bununla birlikte, fibroblast gibi hücrelerde Mfn1' in daha aktif olduğu belirtilmektedir.^{23,29}

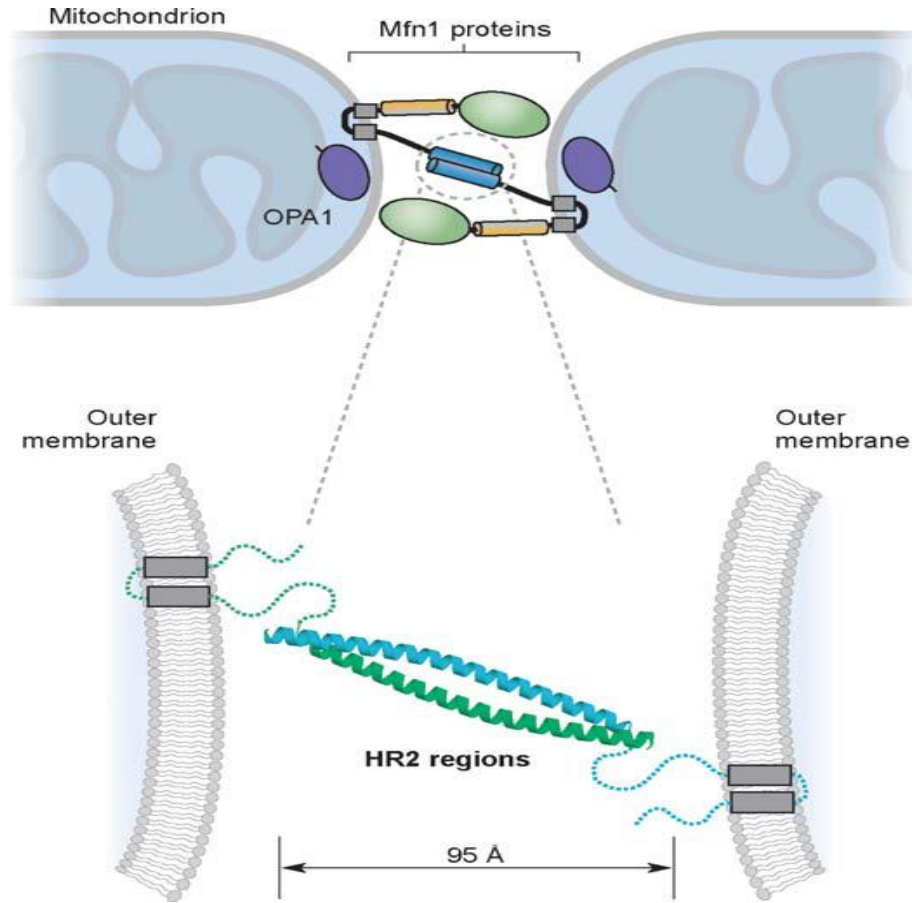
Mfn1' in aksine Mfn2' nin hücrede oksidatif metabolizmada, hücre döngüsü, hücre ölümü, mitokondriyal aksonal taşınma gibi farklı rolleride üstlendiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, mfn2 genindeki mutasyonlar otosomal dominant kalıtım gösteren Charcot-Marie-Tooth 2A gibi nörodejeneratif hasatalıklara neden olabilmektedir. Ayrıca, obezite, diabe ve düz kasların gelişimdeki ananormallikler durumunda bu genin ekspresyonunda azalmalar olduğuda belirtilmektedir.²⁹

OPA 1 genindeki mutasyonlar otozomal dominant kalıtım gösteren optik atrofi

hastalığına neden olduğu için bu gen OPA1 olarak isimlendirilmektedir. İnsan OPA 1 geni mayalardaki Mgm1 (*Saccharomyces cerevisiae*) ve Msp1 (*Schizosaccharomyces pombe*) genleri ile analogdur.³⁰ OPA1 ve homologları mitokondri zarları arasında yer almakta ve mitokondri iç zarına bağlı bulunmaktadır. OPA1 mitokondri füzyonunda ve kristallerin yeniden modellenmesinde görev almaktadır.²⁹ Dolayısıyla, RNA interferens ile bu gen knockdown edildiğinde füzyon gerçekleşmemekte hatta hücreler daha fazla fisyonu uğramaktadır. Ayrıca, bu genin knockdown edilmesine bağlı olarak mitokondrilerin krista yapılarında ciddi anormallikler ortaya çıkmaktadır.^{31,32} Diğer taraftan, yapılan çalışmalarda, OPA1' in baskılanmasına bağlı olarak hücrede apoptozisin aktive edildiği, hücre büyümesinin ve oksijen tüketimin azaldığıda belirtilmektedir. Dahası, bu proteinin otofaji ile birlikte hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasında da görev aldığı açıklanmaktadır.^{29,33,34} OPA1 bütün dokularda eksprese olmasına rağmen, retina, beyin, kalp, iskelet kası ve karaciğerde daha yüksek ekspresyon göstermektedir.²⁹ OPA1 geni ortalama 100 kb büyüklüğünde olup kodlama yapan 30 ekson içermektedir.³⁵ OPA1 geni ekson 4, 4b ve 5b' nin alternatif splayı ile 9 mRNA izoformu meydana getirmektedir. İzoform 1 ve isoform 7 insan ve farele hücrelerinde en sık görülen OPA1 varyantları olup, isoform 1 sadece ekson 4, isoform 7 ise ekson 4 ve 4b' yi içermektedir.²⁹



Şekil 2.1. Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin temel bileşenleri.²⁹



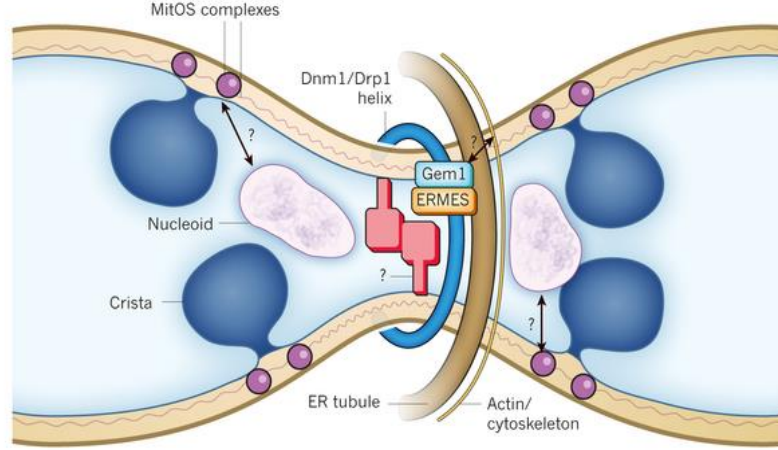
Şekil 2.2. Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin mitokondri zarlarında yerleşimi.²³

2.2.2. Fizyon Proteinleri

Fizyon veya fragmentasyon mitokondrinin bölünmesi anlamına gelmektedir. Mitokondriyal fizyon ilk olarak mayalarda ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra memeli hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, fizyon mekanizmasında görev alan proteinlerin dynamin-ilişkili protein 1 (Drp1), mitokondriyal fizyon protein 1 (Fis1), mitokondriyal fizyon faktörü (mff) ve mitokondriyal dinamik proteinleri (MiD49 and MiD51) olduğu belirtilmiştir.^{26,36} Bu proteinlerden Fis1 mitokondri dış zarında, Drp1 ise stoplazmada yer almaktadır. Ancak, fizyon sırasında Drp1 görev yapmak üzere mitokondri dış zarına giderek bağlanmakta ve bölünmenin gerçekleşeceği yerden mitokondriyi kısıkaç şeklinde sarmaktadır.^{25,37}

Dynamin-ilişkili protein mayalarda Dnm1p, insanlarda ise Drp1 olarak

bilinmektedir. Mayaların fasyon olayında Dnm1p, Mdv1, Caf4, and Fis1 proteinleriyle işbirliği yapmaktadır. Dnm1p' in mitokondriyal fizyon noktasına bağlanması sırasında fis1, Mdv1 ve Caf4 reseptör proteinler olarak görev yapmaktadır. Dnm1p mitokondriye bağlandığında spiraller oluşturarak mitokondriyi sarmakta ve fasyonu gerçekleştirmektedir.^{38,39} İnsanlar dahil memelilerde ise, mitokondri dış zarında bulunan 4 integral proteinin (mff, Fis1, MiD49, MiD51) reseptör görevi yaparak Drp1 proteininin stoplazmadan mitokondri yüzeyine yönelmesine ve buraya bağlanmasına yardımcı olduğu belirlenmiştir. Başlangıçta Drp1 için en gerekli reseptörün fis 1 olduğu belirtilse, daha sonra yapılan çalışmalarda fis1 delesyonu yapılan insan karsinoma hücrelerinde Drp1' in mitokondrilere bağlandığı gösterilmiştir.⁴⁰ Tam tersine, mff knockdown hücrelerde mitokondriyal morfolojide bozulma ve Drp' in mitokondri yüzetine bağlanma oranında azalmalar tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda, mitokondriyal fizyonda Drp1' in aktivitesi için en önemli reseptör proteinin mff olduğunu ortaya çıkarmıştır.^{26,40} Diğer taraftan, MiD49 ve MiD51' in fizyondaki rolü tam olarak açık değildir. Yapılan bazı çalışmalarda, bu iki proteinin fizyona yardımcı olduğu belirtilse bazı çalışmalarda fizyonu engellediği açıklanmaktadır. Örneğin, Palmer et al.⁴¹ çalışmalarında MiD49 ve/veya MiD51 knockdown edilmiş hücrelerde mitokondriyal morfolojide bozulmanın ve mitokondriye Drp1' in bağlanmasında düşüşlerin gözlemlendiğini belirtmiştir. Tam tersine, Zhao et al.⁴² bu proteinlerden MiD51' in Loson et al.³⁶ ise hem MiD49 hemde Mid51' in mitokondriyal fizyona yardımcı olduğunu rapor etmiştir. Drp1 hücre fizyonunda görev alsada bu genin aşırı ekspresyonu sağlıklı hücrelerde mitokondriyal yapıda ve fonksiyonlarda anormalliklere oluşturarak ATP üretiminin inhibisyonuna ve pro-apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olmaktadır.⁴³



Şekil 2.3. Mitokondriyal fizyonda Drp1' in yerleşimi.³⁷

2.3. İnfertilite

Bir yıl içerisinde korunma yöntemi olmadan sürdürülen düzenli bir cinsel yaşama rağmen (ortalama haftada iki kez beraberlik düzenli cinsel yaşam olarak kabul edilir) gebelik oluşmaması durumu infertilite olarak isimlendirilmektedir. Gebelik için hiçbir şansa sahip olmama durumu ise sterilite olarak ifade edilmektedir. Yapılan araştırmalarda, toplumlarda infertilite oranının % 10-15 dolayında olduğu bildirilmektedir.⁴⁴ Çiftlerde daha önce hiç gebelik oluşmamışsa primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın yada sonuçlanmasın en az bir gebelik durumu ortaya çıkmış ise bu durum sekonder infertilite olarak adlandırılmaktadır.⁴⁵

İnfertilite olgularının yaklaşık olarak % 20'si tamamen erkek, % 30-40'ında ise hem erkek hem kadın faktörleri etkili olmaktadır. Sonuç olarak, infertil çiftlerin yaklaşık olarak %50' sinde erkek infertilitesi rol oynamaktadır. Hatta, bazı çalışmalarda infertil çiftlerinin % 30-40'ında sadece erkek faktörünün etkili olduğu belirtilmektedir. Sağlıklı bir çifte gebelik oluşma ihtimali bir ay içerisinde % 20-25, 6 ay içerisinde % 75 ve bir yıl içerisinde ise % 90 olarak belirtilmektedir. Gebeliklerin çoğunun, ovulasyon günü ya da ovulasyondan önceki 6 gün içerisinde bulunan cinsel

ilişkiler neticesi oluştuğu, ovulasyonu takip eden günlerdeki cinsel ilişkilerin ise çok azının gebelikle sonuçlandığı rapor edilmektedir.⁴⁵⁻⁴⁸

Kadınlarda fertilitenin ortalama 25 yaşında en yüksek değere ulaştığı, 35 yaşından sonra kaliteli oosit yapımının giderek azaldığı, 40 yaşından sonra her üç kadından birinin infertil olduğu gözlenmiştir. Erkeklerde ise fertilitenin 20 – 30 yaş aralığında en yüksek seviyeye ulaştığı, 40 yaşından sonra sperm üretiminin azalmasına bağlı olarak fertilitenin azaldığı belirtilmiştir Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksek seviyelerdedir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinsiyette de düşüş göstermektedir.⁴⁵

2.3.1. Erkek İnfertilitesi ve Sebepleri

Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ının sebepleri bilinmesine rağmen bir çoğunda etken ortaya konamamakta ve bu durum idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir.⁴⁹

Erkek İnfertilite Nedenleri

- Sperm ile ilgili problemler

Düşük sperm sayısı

Sperm üretiminde bozukluk (defektif sperm sayısında artış)

Oligospermi (sperm sayısının düşük olması)

Azospermi (sperm bulunmaması)

Seminal kanallarda tıkanıklık

Seminal sıvı bozuklukları

- Isı sperm potansiyelini azaltabilir

Kronik yüksek ateş

Seks öncesi egzersiz

Seks öncesi sıcak banyo

- Sperm kalitesi ya da sayısında düşmeyi genellikle etkileyen nedenler

Alkol

İlaçlar

Esrar

Nikotin

Bazı tıbbi uygulamalar

Pestisitler

Kurşun

Kronik alkolizm

- Belirli hormonal bozukluklar sperm kalitesini etkiler

Hipofiz bozuklukları

Feminizasyon

- Testiküler bozukluklar sperm üretimini etkiler

Testiküler vein varikozu

Testiküler hasar

Testiküler tümör

Varikozel

Testikül anomali

İnmemiş testis (çocuklukda başarılı şekilde müdahale edilmemişse)

Testiküler burulma

Kabakulak

Radyasyona maruz kalma

- Testiküler kanalın bloke olması (sperm salınımını etkiler)

Testiküler kanalda kızıl (scarring)

Cinsel yolla bulaşan hastalıklar

Gonera

Klamidya

Genital kanal anomalisi

- Retrograd ejakülasyonu (mesaneye ters ejakülasyon-çeşitli nedenlerden dolayı oluşabilir)

Prostat cerrahisi

- Ejakülasyonun oluşmaması (çeşitli nedenlere bağlı olabilir)

İktidarsızlık (impotens)

Erektile disfonksiyon

Diabet

Prostat cerrahisi

Üretra cerrahisi

Kan basıncı ile ilgili uygulamalar

- Kalıtsal gen hastalıkları ve kromozom bozuklukları

Klinefelter Sendromu, XX erkek, XYY sendromu, Turner sendromu, Y kromozom mikrodelsyonları, Myotonik distrofi, Hemokromatozis, Orak hücre anemisi, Germ hücre aplazisi (SCOS: Sertoli cell only sendromu).^{44,49}

2.4. Nanopartiküller ve Uygulama Alanları

2.4.1. Nanopartikül Çeşitleri

Nanometre, metrenin milyarda biri kadar olan ölçü birimidir ve yaklaşık olarak on atomluk bir genişliği kapsamaktadır. 1-100 nm büyüklüğünde olan ve en az bir boyuta sahip olan maddelere ise nanopartikül adı verilmektedir. Nanopartiküller farklı şekillerde ve büyüklüklerde, tek veya çok elementli, atomik veya moleküler yapıda olabilmektedirler.⁵⁰ Nanopartiküller ise kendi arasında temel olarak organik ve inorganik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Organik nanopartikülleri lipozom, dekstran,

alginat, kitoson, polietilen glikol, dendrimerler ve karbon nanomateryalleri meydana getirmektedir. İnorganik nanometaryelleri ise quantum dotslar (2-10 nm büyüklüğünde kristaller), manyetik (Fe^{+2} ve Fe^{+3}) ve metalik nanopartiküller oluşturmaktadır. Metalik partiküllerin en önemlilerini Au, Ag, Ni, Pt ve TiO_2 teşkil etmektedir.^{1,2}

