



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KOBALT OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN SIÇANLARDA
KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELDA ORDU

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MERSİN
MAYIS-2022

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KOBALT OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN SIÇANLARDA
KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELDA ORDU

ORCID ID: 18-04060171-004

**DANIŞMAN
PROF. DR. SERAP YALIN**

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MERSİN
MAYIS- 2022**

ÖZET

KOBALT OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN SIÇANLARDA KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere sahip bileşiklerdir. Nanopartiküllerin son yıllarda sanayide ve günlük hayatta kullanılmasına olan ilgi oldukça yüksektir. Nanopartiküllerin insan sağlığı ve ekolojik sistem üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi yoktur. Nanomalzemeler için uygun bir doz-metrik seçimi, toksisitelerini ve risklerini değerlendirmek için önemlidir. Partikül boyutu 100 nm'den küçük nanopartiküllerin hava ve sıvıda daha fazla biriktikleri, epitel hücreleri, lenfatikler, kan, sinir sistemi ve sekonder hedef organlara daha fazla geçtikleri, büyük partiküllerin ise karaciğerin eliminasyonu nedeniyle hedef organlara ulaşamadığı ifade edilmektedir. Kobalt oksit nanopartikülleri güneş enerjisinde güneş enerjisi emici olarak uygulanır. Cam ve porselene renklendirici ve pigment olarak eklenir. Katalizde, kimya endüstrisinde organik sentez ve katalizör taşıyıcı için oksidan ve katalizör olarak kullanılır. Kobalt oksit nanopartiküllerinin kan, karaciğer, akciğer, böbrek, testisler ve bağırsaklarda toplandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada kobalt oksit nanopartiküllerinin sıçanların karaciğer dokusunda inflamasyon, DNA hasarı ve oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Wistar Albino cinsi, 30 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele seçilerek 5 gruba ayrılmıştır. Farklı dozlardaki kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan sıçanların karaciğerinde nanopartiküllerin inflamasyon, DNA hasarı ve oksidatif stres üzerine etkisinin değerlendirilmesi için sırasıyla tümör nekroz faktör alfa, interlökin 6, genotoksik hasar, malondialdehid düzeyleri ve süperoksit dismutaz, katalaz enzim aktiviteleri ölçülerek elde edilen bulgular istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak elde edilen bulgular incelendiğinde kobalt oksit nanopartiküllerin oksidatif stres, inflamasyon ve DNA hasarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede etkili olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres; Karaciğer; Nanopartikül; DNA hasarı; Kobalt oksit; İnflamasyon.

Danışman: Prof. Dr. Serap YALIN, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF COBALT OXIDE NANOPARTICLES ON LIVER IN RATS

Nanoparticles are compounds that are smaller than 100 nm and have size-specific properties. Interest in the use of nanoparticles in industry and daily life in recent years is very high. There is not enough information about the effects of nanoparticles on human health and the ecological system. Choosing a suitable dose-metric for nanomaterials is important to assess their toxicity and risks. It is stated that nanoparticles with a particle size of less than 100 nm accumulate more in air and fluid, pass through epithelial cells, lymphatics, blood, nervous system and secondary target organs, and large particles cannot reach the target organs due to the elimination of the liver. Cobalt oxide nanoparticles in solar energy is applied as solar energy absorber. It is added as a colorant and pigment to glass and porcelain. For organic synthesis and catalyst carrier in the chemical industry and catalyst, it is used as an oxidant and catalyst. Cobalt oxide nanoparticles are thought to be collected in the blood, liver, lungs, kidneys, testicles, and intestines. In this study, it was aimed to evaluate the effects of cobalt oxide nanoparticles on inflammation, DNA damage and oxidative stress in liver tissue of rats. For this purpose, 30 female Wistar Albino rats were used. Rats were randomly selected and divided into 5 groups. In order to evaluate the effects of nanoparticles on inflammation, DNA damage and oxidative stress in the liver of rats exposed to different doses of cobalt oxide nanoparticles, tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, genotoxic damage, malondialdehyde levels and superoxide dismutase and catalase enzyme activities were measured, respectively, and the findings were evaluated using statistical methods. As a result, when the obtained findings were examined, it was determined that cobalt oxide nanoparticles did not have a statistically significant effect on oxidative stress, inflammation and DNA damage.

Keywords: Oxidative stress, Liver; Nanoparticle; DNA damage; Cobalt oxide; Inflammation.

Advisor: Prof. Dr. Serap YALIN, Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Mersin.

TEŞEKKÜR

Değerli bilgileri ve tecrübeleri ile çalışmama yön veren ve çalışmamın her aşamasında bana yardım eden, manevi desteğini esirgemeyen başta değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap YALIN'a,

Bilgi paylaşımları ve desteklerinden dolayı değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a, Prof. Dr. A. Erdinç YALIN'a, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Nil ÜNAL'a ve Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na,

Tez çalışmalarım sırasında büyük emeği olan ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Metin YILDIRIM'a ayrıca deneyimlerinden yararlandığım Merih AKKAPULU ve Seher ÖNGEL'e, Deney Hayvanları Araştırma Biriminden Dr. Vet. Hek. Tamer YENER'e

Çalışmalarına verdiği desteklerinden dolayı Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı eşim Saffet SAĞPAZAR'a sonsuz saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2020-1-TP2-4063

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
<hr/>	
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Nanopartiküller	3
2.1.1. Karbon Bazlı Nanomateryaller	5
2.1.2. Metal Bazlı Nanomateryaller	5
2.1.3. Dendrimerler	7
2.1.4. Nanokompozitler	8
2.2. Kobalt Oksit Nanopartikülleri	8
2.2.1. Kobalt Oksit Nanopartiküllerine Maruziyet	9
2.2.2. Kobalt Oksit Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri	10
2.3. Karaciğer	12
2.3.1. Karaciğerin Genel Tanımı	12
2.3.2. Karaciğerin Fonksiyonları	14
2.3.2.1. Glukoz Metabolizması	14
2.3.2.2. Proteinlerin ve Aminoasitlerin Metabolizması	14
2.3.2.3. Karaciğerin Hematolojik Fonksiyonları	15
2.4. Oksidatif Stres ve inflamasyon	15
2.5. Serbest Radikaller	17
2.6. Nanopartiküller ve Oksidatif Stres	18
2.7. Antioksidanlar	19
2.7.1. Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz	20
2.7.1.2. Katalaz	20

	Sayfa
2.7.1.3. Glutasyon S-Transferaz	21
2.7.1.4. Glutasyon Peroksidaz	21
2.8. Genetik Toksikite Yöntemleri	21
2.8.1. Tek Hücreli Jel Elektroforez Yöntemi (KOMET)	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Araç ve Gereçler	23
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	23
3.2. Deney Hayvanları	24
3.3. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması	26
3.4. Doku Homojenatinin Hazırlanması	27
3.5. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi	27
3.5.1. Malondialdehit Düzeyinin Tayini	27
3.5.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	28
3.5.3. Katalaz Aktivite Tayini	30
3.5.4. Lowry Yöntemi	30
3.5.5. Kuyruklu Yıldız Testi (KOMET)	31
3.6. İnflamasyon Belirteçlerinin Saptanması	33
3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	34
4. BULGULAR	35
4.1. KOMET Test Sonucu Verileri	35
4.2. Oksidatif Stres Parametreleri Sonuçlarına Ait Veriler	37
4.2.1. Malondialdehit Sonucu Verileri	37
4.2.2. Süperoksit Dismutaz Sonucu Verileri	38
4.2.3. Katalaz Sonucu Verileri	38
4.3. İnflamasyon Parametreleri Sonuçlarına Ait Veriler	39
4.3.1. İnterlökin Altı Sonucu Verileri	39
4.3.2. Tümör Nekroz Alfa Sonucu Verileri	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Metalik nanopartiküllerin avantaj, dezavantaj ve karakterizasyonu	6
Tablo 2.2. Kobalt oksitin insan metabolizmasındaki etkileri	11
Tablo 2.3. Parankimal ve parankimal olmayan karaciğer hücreleri	12
Tablo 2.4. Serbest radikallerin kaynakları	18
Tablo 3.1. Deney Grupları	26



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Nanopartiküllere ait elektron mikroskobu görüntüleri	4
Şekil 2.2. Karbon nanotüplerin (CNT) çeşitleri	5
Şekil 2.3. Metalik nanopartiküller	6
Şekil 2.4. Dendrimer yapısı	8
Şekil 2.5. Kobalt ve kobalt oksit nanopartiküllerinin genel uygulamaları	9
Şekil 2.6. Nanopartiküllere insanın maruz kalma yolları ve etkileri	11
Şekil 2.7. İnsan vücudunda karaciğerin konumu ve diğer organlarla ilişkisi	13
Şekil 2.8. Karaciğerde oksidatif stres	17
Şekil 3.1. Sıçanlara oral gavaj yoluyla nanopartiküllerin uygulanması	25
Şekil 3.2. Sıçan dokularının alınması	26
Şekil 3.3. Sıçanlardan kan alınması	27
Şekil 4.1. Karaciğer dokusundaki GHİ komet verilerinin değerleri	35
Şekil 4.2. Karaciğer dokusundaki HHY komet verilerinin değerleri	36
Şekil 4.3. Sıçan karaciğerlerine ait komet görüntüleri	36
Şekil 4.4. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri	37
Şekil 4.5. Karaciğer dokusundaki SOD düzeyleri	38
Şekil 4.6. Karaciğer dokusundaki katalaz düzeyleri	39
Şekil 4.7. Karaciğer dokusundaki IL-6 düzeyleri	39
Şekil 4.8. Karaciğer dokusundaki TNF- α düzeyleri	40

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ASA	Askorbik asit
A549	İnsan akciğer adenokarsinom epitel hücreleri
BEAS-2B	İnsan bronşiyal epitel hücreleri
BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Katalaz
CNT	Karbon nanotüp
Co	Kobalt
Co ₃ O ₄	Kobalt oksit
CRP	C-reaktif protein
DMSO	Dimetil Sülfoksit
Fe	Demir
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz enzimi
HepG2	İnsan Hepatokarsinomu
HCP	Altıgen kapalı paket
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IL	İnterlökin
IL-6	İnterlökin 6
LDH	Laktat Dehidrogenaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MDA	Malondialdehid
MNP	Metalik nanopartikül
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	NAD ⁺ 'nin indirgenmiş formu
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
OH·	Hidroksil
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TiO ₂	Titanyum dioksit
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör alfa
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

Kısaltma/Simgesi	Tanım
-------------------------	--------------

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre



1. GİRİŞ

Kobalt elementi yoğunluğunun en fazla ultramafik tür ve mafik türdeki volkanik kayalarda bulunduğu bilinmektedir. Tortul kayaçlar olarak adlandırılan yapılarda kumtaşında ortalama 4 mg/kg, karbonatlı kayalarda 6 mg/kg, şistler ya da killerde yaklaşık 40 mg/kg kobalt bulunmaktadır. Metamorfik kayaçların oluşum esasları kobalt yoğunluğuyla ilgilidir. Bu sebepten bu metamorfik kayaçlar içerisinde bulunan kobalt seviyesi temelde tortul kayaçlar veya volkanik kayaç kaynağındaki elementlerin yoğunluğuna dayanmaktadır. Oksitlenme şartları baz alındığında aynı zamanda mangan oksitlerle birlikte yüksek oranda konsantre oluşturma eğiliminde bulunurlar. Özellikle jet motorlarında süper alaşım olarak kullanılan kobalt, manyetiklik kazandırma, mekanik özelliklerin güçlendirilmesi hedefiyle alaşımlarda, korozyonlardan korunma, yüksek hız ve takım çeliklerinde, kesici olan uçlarda alaşım olarak da kullanılır. Ayrıca pil gibi her türde manyetik özellikli malzemelerde ve kayıt cihazlarında kullanılmaktadır. Kobalt bileşikleri ise petrolde, seramik üretiminde katalizör, boyalarda (renklendirmek amacıyla) pigment, mürekkep olarak kullanılırken verniklerde kurutma amacıyla kullanılır. Günümüz koşulları baz alındığında kobalt elementinin en büyük maden üreticisi Kongo (% 52) iken en fazla metal kullanıcısı ise ABD'dir [1-3].

Nano boyutlu parçacıklar, kendine özgü fizikokimyasal özellikleri nedeniyle geniş bir endüstriyel kullanıma sahiptirler. Nanopartiküllerin çeşitli faydalarına rağmen, insan sağlığı ve çevreye olan riskleri hakkında daha az bilgi bulunmaktadır. Son zamanlarda nanopartiküllerin sadece endüstriyel sektörlerde değil aynı zamanda ilaç ve gıda üretiminde de kullanımlarında çarpıcı bir artışa rastlanmaktadır. Ayrıca, nanoparçacıklar, yığınsal malzemede doğal olaylardan veya antropojenik aktiviteden dolayı kirletici maddeler olarak bulunur. Sonuç olarak, insanlar mesleki ve / veya çevresel koşullardan dolayı dermal absorpsiyon, yutma ve soluma yoluyla nanopartiküllere maruz kalır.

Nanopartiküller, hücrelerin makromoleküllerini etkileyebilmekte aynı zamanda nanopartiküllere maruz kalan organlarda (akciğer, karaciğer, böbrek) sinir sistemleri ve gastrointestinal sistemler üzerinde morfolojik farklılıklara sebep olabilmektedir [3-6]. Suda çözünemeyen kobalt oksit türlerinde solunum yoluyla vücuda alındığında bu nanopartiküller vücut tarafından yüksek oranda emilebilmekte ve aynı zamanda hücre içerisinde bir kaç gün gibi kısa bir sürede çözünerek kana karışabilmektedir. Kobalt oksit nanopartikülleriyle ilgili yapılan çalışmalarda birçok organizmada toksik etki gösterdiği bildirilmiştir [4-6]. Havada asılı olan katı haldeki kobaltın solunum yoluyla alınması ve derinin kobalt tuzlarına temas etmesi sonucunda kobalt zehirlenmesi gerçekleşmektedir. Katı (toz) haldeki kobalt elementi vücuda alındığında akciğerlerde çözünmesi neticesinde idrar ve kana karışır. Hayvanlar üzerinde yapılan incelemelerde çok ince olan partiküllerin (20 nm) otuz dakikada, büyük partiküllerin

(11 µm) ise 3 - 4 gün içerisinde ortalama olarak yarısının çözüldüğü sonucuna varılmıştır. Su içerisinde çözünebilir bileşikler ise ağız yoluyla vücuda girdiğinde yaklaşık olarak % 75 kadarı vücuttan çıkarılabilirken arta kalan kısmı da kan ve karaciğer gibi akciğer, böbrek ve hatta testisler ve bağırsaklarda toplanmaktadır. Kobalt oksit nanopartiküllerinin iki farklı solunum hücrelerinde sitotoksikite ve inflamasyon üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada A549 hücrelerinde 20 ve 40 µg/mL kobalt oksit nanopartikül dozlarında sitotoksik ve inflamasyon etkisi gözlenmemiş ancak BEAS-2B hücrelerinde sitotoksikite ve inflamatuvar etki gözlenmiştir. Kobalt oksit (Co₃O₄) ve titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerinin anjiyogenik hücrelerdeki etkisi ile ilgili çalışmada apoptozisi hızlandırdığı, oksidatif stresi ve inflamasyonu arttırdığı belirtilmiştir [7].

