

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERYUM OKSİT NANOPARÇACIKLARININ ZEBRABALIĞI EMBRİYOLARINA  
ETKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Muhammed Salih AKGÜL**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ÖZMEN**

**HAZİRAN 2022**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERYUM OKSİT NANOPARÇACIKLARININ ZEBRABALIĞI  
EMBRİYOLARINA ETKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Muhammed Salih AKGÜL  
(36183611022)**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ÖZMEN**

**HAZİRAN 2022**

## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez çalışmamda beni yönlendiren, çalışmalarımın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bilgisi, anlayışı ve sabrıyla akademik ortamda olduğu kadar engin fikirleri ile de gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında ve tez yazım aşamasında bilgi, öneri ve desteğiyle bana yol gösteren hocam Sayın Prof.Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ 'ye,

Biyoloji Laboratuvarı'nda çalışmalarımda ve embriyo temininde bana destek olan hocam Sayın Dr. Duygu ÖZHAN'a ve Tekniker Nazan BATTALOĞLU'na,

Bu tez çalışmasına, FYL-2020-2543 numaralı proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne,

Tez çalışmalarım sırasında manevi desteklerini benden esirgemeyen, bana olan desteği ve güveniyle yanımda olan, sevgisiyle beni yücelten, varlığıyla güçlü kılan ve hayat arkadaşım olmasından onur duyduğum, eşim Dilek AKGÜL'e,

Bu çalışmamın sizlere armağan olması dileğiyle evlatlarım, Efe ve Ege'ne

teşekkür ederim.

## ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Seryum Oksit Nanoparçacıklarının Zebrabalığı Embriolarına Etkileri Üzerine Bir Araştırma” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Muhammed Salih AKGÜL



## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....	i
ONUR SÖZÜ .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR .....	vii
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Seryum Oksit (CeO <sub>2</sub> ) .....	2
1.2 Nanoteknoloji ve Seryum Oksit Nanoparçacıkları .....	3
1.3 Doksorubisin .....	8
1.3.1 Doksorubisinin hücrelere etki mekanizması .....	11
1.3.1.1 DNA'ya bağlanma .....	11
1.3.1.2 DNA ve RNA polimeraz inhibisyonu .....	11
1.3.1.3 Hücre zarı üzerine etkileri .....	11
1.3.1.4 Serbest radikal oluşturma .....	11
1.4 Serbest Radikaller .....	12
1.5 Antioksidanlar .....	13
1.6 Çalışmada Kullanılan Test Organizması, <i>Danio rerio</i> .....	15
1.6.1 Zebrabalığının genel özellikleri .....	15
1.6.2 Zebrabalığının deneysel çalışmalarda kullanılmasının sebepleri.....	17
1.7 Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılacak Biyokimyasal belirteçler .....	17
1.7.1 Glutasyon S-transferaz (GST) .....	17
1.7.2 Glutasyon redüktaz (GR).....	18
1.7.3 Glutasyon peroksidaz (GPx).....	18
1.7.4 Katalaz (CAT) .....	19
1.7.5 Karboksilesteraz (CaE) .....	20
<b>2. KAYNAK ÖZETİ.....</b>	<b>21</b>
2.1 Seryum Oksit ile İlgili Çalışmalar .....	21
2.2 DOX ile İlgili Çalışmalar .....	25
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	30
3.2 Test Organizmalarının Sağlanması .....	30
3.3. ZebraBalığı Embriyo Toksikite Testi.....	31
3.4 Toksikite Testlerinin Uygulanması .....	31
3.4.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin LC <sub>50</sub> değerlerinin ve uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	31
3.5 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	32
3.5.1 Balıkların homojenizasyonu ve santrifüj işlemleri.....	32
3.5.2 Glutasyon S-transferaz aktivitesi (GST).....	33
3.5.3 Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR) .....	33
3.5.4 Glutasyon peroksidaz aktivitesi (GPx) .....	33
3.5.5 Katalaz aktivitesi (CAT) .....	34
3.5.6 Karboksilesteraz aktivitesi (CaE).....	34
3.6 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar:.....	34
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>

4.1 DOX Toksisitesi ile İlgili Bulgular.....	35
4.2 Seryum Oksit Toksisitesi İle İlgili Bulgular .....	37
4.3 Test Materyallerinin Karışımları ile İgili Bulgular.....	41
4.3.1 DOX-CeO <sub>2</sub> karışımının gelişimsel etkileri .....	41
4.3.2 DOX ve CeO <sub>2</sub> karışımı ile ilgili biyokimyasal bulgular .....	44
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>56</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>63</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1:</b> Antioksidanların sınıflandırılması .....	14
<b>Çizelge 1.2:</b> Zebrabalığının ( <i>D. rerio</i> ) sistematikteki yeri .....	15
<b>Çizelge 4.1:</b> 120 saat süre ile 40-106.4 µM DOX'a maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları	37
<b>Çizelge 4.2:</b> 120 saat süreyle 0.78-50 mg/L CeO <sub>2</sub> 'ye (CNP-5, CNP-25, CNP-50 ve CeO <sub>2</sub> -B) maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları .....	39
<b>Çizelge 4.3:</b> 120 saat süre ile DOX ve CeO <sub>2</sub> (CNP-5, CNP-25, CNP-50 ve CeO <sub>2</sub> -B) karışımlarına maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları .....	43
<b>Çizelge 4.4:</b> Biyokimyasal analizler için 120 saat süre ile DOX ve CNP-25 ile CeO <sub>2</sub> -B'ye maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında ölüm düzeyleri ve koryondan çıkma durumları .....	45
<b>Çizelge 4.5:</b> DOX ve CeO <sub>2</sub> 'lere maruz bırakılan <i>D. rerio</i> embriyolarının biyokimyasal belirteç düzeyleri .....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Seryum Oksit'in kübik yapısı .....	3
Şekil 1.2: Nanoboyutun biyolojik yapılarla gösterimi .....	4
Şekil 1.3: Fare makrofaj hücrelerinin boyutunu NP'lerin boyutuyla kıyaslama .....	6
Şekil 1.4: DOX'un kimyasal yapısı ve uzaysal düzlemde görünümü .....	9
Şekil 1.5: Dolksorubisine bağlı olarak toksik etkinin en fazla görüldüğü doku ve organlar .....	10
Şekil 1.6: Dişi ve erkek zebrafalıkları .....	16
Şekil 4.1: 72 hpf embriyoda DOX maruziyetine bağlı olarak gözlenen malformasyonlar .....	36
Şekil 4.2: DOX'a maruz bırakılan zebrafalığı embriyolarında kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları .....	36
Şekil 4.3: CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan embriyolarda kalp atım sayıları(dk) .....	40
Şekil 4.4: CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan embriyolarda toplam vücut uzunlukları(mm).....	40
Şekil 4.5: DOX- CeO <sub>2</sub> (5-25-50 ve bulk) karışımlarında toplam vücut uzunlukları .....	42
Şekil 4.6: DOX- CeO <sub>2</sub> (5-25-50 ve bulk) karışımlarında kalp atım sayıları .....	44
Şekil 4.7: DOX ve CeO <sub>2</sub> 'lere (25nm ve bulk) maruz bırakılan <i>D. rerio</i> embriyolarının biyokimyasal belirteç düzeyleri.....	46