2.4.2. Metalik Nanopartiküller ve Uygulama Alanları

Nanopartiküller günümüzde biyoloji ve tıp alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin tıp alanında kullanılmasına nanotıp adı verilmektedir.^{4,5}

Tıp alanında nanopartiküller duyarlı analizler sağlamak amacıyla biyomarkır tabanlı proteomik ve genomik teknolojilerde, manyetik rezonans, ultrason, floresan, nükleer ve bilgisayarlı tomografi gibi radyolojik alanlarda moleküler görüntüleme amacıyla, ilaç geliştirme sistemleri, hedefe yönelik tedavi, aşı geliştirilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır.³

Nanopartikülleri tıp alanında kullanışlı yapan bir çok özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri diğer partiküllere oranla yüzey/kütle oranlarının, moleküllere (ilaçlar, proplar ve proteinler) bağlanma ve onları taşıma kapasitelerinin daha yüksek olmasıdır. Nanopartiküller ayrıca küçük olduklarından hücre zarlarından kolaylıkla geçebilmekte ve bazıları hücrenin fagositik sindirim mekanizmalarından kaçabilmektedir.^{4,5,51} Nanopartiküllerin tıp alanında kullanımının esas çıkış noktasını ilaçların yada diğer moleküllerin nanopartiküllere bağlanarak belirli hedef doku yada hücrelere taşınması oluşturmaktadır. Tedavi sırasında ilaın sadece hedef organa yönlendirilmesi ve bu sayede diğer organlarda istenmeyen ilaç yan etkilerinin ortadan kaldırılması sağlık açısından çok önem arz etmektedir. Nanopartiküllerde bağlanmış oldukları ilaçları hedef organlara taşıdıklarından dolayı hastalık tedavilerinde daha iyi sonuçlar sağlamaktadır. Bu durum özellikle bir dokudaki kanserli hücrelere ilaçların spesifik olarak yönlendirilmesinde çok önem arz etmektedir.^{4,5} Örneğin, nanopartiküllere

bağlanmış olan bir kanser ilacı olan paklitaksel' in gerek in vitro çalışmalarda gerekse in vivo hayvan modelleri üzerinde daha fazla teröpatik etki gösterdiği belirtilmektedir.⁵² Kanser hücrelerini besleyen kılcalların zayıf çeperli ve büyük porlu olması nanopartiküllerin kanser hücrelerine daha kolay yönlendirilmesinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Kanser hücreleri hızlı çoğaldıklarından dolayı bunları besleyen kılcalarında çeperleri zayıf kalmaktadır. Bu yüzden, normal hücre kılcalarındaki geçitlerin çapı 5-10 nm kadar düşük kalırken, kanserli hücrelerin kılcalarındaki geçitlerin çapı 100 nm nin çok daha üzerinde olabilmektedir. Büyük geçitlere sahip kılcallarda ilaç taşıyan nanopartiküller kolaylıkla girerek kanserli hücrelere ulaşmaktadır. Dolayısıyla, aynı doku içerisinde normal hücrelere oranla kanser hücresine daha fazla nanopartikül yerleştirilebilmektedir. Diğer taraftan, normal hücrelerin aksine kanser hücrelerinde lenf sisteminin etkin bir şekilde çalışmadığı ve makromoleküllerin kanserli hücrelerde tam olarak yıkılamadığıda bilinmektedir. Yıkılamayan makromoleküller ise kanserli hücrede birikmektedir. Kanserli hücrelerin lenfematik sisteminin düzgün çalışmaması durumundan faydalanılarak nanopartiküller kanserli hücreler içerisinde daha uzun süre kalabilmektedir. Bu durum ise nanopartiküllere bağlı ilaçların kanserli hücreler içerisinde daha uzun süre aktivite göstermesini sağlamaktadır.⁵³ Hatta bazı çalışmalarda, metalik partikül ve ilaçtan oluşan ikili kompleks polietilen glikol gibi bir üçüncü maddeye tutturulduktan sonra hedef dokuya yöneendirilmektedir. Polietilen glikol ise vücudun savunmasından sorumlu olan retikuloendotelial sisteminin makrofajlarından kaçabildiğinden dolayı nanopartikülleride savunma sistemlerinden koruya bilmektedirler. Bu şekilde nanopartikül komplekslerinin kan dolaşımında yada hedef dokuda daha uzun süre kalması ve daha uzun süre aktivite göstermesi sağlanmaktadır.¹¹

Kanser tedavilerinde kemoteropatik ilaçları taşıyan en önemli nanopartiküllere

lipozomlar ve albümin örnek verilebilir. Lipozomlar tek veya çok katlı doğal veya sentetik lipitlerden oluşan küresel şekilli materyallerdir. Lipozomlar hidrofilik özelliğe sahip ilaçları merkezinde hidrofobik olanları ise lamellerinde taşıma özelliğine sahip olduklarından mükemmel taşıyıcılar olarak kabul edilmektedirler. Albümin ise hidrofobik kemoteropatik taşıma özelliğine sahip nanopartiküldür. Kanseri tedavilerinde lipozomlar özellikle doksorubisin, albümin ise paklitakselin' in taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır.⁵³

2.4.2.1. Altın Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları

Kanser çalışmalarında kullanılan diğer önemli nanopartiküllere metalik altın ve titanyum partikülleri örnek verilebilir.⁶ Altın'ın tıbbi çalışmalarda kullanımı çok eski tarihlere kadar gitmektedir. Örneğin, altının tedavi amaçlı olarak kullanımı Çin'de M.Ö 2500' lü yıllara kadar uzanmaktadır. Eski tarihlerde, batı dünyasında altın sinirsel hastalıklarda yatıştırıcı olarak kullanılmıştır. Altın 16. yüzyılda epilepsi, 19.yüzyılda ise sifilis hasatlığının tedavisinde kullanılmıştır. Yine geçmişten başlayarak günümüze kadar altının farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.⁵⁴

Altın nanopartikülleri günümüzde kanser hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu nanopartiküllerin kanser tedavisinde ise iki farklı uygulama şekli olmaktadır. Birincisinde bu nanopartiküller antikanser özelliğe sahip olan ilaçlara bağlanarak onları spesifik olarak kanserli hücrelere taşımaktadır.⁵⁵ Bu sayede ise ilaçların normal hücrelerdeki olası toksik etkisi azaltılmaktadır. Örneğin, insan tümör nekrosis factor- α (TNF- α) kanser hücrelerine karşı etkili bir şekilde kullanılan bir ilaçtır. Bununla birlikte, bu biyolojik ajanın normal hücreler üzerinde toksik etki yaptığı belirtilmektedir. Bu ajanın altın nanopartiküllerine bağlanması ve daha sonrada kanserli hücrelere yönlendirilmesi sayesinde TNF' nin kanserli hücreler üzerindeki

antikanserojen etkisinin arttığı tam tersine normal hücreler üzerindeki toksik etkisinin ise azaldığı tespit edilmiştir.⁵⁶ İkinci durumda ise altın nanopartikülleri sadece kendileri ilaç olarak kullanılmaktadır. Yönlendirilmiş oldukları hücrelerde bazı biyolojik moleküllere bağlanarak onların aktivitelerini etkilemek suretiyle antikanserojen etki göstermektedirler.⁵⁵ Örneğin, VEGF ve VPF endotelial hücrelerinin mitoz yeteneğini artırmak suretiyle angiogenezi (yeni damar oluşumu) sağlayan moleküllerdir. Hastalıklı dokuya verilen altın nanopartiküllerde VEGF ve VPF moleküllerine bağlanarak onları inhibe etmektedir. Dolayısıyla, altın nanopartikülleri aracılığıyla kanser hücrelerinde angiogenesis engellendiğinde kanser hücrelerini besleyen damarlar oluşmamakta ve kanser hücreleri yok olmaktadır.⁵⁷

Yine, radyoterapide tek başına kullanılan altın radyoizotopları kanserli hücrelerinin yok edilmesinde başarıyla uygulanmaktadır. Dokuya uygulanan radyoaktif altın partikülleri lösemi, ovaryum, bronş, boyun ve baş kanserlerinin tedavisinde tumor hücrelerini yok ettiği açıklanmaktadır.⁵⁵ Altın nanopartikülleri hyperthermia (aşırı ısıtma) adı verilen yöntem sayesinde de kanser tedavilerinde başarıyla kullanılmaktadır. Hyperthermia yönteminin esasını bir dokudaki kanserli hücreleri 42 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda ısıtarak ortadan kaldırmak oluşturmaktadır. Normal hücrelere oranla, kanser hücreleri sıcaklık değişimlerinden daha fazla etkilenmektedir. Sıcaklıktaki artışta kanserli hücrelerdeki prokaspaz ve Bax gibi apoptozda görev alan proteinleri uyarmaktadır. Bu proteinlerin teşvik edilmesiyle kanser hücreleri apoptoza daha hızlı girerek yok olmaktadır.⁵⁸ Hyperthermia'da altın nanopartiküllerinin kullanılırken onların yüksek ısı iletkenliğinden faydalanılmaktadır. Bu yöntemde altın nanopartikülleri dokudaki kanserli bölgeye yerleştirilmektedir. Ardından elektromanyetik dalgalar dokuya yönlendirilmektedir. Altın nanopartikülleri elektromanyetik dalgaları daha fazla absorblama yeteneğine sahip olduğundan dolayı

daha fazla ısınmaktadır. Dolayısıyla, dokuda ısınma olayı altın nanopartiküllerinin olduğu bölgede yani kanserli hücrelerde daha fazla olmaktadır. Bu şekilde kanser hücrelerinde altın nanopartikülleri kullanılarak bölgesel hyperthermia uygulaması başarıyla uygulanmaktadır.⁵⁵ Kanserın yanı sıra günümüzde altın nanopartikülleri tek başına arthritis (kireçlenme) tedavisinde de kullanılmaktadır.⁵⁹ Altın nanopartikülleri ayrıca tıpta gen terapisinde, biyosensör geliştirilmesinde, enzimlerin immobilizasyonunda ve hücre görüntüleme çalışmalarında, endüstride ise su ve hidrojen saflaştırmasında, kirlilik kontrolünde ve karbonmonoksit oksidasyonunda kullanılmaktadır.¹²

2.4.2.2. Gümüş Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları

Altın nanopartikülleri, gibi gümüş nanopartikülleride tıbbi çalışmalarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Gümüş 17 ve 18. yüzyılda ülser, 19. yüzyılda yanık tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde, gümüş sulfadiazine içeren silvazine biosit, silverex ise antibakteriyel madde olarak kullanılmaktadır. Yine, gümüş nitrat içeren flammazine antibakteriyel ilaç olarak uygulanmaktadır. Gümüşün antibakteriyel veya anitimikrobiyal etkisi ise gümüşün DNA bazlarının fosfor gruplarına bağlanarak replikasyonu inhibe etmesi yada sülfür içeren enzimlere bağlanarak bu enzimlerin inaktive edilmesi şeklinde gerçekleşmektedir.^{54,60} Antibakteriyel özelliğinden dolayı, gümüş nanopartikülleri günümüzde tıbbi aletlerin, evsel eşyaların ve içme sularının dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Yine antibakteriyel özelliğinden dolayı, gümüş nanopartikülleri tekstil endüstrisi tarafından giysiler içerisine yerleştirilmektedir. Diğer taraftan, gümüş nanopartikülleri hızlı sonuç alınması gereken reaksiyonlar için nanosensör hazırlanmasında kullanılmaktadır.⁷ Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, gümüş nanopartiküllerinin HIV-I enfeksiyonunuda engellediğide belirtilmektedir.⁸

2.4.2.3. Titanyum Nanopartikülleri ve Uygulama Alanları

Altın ve gümüş nanopartiküllerinde olduğu gibi titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküllerinde günümüzde çok farklı kullanım alanları bulunmaktadır. TiO_2 sentetik olarak üretilen beyaz renkli bir maddedir. Bu madde gıdalara, boyalara, mürekkeplere, kağıtlara ve diş macunlarına onların renklerini parlaticı olarak eklenmektedir. Diğer ifadeyle renklerin parlaticısı olarak kullanılmaktadır. Bu madde hatta nanopartikül boyutunda kullanıldığında deriyi UV ışınlarına karşı koruma özelliği taşımaktadır. Bu yüzden TiO_2 nanopartikülleri kremlere yada deri tedavisinde kullanılan ilaçlara katılmaktadır.⁹ Hava ve su ortamlarında kirlileticilerin remediasyonunda, fotoaktivasyon ve serbest radikal oluşturma özelliği sayesinde de mikroorganizmaların öldürülmesinde kullanılmaktadır.¹⁰ Diğer nanopartiküllerde olduğu gibi TiO_2 ' ninde kanser tedavilerinde kullanılan ilaçları (örneğin paklitaksel) hedeflerine başarıyla taşıdıkları belirtilmiştir.¹¹ Örneğin, yapılan bir çalışmada beyindeki kanser hücrelerinin reseptörüne spesifik olarak bağlanma özelliğine sahip olan bir antibiyotik TiO_2 nanopartiküllerini bağlamış ve bu ikili yapıyı beyindeki kanser hücrelerine yönlendirmiştir. TiO_2 nanopartikülleri bu hücrelere ulaştığında ışığın etkisiyle serbest radikal oluşturarak, kanser hücrelerinin mitokondrilerini inaktif hale getirmiş ve kanserli hücreyi yok ettiği gözlenmiştir.⁶¹

2.4.3. Nanopartiküllerin Toksik Etkileri ve İnfertilite İle İlişkisi

İnsanlar metalik nanaopartiküllere, onların üretimi, endüstride (besin, kimya v.b) kullanımı, tıbbi çalışmalarda hayvan yada insan modellerine uygulanması sırasında maruz kalabilmektedir. Bu metalik partiküller ise solumum yolu, deri ve kan gibi yolları izleyerek insan vücuduna giriş yaptıktan sonra farklı organ ve dokulara yerleşebilmektedir.¹² Yerleşmeyi takiben, metalik nanopartiküller molekül özellikleri nedeniyle organlarda, dokularda, hücrelerde, organellerde ve enzimler üzerinde

istenmeyen toksik etkiler oluşturabilmektedir. Toksik etkiye bağı olarakta solunum sistemi, kan, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, üreme sistemine ait doku ve organlarda ve cilt üzerinde hasarlar meydana getirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda metalik nanopartiküllerinin toksik etkisinde onların şeklinin, büyüklüğünün, yüzey yapısının ve yükünün etkili olduğu belirtilmektedir.^{7,13}

Yürütülen in vivo çalışmalarda altın nanopartiküllerinin incebarsağı geçerek kana beyne, kalbe, dalağa, akciğere, karaciğere, böbreğe ve mideye ulaşabileceği belirtilmektedir.⁶² Balıklarda yapılan bir çalışmada bu partiküllerin balık emriyolarının içerisine girerek toksik deformasyonlar gösterdiği açıklanmıştır.⁶³

Gümüş nanopartiküllerinin toksik etkisi esas olarak bu partiküllerin reaktif oksijen türlerini oluşturma, sitokin salınımına ve ısı şoku proteinlerinin aşırı uyarılmasına neden olma özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Yine, bu nanopartiküller hücre döngüsünü bozan ve DNA hasarı oluşturan apoptosis ve nekrosis olaylarında sebep olarak toksik etki gösterebilmektedir. Dahası, bu gümüş nanopartikülleri oksidatif stressle ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde de değişimlere neden olarak hücrelerde toksik etki oluşturabilmektedir.⁶⁴ Gümüş nanopartikülleri vucüt savunma sisteminde görev alan fagositlerden kolaylıkla kaçabildiğinden kana ve oradan beyindeki sinir sistemine kolaylıkla ulaşabilmektedir. Bazı çalışmalarda, sinir sistemine ait dokuların yada hücrelerin görüntülenmesinde kullanılan gümüş nanopartiküllerinin oksidatif stres ve ROS oluşturarak Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları artırabileceği açıklanmıştır.¹³