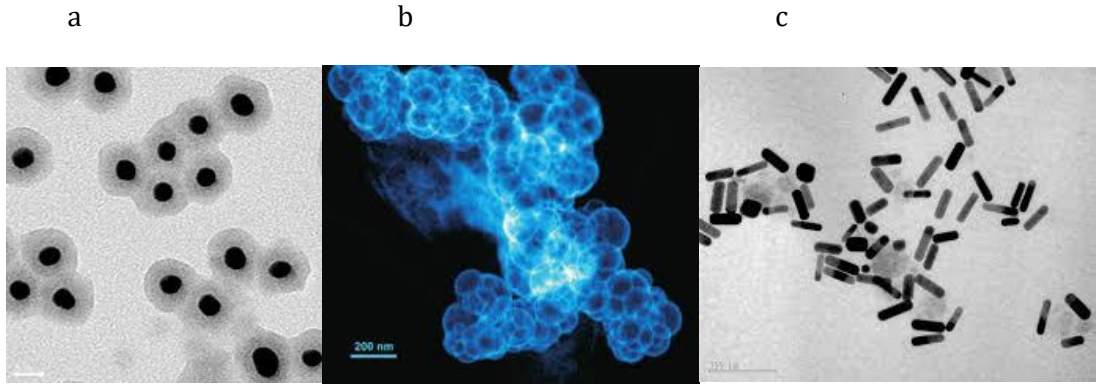
Nanopartiküllerin insan sağlığı ve ekolojik sistem üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi yoktur. Artan kullanımlarının ışığında, insan sağlığı üzerindeki nanopartiküllerin etkileriyle ilgili endişeler, mesleki ortamlarla sınırlı değildir, aynı zamanda tüketicinin maruz kalmasını da içerir. Kobalt oksit nanopartiküllerinin sanayi ve teknolojiye kullanımı oldukça yaygındır. Bu tez kapsamında kobalt oksit nanopartiküllerinin karaciğer dokusunda inflamasyonu tetikleyip tetiklemediği, DNA hasarına sebebiyet verip vermediği ve oksidatif stres üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

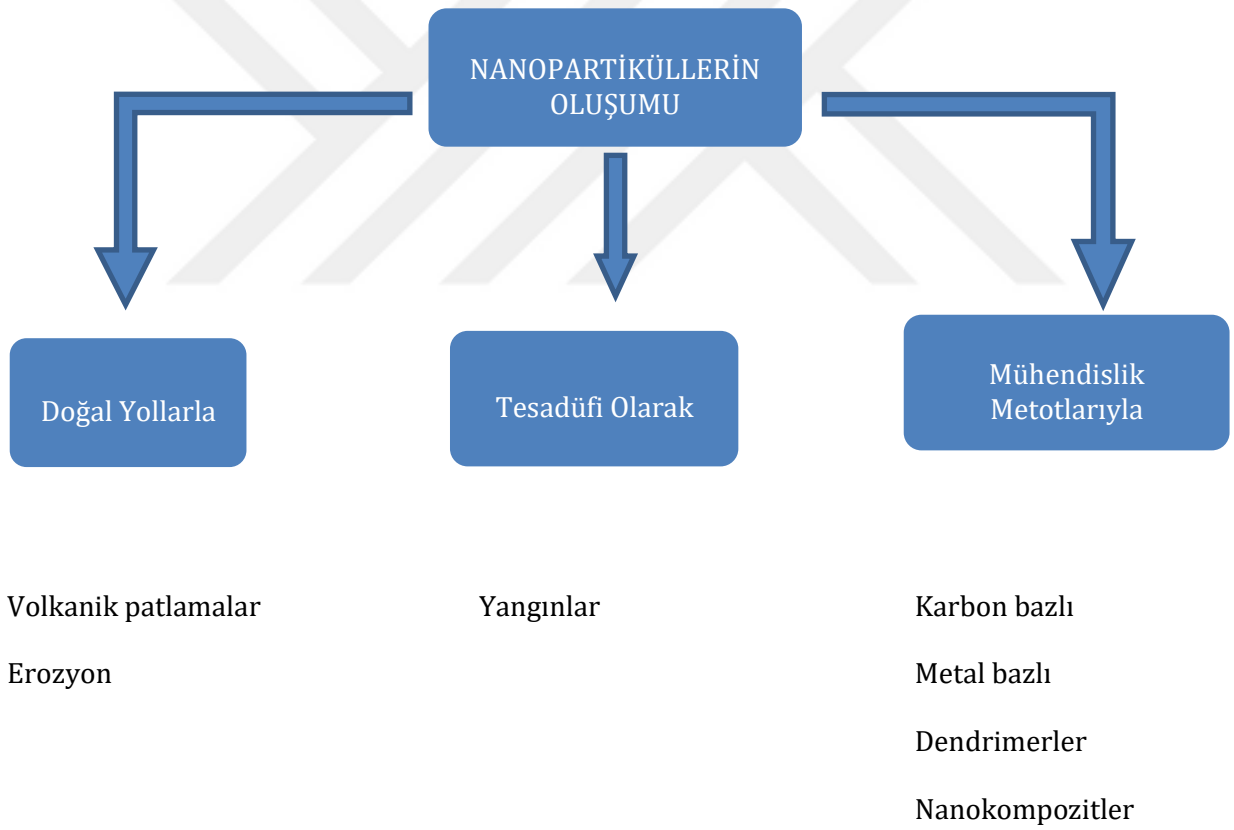
2.1. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanokristal, nanotüp ve boyutu 0,1 nm ile 100 nm arasında değişen partiküller (nanopartiküller) gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesi sağlanabilmektedir. Nanopartiküllerin hacimsel yapıları malzemelerden yüksek oranda farklı ve aynı zamanda da üstün olarak kabul gören özellikler sergiledikleri bilinmektedir [8-10]. Sık sık belirtilen nanopartiküllerin bu özelliklerinin bu denli çekici olmasının nedenleri arasında günümüzde bilinenleri ise; nanopartiküllerin sahip olduğu temel fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilecek kuantum boyutta olmasından kaynaklanan etkileri (elektrik ve optik hatta mekanik spesifik özelliklere sahip olan bu benzersiz yeni üretilen malzemeler oluşmasının nedeni malzemelerin boyutlarının nanometreye indirgenmesi sayesinde gerçekleşmesi), yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ile elektronik yapısının boyuta bağımlı olması, yüksek yüzey alanı ve hacim oranı sayesinde öne çıkmaktadır [8,11]. Bu yapıların sahip oldukları olağanüstü özelliklerinden dolayı nanopartiküllerin üretimi yüksek aktiviteli katalizörlerin, teknolojik olarak özel ürünler ile süperiletkenlerin (optik uygulamalar amacıyla), yüzey aktif maddelerin, ilaç transferlerinin ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin sunulmasının yolunu da açmıştır (Şekil 2.1.) [8]. Nanoteknoloji ve nanopartiküller, havacılık-uzay mühendisliği, nano-elektronik, çevre iyileştirme, tıbbi sağlık ve tüketici ürünlerindeki potansiyel uygulamaları ile giderek daha fazla tanınmaktadır [12]. Günümüzün ilerleyen teknolojisi olarak bilinen nanoteknoloji hayatımızın birçok alanına girmiş bulunmaktadır [13].

Kozmetik, gıda, tıp, savunma sanayi, elektronik, iletişim, enerji üretimi, tekstil, ilaç, giyim ve enerji alanlarında nanopartiküllerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Ayrıca boya endüstrisinde de yine nanomalzemelerden yararlanıldığı gözlenmektedir bunun yanı sıra binaların çoğunlukla dış cephelerinde gerektiğinde ise iç cephelerinde faydalanılmak üzere; kendini temizleyebilme, yüksek oranda koruma, kokuların oluşmasını engelleme antimikrobiyal ve antibakteriyel gibi özellikleri bulunan boyalar üretilmektedir [13-15]. Günümüze bakıldığında fizik, kimya, biyoloji dahil olmak üzere ilaç, çevre, bilgisayar ve uzay gibi endüstrinin kapsadığı birçok alanda da yine nanoteknoloji kullanılmaya başlanmıştır [15]. Bunun yanında, nanomalzemelerin atıklarının, insan, hayvan ve diğer canlıların sağlığı ve doğaya ayrıca zararlı etki gösterebileceği bilinmektedir [11]. Nanoteknolojinin kullanım alan büyüklüğü ve bu denli hızla günümüzde gelişip yaygınlaşması göz önüne alındığı zaman, bu nano boyutlu malzemelerin zararlı etkilerinin tespit edilmesi, çevrenin ve aynı zamanda insan sağlığının korunmasında oldukça önemli bir yere sahiptir [15].



Şekil 2.1. Nanopartiküllere ait elektron mikroskobu görüntüleri (a) altın çekirdek silika kabuk nanopartiküller, (b) iç boşluklu platin nanopartiküller ve (c) altın nanoçubuklar [8].

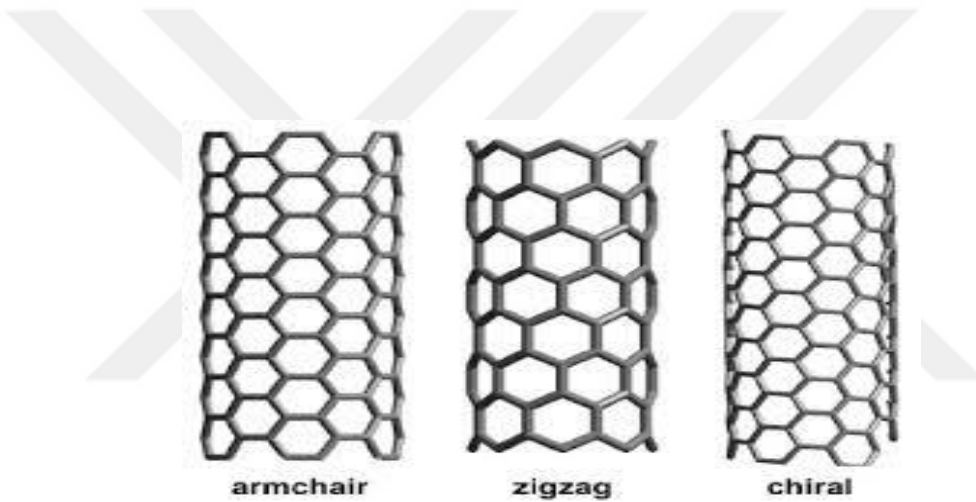


Amerikan Çevre Koruma Örgütü USEPA nanopartikülleri 4 bölümde incelemiştir. Bunlar,

- I. Karbon bazlı nanomateryaller
- II. Metal bazlı nanomateryaller
- III. Dendrimerler
- IV. Nanokompozitler

2.1.1. Karbon Bazlı Nanomateryaller

Karbon malzemeler fullerenler, elmas, karbon fiber, grafit ve karbon nanotüpler olmak üzere birçok farklı şekilde bulunabilmektedirler [15]. En çok incelenen karbon allotroplarından biri olan karbon nanotüp (KNT)'ler benzersiz fizikokimyasal özellikleri ile gen tedavisi, ilaç transferi, doku mühendisliği ve biyosensörler gibi birçok biyomedikal alan uygulamasında kullanıldığı gibi, metalik, yarı iletken ve süper iletken elektron taşıma özelliklerine sahiptirler. Ancak toksisite bakımından KNT'ler biyomedikal alan uygulamalarında endişe vericidir özellikle de birim hacim başına düşen geniş ölçekli bir yüzey alanına sahip olan küçük boyuttaki KNT'lerin toksisite bakımından önemli ölçüde etkisi vardır [16-18]. Bununla birlikte, KNT'lerin oldukça hidrofobik olması biyolojik uyumluluklarını azaltmada önemli bir rol oynar (Şekil 2.2.) [19].



Şekil 2.2. Karbon nanotüplerin (KNT) çeşitleri [15].

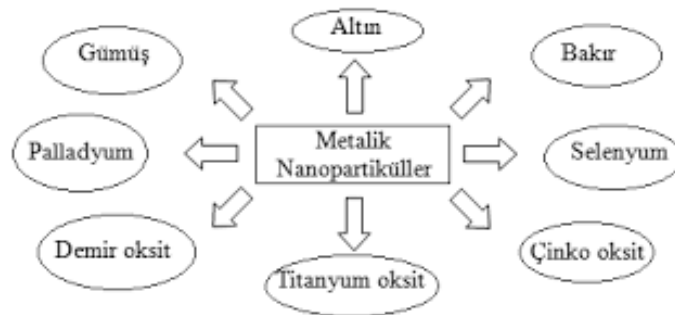
2.1.2. Metal Bazlı Nanomateryaller

Metal bazlı nanopartiküller bakır, bakır oksit ile demir, demir oksit ve titanyum dioksit gibi birçok metalleri ve metal oksitleri de içine alan metal içerikli nanopartiküllerdir (Şekil 2.3.) [20]. Metal kaynaklı nanomateryaller sahip oldukları özelliklerinden ötürü birçok bilim dalında yepyeni ilgi alanını oluşturmuş, ayrıca yeni ürünlerin geliştirilmesine de zemin hazırlamıştır [21]. Metal nanopartiküllere bakıldığında kendine has yapılanmaları sayesinde elektronik ve malzeme endüstrisinde kullanmak için oldukça önem taşımakta ve anti-mikrobiyal malzemelerin sentezi, ilaç taşınması, hastalık teşhisi ve tedavisi gibi birçok tıbbi uygulamada yeni yöntemlerin geliştirilmesine imkân sağlamaktadır [22].

Nanometre boyutlarındaki metal nanopartiküllerin manyetik, optik ve elektriksel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir ve bu nanopartiküllerin kozmetikten ilaca kadar değişiklik gösteren, çok geniş kullanım alanına sahiptir [23]. Metalik nanopartiküllerin avantaj, dezavantaj ve karakterizasyonu Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Metalik nanopartiküllerin avantaj, dezavantaj ve karakterizasyonu [20].

Metalik Nanopartiküller		
Avantajları	Dezavantajları	Karakterizasyonu
Artmış rayleigh saçılımı Yüzeyce güçlendirilmiş raman saçılması Güçlü plazma emilimi Biyolojik sistemleri görüntüleme Nano skaladaki metalik substrat hakkındaki kimyasal bilgileri belirleme	Nanopartiküllerin kararsızlığı Safsızlık Nanomalzemelerin biyolojik olarak toksik olmaları Patlayıcı olmaları Sentez zorluğu	Absorbans Spektroskopisi Infrared Spektroskopisi Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Atomik Kuvvet Mikroskobisi (AFM) X-ışınları Kırınım Difraktometresi (XRD) Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) Uzamış X-ışınları Soğurumlu Ayrıntılı Yapı (EXAFS) X ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

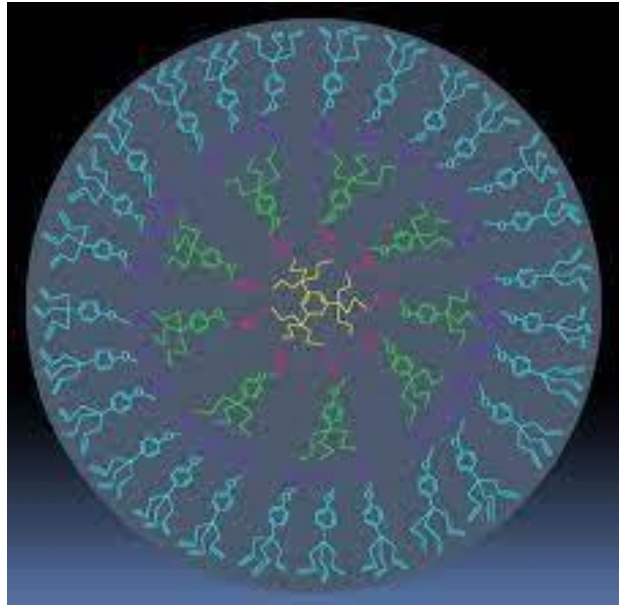


Şekil 2.3. Metalik nanopartiküller [24].

Kolloid veya sol formundaki metal nanopartiküller, orta çağlardan beri insanlar tarafından dekoratif dekorasyon için kullanılmaktadır örneğin 17. yüzyılın ortalarına doğru, Andreus Cassius tarafından cam emaye ve porselen olarak kullanılan eşyalarda renk pigmenti olarak kullanılan, kaplanmış altın kolloidi olan Purple of Cassius'u keşfedilmiştir [25]. Bunun yanı sıra metal nanopartiküllerin kimyasal ve elektronik özellikleri sebebiyle de yeni sistem nano cihaz geliştirilmesi amacıyla biyologlar, fizikçiler, kimyagerler ve özellikle de mühendislerin dikkatini üzerine çekmeyi de başarmıştır [26].

2.1.3. Dendrimerler

Dendrimer kelime anlamı olarak, Yunanca'da ağaçlar anlamındaki "dendri" ve kısım anlamındaki "meros" kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş; düzenli olarak dallanmış insan yapımı, küre şeklinde olan geniş moleküllerin yeni bir sınıfı moleküllerdir [27,28]. Star-burst ya da Arboroller polimer olarak da bilinen dendrimerler, özel kullanımları amacıyla hazırlanmış olan kor ve uç gruplarıyla endüstriyel ve bilimsel olarak son yıllarda oldukça önem kazanmıştır [29]. İyi tanımlanmış bir şekil ile büyüklüğe (2–20 nm) ve dar polidispersiteye sahip olan dendrimerler, hücre içine ve dışına kolaylıkla taşınırken yüzey fonksiyonel grupları, çoklu ilaç moleküllerinin yüzeye bağlanmasını sağlar. Tipik doğrusal polimerler ile karşılaştırıldığında, yüzey fonksiyonel grupları, çoklu ilaç moleküllerinin, yüksek ilaç yükü sağlayan yüzeye bağlanmasını sağlar (Şekil 2.4.) [30,31].



Şekil 2.4. Dendrimer yapısı [30].

2.1.4. Nanokompozitler

Nanometre boyutlarında harmanlanmış bileşenlere sahip olan malzemeler olarak tanımlanan nanokompozitler, bir konak veya konak olan en az iki bileşen malzemedan ve nanofiller veya konuk olarak adlandırılan güçlendirici bir bileşenden oluşur. Nanokompozitler kuantum boyutlarda olduğu için, bu malzemeler polimerlerde moleküller arasında bir köprü görevi görebilmektedir. Bu, özellik sayesinde nanokompozitin diğer mikro ölçekli kompozitlerden farklı özelliklerde olmasını sağlamaktadır. Nanokompozit ürünü malzemeler, zaman zaman bünyelerinde organik veya inorganik, olarak bazen de hibrit kabul edilen bileşenler barındırmaktadırlar. Doğadaki çeşitli nanokompozit örnekleri dişler, kemikler ve deniz kulağı kabuklarıdır. Doğal nanokompozitlerin üstün özelliklerinden yola çıkılarak, bunlarla benzer özellikler göstermesi beklenen sentetik nanokompozitler sentezlemek amacı ile çeşitli çalışmalar yapıldığı bilinmektedir [32].