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>BULK</b>	Hacimli
<b>CaE</b>	Karboksilesteraz
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CDNB</b>	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
<b>CeO<sub>2</sub></b>	Seryum dioksit
<b>CK</b>	Kreatinin kinaz
<b>CK-MB</b>	Kreatinin kinaz-miyoblast
<b>CNP</b>	Seryum oksit nanoparçacıkları
<b>CNP-5</b>	5 nm CeO <sub>2</sub>
<b>CNP-25</b>	25 nm CeO <sub>2</sub>
<b>CNP-50</b>	50 nm CeO <sub>2</sub>
<b>CeO<sub>2</sub>-B</b>	Bulk CeO <sub>2</sub>
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleikasit
<b>DOX</b>	Dokсорubisin
<b>GPx</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GS-SG</b>	Okside glutasyon
<b>GST</b>	Glutasyon S-transferaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>LC<sub>50</sub></b>	Ortalama öldürücü konsantrasyon
<b>LDH</b>	Laktat dehidrogenaz
<b>LOAEC</b>	Olumsuz etki görülen en düşük konsantrasyon
<b>LPO</b>	Lipid peroksidasyonu
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MNP</b>	Manyetik nanoparçacıklar
<b>MS</b>	Multiskleroz
<b>NADH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NADPH</b>	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentetaz
<b>NP</b>	Nanoparçacık
<b>O<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Oksijen radikali
<b>OH<sup>·</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>PNBA</b>	P-nitrofenolasetat
<b>RNA</b>	Ribonükleikasit
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SH</b>	Standart hata
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Titanyum dioksit
<b>ZnO</b>	Çinko oksit

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## SERYUM OKSİT NANOPARÇACIKLARININ ZEBRABALIĞI EMBRİYOLARINA ETKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Muhammed Salih AKGÜL

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

64+IX sayfa  
2022

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Bu çalışmada farklı parçacık büyüklüklerine (Bulk, 5-25-50 nm) sahip seryum oksit ( $\text{CeO}_2$ ) nanoparçacıkların (NP), doksorubisinin (DOX) ve DOX- CNP karışımlarının zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarına toksik etkilerinin saptanması amaçlandı. Ayrıca CNP'lerin parçacık büyüklüğü ile ilintili olarak antioksidatif bir koruyuculuğunun olup olmadığının değerlendirilmesi hedeflendi. Bu nedenle çalışmada, bir kemoterapotik ajan olan DOX'un zebra balığı embriyolarında meydana getirebileceği toksik etki ve sonrası hücrelerde oluşabilecek reaktif oksijen türlerine karşı CNP'lerin koruyuculuğunun değerlendirilmesi amaçlandı. Araştırma ile olası etkilerin belirlenmesi amacıyla basit ve etkin bir test olan zebra balığı embriyonal gelişim ve malformasyon testi kullanılarak etkiler değerlendirildi. Embriyonik gelişim sürecinde ortaya çıkan malformasyonlar, embriyonal gelişim ve kalp atım sayıları incelendi. Organizmada olası antioksidatif etkinin değerlendirilmesi için glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), karboksilesteraz (CaE) biyokimyasal belirteçler olarak değerlendirildi. DOX'un  $\text{LC}_{50}$  değeri  $74 \mu\text{M}$  olarak tespit edildi. DOX maruziyetinin embriyolarda gelişimi baskıladığı, toplam vücut uzunluklarında kısalmaya, yumurtadan çıkma sürelerinin uzamasına, kalp atım hızının artmasına ve çeşitli malformasyonlara neden olduğu saptandı. Sadece CNP'lerin etkisine maruz kalan embriyolarda ise önemli bir morfometrik toksisite gözlenmedi. Bu durum DOX maruziyeti ile meydana gelen toksisiteye karşın CNP maruziyetinin koruyucu ve antagonistik bir etkisi olabileceğini, CNP'nin DOX kaynaklı toksisiteyi azaltabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, biyokimyasal belirteçlerin değerlendirilmesi sonucunda ise DOX kaynaklı toksik etkinin giderilmesinde  $\text{CeO}_2$  uygulamasının yeterli bir etkisinin olmadığı değerlendirilmiştir. CNP'ler DOX ile birlikte uygulandığında DOX'un toksisitesinin kısmen azalabileceği düşünülse de, mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için daha kapsamlı araştırmalara da ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoparçacık, Seryum oksit, zebra balığı, toksisite, antioksidatif etki

## ABSTRACT

Master Thesis

Evaluation Of The Effects Of Cerium Oxide Nanoparticles On Zebrafish Embryos

Muhammed Salih AKGÜL

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

64+IX pages  
2022

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

In this study, it was aimed to determine the toxic effects of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles (NP), doxorubicin (DOX) and DOX-CNP mixtures with different particle sizes (Bulk, 5-25-50 nm) on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. In addition, it was aimed to evaluate whether CNPs have an antioxidative protection in relation to their particle size. Therefore, in this study, it was aimed to evaluate the toxic effect of DOX, a chemotherapeutic agent, in zebrafish embryos and the protection of CNPs against reactive oxygen species that may occur in cells afterward. In order to determine possible effects with the research, the effects were evaluated using the zebrafish embryonal development and malformation test, which is a simple and effective test. Embryonal development, malformations occurring during development, and heart rate were examined. In order to evaluate the possible antioxidative effect in the organism, glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), carboxylesterase (CaE) were evaluated as biochemical markers. The LC<sub>50</sub> value of DOX was determined as 74 µM. It was determined that DOX exposure suppressed development in embryos, caused shortening in total body length, prolongation of hatching times, increased heart rate and various malformations. No significant morphometric toxicity was observed in embryos exposed only to the effects of CNPs. This suggests that CNP exposure may have a protective and antagonistic effect, despite the toxicity caused by DOX exposure, and that CNP may reduce DOX-induced toxicity. On the other hand, as a result of the evaluation of biochemical markers, it was evaluated that CeO<sub>2</sub> application did not have a sufficient effect in eliminating the toxic effect caused by DOX. Although it is thought that the toxicity of DOX may be partially reduced when CNPs are administered together with DOX, extensive research is needed to better understand the mechanism.