Fare modellerinde yapılan çalışmalarda, ağızdan alınan TiO₂'in akciğer, karaciğer, dalak ve peritoneal organlara yerleştiği belirlenmiştir.⁶⁵ 19-21 nm büyüklüğündeki TiO₂ Nanopartiküllerinin fare akciğerlerinde, alveolar septaların parçalanmasına, alveollerin büyümesine, tip II alveolar pnemosit çoğalmasına yol

açarak emphysema (anfizem) adı verilen solunum yolu hastalığını oluşturduğu açıklanmıştır. Hastalığın önemli belirteçleri olarak hücre döngüsü, apaoptozis ve kemokinez yollarındaki bir çok enzimatik yolun aktif olduğu genetik ve moleküler analizlerle ortaya çıkarılmıştır. Özellikle, solunum yolu anfizeminin oluştuğunun bir işareti olan plesenta büyüme faktörü (PIGF) ve kemokinezde rol alan CXCL1, CXCL5 ve CCL3 genlerinde aşırı ekspresyon gözlemlenmiştir.⁶⁶ TiO₂ nanopartiküllerin, fare modellerinde DNA hasarına (DNA kırıklarına ve delesyonuna), mikronükleus ve 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine oluşumuna ve yüksek ateşe neden olduğu belirtilmiştir. Hatta bu partiküllerin farelerin solunum yollarında kansere neden olduğu açıklanmıştır.⁹ Ayrıca, serbest radikal oluşturduğundan beyin ve bronş gibi biyolojik hedeflerde oksidatif hasarlara neden olduğu açıklanmıştır.^{10,67} Jin et al.⁶⁸ TiO₂ nanopartiküllerinin fibroblast hücrelerinde toksik etki göstererek organel hasarlarına ve nekrozise neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yapılan başka bir çalışmada damardan verilen TiO₂ nanopartiküllerinin kan hücrelerinde ve plazmadaki toksisitesinin az ancak akciğer, karaciğer ve böbrekteki toksisitesinin çok fazla olduğu belirtilmiştir.⁶⁹

Nanopartiküllerin toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında ise bu nanopartiküller zaman zaman polietilen glikol (PEG), fosfotidilkolin, cetiltrimetilammonyum bromid gibi yüzey modifiye edici maddelerle dıştan sarılmaktadır. Bu maddelerle kaplanmış olan netalik nanopartiküllerin ise toksik etkisinin son derece azaldığı belirtilmektedir.⁷⁰

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, nanopartiküllerinde erkek ve dişi infertilitesi üzerinde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin, Gromadzka-Ostrowska et al.⁶⁴, damar yoluyla verilen gümüş nanopartiküllerinin testilerdeki epididimal spermiler üzerindeki olası toksik etkisini araştırmış ve çalışmalarının sonucunda bu partiküllerin germ hücrelerinde toksik etkiği yaptığını, sperm sayısını azalttığını,

anormal sperm oluşumuna ve sperm hücrelerinde DNA hasarına neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Asare et al.⁷¹ AgNPs (gümüş) ve TiO₂-NPs (titanyum) nanopartiküllerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak DNA kırıklarına, apoptoza ve nekroza neden olduğunu ve bu yüzden testislerde toksik etki oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. Bir başka çalışmada, TiO₂ nanoprtiküllerinin testiste testosteron üretiminden sorumlu olan leyding hücreleri üzerinde in vitro ortamda toksik etkisi araştırılmış ve bu partiküllerin leyding hücre hatları (TM3)' nın canlılığı ve proliferasyonu üzerinde inhibisyon etkisi oluşturduğu tespit edilmiştir.⁷² Gao et al.⁷³ fare ovaryum dokusunda TiO₂ nanopartiküllerinin, mineral element ve sex hormonlarının dağılımını dengesizleştirmenin yanısıra oksidatif hasara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır.¹² Wiwantitkit et al.⁷⁴ altın nanopartiküllerini sperma örneklerine in vitro koşullarda uygulamış ve uygulama sonrasında hareketli sperm oranının %25 oranında azaldığını, bu nanopartiküllerin spermelerin baş ve kuyruk kısımlarına nüfuz ettiğini rapor etmiştir. Yine, silica nanopartiküllerinin fare spermeleri için toksik etki oluşturduğu belirtilmiştir.⁷⁵ Barkhordari et al.⁷⁶ ZnO NPs (çinko oksit) nanopartiküllerinin *in vitro* koşullarda, insan spermi üzerinde toksik etki gösterdiğini ve yüksek nanopartikül konsantrasyonlarında toksisitenin daha fazla ortaya çıktığını rapor etmiştir.

2.4.4. Nanopartikül Toksisitesi ve Mitokondriyal Fizyon ve Füzyonla İlişkisi

Doku yada hücrelerde ortaya çıkan toksik etkiler nukleusun yanısıra mitokondri ve endoplazmik gibi organelleride etkilemektedir. Mitokondri enerji üretimi, hücre farklılaşması ve hücre apoptozisinde görev almaktadır.¹⁴ Dolayısıyla, mitokondri dışardan hücreye giren bir çok maddenin olumsuz etkisine duyarlı durumdadır. Özellikle, hücreye giren nanopartiküller oluşturdukları toksik etki nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROS) üretmekte ve üretilen ROS' da mitokondri hasarına neden olmaktadır. Mitokondride meydana gelen hasarlar apoptoz mekanizmasını aktif ederek

hücre ölümüne neden olmaktadır. Dolayısıyla, mitokondri hasarına bağlı olarak apaoptozda görev alan Bcl-2, Bax, sitokrom C (CytC), kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin seviyelerinde artış olmaktadır.¹⁴

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-Pcr)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) herhangi bir organizmaya ait DNA veya cDNA üzerinde seçilen bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlarda çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir DNA sentez yöntemi olup çok kısa bir zaman içerisinde DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını yapan bir tekniktir.⁷⁷ Yüzyılın en önemli buluşlarından olan PCR ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, PCR yöntemi temel moleküler biyoloji araştırmalarında (klonlama, dizi analizi ve haritalaması) ve bir çok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrosis, AIDS, lösemi vb) DNA temelli tanısı içinde klinik tıpta kullanılmaktadır. Diğer taraftan, günümüzde, PCR yöntemi allelik dizi varyasyonlarının gösterilmesi, doku transplantasyonu için doku tiplerinin belirlenmesi, adli-tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbi çalışmaların yanı sıra tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evölüsyon çalışmalarında (canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) da kullanılmaktadır.⁷⁸

2.5.1. PCR'nin Bileşenleri ve Temel Aşamaları

PCR reaksiyonunda çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin iki ucuna özgü primerler kullanılarak, bu bölgenin DN'sının suni olarak sentezlenmektedir. Yöntemin işleyiş mekanizması temel olarak DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), ardından primerlerin (sentetik oligonükleotidler) hedef DNA'ya bağlanması (annealing), sonra zincirin uzaması (extension) ve bu döngülerin belirli bir sayıda tekrarlanması oluşturmaktadır. Ardarda tekrarlanan bu döngüler

sayesinde DNA parçaları üssel olarak artmaktadır. Reaksiyon karışımında kullanılan temel bileşenleri ise kalıp DNA (template), primerler, nükleotidler (dNTP), DNA Polimeraz Enzimi, Tampon çözelti (Buffer) ve Magnezyumdan ($MgCl_2$ veya $MgSO_4$) oluşturmaktadır. Kullanılan bu temel bileşenlerin miktarı ve kaliteside reaksiyon sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. DNA polimerazlar karışımdaki nükleotitleri (adenine, guanine, sitozin ve timin) kalıp DNA dizisine göre primerlerin 3' hidroksil ucuna ekleyerek yeni zincirin sentezini ve uzamasını sağlamaktadır.⁷⁸⁻⁸⁰

PCR' de genomik DNA' lar, plasmid ve faj DNA' ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılmaktadır. PCR' de kalıp olarak tek yada çift iplikli DNA' nın yanı sıra RNA' da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA' dan klasik yolla cDNA elde edilir. Diğer bir yaklaşımda ise *Thermus thermophilus* kaynaklı Tth DNA polimeraz enzimi kullanımıyla aynı tüpte RNA' dan DNA ürünü tek kademede elde edilebilir. Eğer yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA kalıp olarak kullanılacaksa, bu DNA kısmı kesim yapan restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra PCR2 de kullanılmalıdır. DNA polimeraz olarak sıcaklığa dayanıklı termostabil özelliğe sahip olan *Thermus aquaticus*' dan elde edilen Taq DNA polimeraz kullanılmaktadır. PCR' de kullanılan primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotit özelliğindeki bu primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak temin edilmektedir. Primer sentezi yapılırken çoğaltılması istenilen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınmaktadır. Yine PCR' de kullanılan nükleotitlerde ticari olarak temin edilmekte ve PCR reaksiyonu sırasında kullanılacak olan dNTP (nükleotit) konsantrasyonu optimize edilmektedir.⁷⁸ PCR çalışmaları sırasında kullanılan magnezyum iyonlarının ve Taq DNA polimeraz konsantrasyonunun yanısıra tampon koşullarında PCR verimini etkilediği belirtilmektedir. Polimerazların tipine bağlı olarak optimal Mg^{2+} konsantrasyonu

farklilik gösterebilmektedir. Örneğin Taq polimerazlar için optimal Mg^{+2} konsantrasyonu 1,5-2 mM iken Klentaq DNA polimerazlar optimal Mg^{+2} konsantrasyonu 3-4 mM arasında değişmektedir. Bu yüzden kullanılan DNA polimeraza göre PCR karışımındaki optimal Mg^{+2} konsantrasyonunun doğru olarak seçilmesi önem arz etmektedir.⁸¹

PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren thermocycler adı verilen PCR cihazlar yardımıyla sağlanmaktadır. Günümüzde farklı firmalar tarafından sıcaklık, inkübasyon süresi ve siklus sayısının programlanabildiği thermocycler cihazları ticari olarak sunulmaktadır. Thermocycler cihazlarına değişik hacim ve sayıdaki eppendorf tüpleri yerleştirilebilmektedir. Bu cihazlarda sıcaklık 4 ile 100°C'ler arasında programlanabilmekte ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle 4°C' ye ayarlanarak eppendorf tüpleri uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir.⁸²

PCR' nin temel aşamaları

a)Hedef DNA'nın Denatürasyonu: PCR' de tek zincirli DNA kalıplarına ihtiyaç duyulduğu için bu aşamada çift zincirli DNA kalıbının denaturasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu aşamada istenilen denaturasyon sağlanamazsa bir diğer fiadeyle denatürasyon verimi düşük olursa kısmen denature olmuş kompleksler tekrar bir araya gelerek primerlerin bağlanmasını ve sentezlenecek olan DNA' nın uzamasını engellemektedir. Her PCR siklusunun başlangıcında oluşan yeni DNA ların denature edilmesi gerekmektedir. Protokolllerde genellikle 94°C'lik bir denaturasyon sıcaklık kullanırken GC nükleotitlerince DNA kalıplarında daha yüksek sıcaklıkların uygulanması gerektiği belirtilmektedir.⁸³ Denaturasyon sırasında bütün gerekli materyaller gerekli miktarlarda mikrofij tüplerine konduktan sonra PCR cihazının (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilmektedir.⁷⁷

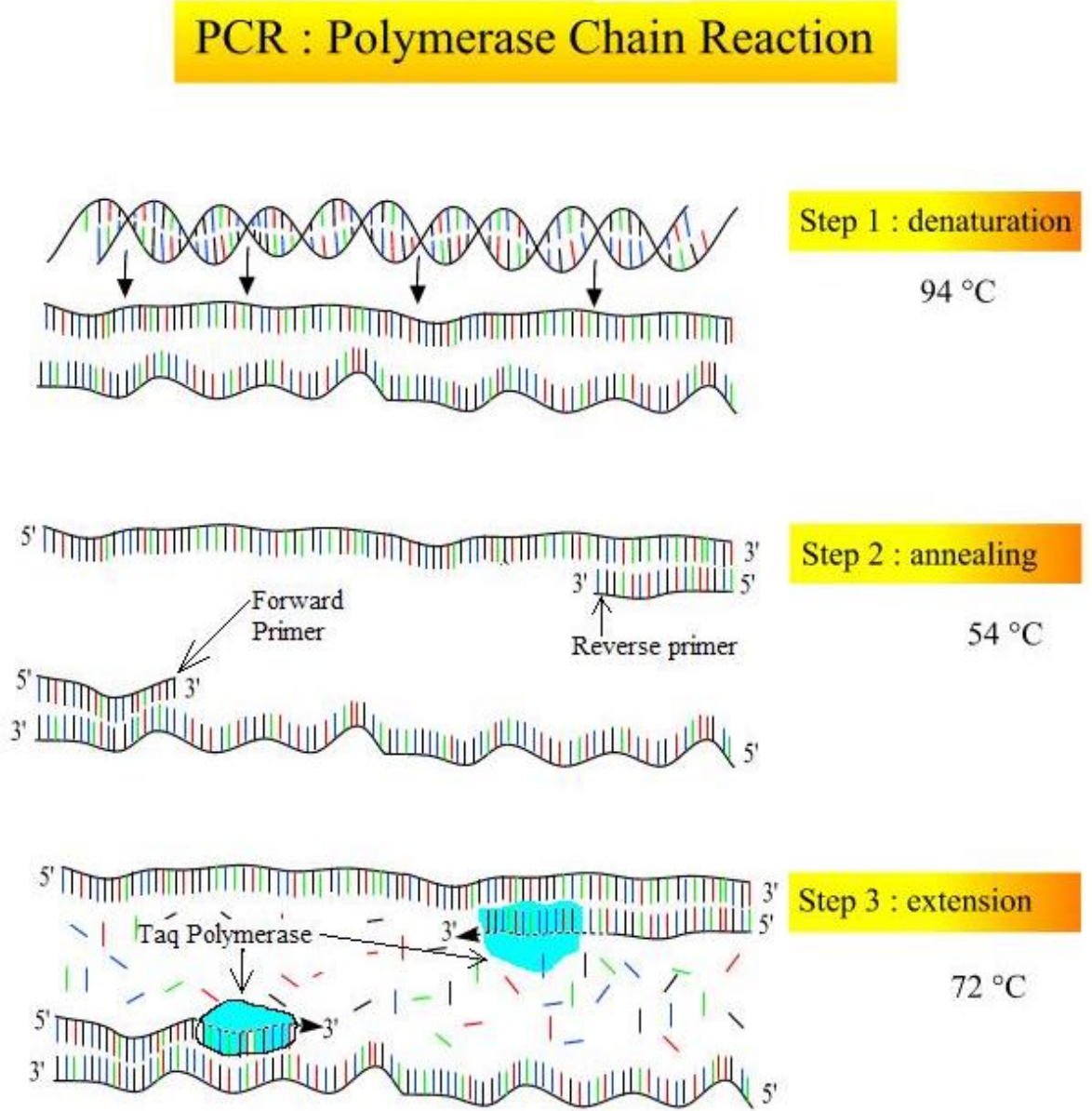
b)Primerlerin Bağlanması (Annealing):

Kalıp DNA' ya primerlerin bağlandığı aşamadır. Reaksiyon karışımı, primerlerin erime sıcaklığının 5 °C altına kadar soğutulur ve primerler kalıp DNA' da kendilerine komplementer olan bölgelere bağlanır. Bu sıcaklığın çok yüksek olması durumunda primer bağlanması zayıf olurken çok düşük sıcaklıkta ise spesifik olmayan bağlanmalar meydana gelir. Bu yüzden bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi önemlidir.⁸⁴ Annealing sırasında cihazın ısısı genellikle 50-52 °C ye ayarlanır. Bu aşamada primerlerden biri kendine ait 5'-terminali ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'→3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder.⁷⁷

c) Uzama basamağı (ekstensiyon, polimerizasyon): Bu aşamada polimeraz enzimi aracılığıyla oligonükleotit primerlerin uzayarak DNA' nın amplifiye edildiği basamaktadır DNA polimerazın çalışma yönü 5'→3' olup ortamdaki nükleotidleri kullanarak primerlerin 3'-terminaline nükleotidleri eklemektedir. Uzama sıcaklığı, genellikle 72 °C' dir. Ancak bu basamağın gerçekleşme süresi, kullanılan polimeraz enziminin tipine bağlı olarak değişir. Taq (*Thermus aquaticus*) polimerazının kullanılması durumunda her 1000 bp' lik kalıp DNA' nın sentezi için 1 dk yeterliyken Pfu (*Pyrococcus furiosus*) polimerazı kullanıldığında bu süre iki katına çıkmaktadır. Bu aşamada hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür ve hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonu için gerekli süre yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir.^{77,84}