2.2. Kobalt Oksit Nanopartikülleri

Manyetik ve antimikrobiyal özelliklere sahip olan kobalt oksit, siyah toz formundaki geçiş metal oksitlerinden biridir. Manyetik nanoparçacıklar, bağımsız bir yapıya ve maksimum 100 nm boyutunda olan, manyetik özelliklere sahip parçacıklardır. Çeşitli kristal yapılara sahip kobalt, altıgen kapalı paket (hcp) fazı, yüzey merkezli kübik (fcc) fazı ve epsilon fazı olmak üzere farklı kristalografik yapılara sahip üç yarı kararlı fazdan dolayı en önemli ferromanyetik metallere biridir [33,34].

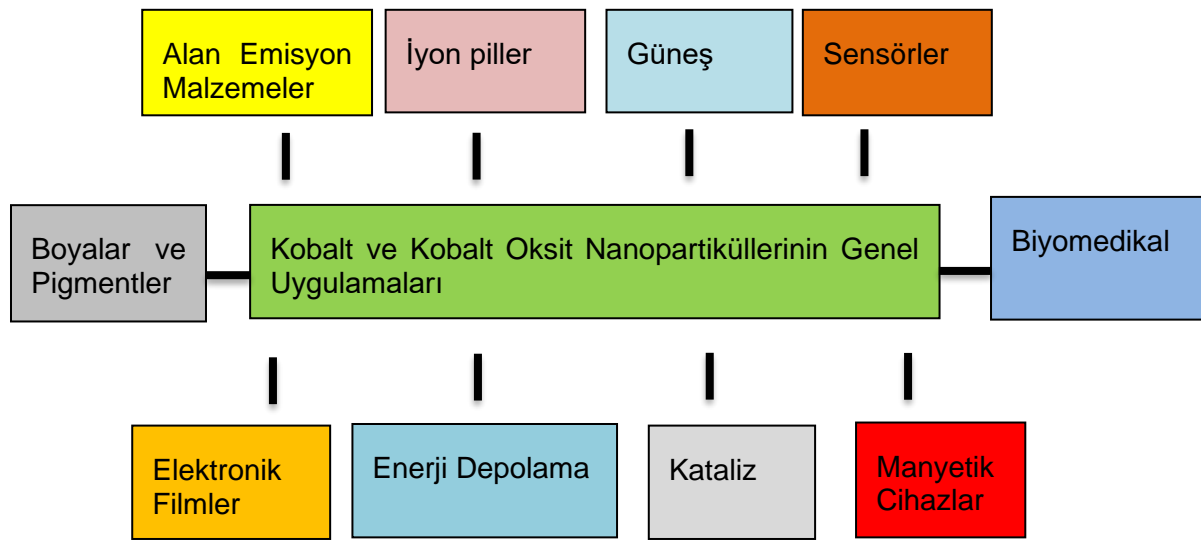
Kobalt oksit bazlı malzemeler özelliklerine göre sensörlerin sentezi, manyetik malzemeler, elektrokimyasal sistemler, elektronik ince filmler, akıllı emiciler, katalizörler gibi çeşitli alanlarda ve medikal alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [33-35]. Tüm bunların yanında kobalt nanoparçacıklarının özelliklerine çok dikkat edilmiş olmasına rağmen bu nanopartiküllerin büyüme mekanizması hakkında çok az araştırma yapılmıştır [35].

Son zamanlarda oldukça ilgi gören ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösteren demir oksit ve bakır oksit gibi nanopartiküller arasında kobalt oksit de bulunmaktadır. Spesifik özellikleri nedeniyle kullanımı birçok alanda artan ilgi gören kobalt oksit nanopartiküllerinin, kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir ve nanopartiküllerin etkin taşıyıcı özellikleri, kanser tedavisinde kullanımlarını artırmıştır [36,37].

Nanotoksikoloji bakımından bu gelişmelerin yanı sıra solunan nanopartiküllerin (NP'ler) insanlarda organlarla hücresel düzeyde nasıl etkileşime girdiği ve zararlı koşullara neden

olduğuna dair yeterli çalışmalar henüz oluşturulmamıştır [36]. Bunun yanı sıra ilk kez, insan derisi üzerinde bir *in vitro* protokol kullanarak kobalt oksit NP'lerin deri emilimine yönelik yapılan bir çalışmada ortaya çıkan sonuçların NP'lerin insan vücudu ile etkileşimi hakkında önemli bilgiler vermiştir [38].

Biyotıpta ve endüstriyel ürünlerde yaygın olarak kullanılmakta olan kobalt oksit nanopartiküllerinin hücreler tarafından hızlı bir şekilde alınabilmesi, insan sağlığı için faydalı olabileceği gibi onları potansiyel olarak tehlikeli bir hale de getirmektedir [39].



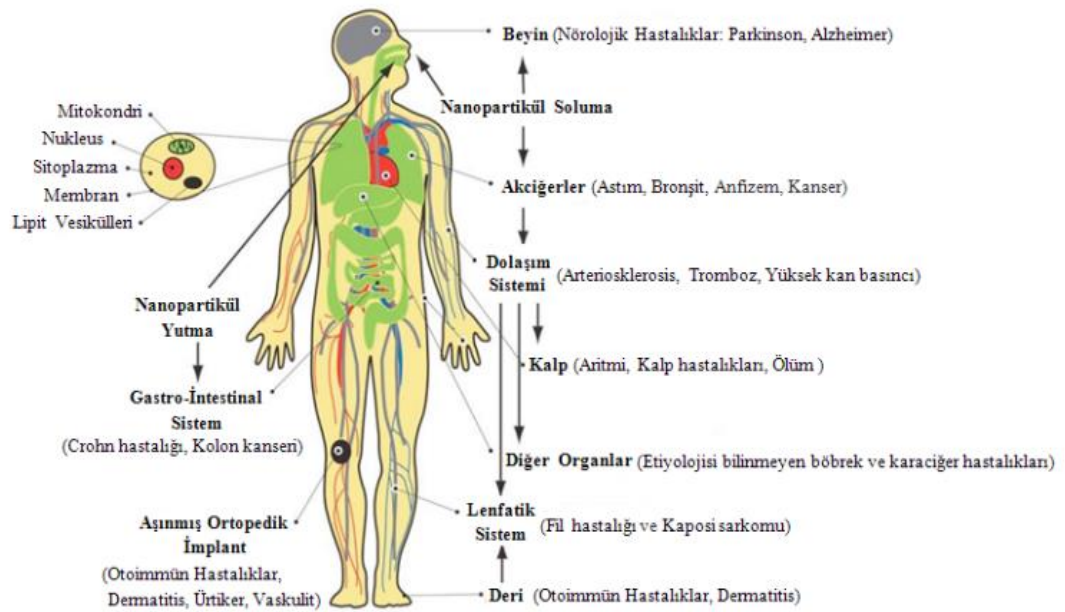
Şekil 2.5. Kobalt ve kobalt oksit nanopartiküllerinin genel uygulamaları [40]

Tıpta, tekstilde, kozmetik alanlarda, elektronik ve optik alanında, enerji üretiminde ve çevre bilimi gibi alanlarda gümüş, demir, kobalt, bakır, altın, çinko oksit NP'ler, magnezyum oksit, titanyum dioksit (TiO_2) ve daha bir çok nanopartikül kullanılmakta olmasına rağmen bu nanopartiküller arasında uygulama alanlarının oldukça fazla olmasından dolayı en fazla kobalt ve kobalt oksit nanopartiküllerinden yararlanılmaktadır (Şekil 2.5.) [40]. Bununla birlikte, bazı raporlarda kobalta maruz kalmış insanların hipertansiyon ile kalp yetmezliği veya kardiyojenik şok ve geri dönüşümlü EKG değişikliklerinin ortaya çıktığı tanımlanmıştır [36].

2.2.1. Kobalt Oksit Nanopartiküllerine Maruziyet

Nanomalzemelerin gerek potansiyel üretim ve kullanımı gerek geri dönüştürme veya bertaraf edilmesi sırasında çevreye salınması, çevresel uygulamalardan dolayı ortaya çıkan yan ürünlerden ya da bu ortaya çıkmış olan ürünlerin kullanılmasından kaynaklı olarak bu

nanomateryallere maruz kalınmasından dolayı insan sağlığına olumsuz etkileri olabilir [41,42]. Kamu ve özel sektör kuruluşlarında kullanılan nano ölçekli malzemelerin benzersiz özelliklerinden dolayı bu malzemelere maruz kalan insanların sağlığı ile ilgili etkilerini inceleyebilmek ve yeni yaklaşımlar üretebilmek amacıyla araştırmalar başlatılmıştır [40]. Potansiyel sağlık riskleri ele alındığında tüketicinin potansiyel maruziyeti oldukça önemlidir. Nanomalzemelerin kullanımı ya da yanlış kullanılması sırasında çevreye salınması, cilt teması, solunum yolu ya da yutma sonucunda maruziyet meydana gelebilir. Temel olarak sentezlenen nanopartiküllere solunum (inhalasyon) başta olmak üzere, ağızdan yutma, deriden temas ve gözle temas olmak üzere dört ana yolla insan maruziyeti gerçekleşir [43]. Kobalt oksit nanopartiküllerinin deri emiliminin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışma hasarlı olan deride yüksek miktarda olduğu sağlıklı deride emilim olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır [38]. Anjiyojenik hücreler üzerinde yapılan başka bir çalışmada kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan hücrelerde hücre canlılığının nanopartikül konsantrasyonu ile doğru orantılı bir azalma olduğu gösterilmiştir [44]. Ayrıca mesleki yönden kobalta maruz kalan çalışanlarda intersiyel pnömoni ve astım benzeri akciğer hastalıkları görülebilmektedir (Şekil 2.6.) [45].



Şekil 2.6. Nanopartiküllere insanların maruz kalma yolları ve etkileri [46]

2.2.2. Kobalt Oksit Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri

Biyomolekül veya bazı materyallerin canlılardaki toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla nanopartiküller kullanılarak sitotoksikite testleri yapılmaktadır [40]. Manyetik rezonans (MR) görüntüleme, biyolojik uygulamalar gibi bir çok alanda kullanılan kobalt oksit nanopartiküllerinin toksik etkileriyle ilgili yeterince bilgi bulunmamasının yanı sıra yapılan bir

çalışma bu nanopartiküllerin sitotoksik etkisinin HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkiye, reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif stres gibi yollarla da DNA hasarına sebep olduğunu göstermiştir [45].

Kobalt oksit nanopartiküllerinin bitkilerde fitotoksik etki gösterişi ve kök büyümesinde ciddi anlamda gecikmeye sebep olduğu ve aynı zamanda çimlenmenin de azaldığı bilinmektedir [47]. Bunların yanı sıra bu nanopartiküller ile ilgili kanser çalışmalarında kanser hücrelerinde spesifik olarak hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir [48].

Çok küçük boyutlara sahip olması sebebiyle nanopartiküller, hücre zarından geçerek ya da hücre transportlarıyla direkt hücre içerisine geçerek deriden emilimle insan vücuduna yayılabilir ve son olarak yapılan araştırmalarda çok duvarlı karbon nanotüplerin insanların keratinositleri (keratin yapan epidermal hücreler) içinde lokalize olabildiğini, aynı zamanda dokulardaki yabancı etkenlere karşı enflamatuar etkiler gösterdiği bilinmektedir [42]. Kobalt oksitin insan metabolizmasındaki etkileri Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kobalt oksitin insan metabolizmasındaki etkileri [49-53]

İnsan Metabolizmasında Oluşturduğu Etki	Toksik Etki	Olumlu Etki
Oksidatif stres	Kimyasal reaksiyonlara etkisi Kanserojen ve mutajen olarak yapı taşlarına etki edenler Alerjen olarak etki edenler	Reproduksiyonu ve immün yanıtı arttırması Biyolojik yararlanımların fazlalığı
Hemoliz	Hormon üretimi, bağışıklık sistemi ve hücre sel homeostazda	Embriyonik ölümleri ve endometrial yaralanmaları azaltması
Değişen lipid metabolizması	Fizyolojik ve taşıyım sistemlerinin metabolizmasını azaltması	Absorbsiyon mekanizmasını etkileyerek rasyonlara katılmaları

2.3. Karaciğer

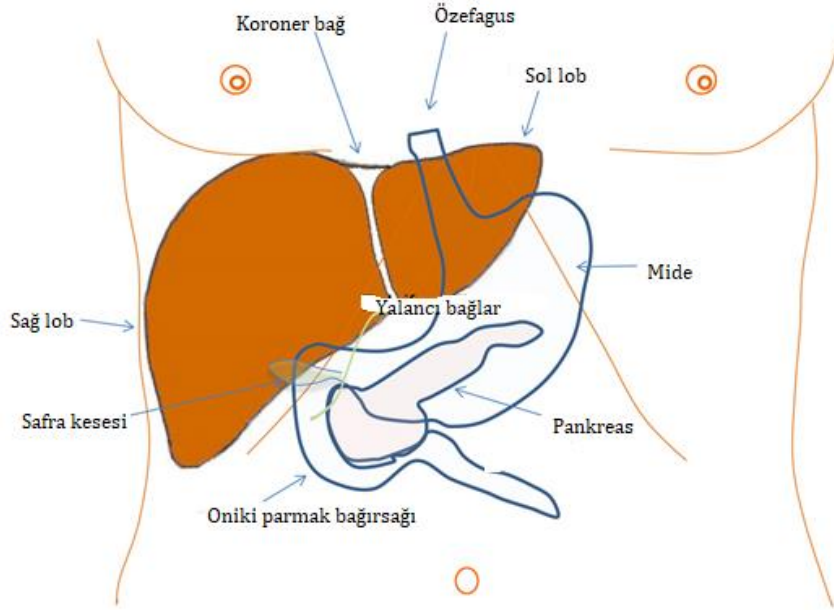
2.3.1. Karaciğerin Genel Tanımı

Karın boşluğunun üst kısmında konumlanmış olan sağ hemidiyaframın hemen altında yerleşmiş olan karaciğerin korunması göğüs kafesi tarafından sağlanır. Canlı vücudunun ortalama %2-%3 kadar ağırlığına sahip, insan vücudunun yaklaşık 1,5 kg ağırlığında en büyük organı lenfoid bir organ olan karaciğer fonksiyonel ve morfolojik açıdan anatomik tanımlaması olan iki lobdan oluşmaktadır [54,55]. Karaciğerin parankimal hücreleri ve parankimal olmayan hücreleri Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Parankimal ve parankimal olmayan karaciğer hücreleri [55].

KARACİĞER						
Parankimal Hücreler				Ekstraselüler Boşluk		
Hepatosit hücreler		Hepatosit olmayan hücreler		Safra kanalikülleri	Sinüzoidler	Disse alanı
Sinüzoidal endotel hücreleri	Kupffer hücreleri	Yıldız hücreleri	Yerleşik lenfositler			

Karaciğer, fonksiyonlarını düzenleyen eşsiz özelliklere sahip olan, yıldız hücrelerin yanı sıra kupffer hücreleri ve sinüzoidal endotel hücreleri gibi birkaç hücre tipinden oluşmaktadır [56].



Şekil 2.7. İnsan vücudunda karaciğerin konumu ve diğer organlarla ilişkisi [55].

Karaciğerin yalancı bağlarla (diyafram yüzeyindeki) sağ sol olarak iki loba ayrılmış formu, göğüs kafesi içerisinde, midenin arkasındaki konumlanması, pankreas, duodenum (on iki parmak barsağı) ve safra kesesi gibi organlarla olan ilişkisi, ve bu organlarla anatomik açıdan bağlantısı ve morfolojik görünümü Şekil 2.7. de gösterilmektedir [55].

Yıldız hücreleri; Vücutta bulunan toplam A vitamininin %80'ini sitoplazma içerisinde bulunan lipid damlacıklarında depo eder ve A vitamininin vücuda hepatik olarak alımı üzerinde önemli ek işi bulunmaktadır. Hepatik fibrozis ve benzeri patolojik şartlara maruz kaldığında, çok hızlı bir şekilde çoğalırlar ve tip I, III, IV kollajenler, laminin, fibronektin ve proteoglikanlar gibi oldukça yüksek miktarda hücre dışı matris (ECM) bileşenlerini sentezler ve salgırlar [57]. Kronik karaciğer hasarı, hepatik yıldız hücrelerinin çoğalmasına ve matris üreten hücelere farklılaşmasına neden olur [58]. Yıldız hücreler aynı zamanda hasarlı olan karaciğerde kolajenin birikmesinden ve organizasyonundan da sorumludur [56].