**Keywords:** Nanoparticle, Cerium oxide, zebrafish, toxicity, antioxidative effect

## 1. GİRİŞ

Günümüzde nanoparçacıklar (NP) giderek günlük yaşantımızın bir parçası haline gelmektedir. Bu materyallerin üstün özelliklerinden dolayı birçok sektörde kullanım alanlarının genişlemesi ile birlikte bir yandan sağlık alanı ile ilgili birçok uygulamada NP'ler öne çıkmaya başlarken, diğer taraftan insan ve çevre sağlığı için olası riskleri de akla getiren bu malzemelere maruz kalan insan sayısı da giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak kullanım ve üretim ile paralel olarak maddelerin etkilerinin hızla ve eş zamanlı değerlendirilmesi zaruri hale gelmiştir (Rao ve diğ, 2007).

Kullanıma sunulmuş olan çok çeşitli NP'lerin canlılar üzerinde gösterdiği en önemli risklerden biri serbest radikal üretimine yol açarak oksidatif stresin artmasına neden olmalarıdır. NP'lerin kullanım alanları giderek artarken, sağlık alanında da kullanımı önem kazanmaktadır. Nanoteknolojik malzemeler hastalık tanısı, çeşitli ilaçların taşıyıcısı, ilaç salınımının düzenlenmesi ve benzeri birçok alanda giderek önem kazanan bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte hem NP'lerin organizmalarda toksik etkileri yeterli düzeyde bilinmemekte, hem de çeşitli ilaçlar ve kimyasal ajanlarla etkileşiminin oluşturabileceği riskler hakkında kısıtlı bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışmada farklı parçacık büyüklüklerine sahip ticari seryum oksit ( $CeO_2$ ) NP'lere (CNP) maruz bırakılacak olan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında toksik etkinin meydana gelip gelmeyeceğinin saptanması ve literatürdeki önceki çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında antioksidatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çünkü diğer NP'ların aksine CNP'lerin antioksidatif etkiye sahip olduğu da iddia edilmektedir. Hipotezimize göre CNP'lerin parçacık büyüklüğü ile ilintili olarak antioksidatif etki göstereceği düşünülmektedir. Eğer CNP'ler antioksidatif bir etkiye sahip ise bunun oksidatif etkinin giderilmesi/azaltılması amacıyla kullanımı da mümkün olabilecektir (Oberdorster ve diğ, 2005).

Doksorubisin (hidroksidaunorubisin; DOX) kemoterapide kullanılan ilaçlardan biridir. Özellikle kan, kemik iliği ve lenf bezlerinde görülen lösemi ve lenfoma benzeri kanserler, deri ve iç organları çevreleyen dokularda meydana gelen kanser tipleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antibiyotik türüdür. Bununla birlikte, hemen tüm kemoteropik ajanlarda olduğu gibi organizmada önemli toksik ve yan etkilere de yol açmaktadır. Akut

lösemi ve lenfoma türü kanserlerde etkinliği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte DOX kuvvetli kardiyotoksik bir ajandır (Carvalho ve diğ, 2013). DNA'ya bağlanarak etki göstermesinin yanısıra, kullanımı esnasında hastalarda oksidatif strese neden olduğu da bilinmektedir (Chang ve diğ, 2014).

Bu araştırma ile olası etkilerin belirlenmesi amacı ile basit ve etkin bir test olan zebrabalığı embriyonal gelişim ve malformasyon testi kullanılacaktır. Organizmada olası antioksidatif etkinin değerlendirilmesi için seçilen biyokimyasal belirteçlerden yararlanılacaktır. Çalışma sonucunda elde edilecek gözlemsel ve biyokimyasal veriler ışığında CNP'lerin zebrabalığı embriyonal gelişimi üzerindeki etkileri, nanoparçacık büyüklükleri dikkate alınarak değerlendirilecektir.

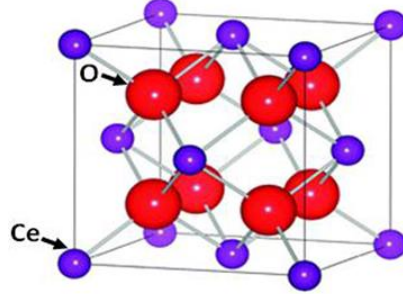
## 1.1 Seryum Oksit (CeO<sub>2</sub>)

Seryum oksit 1803 yılında İsveçli bilim insanları Jöns Jacob Berzelius ve Wilhelm Hisinger tarafından keşfedildiği biliniyor olsa da Almanya'da bir kimyager olan Martin Heinrich Klaproth tarafından da aynı yıl içinde bağımsız olarak keşfedilmiştir. Seryumun oksit formunda izolesini ilk defa 1839 yılında Carl Gustaf Mosander elde etmiştir. 'Seria' adını veren ve bir kimyager olan İsveçli bilim insanı aynı zamanda Berzelius'un çalışma arkadaşıdır. Seryumun ilk uygulaması yine bir kimyager olan Carl Auer von Welsbach'ın kendisinin icat ettiği gaz lambası gömleğinde kullanıldı. Periyodik cetvelin 3-B grubunda yer alan seryumun kimyasal sembolü "Ce"dir. Atom numarası 58, atom ağırlığı 140.11, yoğunluğu 6.77'dir. Nadir toprak elementlerinden olduğu kabul edilen seryum, lantanit serisinin ikinci elementidir. 726 °C ve altında yüzey merkezli kübik kafes şeklinde olan kristal yapısı (Şekil 1.1), 726 °C ve üzerinde ise vücut merkezli kübik bir kristal yapıya geçer (Lide, 2007).

Mükemmel fiziksel ve kimyasal özelliklerden dolayı seryum son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Şimdiye kadar, metal oksitler, ferritler, nadir toprak elementleri ve benzeri pek çok malzemenin nanoparçacığı geliştirilmiştir. Seryumun bolluğu bakır ve kalaydan çok daha yüksektir (Lide, 2007).