PCR reaksiyonunda yeterli miktarda DNA ürünü elde etmek için 30 döngü ideal olarak kabul edilmektedir. Daha yüksek döngü sayıları spesifik olmayan bağlanmalar

meydana getirebilmektedir. Üç basamaktan oluşan döngü sonunda geometrik artış gösterecek şekilde hedef bölgeye ait çift zincirli DNA çoğaltılmaktadır.⁸⁵



Şekil 2.4. PCR'in 3 temel aşaması.⁸⁶

2.5.2. Real Time PCR

Günümüze kadar Gradientli PCR, Multiplex PCR, Nested PCR ve Real Time PCR'ı gibi farklı uygulamalara yönelik PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Real Time PCR adından da anlaşılacağı üzere PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya

cDNA'nın floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif tespiti. PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan ürün miktarı, floresan boyaların verdiği sinyal ile doğru orantılı olarak artmakta ve hangi döngüde hangi oranda artışın olduğu reaksiyon esnasında belirlenebilmektedir. Floresan boyaların verdiği bu sinyal normal klasik PCR'dan farklı olarak cihaz içerisinde bulunan filtrelerden belirli dalga boylarında gönderilen ışığın absorbe edilmesi ile tespit edilmektedir.⁷⁷ Bu yöntemde, uygun primer seçimi en önemli aşama olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden sadece spesifik cDNA'ya bağlanan, primer-dimer veya spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmeyen PCR primerlerinin seçimi önem arz etmektedir.⁸⁷

Ticari olarak geliştirilmiş üç tip PCR sistemi bulunmaktadır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probin 5' ucunda raportör florokrom (6- carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6- carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır.⁸² Söndürücünün yaptığı soğurma işlemi, bir floresan boyanın ışımasının, proton emisyonu olmaksızın bir diğeri tarafından inhibe edilmesi olarak tanımlanan FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) prensibine dayanır. Aslında bu olay, düşük dalga boylu yüksek enerjili bir floresan boyanın (ör. FAM (492 nm)) enerjisinin daha yüksek dalga boylu ve daha düşük enerjili diğeri bir floresan boya (ör. TAMRA (559 nm)) tarafından soğrulması şeklinde özetlenebilir. Floresan işaretleyici olarak çeşitli boyalar kullanmak mümkündür. Burada boya seçiminde ana prensip soğurucunun daha düşük enerjiye yani işaretçiden daha yüksek dalga boyuna sahip olmasıdır.⁷⁷ TaqMan sisteminde Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Proba hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturmaya, 3' uçtaki

baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.⁸⁴ Organizmalara ait dokulardan direkt izole edilen mRNA veya total RNA ardından mRNA izolasyonu ve sonrasında cDNA kütüphanesinin oluşturulması real time PCR'da kullanılacak olan genetik materyalin esasını teşkil etmektedir. cDNA kütüphanesi üzerinde ilgili gen/genlere ait bölgelerin amplifikasyonu ve bu cihazda gerçek zamanlı izlenmesi ürün miktarı hakkında bilgi vermektedir.⁷⁷

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları

3.1.1. Etik Kurul Onayı

“Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Mitokondri Stresi Üzerine Olan Etkileri” adlı çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının, 2014–116 sayılı kararıyla, etik kurallara uygun bir çalışma olduğuna karar verilmiştir.

3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan toplam 40 adet 2 aylık, ortalama 25-30 gram ağırlığında balb c cinsi beyaz erkek denek, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi’den (ATADEM) temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmanın Deney Grupları

Benzer fizyolojik ve biyolojik özelliklere sahip denekler, vücut ağırlıkları birbirine yakın olan fareler aynı grupta olacak şekilde biri kontrol, üçü deney olmak üzere toplam dört grup oluşturuldu. Deney süresi boyunca tüm deneklerimiz optimum laboratuvar koşulları altında, oda sıcaklığında (12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde)günlük su ile beraber % 21 oranında protein içeren standart pelet yemlerle (purina) beslendi. Tüm hayvan deney prosedürleri standart etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışmada; 4 ayrı grup oluşturuldu.

Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırıldı.

- 1.Grup (10 hayvan): Kontrol grubu
- 2.Grup (10 hayvan): 5 mg/kg doku Anatase TiO₂ NPs ile muamele
- 3.Grup (10 hayvan):5 mg/kg doku Ag NPs (düşük doz) ile muamele
- 4.Grup (10 hayvan): 10 mg/kg doku Ag NPs (yüksek doz) ile muamele

3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Farelere Uygulanması

Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. firmasından alınan (99.9, 20 nm, w/~0.3% PVP kaplı) özellikte olan AgNPs nanopartikülleri ve Sigma firmasından alınan (anatase nanopowder, <25 nm partikülleri) özelliğinde olan titanyum nanopartikülleri (TiO₂ NPs) uygulanacak doz oranlarına göre distile suyla sonikatör(cihazın özellikleri yaz) cihazıyla 25-30 dakika karıştırılarak solüsyonlar hazırlandı. Buna göre oluşturulan kontrol ve deney grupları aşağıdaki gibi dizayn edildi.

Grup 1: Kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu grupta bulunan deneklerin sadece, kuyruktan intravenöz olarak distile su verildi.

Grup 2: 0-15. günler arasında 3 gün arayla (en son 13. gün) her dozu 5 mg/kg olan Anatase TiO₂ NPs intravenöz olarak kuyruktan 5 doz verildi. 15. günün sonunda hayvanlar servikal dislokasyon ile ötanazi edildi ve testisler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 3: 0-15. günler arasında 3 gün arayla (en son 13. gün) her dozu 5 mg/kg olan AgNPs 5 doz verildi. 13. günün sonunda intravenöz uygulama bittikten 2 gün sonra, hayvanlar servikal dislokasyon ile ötanazi edildi ve testisler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 4: 0-15. günler arasında 3 gün arayla (en son 13. gün) her dozu 10 mg/kg AgNPs intravenöz olarak kuyruktan 5 doz verildi. 13. günün sonunda intravenöz uygulama bittikten 2 gün sonra hayvanlar servikal dislokasyon ile ötanazi edildi ve testisler cerrahi olarak çıkarıldı.

3.4. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Uygulamalar

3.4.1. Test Nanopartiküllerin ICP İle Testis Dokusundaki Varlığının Tespit Edilmesi

Uygulama sonrası testise geçmesi muhtemel Ag ve anatase TiO₂ nanopartikülleri Ankara Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nde bulunan ICP OES spektrofotometresi (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) kullanılarak belirlendi.^{88,89} Bunun için ilk olarak dokular basınçlı kaplara alındı 2 ml nitrik asit, 3 ml hidrojen peroksit asit ile muamele edildikten sonra 3 farklı adımda yakma işlemi yapıldı:

1. adım; 145 °Cde %75 mikrodalga gücün de 5 dakika,

2. adım; 180 °Cde %90 mikrodalga gücün de 10 dakika

3. adım 100 °Cde %40 mikrodalga gücün de 10 dakika , 40 bar basınca dayanıklı mikrowave yaş yakma ünitesinde (speedwave MWS-2 Berghof productts + Instruments Harresstr.1. 72800 Enien Gernmany) tabi tutuldu. Yakma işleminden sonra örnekler balon jojeye alınarak deionize su ile 25 ml'ye tamamlandı. Daha sonra örneklerdeki nanopartiküller ICP kullanılarak belirlendi.

3.4.2. Spermatolojik analizler

3.4.2.1 Spermanın alınması

Erkek farelerin ötenazisi servikal dislokasyon ile yapıldı. Ötenazi yapılmasından hemen sonra vücut ve testis ağırlıkları ölçüldü. Bununla beraber diseke edilen kauda epididimisler bir petri kutusunda 200 µl %0,9'luk Serum fizyolojik içerisine konularak anatomik bir makas ile 7-9 yerinden parçalandıktan sonra 30 dk boyunca inkübasyona bırakılarak sperm difüzyonu sağlandı. Difüzyon sonrası kauda epididimisler medyundan uzaklaştırıldı (Akman, 2007).⁹⁰

3.4.2.2. Konvansiyonel spermatolojik parametrelerin belirlenmesi

3.4.2.2.1. Motilite muayenesi

Motilite muayenesi, sperm süspansiyonu elde edildikten hemen sonra yapıldı. Motilite muayenesinde kullanılan lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Lam üzerine 10 µl'lik sperma süspansiyonundan damlatılıp üzerine 45°'lik açı ile bir lamel kapatıldı. Motilite, 35 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablası yardımıyla, faz – kontrast mikroskop altında, x400'lük büyütmede, en az on farklı sahada ileri doğru düzgün doğrusal hareket yapan spermatozoonların sayımı ile yapıldı.⁹⁰ Sunulan çalışmada motilite muayenesi esnasında Moore ve ark⁹¹ in farelerde sperma motilitesinin değerlendirilmesi sırasında temel aldıkları hususlara da dikkat edildi.

Aynı zamanda motilitenin yanı sıra velosite değerlendirmesi de yapıldı. Spermatozoonların velosite değerlendirme skalası 0 ile +4 arasında yapılan puanlama ile ölçüldü

3.4.2.2.2. Ölü spermatozoon muayenesi

Ölü spermatozoon oranını belirlemek için sperma süspansiyonunun hazırlanmasından hemen sonra froti hazırlandı. Frotilerin hazırlanması için yağı alınmış lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Sıcaklığı 35 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablası üzerindeki lama 10 µl'lik sperma süspansiyonundan damlatıldı. Bunun üzerine 35°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen eosin ve nigrosin boyalarından 10'ar µl ilave edilerek bir lamel yardımıyla sperma süspansiyonu ve boya nazik bir şekilde karıştırıldı. Bu karışımdan aynı lam üzerine sürme froti çekilerek kısa sürede kuruması sağlandı. Her sperma örneğinden iki froti hazırlandı ve

x1000'lik büyütmede immersiyon bakışla her bir frotiden 100 adet olmak üzere toplam 200 adet spermatozoon sayılarak ölü spermatozoon oranı tespit edildi.⁹⁰

Ölü spermatozoonların değerlendirmesi yapılırken Somfai ve ark.⁹² nın değerlendirmeleri dikkate alınmıştır. Buna göre fare sperm hücresinin başı boyayı tamamen almış ya da postakrozomal bölgeye kadar olan kısma da boya nüfuz etmişse hücre ölü, boya almamış ise canlı olarak nitelendirildi.

3.4.2.2.3. Anormal spermatozoon muayenesi

Anormal spermatozoonların oranını belirlemek için her sperma süspansiyonundan toplam iki adet preparat hazırlandı. Preparatların hazırlanması için yağı alınmış lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Bu çalışmada eosin – nigrosin yöntemi kullanılarak anormal spermatozoon muayenesi yapıldı. Anormal sperm oranı belirlenirken; akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk anomalileri açısından değerlendirilerek toplam anormal sperm oranı da hesaplanmıştır.

Preparatların hazırlanması, yukarıda ölü spermatozoon muayenesi bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı.

Faz – kontrast mikroskopta x1000'lik büyütmede immersiyon bakışla her bir frotiden 100 adet olmak üzere toplam 200 adet spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı tespit edildi.⁹⁰

3.4.2.3. Hypo-osmotic Swelling-Eosin-Y (HE) testinin uygulanması

80 µl HOS test solüsyonu içerisine 20 µl sperm süspansiyonu ilave edilerek 35°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda hafifçe çalkalanarak homojen hale getirilen her tüpten 10 µl örnek alınarak vücut sıcaklığındaki bir lam üzerine damlatıldı ve üzerine 35°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen eosin ve nigrosin boyalarında

10'ar µl damlatılarak ikişer adet preparat hazırlandı. Hazırlanan ikişer frotiden toplam 200 spermatozoon x1000 büyütülmeye faz – kontrast mikroskop altında sayılarak her grupta başı boya almış ve almamış, kuyruğu kıvrılmış ya da kıvrılmamış oluşuna göre dört alt tipte incelendi. Buna göre sınıflandırmalar; Başı boya almamış kıvrık kuyruklu (Tip1), başı boya almış kıvrık kuyruklu (Tip2), başı boya almamış düz kuyruklu (Tip3) ve başı boya almış düz kuyruklu (Tip4) şeklinde oluşturuldu.^{88,89}

3.4.3. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

3.4.3.1. RNA İzolasyonu

Fare testis dokusundan cDNA kütüphanesi hazırlamak için mRNA izolasyonu Qiagen RNeasy lipid tissue kiti protokolüne göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- Dokudan 50 mg alınarak 2 ml'lik ependorf tüplerine konuldu.
- Üzerine 1ml QIAzol Lyziz Reagent eklendi.
- Doku, homojenizatör yardımıyla iyice parçalandı.
- 15-25 °C'de (oda şartlarında) düz bir zeminde 5dk bekletildi.
- Üzerine 200 µl kloroform eklendikten sonra birkaç saniye vortekslendi.
- Düz bir zeminde 2-3dk bekletildi.
- 12000xg de 15dk +4 °C de santrifüj edildi.
- Üst fazdan yaklaşık 500 µl'lik kısım 2ml'lik steril ependorf tüpüne alındı.
- Üzerine 500µl %70'lik etanol eklendi.
- Yıkama işlemleri yapıldı.
- RNA'lar cDNA izolasyonuna kadar -80 °C de saklandı.

3.4.3.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla Thermo Cihazı kullanıldı . Cihaz tarafından verilen 260/280 oranları (saflık) ve konsantrasyon değerleri dikkate alınarak cDNA sentezine geçildi.

3.4.3.3. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

cDNA kütüphanesi hazırlanırken ROCHE Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit'i kullanıldı. Kit içerisindeki solüsyonlar ve kullanılan protokol aşağıda maddeler halinde belirtildi.

Gerekli kimyasallar

1. Random hexamer primer
2. ddH₂O
3. Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer
4. Protector RNase Inhibitor
5. Deoxynucleotide Mix
6. Transcriptor Reverse Transcriptase

Yöntem

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;
 - 2 µl Rastgele (Random) primer
 - 1 µg total RNA konuldu
 - 10 µl'ye ddH₂O ile tamamlandı.
2. Karışım 65 °C'de 10 dakika ısıtıldı ve buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edildi.
3. Karışıma aşağıdaki solüsyonlar sırayla eklendi;
 - Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer 4 µl

- Protector RNase Inhibitor 0.5 µl
- Deoxynucleotide Mix 2 µl
- Transcriptor Reverse Transcriptase 0.5 µl

Karışım hafifçe karıştırıldı. Random primer kullanıldığı için karışım önce 25 °C’de 10dk inkübe edildi.

4. Ardından; 55 °C’de 30 dk inkübe edildi.

5. 85 °C’de 5 dk inkübe edildi.

6. Reaksiyon sonlandırıldı ve qRT-PCR için kullanılabilecek kadar -20 °C’de saklandı.

3.4.3.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR)

PCR, DNA veya cDNA üzerinde seçilen bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlarda çoğaltılması yöntemidir. 1986 yılında Mullis ve arkadaşlarının 1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü aldıkları, moleküler düzeydeki çalışmalara çığır açan bu buluşundan sonra Gradientli PCR, Multipleks PCR, Nested PCR, Real-Time PCR gibi PCR yöntemleri geliştirilmiştir.

Real-Time PCR adından da anlaşılacağı üzere PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya cDNA’nın floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif tespittir. PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan ürün miktarı floresan boyaların verdiği sinyal ile doğru orantılı olarak aratmakta ve hangi döngüde hangi oranda artışın olduğu reaksiyon esnasında belirlenebilmektedir. Floresan boyaların verdiği bu sinyal normal klasik PCR’den farklı olarak cihaz içerisinde bulunan filtrelerden belirli dalga boylarında gönderilen ışığın absorbe edilmesi ile tespit edilmektedir. Real-Time PCR’da klasik PCR’daki gibi ürünün çoğaltılıp çoğaltılmadığının jel elektroforezi gibi yöntemlerle belirlenmesine gerek olmadığından kontaminasyon riski de azdır. Reaksiyon esnasında ürün amplifikasyonu miktarsal olarak izlenebilir. Real-Time

PCR’da çoğaltılan ürünün kantitatif miktarı hakkında bilgi edinilmesine rağmen ürün uzunluğu hakkında bir bilgi edinilemez.^{93,94}

Genlerin ekspresyon miktarlarını ölçmek için floresan işaretli TaqMan prob kullanıldı ve Real-Time PCR yapıldı. Analiz kontrol ve muamele gruplarına her bir cDNA için 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi.