Kupffer hücreleri; Vücutta yerleşik konumda bulunan doku makrofajlarının en büyük popülasyonunu karaciğerde yerleşmiş olan hücre sayılarının kontrolü korunan karaciğer sinüzoidinde bulunan ve bazı reseptörleri sayesinde pro- ve anti-inflamatuar sitokinler ve biyolojik olarak önemli olan diğer moleküllerin sentezlemesi özelliğine sahip olan Kupffer hücreleri oluşturmaktadır [59,60]. Kupffer hücreleri insan vücudunda bulunan kolonize makrofajların %80 ila %90'ını oluşturmaktadır [61]. Kupffer hücresi, antijenlerin de içerisinde bulunduğu, bağırsakta sentezlenen materyaller ve dolaşımdan temizlenirken ölü olan

hücrelerde bulunan hepatik sinüzoide gelen immünoreaktif materyaller karşısında istenmeyen immün tepkileri önlemek için gerekli olan "tolerojenik" fenotip diye adlandırılan bir özellik sergilemektedir [59]. Kupffer hücrelerinin endotoksin ve diğer çözümler aracılığıyla aktive olması alkolik karaciğer hastalığının gelişmesine yol açabilmektedir [62].

2.3.2. Karaciğerin Fonksiyonları

2.3.2.1. Glukoz Metabolizması

Karaciğerin organizmanın doğumundan sonraki metabolik aktarımı için var olan glukozu depolama, sentezleme, metabolizleme ve salma yeteneğinin gerekli olduğu bilinmektedir ve organizmanın hayatı boyunca da sistem korunmaktadır. Besinlerin vücuda alınmasından sonra, karaciğer glukozu alım moduna geçiş yapmaktadır. Bu da insülinde bir artış gerektirdiği için glikojen depolarından glukoz salınmasının düşmesine sebep olmaktadır. Karaciğerin hepatositlerinde glikoliz ve glikojen miktarları yükselerek hepatik glukoz alımına sebep olmaktadır.

İnsülin direnci, vücuda fazla miktarda besin girmesi sırasında glukoneojenik substratlar ve yağ asitlerinin karaciğere artan akışı ile ilişkilidir. Yani karaciğerin hepatik insülin direnci, insülinin artması sebebiyle net glukozun karaciğerden çıkışını azaltma işlevinin bozulması sonucu gelişmektedir. Bunun dışında organizmanın emici durumdan açlık durumuna geçişi sırasında insülin miktarı düşerek glukagonu arttırmaktadır. Bu durum glikojen yıkılmasını ve glukoneogenez ile vücuttaki beyin, iskelet kası ve bağışıklık sistemi gibi dokuların enerji ihtiyaçlarına cevap veren ve depolarda bulunan glukozun salınımını başlatmaktadır [56].

2.3.2.2. Proteinlerin ve Aminoasitlerin Metabolizması

Karaciğer, dolaşımdaki protein miktarının yaklaşık olarak %85-90'ından sorumludur. Organizmadaki hücresel ve organ düzeyinde olan işlevler için proteinlerin sentezi ve parçalanması kritik öneme sahiptir ve karaciğerdeki bu metabolik sistemin daha fazla etkileri olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki proteinlerden en fazla olan, kan hacminin korunması ve lipidler gibi bazı moleküllerin taşınması fonksiyonuna sahip olan albümin toplam plazma proteinlerinin yaklaşık %55'ine katkıda bulunur. Proteinleri oluşturan aminoasitlerin metabolize edilmesi ve bu proteinlerin parçalanması için karaciğer oldukça büyük bir kapasiteye sahiptir. Amino asit metabolizması karaciğer üre döngüsü olarak adlandırılan mekanizmanın azotlu atık ürünlerin atılmasıyla hepatosit için enerji sağlama özelliğine

sahiptir. Bazı özel amino asitlerin karbon iskeleti, trikarboksilik asit döngüsüne glukoneojenik amino asitlerin glukozaya dönüşümü dahil edilerek amino asitlerin iskelet kası ve bağırsak gibi bazı dokulardan glukozaya dönüştürülmesini sağlayabilmektedir [56].

2.3.2.3. Karaciğerin Hematolojik Fonksiyonları

Hepatik kan akışının %80'i bağırsaktan portal ven yoluyla iletilmesi karaciğer tarafından sağlanmaktadır. Bu düşük basınçlı kan kaynağı, çevresel antijenlerin ve ayrıca bağırsak mikroflorasından gelen moleküller açısından oldukça zengindir. Karaciğer, patojenik enfeksiyonlar için bağışıklığı sağlamaktadır.

Bağırsaktan karaciğere giren venöz kan, hepatik arterden gelen oksijenden zengin kanla karışarak hepatik sinüzoidler yoluyla hepatosit plakaları yoluyla merkezi damarlara akmaktadır. Bu da moleküllerin kandan hepatositlere değişimini hızlı bir şekilde sağlamak ve aynı zamanda karaciğerde immünojenik moleküllerin uzaklaştırılmasını ve parçalanmasını kolaylaştırmaktadır [63].

2.4. Oksidatif Stres ve İnflamasyon

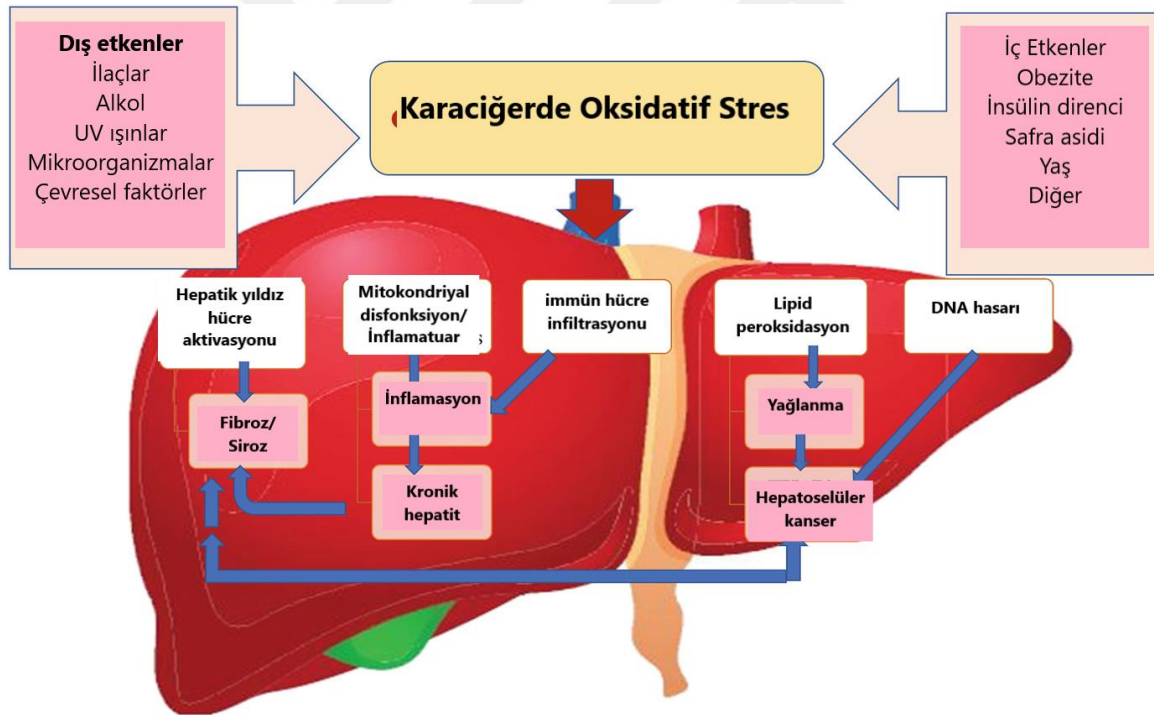
Farklı tiplerdeki nanopartiküllerin, hücre içi reaktif oksijen türleri sentezleyerek oksidatif stresi indüklediğinden dolayı oksidatif stresin nanotoksistelerde kritik bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu sebeple nanopartiküllerin hücre içi ROS sentezi için hücre alımının ve aynı zamanda hücre içi metal iyonlarının salınması oldukça önemli faktörlerdir [64]. Uygun şartlar sağlandığı zaman, oksidan ve antioksidan partiküllerin arasındaki dengenin korunduğu ve oksidatif stresin seviyelerinin kontrol edildiği özel moleküler yöntemlerle donatılmaktadır. Yani oksidatif stres, oksidanların ve antioksidan ajanlarla arasında bulunan dengesizliği temsil etmektedir [65]. Çok sayıda yapılmış olan deneysel çalışmalar, karaciğerde meydana gelen oksidatif ve nitrozatif stresin, karaciğer yağlanmasıyla ve portal inflamasyonla bir ilişkili içerisinde olduğunu göstermektedir [66].

Bazı araştırmacılar oksidatif stresin besinleri enerjiye dönüştüren biyokimyasal reaksiyon olan metabolizmadaki dengesizliğin sebebi olan metabolik sendromun gelişmesinin bir faktörü olduğunu göstermektedir [67].

Reaktif oksijen türlerinin sentezlenmesi ve temizlenmesiyle lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması ve protein oksidasyonunun indüklemesi sonucunda proteinlerin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine ve gen mutasyonlarına sebep olacak şekilde serbest radikaller

arasındaki bir dengesizlik olan oksidatif stres, çeşitli hastalıklarda da kritik bir rol oynamaktadır [68]. Karaciğer, organizmada meydana gelen bu tip streslere karşı korumanın merkezinde yer almaktadır ve birçok detoksifikasyon ve anti-oksidatif stres fonksiyonuna sahiptir [69].

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, sonlanmayan oksidatif stresin kronik inflamasyona yol açabilecek mekanizmayı meydana çıkardığı ve bunun da kanser gibi diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların da dahil olduğu birçok kronik hastalığa aracılık edebileceğini göstermektedir (Şekil 2.8.). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin sentezi ve koruyucu mekanizmalarınca ortadan kaldırılması arasında kronik inflamasyona yol açabilen bir dengesizlik olarak görülmektedir. Genel olarak, şu ana kadar yapılmış olan araştırmalar, oksidatif stresin kronik inflamasyon ve hatta kanserin birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu ve oksidatif stres tarafından tetiklenen inflamasyonun çok sayıda kronik rahatsızlığın sebebi olduğunu göstermektedir [70,71].



Şekil 2.8. Karaciğerde oksidatif stres [72].

2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan atom, molekül veya iyonlardır ve insan vücudunda çeşitli sistemler tarafından sentezlenmektedir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlardan dolayı dikkate değer reaktif özelliklere sahiptir ve vücudun bunları kontrol edebilme yeteneğinden daha büyük hale gelirse, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin endojen veya eksojen saldırılar yoluyla kümülatif üretimi olan oksidatif strese sebep olmakta ve sonuçta çeşitli hastalıkların gelişmesine sebep olmaktadır [73-75].

Serbest radikaller kimyasal türlerdir. Yapılan bazı deneylerde demir şelasyonunun çeşitli bozukluklarda koruyucu etkileri ve ayrıca iskemi-reperfüzyonda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve vitamin C gibi vitaminlerin ve bazı antioksidanların, çoğu bozukluklarda serbest radikallerin temizlenmesinde spesifik rol aldığı açıkça gösterilmektedir. Ayrıca yaşlanmanın destekleyicisi olarak da yine serbest radikal reaksiyonları tanımlanmaktadır [75]. Serbest radikaller tarafından gelişen hastalıklara karşı savunmada antiosidanlar oldukça etkili bir araç olarak kullanılmaktadır [76]. Sonuç olarak avantajlı ve dezavantajlı etkileri arasındaki denge, insan fiziolojisinin önemli yönlerinden biri olması sebebiyle biyolojik olan serbest radikallerin doğru ve hassas tespitinin güvenli bir şekilde yapılması, bu radikallerin insan sağlığı biyokimya, tıp ve toksikolojideki rollerini tanımlamak için gereklidir [77,78].

Birkaç on yıl boyunca, serbest radikallerin temel olarak, serbest oksijen radikallerinin, oksidatif modifikasyonlarını ve fonksiyon kaybını indükleyen tüm biyolojik makromoleküllerle kolayca reaksiyona girmesi bilinmesi sebebiyle bunların yalnızca zararlı etkilere neden olduğu düşünülürken sonradan canlı sistemlerin hem serbest radikallerle birlikte yaşama uyum sağladığı hem de bu toksik maddeleri kritik fiziolojik süreçlerde kullanarak avantaja çevirecek yöntemler geliştirdiği anlaşıldığı ve serbest radikallerin canlı sistemlerde ikili bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Yani aerobik metabolizmanın toksik yan ürünleri olduklarından dolayı hem oksidatif hasara ve doku disfonksiyonuna neden olmaktadır hem de faydalı stres tepkilerini aktive eden moleküler sinyaller olarak etki göstermektedirler [75]. Serbest radikallerin kaynakları Tablo 2.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Serbest radikallerin kaynakları [79-82].

Serbest Radikallerin Kaynakları	
Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondri	Alkol
Peroksizomlar	Sigara dumanı
Endoplazmik retikulum	UV ışınlar
	İlaçlar
	Sıcaklık

2.6. Nanopartiküller ve Oksidatif Stres

Nanopartiküllerin tıp ve biyolojide yaygın olarak çok fazla sayıda uygulamasının olması ile birlikte metabolize edilmedikleri, ancak çeşitli dokularda biriktikleri için biyosistem üzerinde olumsuz toksik etkileri de bulunmaktadır [83,84]. Parçacıkların nano boyutu, biyolojik sistemlere kolayca taşınabildiklerinden duyarlı sistemler üzerindeki etkileri sorusunu ortaya çıkarmaktadır [85].

Nanopartiküller mikro-boyutlu partiküllerden daha büyük ölçüde ROS üretmektedir ve bu da hücre içi sinyal yolları yoluyla artan proinflamatuvar reaksiyonlara ve oksidatif strese neden olmaktadır. Nanopartiküllerin toksik etkileri ve mekanizmaları ile ilgili tartışmalar halen devam etmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin biyolojik sistemlerle etkileşimlerinin incelenmesine atıfta bulunan ve aynı zamanda insan sağlığı ile ilgili toksisite seviyesini ölçen nanotoksikoloji geliştirilmiştir [86].

Kobalt oksit nanopartikülleri ile ilgili yapılan bir çalışma bu nanopartiküllerin kardiyomisit hücre içindeki kalsiyumun kullanımını ve elektromekanik verimini değiştirdiğini, bunun yanı sıra DNA hasarı ve kardiyomiyosit işlevselliği üzerindeki olumsuz etkilere sebep olarak oksidatif strese neden olan ROS üretimini indüklediğini göstermektedir [36].

Kobalt nanopartiküllerinin neden olduğu hepatotoksisiteyi ve potansiyel mekanizmalarını incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, insan fetal hepatositleri kobalt nanopartiküllerine maruz kalmasının doza ve zamana bağlı bir sitotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu kobalt nanopartiküllerine maruz kalmanın, ROS ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (mtROS) üretiminin yanı sıra hepatositlerde NOD benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) iltihabının aktivasyonuna da neden olduğu sonucu gösterilmiştir [87].

Nanopartiküllerin indüklediği, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi oksidanlar üretme yetenekleri aracılığıyla hücre çoğalmasının yanı sıra genotoksisite üzerinde de etkisi olduğu ve bu parçacıkların yüzeyde adsorbe edilen kanserojen bileşenleri akciğere taşıma yetenekleriyle genotoksisiteyi etkileyebilmektedir ve reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan oksijen serbest radikalleri ve metabolitleri, birçok hastalığın patogenezinde yer almıştır [88,89].

2.7. Antioksidanlar

Antioksidan enzimler, istenmeyen biyolojik etkilere neden olan serbest radikaller ve ROS gibi oksidatif ajanlara karşı önemli bir savunma mekanizması sağlar. Spesifik antioksidan moleküller, spesifik ROS ve RNS nötralize etmede etkili olduğundan ve ayrıca farklı antioksidanlar tercihen hücrelerin farklı bölgelerine yerleşme eğiliminde olduğundan, antioksidanların fazlalığının insan vücudu için faydalı olduğu da bilinmektedir [90].

İnsan vücudu, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler kullanılarak ROS kaynaklı hasara karşı savunma mekanizmalarına sahiptir. Aşırı ROS seviyeleri, damar sertliği, iltihaplanma ve kanser gibi olumsuz etkilere neden olabilir. Yapılan birçok çalışma, insan vücudunun, diyet bitkilerinin ve bazı gıdaların doğal antioksidanlara sahip olduğunu ve bu antioksidanların alımının serbest radikalleri ortadan kaldıracılabileceğini ve bazı hastalıkları önleyebileceğini göstermiştir [91,92].

ROS seviyesini kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri korumak için, dokular SOD, katalaz, GPx, glutatyon S-transferaz gibi çeşitli enzimler içerir [93].

2.7.1. Antioksidanların Savunma Sistemleri

ROS oluşumunun bölümlere ayrılması ve antioksidan lokalizasyonu, antioksidanların sentezi ve taşınması, antioksidan savunmasını ve farklı antioksidan sistemler arasında

işbirliğini (ve/veya telafisini) indüklemeye yeteneği, antioksidan sistemin yeterliliğinin belirleyicileridir [93].