Seryum dioksit (CeO<sub>2</sub>) seryumun en kararlı oksidi olarak kabul edilir ve en reaktif elemandır. Doğada elektropozitif olan seryum, çift oksidasyon modunda, Ce<sup>3+</sup> ve Ce<sup>4+</sup> bulunur. Florit bir yapıya sahip olan seryum dioksitin sitokiyometrik yapısında kübik yapının merkezinde dört oksijen atomu bulunurken, merkezi oksijenleri çevreleyen eşgüdümlü sekiz

seryum molekülü vardır. Şekil 1.1’ de kırmızı ile oksijen atomları ve mavi ile seryum temsil edilmektedir. Seryum, köşeleri oksijen atomları tarafından işgal edilen tetrahedronun ortasındadır (Malavasi ve diğ, 2010).



**Şekil 1.1:** Seryum Oksit'in kübik yapısı (Malavasi ve diğ, 2010).

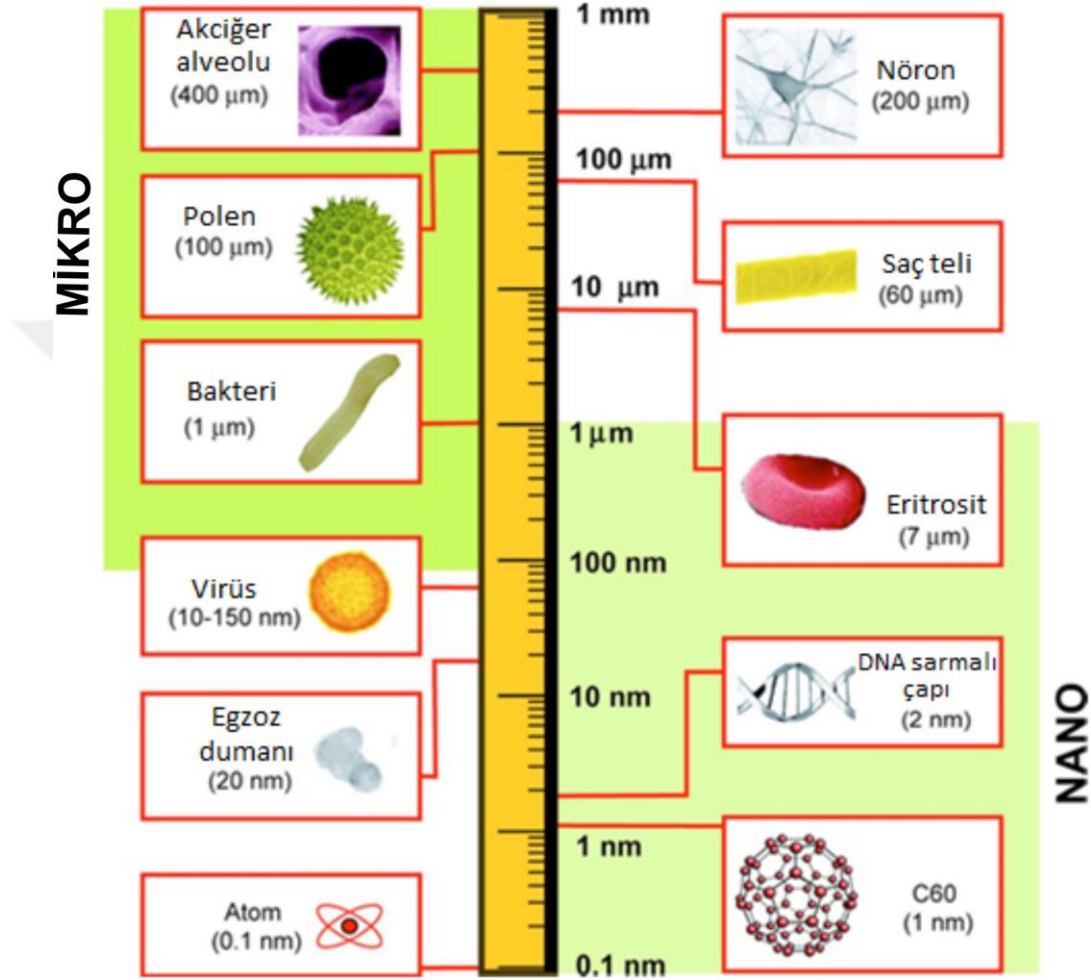
Nadir toprak elementleri arasında yer alsa da yeryüzünde en bol bulunan elementler arasındadır ancak doğada saf olarak bulunmazlar. Seryumun doğada bol miktarda bulunması onun kullanım ve uygulama alanını genişletmiş, özellikle teknolojik alanda önemli bir hale gelmesini sağlamıştır (Haynes, 2017).

Seryum oksitin kullanım alanlarından bazılarını sayacak olursak, yakıt pillerinde, oksijen ve gaz sensörlerinde, optik cihazlarda, aydınlatmalarda, cam malzemeleri parlatmada, alaşım malzemelerinde, otomobillerde katalitik dönüştürücü olarak ve yine CNP'lerin dizel yakıt katkısı olarak kullanıldığında motordaki kurumları yok ederek motor performansını artırmada, güneş ışığına maruz kalmış pigmentlerde polimer oluşumunu önlemesi bakımından kozmetikte UV önleyici malzeme olarak, biyoteknolojide, tıbbi cihazlarda, tıp alanında ve çevre kimyası alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kargozar ve diğ, 2018; Sun ve diğ, 2010). Ayrıca seryum oksit  $Ce^{+4}$  ün  $Ce^{+3}$  e indirgenmesi ile oluşan oksijen boşluğu nedeni ile serbest radikal bağlayıcı özelliğe sahip olması sayesinde biyolojik sistemlerde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Niu ve diğ, 2007).

## 1.2 Nanoteknoloji ve Seryum Oksit Nanoparçacıkları

Nanoteknoloji son yıllarda günlük hayatımızda sıkça duyduğumuz ve farkında olmadan çoğu alanda kullandığımız ürünler ile adeta yaşamımızın içine girmiş bulunmaktadır. ‘Nano’ kelimesi Latince kökenli olup ‘cüce’ anlamına gelmektedir (Johal, 2011). Nanoteknoloji, maddenin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin açığa çıkarılarak atomik düzeyde yeniden üretilerek maddelerin yeni ve faydalı özellikler kazanmasını sağlayabilmektir.