3.4.3.5. PCR Protokolü

PCR işlemi için hedef bölgeye spesifik primerler ile probler dizayn Medsantek şirketine yaptırıldı. PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

Tablo 3.1. Multipleks Real-Time PCR karışımı (25 µl için)

Bileşenler	Miktar(µL)
TaqMan® Probe Master Mix	10
Primer/Probe mix (hedef gen)	1
cDNA (0,5ng)	5
ddH ₂ O (Steril)	4
Toplam hacim	20

*Housekeeping gen olarak Beta Aktin kullanıldı.

3.4.3.6. Real-Time PCR programı

Real-Time PCR uygulamasında kullanılan sıcaklık döngüsü Tablo 3.2’de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.2. Real-Time PCR programında kullanılan sıcaklık döngüsü

Sıcaklık (°C)	Saniye	
50	120	
95	600	
95	10	(45 döngü)
60	60	

3.4.3.7. Real-Time PCR Sonuçların Değerlendirilmesi

Real-Time PCR’da karşılařtırılmalđ ölçüm için ΔC_T matematiksel metodu kullanıldı.

$$\text{Oran (referans/hedef)} = 2^{C_T(\text{referans}) - C_T(\text{hedef})}$$

3.4.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama(ort)±standart sapma(ss) olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testiste Ag ve Anatase TiO₂ Nanopartiküllerinin Varlığının Belirlenmesi

Ag ve anatase TiO₂ nanopartikülleri materyal metot kısmında belirtildiği gibi beş doz şeklinde intravenöz olarak farelere uygulanmıştır. Tablo 4.1 de görülebileceği gibi her iki nanopartikül içinde kontrol grubuna oranla uygulama yapılmış farelerin testislerinde daha yüksek miktarda nanopartikül miktarı tespit edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca, Ag NPs doza bağlı artan uygulaması testis dokusundaki nanopartikülün miktarı ile paralel bir artış göstermiştir ($p<0.001$).

	Ag NPs (mg/kg doku)	TiO ₂ NPs (mg/kg doku)
Kontrol	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Anatase TiO₂ NPs	-	5.761±0.036
Ag NPs (Düşük Doz)	2.953±0,054	-
Ag NPs (Yüksek Doz)	6.748±0,156	-

Tablo 4.1. Fare testis dokusundaki Ag ve TiO₂ NPs (mg/kg doku) miktarı (ortalama±SD).

4.2. Testis Ağırlığı, Testis İndeksi ve Spermatolojik Muayene Sonuçları

Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4' den de görülebileceği gibi Ag NPs (Düşük Doz), Ag NPs (Yüksek Doz) ve Anatase TiO₂ NPs solüsyonları (100 µl) uygulanmış gruplar ve kontrol grupları arasında testis indeksi (testis ağırlığı/vücut ağırlığı) değerlerinde önemli bir fark ortaya çıkmamıştır ($P > 0.05$). Benzer şekilde, bu gruplar arasında testis ağırlığı bakımından da kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$).

Ölü sperm ve toplam sperm anormalitesi konvensiyonel değerlendirilmelerinde, Ag NPs (Düşük Doz), Ag NPs(Yüksek Doz) ve anatase TiO₂ NPs gruplarında ölü sperm yüzdeleri açısından ve toplam anormalitesi açısından istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$).

Ayrıca, bu grupların spermelerde motilite üzerine olan etkisi konvensiyonel olarak incelendiğinde Ag NPs (Düşük Doz) grubunda motilite yüzde değeri açısından kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık gözlenmezken ($P > 0.05$), Ag NPs (Yüksek Doz) grubunda istatistiksel anlamlı bir artış göstermiştir ($P < 0.05$). Ag NPs (Düşük Doz)’ lerde olduğu gibi doku konsantrasyonunda uygulanan Anatase TiO₂ NPs’ lerinde kontrole oranla motiliteyi azalttığı görülmüştür ($P < 0.05$). Kontrole oranla Ag NPs (Düşük Doz) grubunda sperm velositesinde istatistiksel olarak bir farklılık yokken ($P > 0.05$), AgNPs (Yüksek Doz) grubunun velositeyi önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Ag NPs (Düşük Doz) grubunda olduğu gibi, kontrole oranla Anatase TiO₂ NPs grubunda velosisteyi önemli derecede etkilemediği belirlenmiştir ($P > 0.05$).

Materyal metot kısmında belirtildiği şekilde intravenöz Ag NPs (Düşük Doz ve Yüksek Doz) ve Anatase TiO₂ NPs solüsyonları (100 µl) uygulanan farelerde HE testine göre Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 sperm yüzde değeri hesaplandı. Elde ettiğimiz sperm yüzde değeri anatase TiO₂ NPs grubunda kontrol grubuna göre Tip 2’de azalırken ($P < 0.05$), Tip 3’de artış gözlemlendi. Diğer yandan tüm Ag NPs uygulamalarında Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 sperm yüzde değerlerinde kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık gözlenmedi ($P > 0.05$).

HE testine göre Ag NPs (Düşük Doz), Ag NPs (Yüksek Doz) ve Anatase TiO₂ grupları için elde edilen kıvrık kuyruklu sperm yüzde değerleri sırasıyla Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4 ‘

de gösterilmiştir. Kıvrık kuyruklu sperm yüzde değeri; Ag NPs(Yüksek Doz), Ag NPs (Düşük Doz) gruplarıyla kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen; kontrol grubuyla Anatase TiO₂ NPs grubunu karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlemlendi.

	Kontrol	Ag NPs (Düşük Doz)	CI
Testis Ağırlığı (mg)	188.8±9.49737	216.6±33.96362	190-242
Testis İndeks	0.6±0.06182	0.6±0.08015	0.5-0.6
Motilite (%)	43.6±5.53308	39.8±4.60543	36-43
Velosite	2.2±0,44721	2.6±0,52705	2-2
Ölü Sperm (%)	35.7±5.39379	39.2±5.00935	35-43
Toplam Anormalite (%)	34.8±10.54144	40.1±5.31479	35-44
Tip1 Sperm (%)	41.8±3.68551	41.0±7.56919	35-46
Tip2 Sperm (%)	30.4±2.41143	30.7±5.12870	26-34
Tip3 Sperm (%)	6.6±3.86562	12.5±4.21331	9-15
Tip4 Sperm (%)	31.9±4.53023	29.9±5.92600	25-34
Kıvrık Kuyruklu Sperm (%)	57.0±4.02032	56.8±5.96234	52-61
Boyalı (%)	47.2±4.16893	46±8.11680	29-38

Tablo 4.2. Ag NPs (Düşük Doz) grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi (ortalama±SD).

	Kontrol	Ag NPs (Yüksek Doz)	CI
Testis Ağırlığı (mg)	188.8±9.49737	216.5±16.28321	202-230
Testis İndeks	0.6±0.06182	0.6±0.05464	0.5-0.5
Motilite (%)	43.6±5.53308	50.1±5.81322	45-54
Velosite	2.2±0.44721	3.6±0.51755	3-4
Ölü Sperm (%)	35.7±5.39379	36.5±6.37695	31-41
Toplam Anormalite (%)	34.8±10.54144	32.3±9.16994	24-39
Tip1 Sperm (%)	41.8±3.68551	45.1±9.41230	37-52
Tip2 Sperm (%)	30.4±2.41143	27.1±4.67545	23-31
Tip3 Sperm (%)	6.6±3.86562	10.8±3.65120	7-13
Tip4 Sperm (%)	31.9±4.53023	29.5±6.77870	23-35
Kıvrık Kuyruklu Sperm (%)	57.0±4.02032	58.0±6.3312	52-63
Boyalı (%)	47.2±4.16893	42.7±9.87803	34-51

Tablo 4.3. Ag NPs (Yüksek Doz) grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi (ortalama±SD).

	Kontrol	Anatase TiO2 NPs	CI
Testis Ağırlığı (mg)	188.8±9.49737	202.4±31.78499	173-231
Testis İndeks	0.6±0.06182	0.6±0.09130	0.4-0.6
Motilite (%)	43.6±5.53308	35.7±5.95171	30-41
Velosite	2.2±0.44721	2.4±0.53452	1-2
Ölü Sperm (%)	35.7±5.39379	37.9±5.50688	32-42
Toplam Anormalite (%)	34.8±10.54144	44.2±7.96187	36-51
Tip1 Sperm (%)	41.8±3.68551	37.4±8.74351	29-45
Tip2 Sperm (%)	30.4±2.41143	19.1±3.43060	15-22
Tip3 Sperm (%)	6.6±3.86562	27.6±8.39345	19-35
Tip4 Sperm (%)	31.9±4.53023	32.4±5.67861	27-37
Kıvrık Kuyruklu Sperm (%)	57.0±4.02032	44.1±10.04381	34-53
Boyalı (%)	47.2±4.16893	39.2±5.05461	34-44

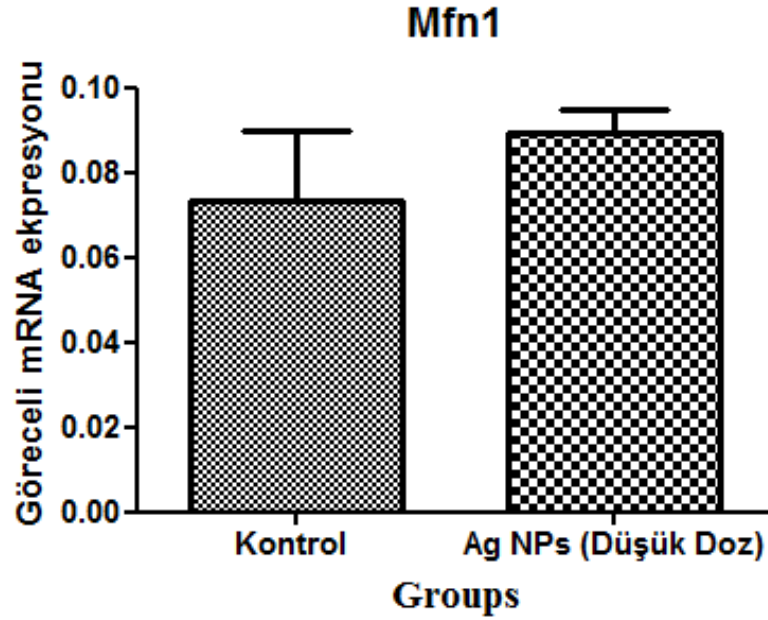
Tablo 4.4. Anatase TiO2 NPs grubunun testis ağırlığı, testis indeksi ve sperm parametreleri üzerine olan etkisi (ortalama±SD).

4.2. Real-Time PCR Uygulamasından Elde Edilen Bulgular

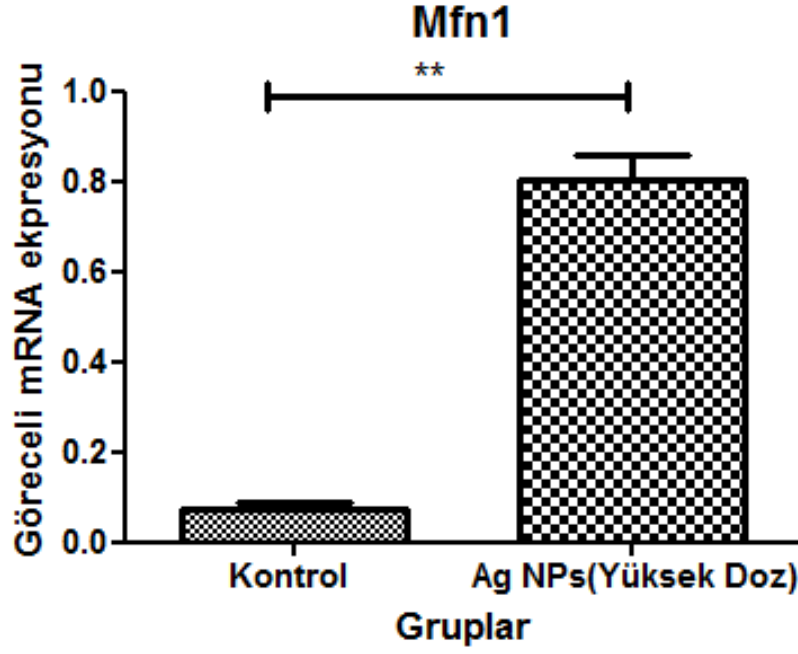
Ag NPs' nin 5 mg/kg konsantrasyonu (düşük doz) kontrole oranla füzyon genlerinden Mfn1' in (şekil 4.3) ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, Mfn 2' nin (şekil 4.5) seviyesinde bir artışa OPA 1' in seviyesinde (şekil 4.7) ise bir azalmaya neden oldu. Bu konsantrasyonun füzyon geni olan Drp1 ' de ise istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.9). 10 mg/kg Ag uygulanmış gruplarda (yüksek doz) ise hem füzyon hemde füzyon genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrole oranla istatistiksel olarak önemli artışlar görüldü. Örneğin, kontrol grubunda Mfn 1' in ekspresyon seviyesi yaklaşık olarak 0.1 seviyesinde iken aynı genin ekspresyon seviyesinin yüksek doz Ag NPs grubunda 0.8

gibi yüksek bir değere ulaştığı belirlendi (Şekil 4.4). Ag NPs' nin bu grubunda Mfn 2' nin seviyesi 0.5 gibi yüksek bir değerde iken kontrolde 0.1 gibi düşük değerde kaldığı görüldü (Şekil 4.6).

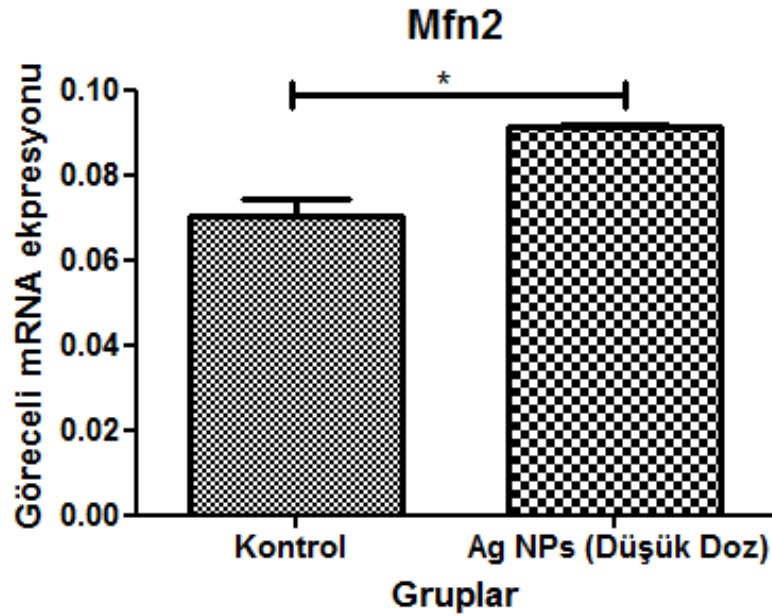
Real-Time PCR sonuçları kontrole oranla anastaz TiO₂ NPs (5 mg/kg doku) uygulanmış gruplarda mitokondriyal füzyon Mfn 1 (şekil 4.9), Mfn 2 (şekil 4.10) ve Opa 1 (Şekil 4.11) genlerinin ekspresyon seviyesinde kayda değer bir değişikliğin olmadığını fakat füzyon geni olarak bilinen Drp 1' in ekspresyonunu (şekil 4.12) istatistiksel olarak bir ölçüde artırdığını ortaya çıkardı.