2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz

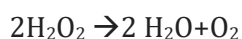
Bir dizi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan tarafından hücre içi ROS seviyeleri, düşük bir seviyede tutulur. Süperoksit dismutazlar hidrojen peroksit ve oksijen oluşturmak için süperoksit anyonlarının dismutasyonunu katalize eden bir metalloprotein ailesindedir ve ilk savunma hatlarını oluşturmaktadırlar [94].

Kuraklık, tuzluluk ve yüksek/düşük sıcaklık gibi stres koşulları altında farklı bitki türlerinde yapılan SOD aktivitesine ilişkin gözlemler, oksidatif stres hasarında farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmektedir [93].

Fizyolojik koşullar sırasında süperoksit üretiminin ana kaynağının, mitokondri olduğu düşünülmektedir. Diğer potansiyel süperoksit üretimi kaynakları, ksantin oksidazları (XOD) ve oksidazların nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ailesini içermektedir. Mitokondride (SOD 2), sitozolde (SOD 1) ve daha yakın zamanda hücre dışı matriste (SOD 3) izozimlerin SOD ailesinin tanımlanması ve lokalizasyonu, vektörel olarak üretilen süperoksidin içinde bulunduğunu ve reaksiyona girdiğini göstermektedir [95].

2.7.1.2. Katalaz

Katalazlar, hücreleri hidrojen peroksitin toksik etkilerine karşı korumada kritik rol oynayan enzimlerdir [96]. Katalaz, H₂O₂ ve reaktif nitrojen türlerinin metabolizmasında anahtar bir enzimdir ve tümörlerde ekspresyonu ve lokalizasyonu belirgin şekilde değişmektedir [97]. Klasik tek işlevli katalazlar, 56 kD protomer başına bir molekül heme sahip tetramerik yapıda hemoproteinlerdir. Hidrojen peroksiti yüksek verimle su ve oksijene (2H(2)O(2) --> 2 H(2)O + O(2)) indirgeyerek hücre oksidatif hasarını önleyen her yerde bulunan enzimlerdir (formül 1) [98,99]. Tek işlevli katalazlar (> 225), çift işlevli katalaz-peroksidazlar (> 50) ve manganez içeren katalazlar (> 25) arasında bölünmüş 300'den fazla katalaz dizisi mevcuttur [100]



Formül 1

2.7.1.3. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon S-transferaz (GST) enzim ailesi, tipik Faz II detoksifikasyon enzimlerinin bir grubudur ve birçok prokaryot ve ökaryotta bulunur. Bu enzimlerden GST π , zararlı serbest radikallere maruz kaldığında GSH ve elektrofilik substratları arasındaki bağlantıyı katalize etmektedir. Ayrıca hücrel stres tarafından tetiklendiğinde hücrel apoptozu başlatan ligand bağlama özellikleri de sergilemektedir [101].

Glutasyon S-transferaz P (GSTP) ise hücrel redoks homeostazını sağlayan karmaşık bir dizi yolun bir bileşenidir. Bazı memeli dokularında, özellikle malignit tümörlerle ilişkili olanlarda bol miktarda bulunan bir proteindir ve kanser ilacı direncinde aşırı ifade edilir. Enzim, bazı elektrofilik kimyasallar ve GSH arasındaki tiyoeter bağı oluşumunu katalize edebilmektedir [102,103].

2.7.1.4. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz homologları (GPx'ler), glutasyon (GSH), tioredoksin (Trx) veya protein disülfid izomerazdan (PDI) elektronları kullanarak hidroperoksitleri verimli bir şekilde azaltır [104].

GPX'ler, temel bir kofaktör olarak GSH'yi kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin suya veya ilgili alkollere indirgenmesini katalizlemektedir. Bunun dışında GSH tükenmesi glutasyon bağımlı peroksidazların inaktivasyona sebep olabilmektedir [105].

2.8. Genetik Toksikite Yöntemleri

2.8.1. Tek Hücreli Jel Elektroforez Yöntemi (KOMET)

Kuyruklu yıldız testi olarak da bilinen tek hücreli elektroforez analizi (komet), verimli ve gerçekleştirmesi kolay ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip bir DNA hasarı inceleme yöntemidir. Komet testi, *in vitro* ve *in vivo* genetik toksikolojik çalışmalar için hassas bir yöntem olarak kabul edilir ve çevresel izleme, insan biyolojik izleme ve DNA hasarı ve onarımının temel araştırmaları gibi farklı araştırma alanlarına uygulanabilmektedir. Testin ilkesi, bir elektrik alanı altında, parçalanmış DNA'nın nükleoid gövdeden dışarı çıkması ve agaroz jelde bir DNA lekesi oluşturmasıdır [106].

Komet testi, genotoksik kimyasal ve fiziksel ajanlara maruz kalmanın neden olduğu DNA hasarını tespit etmek için hassas bir tekniktir ve ekotoksikolojide yaygın olarak

kullanılmaktadır. Başlarda balık ve çift kabuklular olmak üzere suda yaşayan türlerde, saha biyoizleme programlarında ve deneysel çalışmalarda bu analiz yöntemi uygulanmıştır ve genotoksik kirlenmelerin değerlendirilmesindeki rolünü tanımlamak için yayınlanmış kanıtları elde etmek amacıyla bu test yapılmaktadır [107]. Ayrıca insan biyoizleme çalışmalarında ve hayvan modellerinde çevresel ve mesleki maruziyetlerin genotoksitesisi üzerine yapılan çalışmalarda kuyruklu yıldız testi kullanılmıştır [108]. Ağırlıklı olarak insan hücreleri üzerinde kullanılsa da, farklı organ ve dokulardan türetilen hemen hemen her hücre tipine uygulanabilmekte olan bu testin maya, bitki ve hayvan hücrelerinde DNA hasarının değerlendirilmesi için uygulanması da özellikle biyoizleme açısından oldukça fazladır [109].

DNA molekülü inert değildir ve hem doğal olarak hem de insanların etkisi sonucu ortamda bulunan çeşitli fiziksel ve/veya kimyasal ajanların sürekli bir saldırı akımı altında olması sebebiyle ortaya çıkan hasar onarılmadığı zaman mutasyonlara ve kanser dahil çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. DNA hasarının değerlendirilmesi ve hem *invitro* hem de *in vivo* onarımı için ames testi, alkali elüsyon, kromozom sapmaları, kardeş kromatid değişimleri, sitokinez blok mikronükleus testi gibi çok sayıda yöntem mevcuttur ve bu yöntemler, genom hasarını değerlendirmede faydalı olduğu gibi çeşitli dezavantajlara da sahip, genellikle zahmetli ve oldukça pahalı olma eğilimindedirler. DNA hasar değerlendirilmesi, elektroforezden sonra hücresel DNA'nın kuyruklu yıldız benzer görünümünden adını alan ve oldukça basit, hassas, güvenilir, hızlı ve yaygın olarak kabul edilen kuyruklu yıldız testidir. Bu test tek bir hücre süspansiyonu olarak hazırlanabilen ökaryotik organizmaların farklı organlarından veya dokularından türetilen sayısız omurgalı türünün yanı sıra kan, karaciğer, böbrek, beyin, solungaç, kemik iliği ve sperm hücrelerini de kapsayan hemen hemen her hücre tipine uygulanabilmektedir [109,110].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (Regal, RBD 4602 NCF)
Derin Dondurucu (Regal, RDD 1145)
Etüv (Binder)
Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P20-P100-P1000)
Spektrofotometre (Analytikjena-SPECORD 50)
Hassas Terazı (Mettler Toledo)
Vorteks (REAX)
Mini santrifüj (Eppendorf)
Su Banyosu (GFL-Wasserbad Water Bath)
Soğutmalı Mikrosantrifuj (Sigma,2-16K)
Distile Su Cihazı (Millipore)
pH Metre (Mettler Toledo)
Homojenizatör (IKA)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Kobalt oksit nanopartikülleri (Sigma Aldrich)
Amonyum Sülfat (Sigma)
Asetik Asit (Merck)
Bakır Klorür (Sigma)
Bakır Sülfat Pentahidrat (Merck)
Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma)
Disodyum Hidrojen Fosfat (Merck)
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Merck)
Folin Ciocalteu's Fenol Reagent (Sigma)
Hidrojen Peroksit (Merck)

Ketamin Pfizer (Ketalar flakon)
Ksantin (Sigma)
Ksantin Oksidaz (Sigma)
Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) (Sigma)
Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck)
Potasyum Sodyum Tartarat (Merck)
Sodyum Azid (Sigma)
Piridin (Riedel de Haen)
Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma)
Sodyum Hidroksit (Merck)
Sodyum Karbonat (Merck)
Sodyum Klorür (Merck)
Tetrametoksiopropan (Aldrich)
Tiobarbitürik Asit (TBA) (Merck)
Trikloroasetik Asit (TCA) (Merck)
ELISA kit rat (BT LABORATORY)

3.2. Deney Hayvanları

Uygulamaların yapılacağı deney hayvanları için Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'ten onay alınmıştır (23/09/2019 tarihli ve 2019/24 sayılı). Planladığımız bu çalışmada denek olarak 30 Adet 250-300 g dişi Wistar Albino sıçan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Deney Hayvanları Araştırma Birimi (DEHAL)'den temin edilmiştir. Temin edilen deney hayvanlarının tüm bakım ve uygulamaları da yine bu laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için rastgele seçilerek oluşturulan sıçan gruplarının kendi aralarında homojen olması ve gruplardaki ağırlık toplamlarının yaklaşık aynı değerde olmasına dikkat edilmiştir.

Deney hayvanlarının her grubu ayrı kafeslerde yer alacak şekilde yerleştirilmiş ve standart sıçan yemi kullanılarak beslenmişlerdir. Sıçanlar 12 saat ışık/karanlık periyodunda ve 18-22° sıcaklıkta muamele edilmiştir. Sıçanlar adaptasyon amacıyla uygulama başlamadan 10 gün önce

karantinaya alınmışlardır. Deney süresince gün aşırı içme suları değiştirilmiş ve kafes temizliği yapılmıştır.

Çalışmada Sigma Chemical Co. Ltd.'den (St. Louis, MO, ABD) ticari olarak satın alınan 50 nm boyutundaki kobalt oksit nanopartikülleri farklı dozlarda kullanılarak uygulanmıştır. Nanopartiküller deney gruplarına gavaj yoluyla uygulanmıştır. Gruplardan biri kontrol olmak üzere her bir grupta 6 adet sıçan olacak şekilde, toplam 5 grup oluşturulmuştur. Tüm gruplarda karantina süresi ve nanopartikül gavaj uygulaması (Şekil 3.1.) eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmamızda kullandığımız kobalt oksit nanopartiküllerinin sıçanlara uygulanan dozları Tablo 3.1 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sıçanlara oral gavaj yoluyla nanopartiküllerin uygulanması

GRUP 1: Rastgele belirlenen birinci grup kontrol grubu olarak seçilmiş ve herhangi bir uygulama yapılmamış, hayvanların bakım ve beslenmesi standartlara uygun gerçekleştirilmiştir.

GRUP 2: Rastgele seçilen ortalama ağırlıkları 185 g olan sıçanlar ikinci grup olarak belirlenmiş ve karantina sonunda 28 gün boyunca standart yem ve su ile beslenmiş ayrıca ay çiçek yağında çözdürülmüş 1 mg/kg 50 nm kobalt oksit nanopartikül çözeltisi her bir sıçana 0,5 mL olacak şekilde oral olarak uygulanmıştır.

GRUP 3: Ortalama ağırlıkları 195 gram olan sıçanlar karantina sonunda 28 gün boyunca standart yem ve su ile beslenmesi sağlanmış ve ay çiçek yağında çözdürülmüş 5 mg/kg 50 nm kobalt oksit nanopartikül çözeltisi her bir sıçana 0,5 mL olacak şekilde oral olarak uygulanmıştır.

GRUP 4: Ortalama ağırlıkları 195 gram olan sıçanların da karantina sonunda 28 gün boyunca standart yem ve su ile beslenmesi sağlanmış ve düzenli olarak ay çiçek yağında çözdürülmüş 10 mg/kg 50 nm kobalt oksit nanopartikül çözeltisi her bir sıçana 0,5 mL olacak şekilde oral olarak uygulanmıştır.

Grup 5: Rastgele seçilmiş olan beşinci grup sıçanlarının ortalama ağırlıkları 200 gram olarak ölçülmüştür. Bu grup da karantina sonunda yine 28 gün boyunca standart yem ve su ile beslenmesi sağlanmış ve ay çiçek yağında çözdürülmüş 50 mg/kg 50 nm kobalt oksit nanopartikül çözeltisi her bir sıçana 0,5 mL olacak şekilde oral olarak uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Deney Grupları

GRUPLAR	UYGULANAN DOZ
GRUP 1	0 mg/kg Kontrol
GRUP 2	1 mg/kg 50 nm Kobalt oksit
GRUP 3	5 mg/kg 50 nm Kobalt oksit
GRUP 4	10 mg/kg 50 nm Kobalt oksit
GRUP 5	50 mg/kg 50 nm Kobalt oksit

3.3. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması

Klinik değerlendirmenin ardından sıçanlara ketamin hidroklorür (Ketalar flakon, Pfizer) 40 mg/kg + xylazine hidroklorür (Rompun flakon, Bayer) 10 mg/kg intraperitoneal (i.p) yoldan



Şekil 3.2. Sıçan dokularının alınması

verilerek genel anestezi sağlanmıştır. Deneye ait bütün çalışmalar ortamın ve kullanılan cerrahi aletlerin steril olması sağlanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Sıçanlardan kan alınması

3.4. Doku Homojenatının Hazırlanması

Karaciğer dokuları 1/10 oranında soğuk serum fizyolojik çözeltisi eklenerek homojenizatör cihazı kullanılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen doku homojenatlarından süpernatantlar dokuların 4000 xg'de ve +4°C'de 20 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilmiştir.

3.5. Oksidatif Stres Parametreleri ve Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

3.5.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.40'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Kullanılan Reaktifler:

Stok tetrametoksiopropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksiopropan 1 mL'de çözüldü.

Günlük tetrametoksiopropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltili.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlandı ve çözüldü.

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

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

N-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırıldı [111].

	Standart (μ L)	Örnek (μ L)	SDS (μ L)	TBA (μ L)	Asetik Asit (μ L)	Distile Su
Kör	-	-	100	750	750	400
Standart	50	-	100	750	750	350
Örnek	-	50	100	750	750	350

Tüpler yukarıdaki tablodaki gibi hazırlandıktan sonra 30 dakika boyunca 95°C'de inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda benmari usulü soğutuldu ve 500 μ L distile su eklendi. 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatıldı beyazımsı renk alana kadar vortekslendi. Santrifüj cihazında 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ölçümler oluşan süpernatandan 1 mL alınarak köre karşı 532 nm'de spektrofotometre cihazında yapıldı.

3.5.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, buradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülecektir.

Kullanılan Reaktifler:

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

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Etilendiamintetraasetik Asit Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg Na₂EDTA·2H₂O distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃ distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

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

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT distile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

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

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

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

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg CuCl₂·2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı [112].

Deneyin yapılışı:

- Kör ve örnek tüplerine 2,85 mL SOD reaktifi eklendi
- Örnek tüpüne 100 µL süpernatant eklendi.
- 50 µL ksantin oksidaz kör ve örnek tüplerinin ikisine de eklendi
- 20 dakika boyunca 25°C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra her iki tüpe de 100 µL CuCl₂ çözeltisi eklendi.
- Kör tüpüne 100 µL süpernatant da eklenip karıştırıldı.

- 560 nm'de köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.
- SOD aktivitesi tespit edildi.
- Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.5.3. Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Reaktifler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0,681 g KH_2PO_4 distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2,77 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ distile suda çözülerek 155 mL'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM pH 7,0): A/B oranı 1/1,55 olacak şekilde karıştırıldı ve pH 7,0'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi (30 mM): 34 μL %30'luk H_2O_2 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kuvartz küvetine 10 μL süpernatant ile 1990 μL fosfat tamponu eklendi.

1 mL 30 mM H_2O_2 örnek küvetine eklenerek karıştırıldı.

Örnek spektrofotometre cihazında 240 nanometrede köre karşı 1 dakika izlendi.

Spesifik aktivitesi U/mg protein cinsinden hesaplandı [113].

3.5.4. Lowry Yöntemi

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi eklenen fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redükler ve sonuç olarak koyu mavi bir renk verir. Rengin koyuluğu örnekte bulunan protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak da değişmektedir [114].

Kullanılan Reaktifler:

A Reaktifi: %2'lik Na_2CO_3 çözelti 0,1 N NaOH ile hazırlandı.

B1 Reaktifi: %1'lik $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

B2 Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat

B Reaktifi: Eşit miktarda B1 ve B2 karıştırılarak hazırlandı.

C Reaktifi: 50 mL B + 1mL A reaktifi

(Reaktif günlük olarak taze hazırlanıp, hemen kullanılmalıdır).