Nanoparçacık (NP) terimi ise birkaç farklı tanımı olmakla birlikte en çok kabul gören tanıma göre “en az bir boyutu 1 ile 100 nm arasında olan materyallere nanoparçacık adı verilmektedir (Klaine ve diğ, 2008). Bir nm, metrenin milyarda biridir. Şekil 1.2’de gösterilen biyolojik yapıların boyutlarının karşılaştırılması NP’lerin boyutlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.



Şekil 1.2: Nanoboyutun biyolojik yapılarla gösterimi (Buzea ve diğ, 2007).

Nanoteknolojinin temellerinin atılmasına neden olan Nobel ödüllü ünlü fizikçi Richard Feynman 1959 yılında yaptığı bir konuşmada ‘ Aşağıda tahmin edildiğinden daha çok yer var ’ sözüyle atom ve moleküllerin kontrol edilebileceğini ve bunu yapabilmek için yeni cihazlara ihtiyaç duyulduğunu söyleyerek bu alanda araştırmaların artmasına neden olmuştur (Drexler, 2004). 1980’lere gelindiğinde Richard Feynman’ın bahsetmiş olduğu cihazları keşfedip geliştiren araştırmacılar aynı zamanda bilgisayarlarında gelişimi ile nano boyutta ölçümler yapılmasına imkân sağlamışlardır (Baird ve diğ, 2005).

NP'leri bu kadar ilgi çekici kılan sebep, malzemelerin nano boyutta olduklarında, bulk (hacimli) boyutta olanlarından farklı davranmalarındır. NP'ler küçük parçacık boyutları nedeniyle yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir. Boyutu küçülen parçacıkların yüzeylerinde çok sayıda atom bulunabilmekte ve bu sayede parçacıklar daha reaktif hale gelebilmektedir. Maddeler bulk boyut ile nano boyut arasındaki geçişlerinde kimyasal özellikleri, manyetik özellikleri, iletkenliği ve optik özellikleri gibi birçok özelliği önemli ölçüde değişim göstermektedir ( Rao ve diğ, 2007). Ortaya çıkan bu yeni özelliklerin pozitif veya negatif sonucu olabilir. Örneğin, ilaçlar için hücrede istenilen yere ulaşmasında ve hücresel bariyerlerin aşılmasında yardımcı olması veya antioksidan etki göstermesi pozitif etkisi olabilir. Negatif etkisi, oksidatif strese neden olabilmesi, hücrelerin işlevselliğinin bozulması veya toksisiteye neden olması sayılabilir (Oberdorster ve diğ, 2005).

Canlılar NP'lere doğal kaynaklardan maruz kalabilecekleri gibi teknolojik gelişmeler sonucu üretilen yeni NP'ler nanoparçacık çeşitliliğini ve miktarını artırmakta buna paralel olarak etkileşim artmaktadır. Boyutlarından dolayı NP'lerin çoğu hücre zarından geçebilmektedir. NP'ler boyut, şekil, kimyasal özelliği ve yüzey özellikleri gibi birçok faktöre bağlı olarak hücrelere hasar vermekte, hücrede ROS oluşumunu tetikleyerek toksisiteye neden olabilmekte ve hücreyi ölüme götürebilmektedir. NP'lerin toksisitesini incelemek için yapılan çeşitli hayvan ve hücre kültürü deneylerinde, şekil, boyut, yüzey özelliği, çözünürlük gibi faktörlerin, NP'lerin toksisitesi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Yüzey özellikleri, özellikle hücre zarlarında biyoaktif bileşiklerle elektrostatik etkileşimleri belirleyebilir (Ozmen ve diğ, 2020).

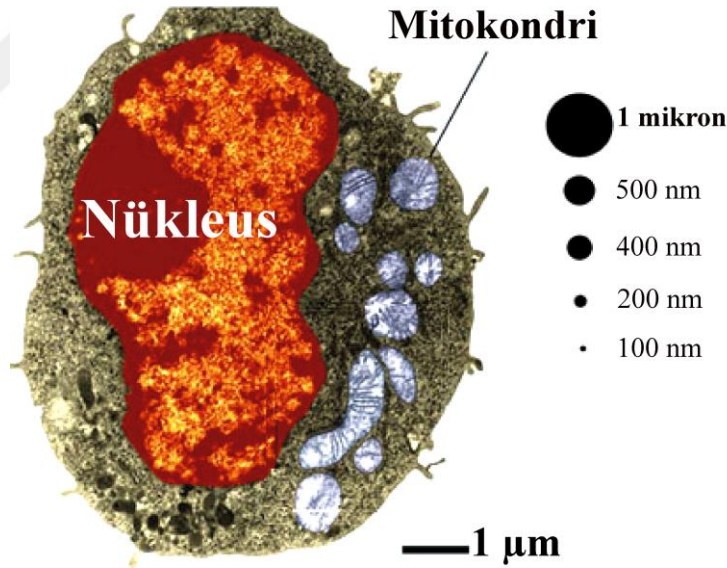
Metal oksit NP'ler, mühendislik sistemlerinde ve doğal ortamlarda yarı iletkenlik özellikleri sebebiyle, oksidasyon redüksiyon süreçlerinde katalizör olarak kullanılan ve endüstriyel öneme sahip nano malzemelerdir (Zhang ve diğ, 2012). Şirketler çok sayıda metal oksit NP'ler üretmektedir. Seryum oksitte bunlardan biridir. Nanoceria adı ile de bilinen ve nadir toprak elementlerinden olan seryum oksit iyi bir iletken, katalizör, elektrot, UV absorpt ve optik malzemelerin parlatılması gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmasının yanı sıra düşük toksisitesi nedeni ile retina tabakasında meydana gelen bozuklukların giderilmesi ve cilt kanseri tedavisinde kullanılması önerilmiştir (Liyong ve diğ, 2015).

Maddelerin toksik olup olmadığını belirlemek için konsantrasyon ve zamana bağlı olarak maddenin "güvenli" veya "tehlikeli" olarak nitelendirmek kolay iken nano boyutta malzemelerin toksikliğini ölçebilmek daha karmaşık ve zor olabilmektedir. NP'lerin değişen yeni özellikleri endüstride yeni imkânlar meydana getirmiş olmakla beraber bir takım riskleri



meydana getirebileceği, nitekim daha önce benzer durumlar ile karşılaşmış, elde edilen ürünlerin faydalı özelliklerinden ötürü yeterince araştırma yapılmadan piyasaya kullanıma sunulmuş olan ürünlerin daha sonradan yan etkilerinin olduğu ortaya çıktığı görülmüştür. Örneğin 1929'dan önce, soğutucularda yaygın olarak kullanılan amonyak, metil klorür ve sülfür dioksit gibi gazların zamanla zehirli olduğu anlaşılmıştır (Krupp ve diğ, 2005).