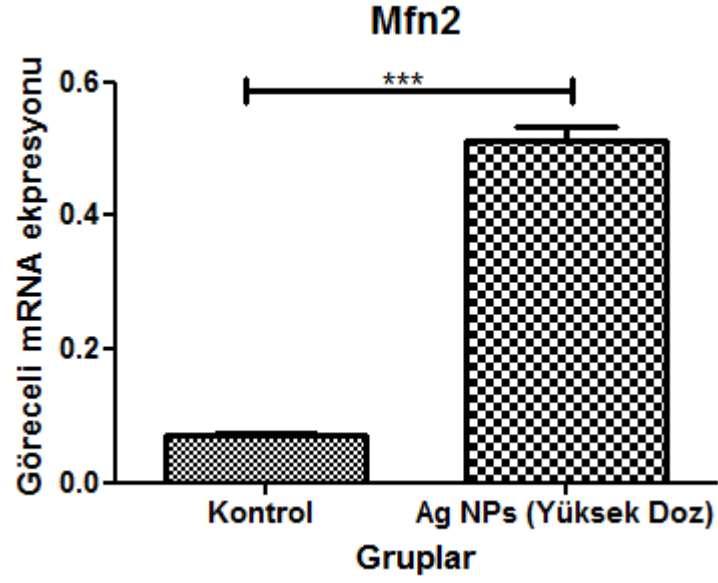
Şekil 4.3. Ag NPs (Düşük Doz)' nin Mfn 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * P < 0.005, ** p < 0.01, *** p < 0.001 ve istatistiksel farklılık yok=P>0.05



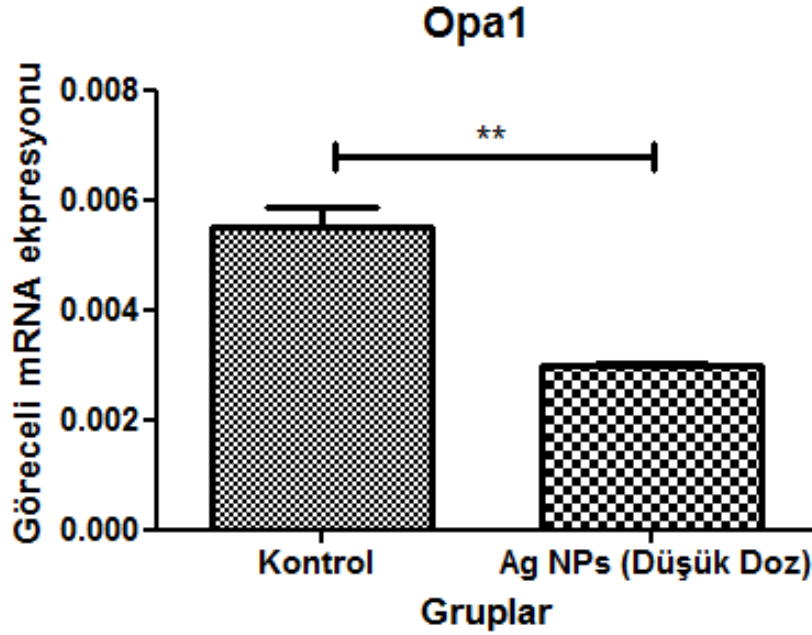
Şekil 4.4. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin Mfn 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



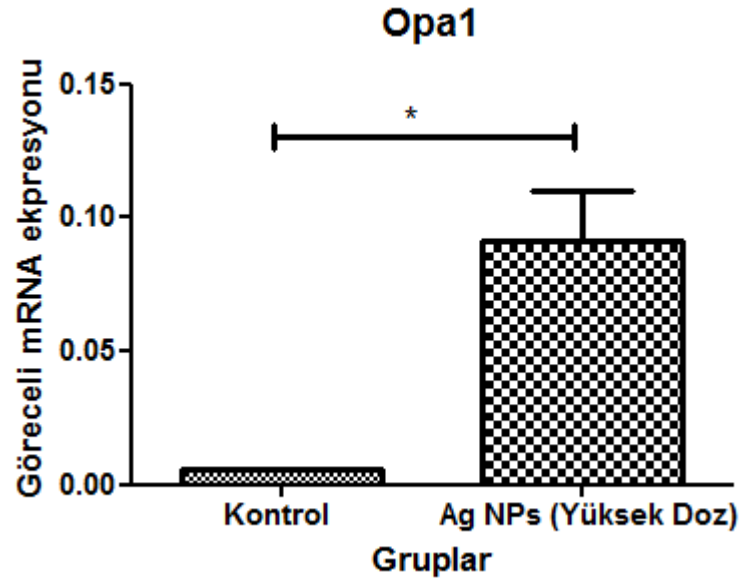
Şekil 4.5. Ag NPs (Düşük Doz)' nin Mfn 2' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



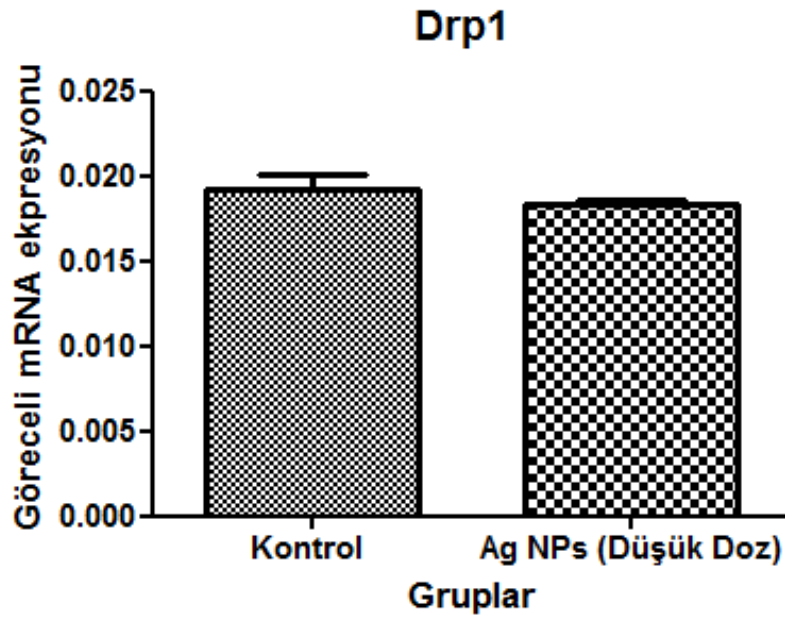
Şekil 4.6. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin Mfn 2' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.
* $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



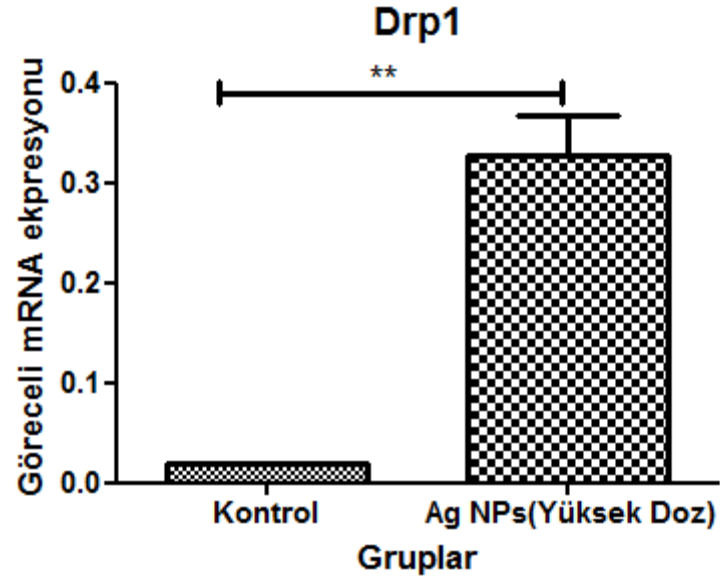
Şekil 4.7. Ag NPs (Düşük Doz)' nin OPA 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.
* $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



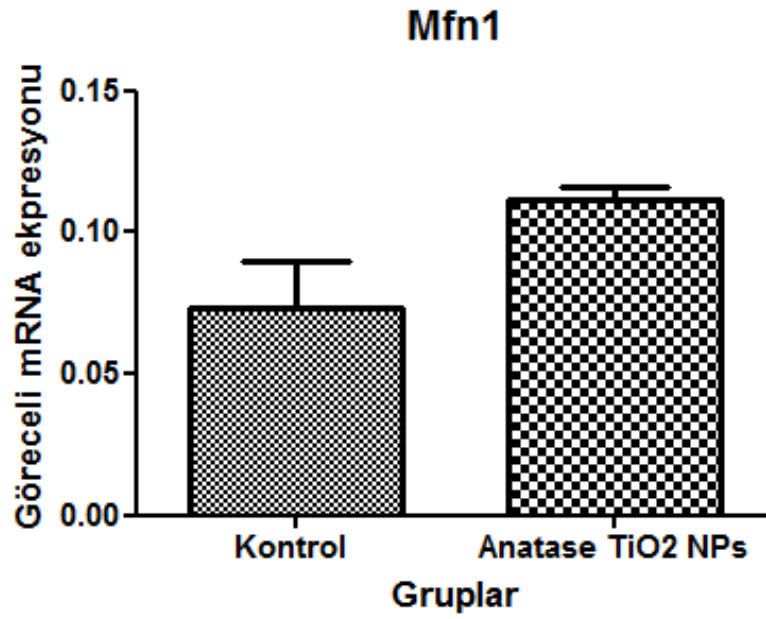
Şekil 4.8. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin OPA 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.
 * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



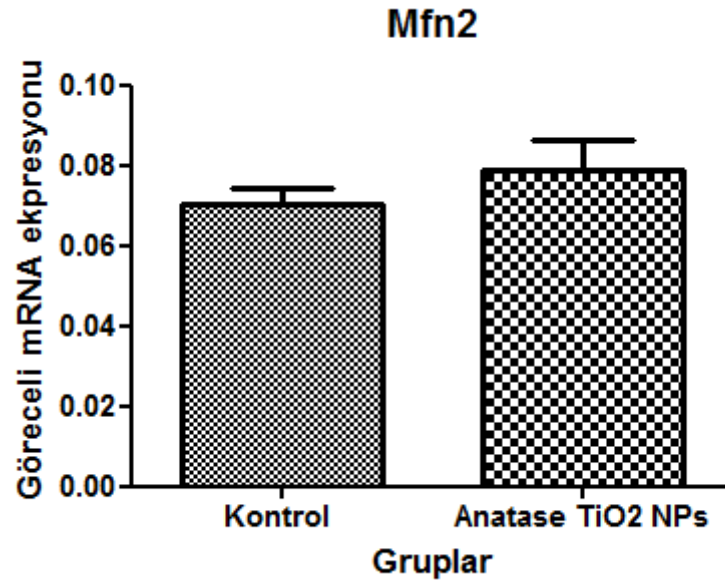
Şekil 4.9. Ag NPs (Düşük Doz)' nin DRP 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi.
 * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



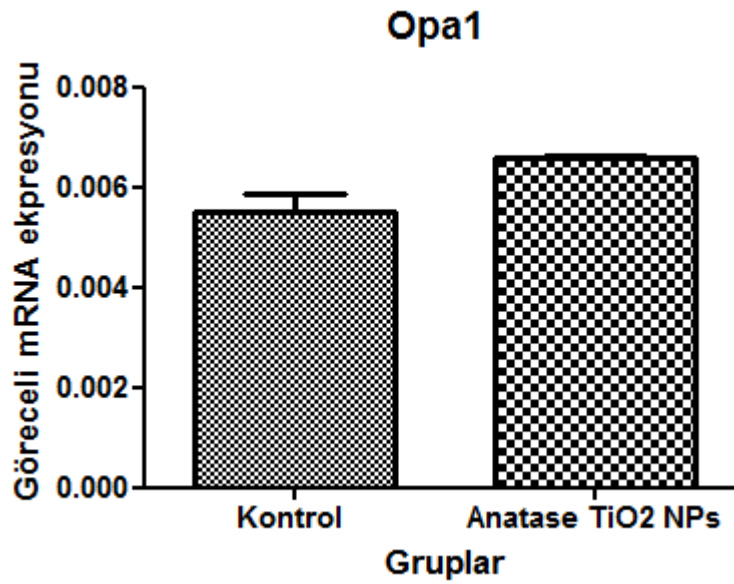
Şekil 4.10. Ag NPs (Yüksek Doz)' nin DRP 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



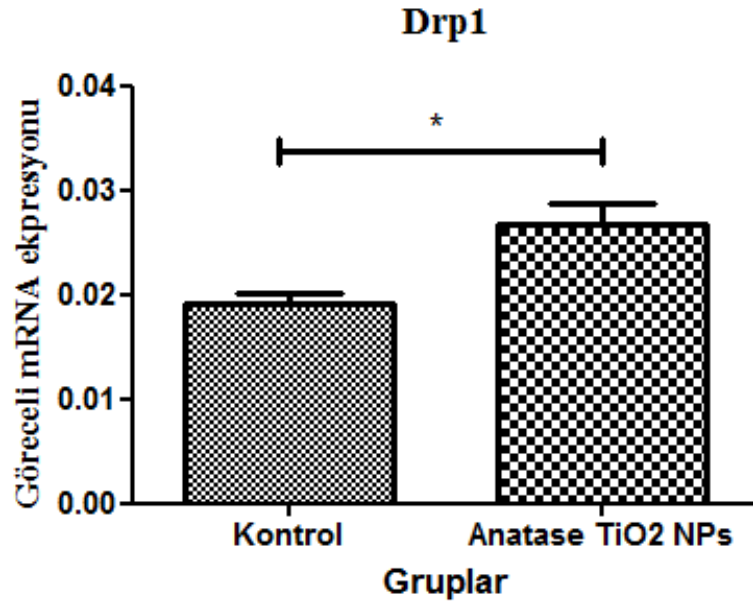
Şekil 4.11. Anatase TiO2 NPs grubunun Mfn 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



Şekil 4.12. Anatase TiO2 NPs grubunun Mfn 2' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



Şekil 4.13. Anatase TiO2 NPs grubunun OPA 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve istatistiksel farklılık yok= $P > 0.05$



Şekil 4.14. Anatase TiO₂ NPs grubunun Drp 1' in ekspresyon seviyesi üzerine olan etkisi. * P < 0.005, ** p < 0.01, *** p < 0.001 ve istatistiksel farklılık yok=P>0.05

5. TARTIŞMA

Günümüzde, metalik nanopartiküller radyolojik alanlarda, moleküler görüntüleme, hedefe yönelik tedavi ve aşı geliştirilmesi gibi amaçlar doğrultusunda sıklıkla kullanılmaktadır.³ İnsanlar ise metalik nanaopartiküllere, onların üretimi, endüstride (besin, kimya v.b) kullanımı, tıbbi çalışmalarda hayvan ve insan modellerine ilaç yada ilaç taşıyıcısı olarak uygulanması sırasında maruz kalabilmektedir. Bu metalik partiküller ise organlarda, dokularda, hücrelerde, organellerde ve enzimler üzerinde istenmeyen toksik etkiler oluşturabilmektedir.^{12,14} Nanopartiküllerin üreme sistemi üzerinde olan toksik etkileri ise insan ve hayvanlarda infertiliye sebep olabilmektedir.^{64,71,75,76} Örneğin, Gromadzka-Ostrowska et al.⁶⁴, ratlara damar yoluyla uygulanan gümüş nanopartiküllerinin testiste nanopartikül boyutuna, konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak epididimal sperm sayısını azalttığını, germ hücrelerinde DNA hasarı oluşturduğunu ancak vücut ağırlığı, adipoz doku dağılımı ve anomal sperm dağılımı üzerinde ise değişiklik oluşturmadığını ortaya çıkarmıştır. Komatsu et al.⁷² dizel yakıtların tüketiminden açığa çıkan partiküllerin (DEP), karbon ve titanyum dioksit nanopartiküllerinin testiste testesteron üretiminden sorumlu olan Leydig TM3 hücreleri üzerine uygulamıştır. Araştırmacılar her üç nanopartiküllünde leyding TM3 hücreleri tarafından hücre içerisine alındığını, bu nanopartiküllerin hücre canlılığı ve hücre çoğalmasının yanısıra hücrelerde gen ekspresyon seviyesini değiştirdiğini belirtmiştir. Bu araştırmacılar özellikle titanyum nanopartiküllerinin diğerlerine oranla daha fazla sitotoksik etki oluşturduğunu açıklamıştır. Wiwantitkit et al.⁷⁴ altın nanopartiküllerini spermatozon üzerindeki olası toksik etkisini araştırmış ve çalışma sonrasında bu nanopartiküllerin spermelerin baş ve kuyruk kısımlarına nüfuz ettiğini, nanopartikül uygulanmış örneklerde kontrole oranla hareketli sperm sayısını %25 oranında azaldığını ve spermelerde fregmantasyonun meydana geldiğini rapor etmiştir.