D Reaktifi: 5 mL distile su + 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi

Protein standardı: 250 mg/100 mL (BSA) distile su ile 640-320-160-80-40-20 µg/mL, protein içerecek şekilde seyreltilip çalışma standartları hazırlandı.

	Numune (µL)	Distile su (µL)	Standart (µL)	C reaktifi (µL)	D reaktifi (µL)
Kör	-	100	-	1000	100
Numune	100	-	-	1000	100
Standart	-	-	100	1000	100

Tablodaki şekilde hazırlanan tüpler homojen karışana kadar vortekslendi.

Daha sonra 20-30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

Numune ve standart absorbansı 750 nm'de spektrofotometre cihazında köre karşı okundu.

3.5.5. Kuyruklu Yıldız Testi (KOMET)

Kuyruklu yıldız testi, Singh ve ark. yönteminde bazı değişikliklerle alkali koşullar altında yapıldı [115].

Deneyin Yapılışı:

- Kuyruklu yıldız testi için karaciğer dokuları falkon tüplerin içine yerleştirildi.
- Karaciğer numuneleri (1 g) kaba aktarıldı ve buz üzerinde kesildi ve kıyıldı,
- 1 ml/g soğutulmuş homojenleştirme tamponunda (0,075 M NaCl ve 0.024 M EDTA, %10 DMSO) süspanse edildi
- Kuyruklu yıldız analizi için buz üzerinde hafifçe homojenleştirildi.

- Tek taraflı buzlu mikroskopik cam deney plakası, yaklaşık 50°C'de Ca₂ ve Mg₂ serbest fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içinde çözülmüş % 0.5 normal eriyen agarozdan (NMA) oluşan ince bir tabaka ile kaplandı.
- Eppendorf tüpleri 40°C'deki su banyosuna yerleştirildi.
- Yüz mikrolitre karaciğer dokusu süspansiyonu, eppendorf tüpü içinde 1 ml PBS ile seyreltildi.
- Daha sonra 30 µL karışımlar 250 µL NMA (% 0,5) ile karıştırıldı.
- Bu karışımın yüz mikrolitresi, mikropipet kullanılarak NMA kaplı lamlara yayıldı ve hemen lamellerle kapatıldı.
- Cam deney plakaları (preparatlar) buzdolabında +4°C'de 15 dakika saklandı.
- Lameller, cam deney plakalarının tepesinden yavaşça çıkarıldı.
- Daha sonra cam deney plakası (preparatlar) lizis solüsyonu içeren şalelere yerleştirildi ve karanlıkta 2 saat buzdolabında saklandı.
- Cam deney plakaları, soğutulmuş damıtılmış su ile yıkandı ve elektroforezden önce 20 dakika boyunca DNA'nın çözülmesine izin vermek için taze elektroforetik tamponla (0,3M NaOH+1mM EDTA) doldurulmuş yatay bir jel elektroforez ünitesine yerleştirildi.
- Elektroforez, 20 dakika boyunca 25V ve 300mA kullanılarak 20 C'de gerçekleştirildi.

DNA hasarını önlemek için yukarıdaki adımlar karanlıkta gerçekleştirilmelidir.

- Elektroforezden sonra lamalar soğutulmuş damıtılmış su ile yıkandı ve nötrale edici tampona (5 dakika) yerleştirildi.
- Daha sonra tekrar lamalar soğutulmuş damıtılmış su ile yıkandı ve 10 dakika soğutulmuş etanol içerisine yerleştirildi.
- DNA etidyum bromür (0,1 mg/ml, 1:4) ile boyandı ve lamalar bir floresan mikroskobu (BX51, Olympus, Tokyo, Japonya) ile incelendi.

Kuyruklu yıldız testinde genetik hasar için iki farklı parametre değerlendirildi:

Genetik hasar indeksi AU değerleri olarak hesaplanmıştır. "Rastgele birimler (AU)" DNA hasarının boyutunu ifade etmek için kullanıldı ve aşağıdaki formülle hesaplandı:

N_i, i seviyesindeki puanlanmış hücre sayısıdır, i, DNA hasarının seviyesidir (0, 1, 2, 3 ve 4).

Genetik hasar indeksi: [(0 Tip 0)+(1 Tip 1)+(2 Tip 2)+(3x Tip 3)+(4 Tip 4)]

Kuyruklu yıldız test puanlarını gösteren AU değerleri,

UD (hasarsız, 0),

Tip 1 (düşük hasarlı, 1),

Tip 2 (orta hasarlı, 2),

Tip 3 (yüksek hasarlı, 3) ve

Tip 4 (ultra yüksek) seviyelerini gösterir.

Hasarlı hücre yüzdesi (DCP): Tip 2+Tip 3+Tip 4

3.6. İnflamasyon Belirteçlerinin Saptanması

Tümör Nekroz Faktör Alfa : Akut inflamasyon sırasında makrofajlar ve monositler de dahil olmak üzere çokça hücre tipi tarafından üretilmekte olan tümör nekroz aktivitesine sahip bir sitokin olan Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α), ayrıca hücre içinde apoptoza yol açan çeşitli sinyal olaylarından da sorumludur. Aynı zamanda bu protein kanser ve enfeksiyonlara karşı direnç oluşturmak için de oldukça önemlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre kötü huylu (malign) hücrelerinin yanı sıra birçok normal hücre türünü de etkileyebilen oldukça önemli bir konak savunma faktörü olarak kabul edilmektedir [116,117].

Interlökin 6: Interlökin 6 (IL-6), homeostazı sürdürmek için gerekli prototipik bir sitokindir. Enfeksiyon ve doku yaralanmalarına cevap olarak hızlı ve geçici olarak üretilen IL-6, akut faz ve bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu yoluyla bu tür acil strese karşı konak savunmasına katkıda bulunur.

IL-6'nın düzensiz olarak sürekli sentezlenmesi durumunda, kronik inflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik etki gösterir. IL-6, iltihaplanmanın ilk aşamasında sentezlendikten sonra, kan yoluyla karaciğere gider, sonrasında serum C-reaktif protein (CRP) gibi çok çeşitli akut faz proteinlerinin hızlı indüklenmesi izler. Öte yandan IL-6, fibronektin, albümin ve transferrin üretimini azaltır.

IL-6, taşıyıcılarının kontrolü ile serum demir ve çinko seviyelerinin düzenlenmesinde de rol oynar. Serum demirine gelince, IL-6, demir taşıyıcı ferroportin 1'in bağırsak üzerindeki etkisini bloke ederek hepsidin üretimini indükler [118,119].

Ticari olarak satın alınan TNF- α ve IL-6 düzey tayini ELISA yöntemi kullanılarak kit prosedürlerine uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

“SPSS 20.0 for Windows” paket programı ile “One Way Anova-Tukey” testi kullanılarak çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p < 0,05$ önem derecesinde anlamlı olarak kabul edilmiştir.

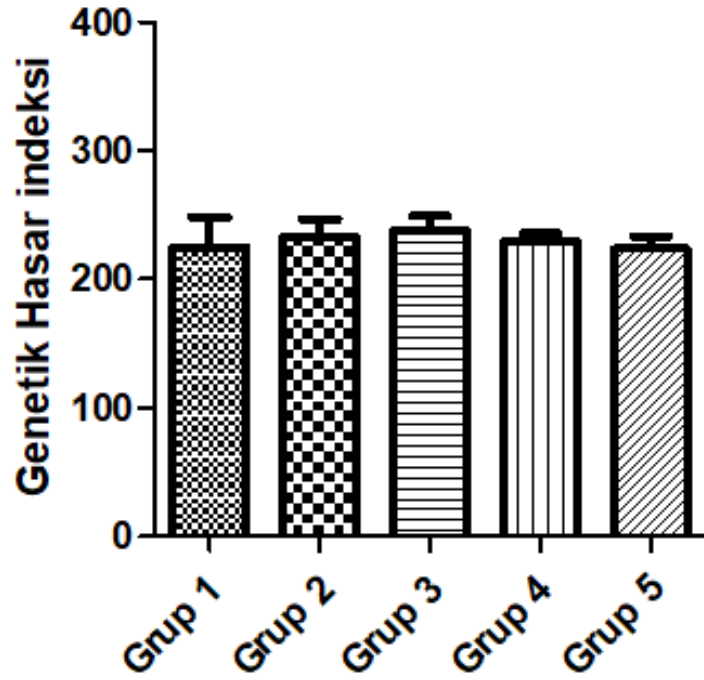


4. BULGULAR

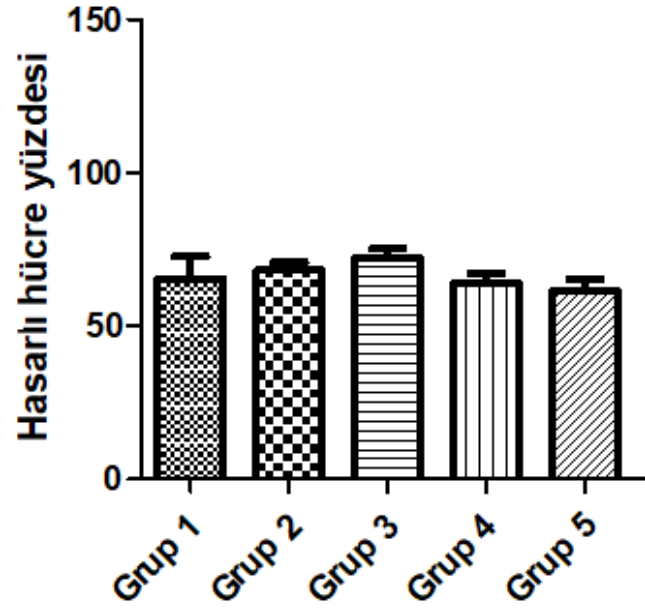
4.1. KOMET Testi Sonucu Verileri

Karaciğer dokusundaki Genetik Hasar İndeksi (GHİ) komet verileri incelemesinde kontrol grubu (Grup 1) ile kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.1.).

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY) komet verileri incelemesinde kontrol grubu ile kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.2.).

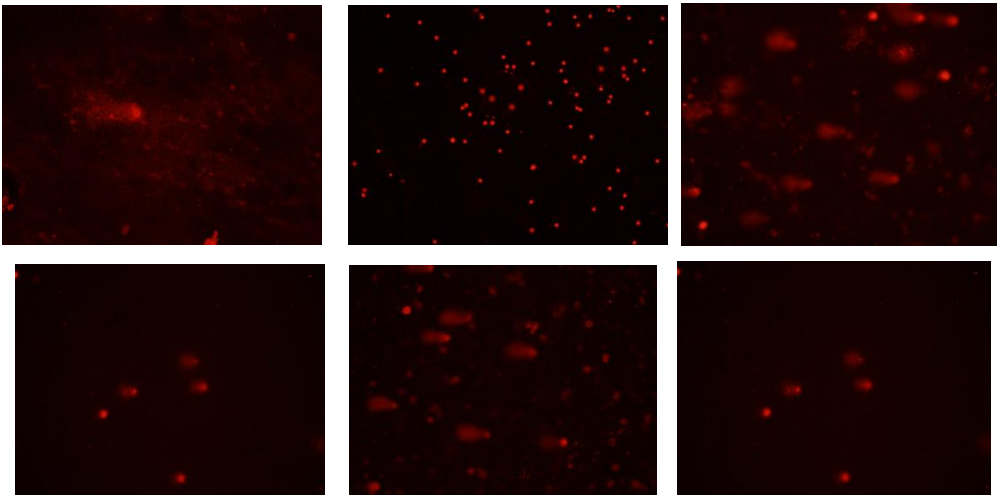


Şekil 4.1. Karaciğer dokusundaki GHİ komet verilerinin değerleri



Şekil 4.2. Karaciğer dokusundaki HHY komet verilerinin değerleri

Kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokusundaki komet görüntüleri Şekil 4.3. de gösterilmiştir.

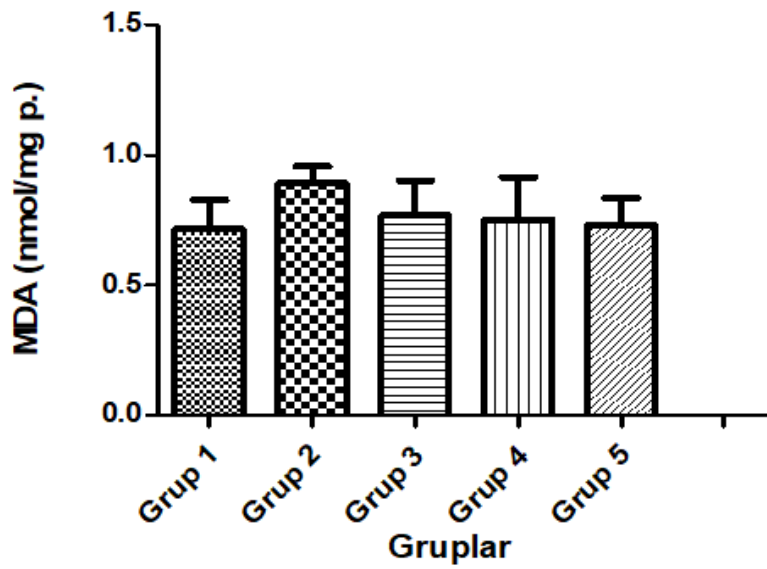


Şekil 4.3. Sıçan karaciğerlerine ait komet görüntüleri

4.2. Oksidatif Stres Parametreleri Sonuçlarına Ait Veriler

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Sonucu Verileri

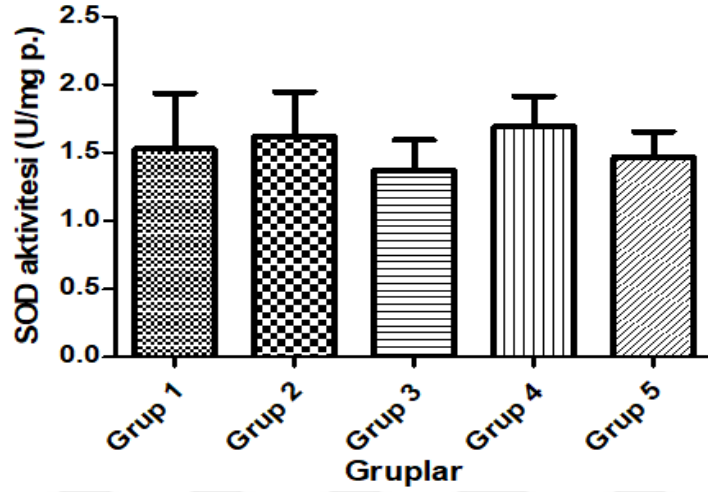
MDA düzeyleri incelendiğinde kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında genel olarak artış gösterdiği, ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri

4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Sonucu Verileri

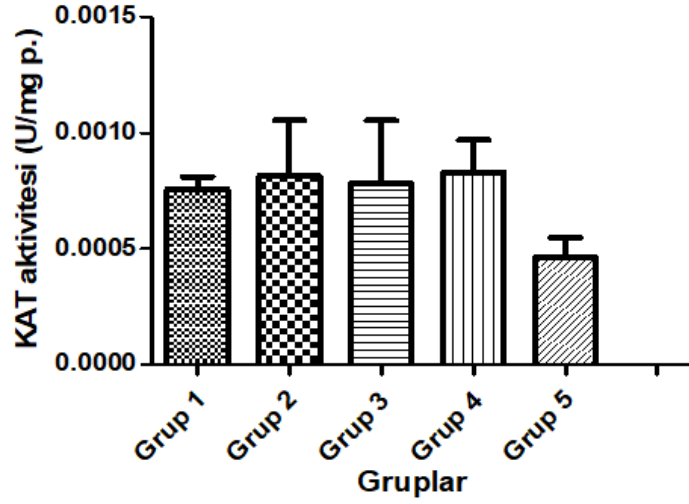
Karaciğer dokusundaki SOD parametresinin düzeyleri incelendiğinde kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla genel olarak artış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Karaciğer dokusundaki SOD düzeyi

4.2.3. Katalaz (KAT) Sonucu Verileri

Karaciğer dokularındaki katalaz aktivitesi incelemesinde kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında sadece 50 mg/kg kobalt oksit nanopartiküle maruz bırakılan grupta (5. Grup) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.6.).