Küçük boyutlara sahip olan bu NP'ler insan vücuduna solunum, sindirim ve deri yolu ile nüfuz ederek kolaylıkla hücre içerisine girebilmekte ve hücrede meydana getirebileceği reaksiyonlar sonucu hücrenin ölümüne neden olabilmektedir. NP'lerin buldukları ortamda biyolojik madde ile bağlanma ve yüzey özelliklerini değiştirebilmeleri bunların toksisitelerini belirleme açısından durumu daha karmaşık hale getirmektedir. Yapılan çalışmalar nano boyutta solunan Titanyum oksit ( $TiO_2$ ) parçacıklarının makro boyuttaki yapılarına kıyasla akciğerlerde makrofaj mekanizması ile akciğerlere zarar verdiğini göstermiştir. Bu NP'ler kolayca dolaşım sistemine, lenf ve sinir sistemine ulaşabilmekte ve bu şekilde birçok organa ulaşabilmekte, hatta beyin bariyerini dahi geçerek beyine zarar verebilmektedir (Buzea ve diğ, 2007).



**Şekil 1.3:** Fare makrofaj hücrelerinin boyutunu NP'lerin boyutuyla kıyaslama (Buzea ve diğ, 2007)

Canlılarda meydana gelen oksidatif stres sonucu oluşan bozukluklar için yeni tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu anlamda CNP'ler, antioksidan ve rejeneratif özellikleri sayesinde,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  seviyelerini azalttığını, aynı zamanda OH olarak serbest radikal oluşumunu engellediğini göstermiştir. CNP'lerin bu olağanüstü

kapasitesi, bunların oksidatif stres ile ilgili hastalıklar ve bozukluklar için bir alternatif tedavi veya tedaviye yardımcı maddeler olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir (Nelson ve diğ, 2016).

CNP'lerin antioksidan özelliklerinden yararlanılarak tıbbın özellikle kanser tedavisinde başta olmak üzere farklı alanlarında, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerde tedavi olarak etkinliklerini değerlendirmek için çalışmalar yapılmaktadır (Estevez ve diğ, 2014). Colon ve arkadaşları (2010), CNP'lerinin radyasyondan koruma yeteneğini araştırmak için gastrointestinal epitelyum üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda CNP'lerin gastrointestinal epitel serbest radikaller tarafından radyasyonun meydana getireceği zararlı etkilerden koruduğunu ve radyasyona maruz kalmadan önce süperoksit dismutaz (SOD) üretimini artırdığını göstermişlerdir.

Nanocerallerin (5nm CeO<sub>2</sub>) hücre içinde serbest radikal oluşumunu engellediği özelliğinden yola çıkarak retinadaki fotoreseptör hücrelerinin yüksek oksijen metabolizması nedeniyle sürekli olarak yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin engellenmesini sağlamak amacıyla sıçan retinalarında çalışma yapan Chen ve arkadaşları (2008) CNP'lerin retinada oluşan ROS birikimini azalttığını ve hücre dejenerasyonundan kaynaklanan görme kaybını önlediğini göstermiştir. CNP'lerin kanser tedavisinde kanserli hücrelerde toksisite göstererek onları radyasyon tedavisine daha duyarlı hale getirdiği gözlenmiştir.

CNP'lerin ayrıca hamile kalamayan kadınların %25-30'unda görülen endometriozise karşı umut verici bir etkinlik gösterdiğini söyleyen ve serbest radikallerin patolojik anjiyogenezde önemli bir rol oynadığını belirten Chaudhury ve arkadaşları (2013) fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada CNP'lerin endometriumda oluşan lezyonları hafiflettiğini, oksidatif stresi azalttığını ve patolojik anjiyogenezini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca başarılı ve sağlıklı bir gebelik için kritik olan endometriozise bağlı oositleri olumsuz etkilere karşı koruduğunu gözlemlemişlerdir.

CNP'lerin hücreleri koruduğu, serbest radikal oluşumunu önlediği, oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etkilere sahip olduğunu ileri süren çalışmalar (Nelson ve diğ, 2016; Xue ve diğ, 2011; Ju-Nam ve Lead, 2008; Chen ve diğ, 2006) bulunmasına rağmen farklı koşullar altında oksidatif strese neden olduğunu ileri süren Park ve arkadaşları (2008) insan bronşiyal epitel hücreleri üzerinde farklı boyutlara sahip (15, 25, 30, 45 nm) CNP'lerin sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Hücre kültürü ortamında yapmış oldukları bu çalışmada CNP'lerin 5, 10, 20 ve 40 µg/ml miktarlarına maruziyet sonucu hücre ölümü,

serbest radikal artışı ve GSH düşüşüne neden olmuştur. Ayrıca oksidatif stresle ilgili genlerin indüklenmesine yol açtığı, bu da CNP'lerin sitotoksiste meydana getirdiğini gösteren bir sonuçtur.