Barkhordari et al.⁷⁶ çinko oksit nanopartiküllerinin in vitro koşullarda insan spermi üzerindeki toksik etki oluşturduğunu ve toksisitenin nanopartikül konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak arttığını belirtmiştir. Ema et al.⁷⁵ titanyum oksit ve altın nanopartiküllerinin sperm hareketliliğini azalttığını, gümüş, aliminyum ve molibden trioksit nanopartiküllerinin ise fare spermatogonyum ana hücreleri üzerinde toksik etki oluşturduğunu rapor etmiştir. Asare et al.⁷¹ gümüş, altın ve titanyum nanopartiküllerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak DNA kırıklarına, apoptoza ve nekroza neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu araştırmacılar aynı zamanda titanyumun toksik etkisinin altın ve gümüşten daha az olduğunu belirtmişlerdir. Bai et al.⁹⁵ intravenous olarak uygulanan karbon nanopartiküllerinin fare testisinde oluşturması muhtemel toksik etkisini araştırmış ve bu nanopartiküllerin fertiliyeti etkilemeyen geriye dönüşümlü bir testis hasarına neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı çalışmada, ilaveten bu nanopartiküllerin 15 günlük maruz kalma süresinin sonunda testiste biriktiğini, oksitadif hasar oluşturduğunu ve seminifer epitel kalınlığını azalttığını ancak 60 ve 90 günlük gibi daha uzun maruz kalma sürelerinin sonunda bu hasarın geriye dönüşümlü olarak düzeldiğini belirtilmiştir. Yoshida et al.⁹⁶ 10 haftanın üzerinde ve 10 doz olarak trake içerisine uygulanan karbon siyah (CB) nanopartiküllerinin farelerin seminifer tübüllerinde vakuolizasyon oluşturduğu ve serum testosteron seviyesini yükselttiğini ortaya çıkarmıştır. Miresmaeili et al.⁹⁷ 70 nm büyüklüğündeki gümüş nanopartiküllerini gavaj şeklinde ratlara uygulamış ve bu nanopartiküllerin spermatojenik hücre sayısı ve spermin akromozom yapısı üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, araştırmacılar bu nanopartiküllerin spermatozoa sayısının yanısıra primer spermatosit ve spermatit sayısının da azalttığı fakat sertoli hücre sayısında ve seminifer tübüllerin çapında herhangi bir değişikliğe neden

olmadığını ortaya çıkarmıştır. Yine aynı çalışmada, akromozom yapısında da anormallik oluşabileceği gösterilmiştir.

Braydich-Stoll et al⁹⁸ gümüş ve aliminyum nanopartiküllerinin sperm membranı' nı geçerek sperm akromozomu ve mitokondri ile temas kurabileceği ve dolayısıyla toksik etki oluşturabileceği gösterilmiştir. Dişi üreme sistemi üzerine nanopartikül toksisitesi ile ilgili olarak yürütülen bir çalışmada, Gao et al.⁷³ TiO₂ nanopartiküllerinin uzun süreli maruz kalmaya bağlı olarak fare ovaryum dokusunda biriktiğini, burada mineral element ve sex hormonlarının dağılımını dengesizleştirdiğini, oksidatif hasara neden olduğunu ve fertilitiyi azalttığını ortaya çıkarmıştır.

Doku yada hücrelerde ortaya çıkan toksik etkiler nukleusun yanısıra mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organelleride etkilemektedir. Özellikle, hücreye giren nanopartiküller oluşturdukları toksik etki nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROS) üretmekte ve üretilen ROS' da mitokondri hasarına neden olmaktadır. Mitokondride meydana gelen hasarlar apoptoz mekanizmasını aktif ederek hücre ölümüne neden olmaktadır. Dolayısıyla, mitokondri hasarına bağlı olarak apoptozda görev alan Bcl-2, Bax, sitokrom C (CytC), kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin seviyelerinde artış olmaktadır.¹⁴

Doku, hücre ve organel düzeyinde nanopartikül toksisitesi bir çok çalışmada araştırılmasına rağmen, nanopartikül toksisitesinin mitokondriyal füzyon ve fizyon mekanizmalarıyla ilişkisine literatürde değinilmemiştir. Mitokondrinin bölünmesi ifade edilen fragmentasyon (fizyon) ve iki mitokondrinin birleşmesi anlamına gelen füzyon mitokondri dinamiğinin korunmasını sağlayan iki önemli antogonistik olaydır. Hücrelerde mitokondriyal morfoloji, mitokondri dağılımını, hareketi ve aktivitesi bu olaylarla kontrol edilmektedir.²² Bu iki olayın herhangi birisindeki eksiklik yada anormallik mitokondri hareketini engellemekte yada verimsiz hale getirmektedir.²⁴ Drp-

1 hücre fizyonda görev alsada bu genin aşırı ekspresyonu sağlıklı hücrelerde mitokondriyal yapıda ve fonksiyonlarda anormalliklere oluşturarak ATP üretiminin inhibisyonuna ve pro-apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olmaktadır.^{23,29} Yapılan çalışmalarda ise, mitokondriyal fizyonun antogonisti olan füzyonun hücrede oluşması muhtemel toksik etkiyi ortadan kaldırdığıda bildirilmektedir.⁹⁹⁻¹⁰¹ Füzyon olayındaki artışın hücreleri apoptoza karşı koruduğu ve stres koşulları altında hücrenin hayatta kalma olasılığını artırdığı belirtilmektedir.⁹⁹ Mayalar üzerinde yapılan bir çalışmada hücrede oluşturulan stres durumunda fizyon geni olan Dnm 1 ' in artışına karşılık olarak mitokondriyal füzyon geni olan fzo1' in ekspresyon düzeyinde bir artış olduğu gösterilmiştir.¹⁰¹ Diğer bir ifadeyle, füzyon mekanizması fizyonun arttığı durumlarda strese karşı hücrede koruyucu bir rol üstlenmektedir.

Bu yüzden, mevcut çalışmada, iki metalik nanopartikül olan Ag (gümüş) ve TiO₂ (titanyum dioksit)' in fare testis dokusunda hücre, doku ve mitokondri seviyesinde oluşturması muhtemel toksik etki ve bu toksik etkinin mitokondri füzyon-fizyon mekanizmaları üzerinde gen seviyesinde nasıl bir etki oluşturacağı araştırılmıştır. Çalışmanın amacına yönelik olarak ilk adımda kuyruk veninden uygulanan Ag ve anatase TiO₂ NPs kan-testis bariyerini aşarak testise geçip geçmediği araştırılmıştır. Bunun için 5 dozlu uygulama periyodu sonunda testisler farelerden materyal-metod kısmında belirtildiği şekilde çıkartılmış ve ICP cihazıyla bu iki nanopartikülün testislerdeki varlığı araştırılmıştır. ICP cihazından elde edilen verilere göre testislerde nanoaprtiküllere rastlanması olası toksik etkinin ön bir belirteci olarak kabul edilmiştir. ICP cihazından elde edilen mevcut verilere göre her iki nanopartikülün test edilen konsantrasyonlarda testise geçtiği belirlenmiştir. Bu durum gümüş ve titanyum nanopartiküllerinin testise geçebileceğini gösteren önceki çalışmalarla paralellik taşımaktadır.⁷¹

Mevcut çalışmada Ag ve TiO₂ nanopartiküllerinin testise geçtiği belirlendikten sonra bu nanopartiküllerin testis indeksi ve testise ağırlığı değerlerinin yanısıra sperm kalitesi üzerinde bir farklılık oluşturup oluşturmadığı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu nanopartiküllerin testis indeksi ve ağırlığı üzerinde kayda değer bir farklılık oluşturmadığını göstermiştir. Kontrole oranla Tip 3 sperm grubunda Ag nanopartikülleri herhangi bir değişiklik oluşturmazken Anatase TiO₂ nanopartikülleri istatistiksel bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde Tip 1 ve Tip 2 sperm grubunda Ag nanopartikülleri bir değişiklik oluşturmazken Anatase TiO₂ nanopartiküllerinde bir azalmaya neden olmuştur. Tip 3 oranındaki artış, Tip 1 ve 2’deki azalış motilitenin azalmasının bir göstergesi olarak kabul edildiğinden dolayı TiO₂ nanopartiküllerinin motiliteyi azalttığı ve bu yüzden de infertiliteyi artırdığı söylenebilir.

Real time PCR (RT-PCR); klinik mikrobiyoloji ve genetik hastalıkların yanısıra Parkinson, alzheimer ve Tourette sendromu gibi nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisiyle ilgili gen ekspresyon çalışmalarında da başarıyla kullanılabilmektedir.¹⁰²⁻¹⁰⁸ RT-PCR yöntemi ayrıca lösemi, lenfoma, kolan, karaciğer ve tiroid kanseri gibi bir çok kanser türünün tanısında da etkili bir şekilde uygulanmaktadır. Hatta bu hastalıkların teşhisi için RT-PCR’de kullanılmak üzere hazır ticari kitlerde satılmaktadır.¹⁰⁴

RT-PCR yöntemi günümüzde toksikoloji çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin, Siffringer et al.¹⁰⁹ α 2-reseptörlerine bağlanan ve bir çok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılan Dexmedetomidine maddesinin neonatal (doğum öncesi) rat modellerinin beyinlerinde toksik etki oluşturup oluşturmadığını ortaya koymak için çeşitli biyokimyasal testlerin yanısıra bir sitokin olan IL-1 β ’nin gen ekspresyon seviyesini RT-PCR yöntemi ile analiz etmiştir. Chen et al.¹¹⁰, X-ray ışınına maruz bırakılan farelerde quersetinin potansiyel toksik etkisini araştırırken MTRNR1, POLG, POLG2 ve TFAM genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek için

RT-PCR yöntemini kullanmıştır. Zordoky et al.¹¹¹; Doxorubisin' in ratların böbrek ve karaciğerinde oluşturduğu toksisiteyi ortaya çıkarmak için RT-PCR yöntemini kullanarak EPHX2, CYP1, CYP2, CYP4A ve CYP4F genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemiştir. Voss et al.¹¹² bir fungal sekonder metabolit olan fumanosin' in fare karaciğerinde oluşturduğu toksik etki mekanizmasını açıklamak için Acox, Ahcy, Anxa2, Caplain2, Cyp4a10, FMO1 gibi çok sayıda genin ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile analiz etmiştir. Diğer taraftan, çeşitli nanopartiküllerinde olası toksik etkileri gen seviyesinde RT-PCR kullanılarak ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Örneğin, Siddiqui et al.¹⁰³ bakır oksit nanopartiküllerinin insan hepatokarsinoma hücrelerinde mitokondri aracılı apoptozisi teşvik ettiğini ortaya çıkarmak için p53, bcl-2, kasapaz-3 ve bax genlerinin ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile araştırmıştır. Watanabe et al.¹¹⁴ tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılan Fe₃O₄ magnetik nanopartiküllerinin insan akciğer epitel hücrelerinde oluşturması muhtemel sitotosik ve genotoksik etkileri Heme Oksijenaz-1 (HO-1) gen seviyesini RT-PCR ile analiz etmek suretiyle belirlemeye çalışmıştır. Herzog et al.¹¹⁵ insan A549, makrofaj ve dentritik hücrelerine in vitro şartlarda gümüş nanopartiküllerini uygulamış ve ortaya çıkması muhtemel toksik etkiyi belirlemek için TNF- α , IL-8, HMOX-1 ve SOD-1 genlerinin ekspresyonu RT-PCR ile analiz etmiştir.

Bulgular kısmından görülebileceği gibi dokuya düşük doz Ag NPs uygulaması sonrasında mitokondriyal fizyon geni olan Drp 1' in ekspresyon seviyesinde önemli bir değişim ortaya çıkmamıştır. Aynı grupta füzyon genlerinden Mfn1' de bir değişim olmazken, Mfn2' de artış, Opa 1 ' de ise bir azalış görülmüştür. Mfn2 deki artışın ise yaklaşık olarak Opa 1 deki azalmaya denk geldiği görülmüştür. Bu bulgulara göre, mevcut çalışmada Ag (Düşük Doz) grubunun füzyonun ve fizyonun meydana gelme sıklığında önemli bir değişim yapmadığı ve bu yüzden de Ag' nin bu

konsantrasyonunun fare testisinde kayda değer bir toksik etki oluşturmadağı sonucunu çıkarılmıştır. Ag (Yüksek Doz) grubunda ise hem mitokondriyal füzyon hemde fizyon genlerinin ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar görölmüşür. Aşırı fizyonun stress durumunda hücre ölümlünü tetiklediğı, füzyonun ise bu strese karşı bir koruma rolü üstlendiğı bilgisi göz önüne alındığında^{99,101}, mevcut çalışmada fizyon genindeki yüksek ekspresyona karşı her üç füzyon geninde kontrole oranla daha fazla eksprese olması hücrede ortaya çıkan stresin ortadan kaldırılmasına yönelik bir strateji olabilir. Çalışmada, gen ekspresyon analizleri yüksek doz Ag uygulamasının testiste toksik etki oluşturduğunu fakat spermatolojik muayene sonuçları aynı yüksek dozun sperm motilitesi ve velositesi üzerinde olumlu etki yaptığını göstermiştir. Diğer bir ifadeyle gen ekspresyon analizleri yüksek doz Ag uygulamasının fertilitayı azalttığını fakat spermatolojik muayene sonuçları aynı yüksek dozun fertilita olasılığını artırdığını işaret etmektedir. Bununla birlikte, fertilitada sperm tiplerinin, sperm canlılığının, sperm DNA yapısının ve doku hasarının da etkili olduğı bilinmektedir. Bu yüzden, sperm velositesi ve motilitesinde bir artışın görölməsi tek başına fertilita oranının arttığını söylemek için yetersiz olmaktadır. Dahası, nanopartiküllerin sperm zarlarını geçerek akromozom yapısına girdiğı ve burada DNA hasarı oluşturduğı belirtilmektedir.⁹⁸ Bu yüzden spermelerin motilitesi ve velositesi artmış olsada bu spermelerde fertilitayı azaltabilecek DNA hasarının meydana gelmesi olasıdır.

Literatürde, hücrede oluşturulan toksik etki durumunda mitokondriyal füzyonun artması hücreyi toksik etkiye karşı korurken fizyon mekanizmasındaki artış hücreleri toksik etkiye karşı daha korunaksız yapmaktadır.¹⁰⁰ Mevcut çalışma, TiO₂ (5 mg/kg) grubunun füzyon genlerinin ekspresyon seviyesinde herhangi bir değışiklik yapmadığını ancak fizyonun meydana gelme sıklığını artırdığını göstermiştir. Fizyon olayındaki artışın sebebi Drp1 geninin ekspresyon seviyesindeki artışa bağlanmıştır. Drp1 geni

bağlantılı fizyon olayı mitokondrilerden sitokrom C salınımını artırmakta ve bu aşırı salınımında hücreyi aPoptozise götürmektedir.¹¹⁶ Dolayısıyla, mevcut çalışmada anatase TiO₂ grubunda Drp 1 geninde bir ekspresyon artışının olması testiste ortaya çıkan bir toksik etkinin varlığıyla açıklanmıştır. Ancak, Drp1' in etkisini dengeleyecek şekilde füzyon genlerinde bir ekspresyon artışı olmadığından dolayı anatase TiO₂ grubunun testiste oluşturduğu toksik etkinin düşük seviyede olduğunu söylemek olasıdır. Zaten, sperma üzerine yaptığımız denemeler sonucunda da anatase TiO₂ grubunun toksik etkiden dolayı kıvrık kuyruklu sperm oranını azaltmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak mevcut çalışma kuyruk veninden verilen Ag (5 ve 10 mg/doku) ve anatase TiO₂ (5 mg/doku) nanopartiküllerinin ICP cihazı verilerine göre testis dokusuna geçtiği tespit edildi. Düşük dozda, Ag nanopartiküllerinin testis ağırlığı ve indeksinin yanısıra sperm parametreleri üzerinde çok fazla toksik etki göstermediği belirlendi. Aynı düşük dozda, mitokondriyal füzyon ve fizyon genlerinin ekspresyon seviyelerinde kayda değer bir değişim gözlemlenmedi. Yüksek Ag dozunda ortaya çıkan yüksek toksik etkiye bağlı olarak fizyon ve füzyon genlerinin ekspresyon seviyelerinde değişimler tespit edildi. Testiste ayrıca düşük seviyede de olsa anatase TiO₂ nanopartiküllerinin toksik etki yapabileceği belirlendi. Genel olarak, en fazla toksik etki yüksek doz Ag grubunda görülürken bunu sırasıyla Anatase TiO₂ ve düşük doz Ag grupları izlemiştir.