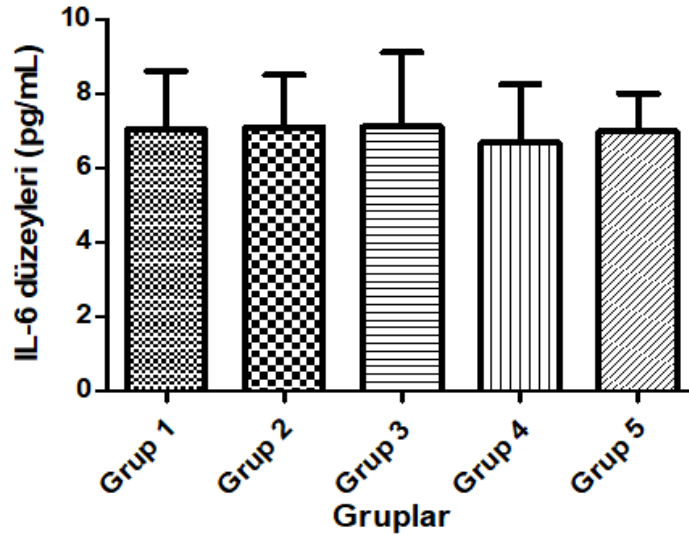


Şekil 4.6. Karaciğer dokusundaki katalaz düzeyleri

4.3. İnflamasyon Parametreleri Sonuçlarına Ait Veriler

4.3.1. İnterlökin Altı (IL-6) Sonucu Verileri

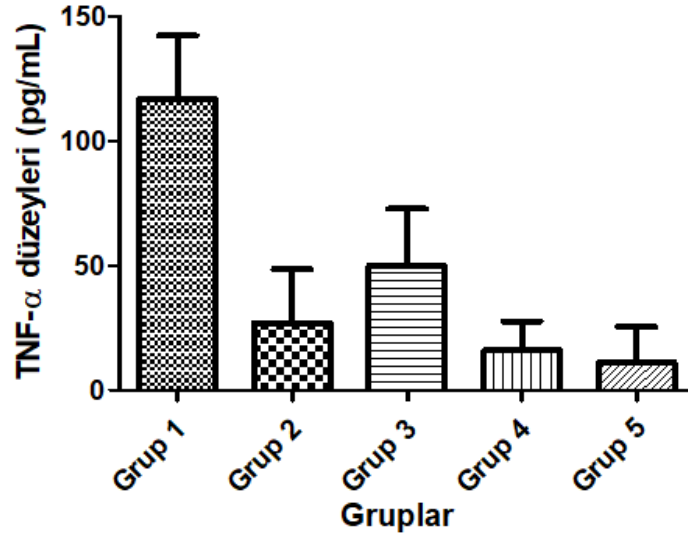
Karaciğer dokusundaki inflamasyonu belirlemek için yapılan IL-6 düzeyinin incelenmesinde kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla genel anlamda bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Karaciğer dokusundaki IL-6 düzeyleri

4.3.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Sonucu Verileri

Karaciğer dokularında TNF- α düzeyinin incelemesinde kobalt oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Karaciğer dokusundaki TNF- α düzeyleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kobalt oksit nanopartiküllerinin sitotoksikite ve genotoksikiteyi indüklediği gösterilmiştir. ROS üretimi ve oksidatif stres yoluyla insan hepatom hücrelerinde kobalt oksit nanopartikülleri tarafından indüklenen sitotoksikite ve genotoksikitenin altında yatan mekanizmaları incelemek için araştırmalar yapılmıştır [46].

Kobalt oksit NP'lerin neden olduğu sito-genotoksik ve inflamatuvar etkiler, bunlara maruz bırakılan insan alveolar (A549) ve bronşiyal (BEAS-2B) hücrelerinde yapılan araştırmalarda normal bronş hücrelerinde orta derecede sitotoksikite, sadece yüksek konsantrasyonda doğrudan DNA hasarı ve daha düşük konsantrasyonlarda önemli oksidatif-inflamatuvar etkiler tespit edildiğini göstermiştir [7].

NP'lerin insan sağlığına zararlı olduğunu inkar etmek mümkün değildir. Örneğin, kaynakçılar veya kömür madencileri, metalik oksitlerin veya silikanın nanoparçacıklarına maruz kaldıktan sonra hastalığa yakalandıkları bilinmektedir [2].

Son yıllarda artan bakteri direnci ve ortaya çıkan problemler ile bu problemin üstesinden gelmek için yeni biyouyumlu bileşiklerin bulunması gerekli görünmektedir. En yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip kobalt oksit nanoparçacıklarının sentezini optimize etmek için yapılan deneysel bir çalışmada sentezlenen kobalt oksit nanoparçacıklarının antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesi, çalışılan gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin koloni oluşumunda önemli bir azalma olduğunu göstermiştir [34].

Nanopartiküllerin bitki aracılı sentezi, toksik olmayan öncülerin kullanımı yoluyla kimyasal atık oluşumunu en aza indirmek için büyük bir potansiyel sergiler. Yapılan bir araştırmada, Manilkara zapota yaprağı ekstresi kullanılarak yeşil bir yaklaşımla magnezyum oksit (MgO) ve kobalt oksit nanoparçacıklarının sentezini, bunların polianilin ile yüzey modifikasyonu ve *Aspergillus niger*'e karşı antifungal özelliklerinin raporlandığı bir çalışmada incelenen nanopartiküllerin *Aspergillus*'un neden olduğu gıda bozulmalarını önlemek için kullanılan mevcut teknolojilere bir alternatif sunabileceği sonucuna varılmıştır. Kobalt oksit NP'lerin in vitro sitotoksik deneyleri, insan hepatomu kanser hücrelerine ve hepatoselüler karsinom HepG2'ye karşı güçlü antikanser aktivitesi olduğunu ortaya çıkarmıştır [120,121].

Kobalt oksit ile altın nanopartiküllerin sağlıklı sıçanların siyatik sinirinde sinir yenilenmesi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada altın ve kobalt oksit nanoparçacıkla modifiye edilmiş membranların, sinir rekonstrüksiyonundan sonra aksonal büyümeyi iyileştirdiği ve kanalların rejeneratif performansını arttırdığı sonucuna varılmıştır [122].

Birçok teknolojik uygulama, yalnızca büyük ölçekli üretim yöntemleri kullanılarak mümkün olan, iyi tanımlanmış özelliklere sahip büyük miktarda nanoparçacık gerektirir. Bu çerçevede,

helyumda ve hava atmosferinde farklı ark akımları ile yüksek sıcaklıkta ark plazma yolu ile sentezlenen kobalt oksit nanoparçacıklarının yapısal ve yerel geometrik incelemelerini gerçekleştirilmiş ve değişken olarak, yüksek söndürme hızı ve yüksek termal iletkenlik nedeniyle ortam sentezlenen numunelerde, nanoparçacıkların kristal fraksiyonunun azaldığı çok alanlı bir oluşum ve çekirdek-kabuk yapısından dolayı dalgalı bir zorlayıcılık gözlemlenmiştir [123]. NP'lerin değişen konsantrasyonları, kanser hücre hattında kobalt oksit nanoparçacıklarının bazı tümör hücrelerinin hayatta kalma oranını azalttığı da farklı bir çalışma sonucunda ortaya çıkmıştır [124].

Mikroemülsiyon yöntemiyle kobalt oksit ve hidroksit nanosüspansiyonlarından (Ns) türetilen metallosurfaktanların üretimi ile ilgili yapılan çalışmada antimikrobiyal, sitotoksik, genotoksik, antioksidan ve sitostatik aktiviteleri çevreyle uyumlu metod kullanılarak araştırılmıştır. Bisheksadesiltrimetilamonyum kobalt tetraklorür çoklu ilaca dirençli Staphylococcus Aureus'a karşı maksimum antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve kuvvetli genotoksik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır [125].

Yakın zamanda, bazı nanopatiküllerin, sitoplazmaya erişim sağlayan endositotik olmayan bir yolla da plazma zarını geçebileceği varsayılması üzerine araştırmacıların bazı oositlerin farklı kobalt nanopatiküllerine maruz bıraktıkları bir deneyde bir protein korona ile çevrili kobalt veya kobalt oksit nanopatiküllerinin değil, kobalt oksit nanopatiküllerinin plazma zarlarını geçebileceği ve "protein korona" etkisinin, nanopatiküller ile oosit zarı arasındaki etkileşimleri nanopatiküllerin sitoplazmaya geçişini bloke eden veya sınırlayan etkileşimleri önleyebileceği veya önemli ölçüde azaltabileceği sonucuna varılmıştır [126].

NP'lerin biyolojik sistemler üzerinde bazı olumsuz etkileri nasıl indükleyebileceği iyi araştırılmadığı gerekçesiyle yapılan bir çalışmada, sinir sistemi modelleri olarak kobalt oksit nanopatiküllerinin tau proteininin üçüncül ve ikincil yapısında belirgin değişiklikleri tetikleyebildiği ayrıca kobalt oksit NP'lerin dozu, hücreler üzerinde olumsuz etkilerini indükleyen çok önemli bir faktör olduğu ve nanopatiküllerin tüm yan etkileri iyi araştırılmadığından, ek detaylı deneylere daha fazla ihtiyaç olduğu sonucu çıkarılmıştır [127].

Kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanser, gelişmiş ülkeler arasında en önde sayılan ikinci ölüm nedenidir. Hastalığa bağlı ölümler son yıllarda giderek artmış ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Mide kanseri modern toplumlarda en sık görülen kanserlerden biridir. Önceki çalışmalar, nanoparçacık komplekslerinin kullanımının kanser tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir. Glutamik asit ile fonksiyonelleştirilmiş ve tiyosemikarbazid ile konjuge edilmiş kobalt oksit nanopatiküllerinin mide kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksikite ve antikanser özelliklerini araştırmak amacıyla bir takım çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak da bu nanopatiküllerin mide kanseri hücrelerinin artan nanopatikül

konsantrasyonu ile hücre canlılığı azalmış ve apoptozu arttırarak hücre canlılığını etkilemiştir [128].

Aşırı miktarda ROS, hücreler için oldukça toksiktir. Fazla üretildiğinde, serbest radikaller ve oksidanlar, hücre zarlarını ve proteinler, lipidler ve DNA gibi başlıca hücrenel bileşenleri etkiler. Bununla birlikte, yüksek seviyelerde ROS'a akut maruz kalma, karaciğerin iskemi/reperfüzyonu (I/R) sırasında olduğu gibi insan vücudunda ciddi hasara da neden olabilir. Zararlı etkilerinin yanı sıra ROS, büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve hücre dışı ATP'ye yanıt olarak üretilen moleküler ikincil haberciler olarak da algılanır. Bu nedenle hücrelerde oksidan ajanların rolü karmaşıktır ve oksidan ve antioksidan partiküller arasındaki dengeye bağlıdır. Oksidatif stres, karaciğer hasarına neden olan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir [65,67].

Son yirmi yılda yapılan kapsamlı araştırmalar, devam eden oksidatif stresin kronik inflamasyona yol açabileceğini ve bunun da mide kanseri gibi kanser, diyabet, kardiyovasküler, nörolojik ve pulmoner hastalıklar dahil olmak üzere çoğu kronik hastalığa aracılık edebileceğini ortaya koymaktadır ve ROS ve RNS'nin endojen veya eksojen saldırılar yoluyla aşırı üretimi canlı organizmalar için zararlı olduğu kabul edilmektedir [70,74].

Kobalt oksit nanopartiküllerinin sıçanların karaciğeri üzerindeki etkilerini araştırmak için yaptığımız bu çalışmada kobalt oksit nanopartikülüne maruz bırakılan sıçanların oksidatif strese karşı iyi bir enzimsel antioksidan olan katalaz aktivitesinde 5. grup olan 50 mg/kg uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Bu da yüksek dozlarda uygulanan kobalt oksit nanopartiküllerinin katalaz aktivitesini azalttığını göstermektedir.

SOD oksijene maruz kalan tüm hücrelerde antioksidan savunmanın önemli bir parçasıdır. Yapılan çalışmalar SOD'un oksidatif stres, iyonlaştırıcı radyasyon ve enflamatuar sitokinlere karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda kobalt oksit nanopartiküllerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisinde genel olarak artış gözlemlendiği ancak bu artışın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bunun dışında lipid peroksidasyonuna neden olarak karaciğerde hasar oluşturan MDA seviyesinin de kobalt oksit nanopartiküllerinin sıçanların karaciğer dokusunda arttığını ancak istatistiksel bir anlam bulunamaması kobalt oksitin MDA düzeyinde genel anlamda etkili olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda kobalt oksit nanopartiküllerinin inflamasyonla olan ilişkisini araştırmak için yaptığımız IL-6 parametresinin ölçümlerinde sıçanların karaciğer dokusunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ayrıca özellikle enfeksiyonlara karşı direnç oluşturmak için

önemli olan TNF- α proteini ile yapılan incelemede ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.

Kobalt oksit nanopartikülleri ile ilgili bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Biz de bu nanopartiküllerin dokulardaki DNA hasarını, inflamasyon ve oksidatif stresle olan ilişkisini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmada kobalt oksit nanopartiküllerinin karaciğer dokusundaki GHİ'nin ve HHY'nin kontrol grubu kıyaslamasında anlamlı bir değişiklik olmadığını gözlemledik. Bu da kobalt oksit nanopartiküllerinin uyguladığımız dozlarının ve uygulama yöntemimizin sıçanların karaciğerlerinde herhangi bir genotoksik etki göstermediği anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda kobalt oksit nanopartiküllerin oksidatif stres, inflamasyon ve DNA hasarı üzerinde anlamlı derecede etkili olmadığını belirledik. Nanopartiküllerin organizmalar üzerindeki etki mekanizmasını açıklamak için farklı maruziyet şekli ve süresi, nanopartikül boyut ve konsantrasyonu, enzim aktivitesinin yanı sıra gen ekspresyonun da dahil edildiği daha fazla çalışmaya gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] Portakal, O. Biyolojik ölçümler ve nanopartiküller. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2008, 33(1), 35-38.
- [2] Valentini X.; Rugira P.; Frau A.; Tagliatti V.; Conotte R.; Laurent S.; Colet J.M.; Nonclercq D. Hepatic and renal toxicity induced by TiO₂ nanoparticles in rats: a morphological and metabonomic study. *Journal of Toxicology*. 2019.
- [3] Haynes, V.N.; Ward, J.E.; Russell, B.J.; Agrios, A.G. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. *Aquatic Toxicology*. 2017, 185,138-148.
- [4] Cho, W. S.; Duffin, R.; Bradley, M.; Megson, I. L.; MacNee, W.; Lee, J. K. Donaldson, K. Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*,2013, 10(1), 55.
- [5] Abudayyak, M.; Gurkaynak, T. A.; Özhan, G. In vitro toxicological assessment of cobalt ferrite nanoparticles in several mammalian cell types. *Biological Trace Element Research*. 2017,175(2), 458-465.
- [6] Faisal, M.; Saquib, Q.; Alatar, A.; Al-Khedhairy, A. A.; Ahmed, M.; Ansari, S. M.; Praveen, S. Cobalt oxide nanoparticles aggravate DNA damage and cell death in eggplant via mitochondrial swelling and NO signaling pathway. *Biological Research*, 2016, 49(1), 20. 12/15
- [7] Cavallo, D; Ciervo, A. Investigation of CoO nanoparticles cyto-genotoxicity and inflammatory response in two types of respiratory cells. *J. App. Tox.* 2014, 1102-1113.
- [8] Gürmen, S., Ebin, B., & İTÜ, M. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metalurji Dergisi*, 150, 31-38.
- [9] TUNCA, E. Ü. (2015). Nanoteknolojinin temeli nanopartiküller ve nanopartiküllerin fitoremediasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 23-34.
- [10] Dikensoy, Ö. (2010). Nanopartiküller ve plevra. *Plevra Bülteni*, 4, 7-9.
- [11] Dağlıoğlu, Y. (2018). Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksosite deneylerindeki önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1), 1-17.
- [12] Korkmaz, N. (2019). Saintpaulia sulu yaprak özütü kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(4), 2225-2234.
- [13] Seçkin, H. (2020). *Gümüş-kalay alaşım nanopartiküllerinin insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması* (Master's thesis, Bursa Uludağ Üniversitesi).
- [14] Ulutaş, G. (2015). *Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin zebra balığı (Danio rerio) larvaları üzerine genotoksik etkileri ve gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi* (Master's thesis, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı).
- [15] Yetim, A. (2011). *Karbon nano tüpler* (Doctoral dissertation, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana).
- [16] Alshehri, R., Ilyas, A. M., Hasan, A., Arnaout, A., Ahmed, F., & Memic, A. (2016). Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity: miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8149-8167.
- [17] Saleemi, M. A., Hosseini Fouladi, M., Yong, P. V. C., Chinna, K., Palanisamy, N. K., & Wong, E. H. (2020). Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications. *Chemical Research in Toxicology*.
- [18] Dağlıoğlu, Y., & Öztürk, B. Y. Moleküler Biyolojide Kullanılan Nanopartikül Türleri. *Research in Natural and Engineering Sciences*, 195.
- [19] Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z., & Zhao, Y. (2011). Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*, 3(2), 362-382.
- [20] Ateş, M., Demir, V., & İmamoğlu, H. Nanoparçacıkların Özellikleri ve Akutik Çevreye Etkisi. *Ziraat Mühendisliği*, (360), 52-59.