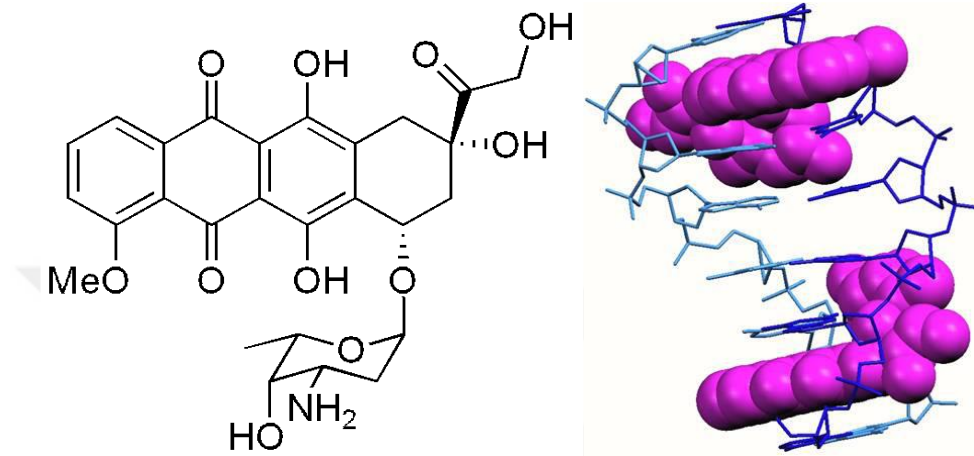
Bir diğer çalışmada Lin ve arkadaşları (2006) insan akciğer hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada 20 nm boyuttaki CNP'lerin farklı dozlarına maruz kalması sonucu hücre canlılığının CNP'lere maruziyet süresince doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı, maruziyet sonucu ROS oluşumunu tetiklediği göstermiş ve elde edilen bulgulara göre CNP'lerin hücrelerde oksidatif stresi artırdığı kanaatine varılmıştır. Rosenkranz ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada biri nano boyutta diğeri mikro ölçekli 2 farklı CeO<sub>2</sub> ile yaptıkları çalışmada mikro ölçekli CeO<sub>2</sub>'ye maruziyette bir farklılık tespit edilmezken nano boyuttaki CeO<sub>2</sub>'ye maruz kaldıktan sonra konsantrasyon ve parçacık boyutuna bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma gözlenmiştir. Yine ortam pH'sının nasıl bir etki yapacağını araştıran Gao ve arkadaşları (2014) CNP'lerin pH nötr iken antioksidan özellik gösterirken pH asit özellikte sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Auffen ve arkadaşları (2009) 7 nm boyuttaki CNP'lerinin insan deri hücreleri üzerinde yapmış oldukları sitotoksiste ve genotoksiste deneylerinde CNP'lerin düşük dozda bile kromozom ve DNA hasarları meydana getirdiği, bunun nedeninin oksidatif strese bağlı olarak yüzey atomlarının bir kısmının indirgenmesinden dolayı meydana gelmiş olabileceğini belirtmişlerdir.

CNP'lerin yararlı veya zararlı mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı bilgilere ihtiyaç vardır ve bu nedenle CNP'lerin çevresel dağılımlarını kontrol etmek ve sınırlı tutmak daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Özellikle CNP'lerin dizel yakıtta katkı maddesi olarak kullanılırken partikül filtresi ile birlikte kullanılması otomobil egzozlarından çıkan zararlı etkilerini %90'a kadar azaltabilir, ancak bir kısmı havaya yayılacağından hava kirliliğine, solunum yolu ile dokularda birikime ve toprakta birikime neden olabilir. Ayrıca CNP'ler düzenli depolama alanlarına dahil edilebilir ve atık su akışlarından verimli bir şekilde uzaklaştırılmaz ise çevre için olumsuz sonuçlar doğurabilir. Bu yan etkilerini azaltmak için hedefler ve moleküler mekanizmalar ile etkileşim dahil olmak üzere toksisitelerinin daha iyi anlaşılması gereklidir (Park ve diğ, 2008).

### **1.3 Doksorubisin**

Kanser tedavisinde en çok tercih edilen ilaçların başında antrasiklin türevi bir ilaç olan ve Adriamisin adı ile de bilinen doksorubisin (DOX) gelir. DOX, *Streptomyces peucetius*

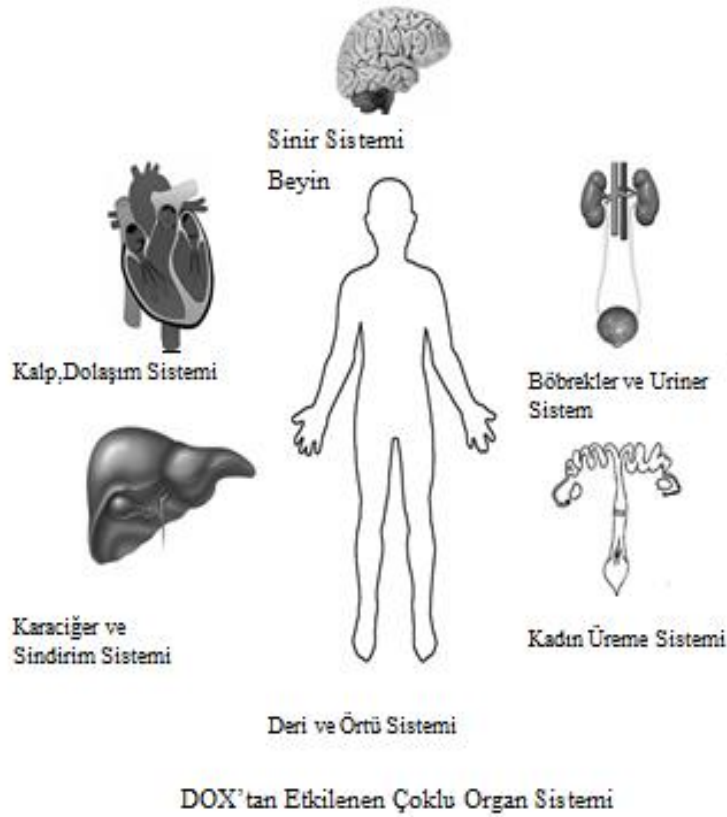
*variete caesiu* kültüründen elde edilmiştir (Baker ve diğ, 1997). DOX molekülü, amino şekerden ve bir tetrasiklik çekirdekten oluşur (Şekil 1.4). Tetrasiklik yapıdaki çekirdek DOX'un kırmızı renkli olmasına neden olur. Antrasiklin grubundaki üyelerinin tümünde tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (Molinari ve diğ, 1990). Benzer bir molekül olan daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubuna glikozidik bağ ile bağlanmasıyla DOX oluşur.



**Şekil 1.4:** DOX'un kimyasal yapısı ve uzaysal düzlemde görünümü (Molinari ve diğ, 1990).

1960'larda kullanılmaya başlanan bu ilacın yan etkileri tedavide kullanımını sınırlandırsada, günümüzde akut lösemi ve lenfoma benzeri kanserler, kemik iliği kanseri, deri ve iç organları çevreleyen dokularda meydana gelen kanser tipleri gibi çeşitli kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. DOX'un yan etkilerinin fazla olması ilacın kullanımını kısıtlayan en önemli faktörlerdendir. Uzun süreli DOX kullanımına bağlı olarak gelişen toksik etkilerin detaylı mekanizmaları henüz tamamen anlaşılammış olmakla birlikte birçok görüş ileri sürülmüştür (Ferrans, 1983). Bu görüşlerden bazıları, DOX'un nükleik asitler üzerinde etki ederek protein sentezinde bir baskılama meydana getirdiği, kan damarlarını genişletici enzim salınımı, mitokondri ve lizozomlarda meydana gelen değişiklikler, hücre zarı  $Ca^{+}$  geçirgenliğinde değişiklik, hücre içi Na-K geçirgenliğinde değişiklik, kalp kası elektrolit dengesinde değişiklik, radikal oluşumu artırma, kalp kası hücrelerinde antioksidan enzim düzeyinde azalma, LPO'da artış ve apoptozis sayılabilir (Takemura, 2007). Yukarıdaki bilgilerden anlaşılacağı üzere kardiyotoksisite ile ilgili birçok sebep ileri sürülmekte ve bu görüşlerin ortak yönü ise radikal oluşumuna bağlı olarak gelişen LPO ve oksidatif stres olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise kalp kası hücrelerindeki (miyositler) antioksidan kapasitesinin serbest radikallerden korunmak için yetersiz olmasıdır (Menna, 2008).