Bu bulgulara göre:

- fabrika, laboratuvar vb ortamlarda nanopartiküllerle temas halinde bulunan kişilerin infertilite riskine karşı daha dikkatli olması
- titanyum oksit ve gümüş nanopartiküllerinin testise ilaç vb maddelerin taşınmasında araç olarak kullanılması durumunda bu nanopartiküllerinin toksisiteyi azaltacak olan yüzey modifiye edici maddelerle kaplanmasını önermekteyiz.
- Ayrıca, gelecek çalışmalarımızda farklı şekillere, konsantrasyonlara ve büyüklüklere sahip nanopartikülleride test etmeyi planlamaktayız.

KAYNAKLAR

1. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2004, 2: 1-6.
2. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 2008, 8: 424-433.
3. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150: 552.
4. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1252–1265.
5. Jong WHD, Borm PJ. Drug Delivery and nanoparticles: Applications and Hazards. *International journal of Nanomedicine*. 2008, 3: 133-149.
6. Minelli C, Lowe SB, Stevens MM. Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2010, 6: 2336–57.
7. El-Nour KMMA, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 2010, 3: 135–140.
8. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, 3: 6.
9. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability *In vivo* in Mice. *Cancer Research*, 2009, 69: 8784-8789.
10. Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environmental Science & Technology*,

2006, 40:4346–4352.

11. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Ramakrishnan V, Kumar J. Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Advanced Powder Technology*, 2013, 24: 947–954.
12. Yah CS. The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomedical Research*, 2013, 24: 400-413.
13. Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA and Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010, 2: 544-568.
14. Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, Guo C, Huang P, Sun Z. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25: 1619–1629.
15. Özyalvaçlı E. Varikosilli infertile hasatalrda internal spermatik Ven Duvarında Nosizoformlarının Ekspresyonu Ve Periferik Ven İle Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul; Sağlık Bakanlığı, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2009.
16. Yasılıgöz E. Karbosulfan İnhalasyonunun Fare Testisine Ultrastrüktürel Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
17. Atal S. Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2014.
18. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 4. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2006.
19. Ünlükal, N, 2011. Profenofos Ve Mcp’ Nin Testise Etkilerinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
20. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji, Konu Anlatımı ve Atlas. Aytekin Y.,

- Solakoğlu S. (Çeviri editörleri) Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. Tanyolaç, A. 1999.
21. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Molecular Cell Biology, fifth edition, WH Freeman: New York, NY, 2004.
 22. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews*, 2007, 8: 870-879.
 23. Chan DC. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 79–99.
 24. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18: R169-176.
 25. Cagalinec M, Safiulina D, Liiv M, Liiv J, Choubey V, Wareski P, Veksler V, Kaasik A. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *Journal of Cell Science*, 2013, 126: 2187–2197.
 26. Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19: 2402–2412.
 27. Youle RJ, van der Bliek A. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, 2012, 337: 1062-1065.
 28. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 2008, 456: 605–10.
 29. Zorzano A, Liesaa M, Sebastián D, Segalés J, Palacín M. Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21: 566–574.
 30. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez

- M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genetics*, 2000, 26: 211–215.
- 31 Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 15927–32.
 32. Griparic L, Van Der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, Van Der Bliek AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279:18792–98.
 33. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278:7743–7746.
 34. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Lass G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal*, 2008, 27: 433–46.
 35. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, Corti S, Comi GP. Mitochondrial Fusion Proteins and Human Diseases. *Neurology Research International*, 2013, 2013:1-11.
 36. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24: 659-667.

37. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*, 2014, 505, 335-343.
38. Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17: 563-569.
39. Westermann, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1817: 1833–1838.
40. Otera H, Wang C, Cleland MM, Satoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191: 1141-1158.
41. Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Reports*, 2011, 12:565–573.
42. Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlen P, Tomilin N, Shupliakov O, Lendahl U, Nister M. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *The EMBO Journal*, 2011, 30:2762–2778.
43. Reddy PH, Reddy TH, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 2011, 67: 103-118.
44. Leventerler H. Fertil ve infertil semen örneklerinde enerji üretiminde görev alan bazı sitozolik ve mitokondriyal enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana:Çukurova Üniversitesi, 2005.
45. Aktaş H. Derin teratozoosperminin İcisi’de gebelik sonuçları üzerindeki etkisi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2007.

46. Spira A. Epidemiology of human reproduction. *Human Reproduction*. 1986, 1: 111-115.
47. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. *Fertility and Sterility*, 1991, 56: 192-193.
48. Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: Effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *British Medical Journal*, 1991, 302: 1361-1365.
48. Hasırcı E. Testis dokusundaki cıajal benzeri hücrelerin sperm matürasyon evrelerine olası etkilerinin değeriendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2012.
49. Taęa S. Çukurova bölgesindeki infertil erkeklerde Y kromozomu (Azf Genleri) mikrolelesyonlarının saptanması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2008.
50. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2008, 83: 761–769.
51. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M, O’Shaughnessy J. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23: 7794–7803.
52. Win KY, Feng SS. In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials*, 2006, 27: 2285-2291.
53. Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine*, 2012, 63: 185–198.

54. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1289–1306.
55. Cherukuri P, Glazer ES, Curley SA. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62: 339–345.
56. Visaria RK, Griffin RJ, Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, Song CW, Bischof JC. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- α delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5: 1014–1020.
57. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11: 3530–3534.
58. Milleron RS, Bratton SB. 'Heated' debates in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64: 2329–2333.
59. Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, Chen DH, Chou CH, Wang CR, Wu CL. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis & Rheumatology*, 2007, 56: 544–554.
60. Rai R, Jamuna BA. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Formatex*, 2011, 197-209.
61. Rozhkova EA, Ulasov I, Lai B, Dimitrijevic NM, Lesniak MS, Rajh T. A high-performance nanobio photocatalyst for targeted brain cancer Therapy. *Nano Letters*, 2009, 9: 3337-3342.
62. Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2001, 90: 1927–1936.
63. Browning LM, Kerry J, Lee KJ, Huang T, Nallathamby PD, Lowman JE, Xu NXH.

- Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments. *Nanoscale*, 2009, 1: 138–152.
64. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzynska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewodzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 2012, 214: 251– 258.
65. Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1994, 105: 157– 68.
66. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *The FASEB Journal*, 2006, 20; 2303-2395.
67. Park SJ, Kim TS, Park CK, Lee SH, Kim JM, Lee KS, Lee IK, Park JW, Lawson MA, Lee DS. hCG induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2010, 50: 151- 166.
68. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21: 1871– 1877.
69. Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Ravenzwaay BV. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archivies of Toxicology*, 2008, 82: 151–157.
70. Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter

- SC. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 12: 1721-1730.
71. Asare N, Instanes C, Sandberg WJ., Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, Brunborg G, Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 2012, 291: 65– 72.
72. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K, Nihei Y, Takeda K. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22: 1825–1831.
73. Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, Hu R, Giu S, Sang X, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Wang L, Tang M, Hong F. Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 243: 19– 27.
74. Wiwantitkit V, Sereemasum A, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertility and Sterility*, 2009, 9: 7–8.
75. Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology*, 2010, 30: 343-352.
76. Barkhordari A, Hekmatimoghaddam S, Ali Jebali A, Khalili MA, Talebi A, Noorani M. Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2013, 11: 767-771.
77. Erdogan O. Moleküler Biyoloji Teknikleri Laboratuvar El Kitabı, 1. Baskı, İstanbul, Aktif Yayın Evi, 2014.
78. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, (BİYOGEM) Yayın No: 3, 2008.

79. Atasoy-Ulusoy Öİ, Görgül G, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve endodontik mikrobiyoloji polymerase chain reaction (PCR) and endodontic microbiology. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2006, 16: 61-65.
80. Yıldırım A, Kandemir N, Sönmezoglu ÖA, Güleç T. Buğdayda polimeraz zincir reaksiyonu ve olası sorunların optimizasyonu. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 2011, 26:36-39
81. Ignatov KB, Miroshnikov AI, Kramarov VM. A New Approach to enhanced PCR Specificity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, 29: 368-371.
82. Özmen M. Tavuk trakealarında *Mycoplasma gallisepticum*'un Real-Time Pcr Tekniği İle Saptanması ve istatistikanalizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana:. Çukurova Üniversitesi, 2011.
83. McPherson M, Moller S. PCR. The Basics, 2nd ed. Taylor & Francis Group, UK and US, 2007.
84. Unver Y. İnsan Paraoksanaz 1 (Pon1) Geninin Klonlanması ve *Pichia pastoris*' te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2014.
85. Primrose SB, Twyman RM, Old RW. Principles of gene manipulation, 6th edition. Blackwell Publishing, USA.
86. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ad/PCR_Steps.JPG
87. Esmaeilian Y. Fare ovaryumu kök hücrelerinin real time-PCR ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2010.
88. Mertens D. AOAC Official Method 922.02. Plants Preparation of Laboratory Sample. Official Methods of Analysis, 18th edn. Horwitz, W., and G.W. Latimer,

- (Eds). Chapter 3, pp1-2, AOAC-International Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA, 2005a.
89. Mertens D. AOAC Official Method 975.03. Metal in Plants and Pet Foods. Official Methods of Analysis, 18th edn. Horwitz, W., and G.W. Latimer, (Eds). Chapter 3, pp 3-4, AOAC-International Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA, 2005b.
90. Akman O, Swiss albino ırkı farelerde sperma kalitesinin belirlenmesi amacıyla hos testi sonuçları ve diğer spermatolojik parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2007.
91. Moore H, Dvorakova K, Jenkins N, Breed W. Exceptional Sperm Cooperation in the Wood Mouse. *Letters to Nature*, 2002: 418, 174-177.
92. Somfai T, Bodo SZ, Nagy SZ, Gocza E, Ivancsics J, Kovacs A. Simultaneous Evaluation of Viability and Acrosome Integrity of Mouse Spermatozoa Using light Microscopy, *Biotechnic & Histochemistry*, 2002, 77 : 117-120.
93. Ceyhun SB, Ekinci D, Aksakal E, Erdoğan O, Beydemir S. Influence of cobalt and zinc exposure on mRNA expression profiles of metallothionein and cytochrome P450 in rainbow trout. *Biological Trace Element Research*, 2011, 144: 781-789.
94. Ceyhun SB, Aksakal E, Kırım B, Atabeyoglu K, Erdoğan O. Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. *Toxicology and Industrial Health*, 2012, 28:162-169.
95. Bai Y, Zhang Y, Zhang J, Mu Q, Zhang W, Butch ER, Snyder SE, Yan B. Repeated carbon nanotube administrations in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5:683-689.

96. Yoshida S, Hiyoshi K, Ichinose T, Takano H, Oshio S, Sugawara I, Takeda K, Shibamoto T. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 2009, 32:337–342.
97. Miresmaeili SM, Halvaei I, Fesahat F, Fallah A, Nikonahad N, Taherinejad M. Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2013, 11:423-430.
98. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 2005; 88: 412-419.
99. Chen HC, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 2007, 130:548-562
100. Hwang RD, Wiemerslage L, LaBreck CY, Khana M, Kannan K, Wang X, Zhu X, Lee D, Fridell YWC, The neuroprotective effect of human uncoupling protein 2 (hUCP2) requires cAMP-dependent protein kinase in a toxin model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2014, 69: 180–191.
101. Li S, Liu L, Chen J. Mitochondrial fusion and fission are involved in stress tolerance of *Candida glabrata*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2015, 2:12.
102. Günel T, Aydın K. Real Time PCR ve uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergesi*, 2009, 2: 43-45.
103. Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41: 1565-1568.
104. Deepak SA, Kottapalli KR, Rakwal R, Oros G, Rangappa KS, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal GK. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, 2007, 8: 234-251.

105. Yenilmez ED, Tuli A. İnvaziv olmayan bir prenatal tanı yöntemi: Maternal plazmada serbest fetal DNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2013, 22: 317-334.
106. Gutala RV, Reddy PH. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *Journal of Neuroscience Methods*, 2004, 132: 101-107.
107. Soilu-Hanninen M, Broberg E, Roytta M, Mattila P, Rinne J, Hukkanen V. Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2010, 121: 44–50.
108. Tian Y, Gunther YR, Liao IH, Liu D, Ander BP, Stamova BS, Lit L, Jickling GC, Xu H, Zhan X, Sharp FR. GABA- and acetylcholine-related gene expression in blood correlate with tic severity and microarray evidence for alternative splicing in Tourette syndrome: A pilot study. *Brain Research*, 2011, 1381: 228–236.
109. Sifringer M, von Haefen C, Krain M, Paeschke N, Bendix I, Bühner C, Spies CD, Endesfelder S. Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-10.
110. Chen R, Lin J, Hong J, Han D, Zhang AD, Lan R, Fu L, Wu Z, Lin J, Zhang W, Wang Z, Chen W, Chen C, Zhang H. Potential toxicity of quercetin: the repression of mitochondrial copy number via decreased POLG expression and excessive TFAM expression in irradiated murine bone marrow. *Toxicology Reports*, 2014, 1: 450–8.
111. Zordoky BNM, Anwar-Mohamed A, Aboutabl ME, El-Kadi AOS. Acute doxorubicin toxicity differentially alters Cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 2011, 39: 1440-1450.

112. Voss KA, Liu J, Anderson SP, Dunn C, Miller JD, Owen JR, Riley RT, Bacon CW, Corton JC. Toxic effects of fumonisin in mouse liver are independent of the peroxisome proliferator-activated receptor α . *Toxicological Sciences*, 2006, 89: 108–119.
113. Siddiqui MA, Alhadlaq HA, Ahmad J, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, Ahamed M. Copper Oxide Nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Public Library of Science*, 2013, 8: e69534.
114. Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y. Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14: 15546-15560.
115. Herzog F, Clift MJ, Piccapietra F, Behra R, Schmid O, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B: Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013, 10:11.
116. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingberman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, Nurrani J. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental Cell*, 2008, 14: 193–204.

EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Nazlı Pınar ARSLAN Doğum tarihi: 1988 Doğum yeri: Samsun Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C Adres: Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tel: 05317192634 Faks: E-mail: nparslan55@hotmail.com
Eğitim
Lise: Samsun 19 Mayıs Lisesi Lisans: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Yüksek lisans: Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2013-Devam ediyor) Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
IELTS(4.0), ÜDS eş değeri (60) 13 Temmuz 2013 (Sınav Tarihi)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK 2. ETİK KURUL FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-139

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

31.07.2014
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 24.07.2014 tarih ve 42190979-01-02/3404 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Osman Nuri KELEŞ'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Mitokondri Stresi Üzerine Olan Etkileri" başlıklı tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.07.2014 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 116 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ DEKANLIĞI
TIP FAKÜLTESİ
24.07.2014

Toplantı Tarihi : 25.07.2014

Toplantı Sayısı : 5

KARAR NO : 116- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Osman Nuri KELEŞ'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Mitokondri Stresi Üzerine Olan Etkileri" başlıklı tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 24.07.2014 tarih ve 42190979-01-02/3404 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM

Telefon : 0-442-231 47 30

Fax : 0-442-231 55 63

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr

Prof. Dr. S. Selçuk ATAMANCI