- [21] Burhan, N. A. S., & Çolak, D. A. NiFe₂O₄ Nanokompozitinin Olası Toksik Etkisine Karşı Olueropein'in Koruyucu Rolü. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 172-183.
- [22] Akçay, F. A., & Avcı, A. (2018). Synthesis of Metal Nanoparticles by Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(4), 408-414.
- [23] Dash, A., Singh, A. P., Chaudhary, B. R., Singh, S. K., & Dash, D. (2012). Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. *Nano-micro Letters*, 4(3), 158-165.
- [24] Alaraby, M., Hernández, A., & Marcos, R. (2016). New insights in the acute toxic/genotoxic effects of CuO nanoparticles in the in vivo Drosophila model. *Nanotoxicology*, 10(6), 749-760.
- [25] Rao, CR, Kulkarni, GU, Thomas, PJ ve Edwards, PP (2000). Metal nanopartiküller ve bunların asambleleri. *Chemical Society Reviews* , 29 (1), 27-35.
- [26] Kamat, PV (2002). Metal nanopartiküllerin fotofiziksel, fotokimyasal ve fotokatalitik yönleri. *Fiziksel Kimya B Dergisi* , 106 (32), 7729-7744.
- [27] BULUT, M., & Ezgi, A. K. A. R. (2012). Dendrimerlerin önemi ve kullanım alanları. *Teknik Bilimler Dergisi*, 2(1), 5-11.
- [28] NAMIRTI, O., & Atav, R. (2011). Tekstilde yeni bir konsept olan dendrimerlerin tarihçesi, sınıflandırılması, molekül yapısı ve özellikleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(2), 109-115.
- [29] İcduygu, G.,Seçkin, T., & Gültek, A. Siklofosfozen korlü siloxan dendrimerlerin sentezi ve uygulamaları, XIII. Ulusal Kimya Kongresi, Samsun, 1999.
- [30] Kambhampati, S. P., & Kannan, R. M. (2013). Dendrimer nanoparticles for ocular drug delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), 151-165.
- [31] Menjoge, A. R., Kannan, R. M., & Tomalia, D. A. (2010). Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*, 15(5-6), 171-185.
- [32] Vellayappan, M. V., Balaji, A., Subramanian, A. P., John, A. A., Jaganathan, S. K., Murugesan, S., & Yusof, M. (2015). Multifaceted prospects of nanocomposites for cardiovascular grafts and stents. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2785.
- [33] Athawale, A. A., Majumdar, M., Singh, H., & Navinkiran, K. (2010). Synthesis of cobalt oxide nanoparticles/fibres in alcoholic medium using y-ray technique. *Defence Science Journal*, 60(5)]
- [34] Moradpoor, H., Safaei, M., Rezaei, F., Golshah, A., Jamshidy, L., Hatam, R., & Abdullah, R. S. (2019). Optimisation of cobalt oxide nanoparticles synthesis as bactericidal agents. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(17), 2757.
- [35] Salman, S. A., Usami, T., Kuroda, K., & Okido, M. (2014). Synthesis and characterization of cobalt nanoparticles using hydrazine and citric acid. *Journal of Nanotechnology*, 2014.
- [36] Savi, M., Bocchi, L., Cacciani, F., Vilella, R., Buschini, A., Perotti, A., ... & Zaniboni, M. (2021). Cobalt oxide nanoparticles induce oxidative stress and alter electromechanical function in rat ventricular myocytes. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 1-17.
- [37] Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2015). Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials*, 5(2), 1004-1021.
- [38] Mauro, M., Crosera, M., Pelin, M., Florio, C., Bellomo, F., Adami, G., ... & Filon, F. L. (2015). Cobalt oxide nanoparticles: behavior towards intact and impaired human skin and keratinocytes toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 8263-8280.
- [39] Bossi, E., Zanella, D., Gornati, R., & Bernardini, G. (2016). Cobalt oxide nanoparticles can enter inside the cells by crossing plasma membranes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9
- [40] Thomas, K., & Sayre, P. (2005). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part I: evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials. *Toxicological Sciences*, 87(2), 316-321.
- [41] Waris, A., Din, M., Ali, A., Afridi, S., Baset, A., Khan, A. U., & Ali, M. (2021). Green fabrication of Co and Co₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications: A review. *Open Life Sciences*, 16(1), 14-30.

- [42] Karluss Thomas, Pilar Aguar, Hajime Kawasaki, Jeff Morris, Junko Nakanishi, Nora Savage (2006). Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part VIII: International Efforts to Develop Risk-Based Safety Evaluations for Nanomaterials, *Toxicological Sciences*, 92(1), 23–32.
- [43] Thomas, T., Thomas, K., Sadrieh, N., Savage, N., Adair, P., & Bronaugh, R. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VII: evaluating consumer exposure to nanoscale materials. *Toxicological Sciences*, 91(1), 14-19.
- [44] Spigoni, V., Cito, M., Alinovi, R., Pinelli, S., Passeri, G., Zavaroni, I., ... & Dei Cas, A. (2015). Effects of TiO₂ and Co₃O₄ nanoparticles on circulating angiogenic cells. *PLoS One*, 10(3), e0119310.
- [45] Atlı Şekeroğlu, Z. (2013). From nanotechnology to nanogenotoxicology: genotoxic effect of cobalt-chromium nanoparticles. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 70(1), 33-42.
- [46] Saud Alarifi, D. A., Al Omar Suliman, Y., Maqsood Ahamed, M. A. S., & Abdulaziz, A. (2013). Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 189.
- [47] Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A. A., Al-Khedhairi, A. A., Ahmed, M., Ansari, S. M., & Praveen, S. (2016). Cobalt oxide nanoparticles aggravate DNA damage and cell death in eggplant via mitochondrial swelling and NO signaling pathway. *Biological Research*, 49(1), 1-13.
- [48] Arsalan, N., Kashi, E. H., Hasan, A., Doost, M. E., Rasti, B., Paray, B. A., & Falahati, M. (2020). Exploring the interaction of cobalt oxide nanoparticles with albumin, leukemia cancer cells and pathogenic bacteria by multispectroscopic, docking, cellular and antibacterial approaches. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 4607.
- [49] Feng X, Knowlton KF, Dietrich AD, Duncan S. Effect of abomasal ferrous lactate infusion on phosphorus absorption in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013; 96(7):4586-91.
- [50] Nelson CD, Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RE, Powell JL, Drenowski ME et al. Vitamin D status of dairy cattle: outcomes of current practices in the dairy industry. *J. Dairy Sci* 2016; 99:10150-60
- [51] Pulido E, Giraldez FJ, Bodas R, Andres S, Prieto N. Effect of reduction of milking frequency and supplementation of vitamin e and selenium above requirements on milk yield and composition in Assaf ewes. *J Dairy Sci* 2012; 95(7): 3527-35
- [52] . Spears JW, Lloyd KE, Krafka K. Chromium concentrations in ruminant feed ingredients. *J Dairy Sci* 2017; 100(5):3584-90.
- [53] Alvarez R, Melendez-Martinez AJ, Vicario IM, Alcaide MJ. Carotenoid and vitamin A contents in biological fluids and tissues of animals as an effect of the diet: a review. *Food Rev Int* 2015; 31:319-40.
- [54] Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics*, 90(4), 643-653.
- [55] Bogdanos, D. P., Gao, B., & Gershwin, M. E. (2013). Liver immunology. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 567
- [56] Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology : CB*, 27(21), R1147–R1151.
- [57] Imai, K., Sato, M., Kojima, N., Miura, M., Sato, T., Sugiyama, T., ... & Senoo, H. (2000). Storage of lipid droplets in and production of extracellular matrix by hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) in Long-Evans cinnamon-like colored (LEC) rats. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 258(4), 338-348.
- [58] Favier, R. P., Spee, B., Penning, L. C., & Rothuizen, J. (2011). Copper-induced hepatitis: the COMMD1 deficient dog as a translational animal model for human chronic hepatitis. *Veterinary Quarterly*, 31(1), 49-60.
- [59] Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2): 785–797.
- [60] Tsutsui, H., & Nishiguchi, S. (2014). Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7711-7730.

- [61] Chen, J., Deng, X., Liu, Y., Tan, Q., Huang, G., Che, Q., & Su, Z. (2020). Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: Friend or foe? *International Journal of Biological Sciences*, 16(13), 2367.
- [62] Cubero, F. J., & Nieto, N. (2006). Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 98(6), 460.
- [63] Robinson, M. W., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(3), 267-276.
- [64] Horie, M., & Tabei, Y. (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*, 55(4), 331-342.
- [65] Lach, C. H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver disease. *World J Gastroenterology*, 20(25), 8082-8091.
- [66] Jorgačević, B., Vučević, D., Samardžić, J., Mladenović, D., Vesković, M., Vukićević, D., ... & Radosavljević, T. (2021). The effect of CB1 antagonism on hepatic oxidative/nitrosative stress and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Medicinal Chemistry*, 28(1), 169-180.
- [67] Rezzani, R., & Franco, C. (2021). Liver, oxidative stress and metabolic syndromes. *Nutrients*, 13(2), 301.
- [68] Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., & Mitcheva, M. (2014). Some in vitro/in vivo chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats. *BioMed Research International*, 1-6.
- [69] Nakajima, T. (2015). Roles of sulfur metabolism and rhodanese in detoxification and anti-oxidative stress functions in the liver: responses to radiation exposure. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 21, 1721.
- [70] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616.
- [71] Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 1-9.
- [72] Singh, L., Majhi, S., Pabreja, K., Negi, P., Goyal, R., Gupta, G., & Dua, K. (2020). Oxidative Stress in Liver Diseases. In *Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Diseases* (pp. 209-228). Springer, Singapore.
- [73] Alkadi, H. (2020). A review on free radicals and antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 20(1), 16-26.
- [74] Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- [75] Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-32.
- [76] Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2).
- [77] Mason, R. P. (2016). Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and in vivo with immuno-spin trapping. *Redox Biology*, 8, 422-429.
- [78] Spasojević, I. (2011). Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(3), 114-142.
- [79] Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766.
- [80] Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89
- [81] Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., & Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(2), 299-304.

- [82] Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- [83] Abdel-Azeem, H. H., & Osman, G. Y. (2021). Oxidative stress and histopathological effect of zinc oxide nanoparticles on the garden snail *Helix aspersa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(8), 9913-9920.
- [84] Medina-Reyes, E. I., Rodríguez-Ibarra, C., Déciga-Alcaraz, A., Díaz-Urbina, D., Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). Food additives containing nanoparticles induce gastrototoxicity, hepatotoxicity and alterations in animal behavior: The unknown role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111814.
- [85] Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L., & Ding, M. (2012). Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4), 551-561.
- [86] Sarkar, A., Ghosh, M., & Sil, P. C. (2014). Nanotoxicity: oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 730-743.
- [87] Feng, S., Zhang, Z., Mo, Y., Tong, R., Zhong, Z., Chen, Z., ... & Huang, Y. (2020). Activation of NLRP3 inflammasome in hepatocytes after exposure to cobalt nanoparticles: the role of oxidative stress. *Toxicology In Vitro*, 69, 104967.
- [88] Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., & Schins, R. P. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International Journal of Cancer*, 109(6), 799-809.
- [89] Vallyathan, V., & Shi, X. (1997). The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 1), 165-177.
- [90] Kapoor, G., & Banyal, H. S. (2009). Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(4), 421.
- [91] van den Toren, S. J., van Grieken, A., Mulder, W. C., Vanneste, Y., Lugtenberg, M., de Kroon, M. L., & Raat, H. (2019). School absenteeism, Health-Related Quality of Life [HRQOL] and happiness among young adults aged 16–26 years. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(18), 3321.
- [92] Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., & Lu, Z. Z. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Research*, 22(6C), 4179-4181.
- [93] Wildi, B., & Lütz, C. (1996). Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell & Environment*, 19(2), 138-146.
- [94] Müller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1291-1305.
- [95] Ganesana, M., Erlichman, J. S., & Andreescu, S. (2012). Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome c biosensor. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12), 2240-2249.
- [96] Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*, 1(10), 888-897.
- [97] Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095-1108.
- [98] Alfonso-Prieto, M., Biarnes, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131(33), 11751-11761.
- [99] Mashhadi, Z., Boeglin, W. E., & Brash, A. R. (2014). Inhibitory effects of a novel Val to Thr mutation on the distal heme of human catalase. *Biochimie*, 106, 180-183.
- [100] Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- [101] Yang, J., Cao, L., Li, Y., Liu, H., Zhang, M., Ma, H., & Liu, Q. (2021). Gracillin isolated from *Reineckia carnea* induces apoptosis of A549 Cells via the mitochondrial pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 233.

- [102] Zhang, J., Ye, Z. W., Janssen-Heininger, Y., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2020). Development of telintra as an inhibitor of glutathione S-transferase P. In *Reactive Oxygen Species* (pp. 71-91). Springer, Cham.
- [103] Zhang J, Ye ZW, Janssen-Heininger Y, Townsend DM, Tew KD. Development of Telintra as an Inhibitor of Glutathione S-Transferase P. *Handb Exp Pharmacol*. 2021;264:71-91. doi: 10.1007/164_2020_392. PMID: 32767141; PMCID: PMC8963531.
- [104] Maiorino, M., Bosello-Travain, V., Cozza, G., Miotto, G., Roveri, A., Toppo, S., & Ursini, F. (2015). Understanding mammalian glutathione peroxidase 7 in the light of its homologs. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 352-360.
- [105] Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1-2), 317-331.
- [106] Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (128), e56450.
- [107] Bolognesi, C., Cirillo, S., & Chipman, J. K. (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 50-59.
- [108] Møller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1), 1-7.
- [109] Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Novak, M., Sramkova, M., Pourrut, B., & Collins, A. (2019). The comet assay in animal models: From bugs to whales–(Part 2 Vertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 130-164.
- [110] Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Pourrut, B., Del Bo, C., Novak, M., & Collins, A. (2019). The comet assay in animal models: From bugs to whales–(Part 1 Invertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 779, 82-113.
- [111] Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- [112] Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- [113] Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- [114] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- [115] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- [116] Yamazaki M. [TNF-alpha]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1994 Nov;21(15):2679-87. PMID: 7979434.
- [117] Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). *Microscopy Research and Technique*, 50(3), 184-195.
- [118] Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 en la inflamación, la inmunidad, y la enfermedad. *Cold Spring Harbor Perspectives de la Biología*, 6(10), a016295.
- [119] Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, 2(4), 288-294.
- [120] Manzoor, S., Yasmin, G., Raza, N., Fernandez, J., Atiq, R., Chohan, S., ... & Azam, M. (2021). Synthesis of Polyaniline Coated Magnesium and Cobalt Oxide Nanoparticles through Eco-Friendly Approach and Their Application as Antifungal Agents. *Polymers*, 13(16), 2669.
- [121] Abbasi, B. A., Iqbal, J., Khan, Z., Ahmad, R., Uddin, S., Shahbaz, A., & Mahmood, T. (2021). Phytofabrication of cobalt oxide nanoparticles from *Rhamnus virgata* leaves extract and investigation of different bioactivities. *Microscopy Research and Technique*, 84(2), 192-201.
- [122] Hazer Rosberg, D. B., Hazer, B., Stenberg, L., & Dahlin, L. B. (2021). Gold and Cobalt Oxide Nanoparticles Modified Poly-Propylene Poly-Ethylene Glycol Membranes in Poly (ϵ -Caprolactone) Conduits Enhance Nerve Regeneration in the Sciatic Nerve of Healthy Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7146.
- [123] Das, A., Balasubramanian, C., Orpe, P., Pugliese, G. M., Puri, A., Marcelli, A., & Saini, N. L. (2021). Morphological, electronic, and magnetic properties of multicomponent cobalt

- oxide nanoparticles synthesized by high temperature arc plasma. *Nanotechnology*, 33(9), 095603.
- [124] Raeisi, M., Alijani, H. Q., Peydayesh, M., Khatami, M., Bagheri Baravati, F., Borhani, F., ... & Soltaninezhad, S. (2021). Magnetic cobalt oxide nanosheets: green synthesis and in vitro cytotoxicity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(7), 1423-1432.
- [125] Dogra, V., Kaur, G., Jindal, S., Kumar, R., Kumar, S., & Singhal, N. K. (2019). Bactericidal effects of metallosurfactants based cobalt oxide/hydroxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 681, 350-364.
- [126] Bossi, E., Zanella, D., Gornati, R., & Bernardini, G. (2016). Cobalt oxide nanoparticles can enter inside the cells by crossing plasma membranes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9.
- [127] Nouri, M., Esfahanizadeh, N., Shahpar, M. G., Attar, F., Sartipnia, N., Akhtari, K., & Falahati, M. (2018). Cobalt oxide nanoparticles mediate tau denaturation and cytotoxicity against PC-12 cell line. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1763-1772.
- [128] Jarestan, M., Khalatbari, K., Sadat Shandiz, S. A., Beigi, S., Hedayati, M., Majlesi, A., & Salehzadeh, A. (2020). Preparation, characterization, and anticancer efficacy of novel cobalt oxide nanoparticles conjugated with thiosemicarbazide. *3 Biotech*, 10(5), 1-9.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :
Doğum Tarihi :
E-mail :

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Gazi Üniversitesi	2013-2017
Yüksek Lisans	Eczacılık Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2018-2022

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl
Polis Memuru	Emniyet Genel Müdürlüğü	2020