DOX tedavisi uygulanan bazı hastalarda sıklıkla çolu organ/doku toksisitesi yanıtları oluştuğu da bilinmektedir. En fazla görülen toksik etki kalp, sinir sistemi, böbrekler ve bağırsaklarda ortaya çıkmaktadır. (Cottin ve diğ, 1994; Pugazhendhi ve diğ, 2018) (şekil 1.5). Kardiyotoksik etkiler serbest oksijen radikallerinin tetiklediği bir dizi reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır. DOX hücrede serbest oksijen radikal üretimi, lipid peroksidasyonu, hücre içi kalsiyum düzeylerindeki değişiklik, sitokin aktivitesinin ortaya çıkması ve nükleik asit yapısına girerek hidrojen bağlarını koparması ile çeşitli toksik etkilere yol açmaktadır. Bu olumsuz etkiler sonucu kalp kası hücrelerinde hasarlar meydana gelmektedir.



**şekil 1.5:** Dolksorubisine bağlı olarak toksik etkinin en fazla görüldüğu doku ve organlar

DOX, hücrelerdeki etkilerini farklı şekillerde gerçekleştirmektedir; Bunlar; DNA'ya bağlanma, DNA ve RNA polimeraz inhibisyonu, hücre zarı üzerine etkileri ve serbest radikal oluşturmadır.

### **1.3.1 Dokсорubisinin hücrelere etki mekanizması**

#### **1.3.1.1 DNA'ya bağlanma**

DOX'un hücre içerisinde en yoğun bulunduğu yer nükleusdur. DOX, hücre çekirdeğinde DNA'nın yapısında bulunan guanin-sitozin bazları arasına girerek DNA'ya bağlanır. DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu ve sentezini inhibe eder. DNA'da zincir kırılmalarında neden olur (Bielack ve diğ, 1989).

#### **1.3.1.2 DNA ve RNA polimeraz inhibisyonu**

DOX, DNA ve RNA polimeraz enzimlerin fonksiyonlarını bozmak suretiyle DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu engeller. Kemik iliği, saç folikülü ve kanser hücreleri gibi hızla çoğalan hücreler, topoizomeraz II-transkripsiyon inhibitörü olan bu ilaca karşı en hassas olan hücrelerdir. Yani, DNA'ya bağlanan DOX, kovalent bir enzim-DNA ara kompleksini oluşturur ve böylece DNA kırıklarının yeniden birleşmesini önler (Bielack ve diğ, 1989).

#### **1.3.1.3 Hücre zarı üzerine etkileri**

DOX, hem hücre zarı ile hem de plazma proteinleriyle ilişki kurabilir. DOX, hücre zarı ile doğrudan etkileşerek sitotoksik etkiler gösterebilir. Kalp dokusu hücrelerinde lipid sentezini bozarak hücre zarı yapısında ve fonksiyonunda değişikliklere neden olması sonucu hücre zarı sinyal iletimini ve hücre içi iyonların dengesini bozduğu bildirilmiştir (Molinari ve diğ, 1990).

#### **1.3.1.4 Serbest radikal oluşturma**

DOX etkinliğinin önemli bir bölümünden NADPH sitokrom p-450 ve NADH dehidrogenaz enzimleri vasıtası ile meydana gelen semiquinin serbest radikali sorumlu tutulmaktadır. Semiquinin oksijenle reaksiyona girerek süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve nitrik oksit ile kompleks yapılar oluşturur. Lipid peroksidasyonu (LPO) ve hücre zarı hasarlarından da bu mekanizma sorumlu tutulmaktadır. DOX' bağlı kardiotoksisitede lipid peroksidasyon ürünlerinin artmış olması ve serbest oksijen radikali oluşumunda görev alan, süperoksit dismutaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin yüksek düzeylerde bulunması bu görüşü kanıtlayan ipuçlarını oluşturmaktadır (Myers ve diğ, 1977). Ayrıca DOX'un kalp kası hücrelerindeki antioksidan enzim kapasitesini negatif yönde

etkilemesi serbest radikallerin artmasına neden olmakta, bu da oksidatif stresi artırmaktadır (Menna, 2008).

Günümüzde DOX'un yan etkileri önlemek veya azaltmak için çeşitli doz modifikasyonları yapılması, ilaç uygulama şemalarının değiştirilmesi, kalbi koruyacak ilaçların aynı anda uygulanması önerilmektedir. Daha az toksik antrasiklin türevlerinin geliştirilmesine rağmen antrasiklinlerin yan etkileri halen bir sorun olmaya devam etmekte ve kemoterapinin kısıtlanmasına neden olmaktadır.

#### **1.4 Serbest Radikaller**

Biyolojik sistemlerde bulunan ve dış orbitallerinde bir veya birden fazla sayıda eşlenmemiş elektron bulunduran ömürleri kısa olan ve elektron alıcı moleküller olarak bilinen moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır (Valko ve diğ, 2006). Serbest radikallerdeki eşlenmemiş elektronlar radikallerin farklı moleküllerle reaksiyona girme isteğini artırarak kararlı bileşikler oluşturmasını hızlandırır. Ancak  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mo^{5+}$  ve  $Mn^{2+}$  gibi dış yörüngelerinde eşlenmemiş birer elektron taşıyan geçiş metalleri serbest radikaller olarak kabul edilmezler ancak serbest radikallerin oluşumunda önemli rol oynarlar. Metabolizmadaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Serbest radikaller arasında en çok bilinenleri, süperoksit radikali ve hidroksil radikalidir (Niki, 1987).

Serbest radikallerin oluşumundaki yaygın mekanizmalar arasında homolitik bağ ayrılması ve bir elektron molekülünün diğer bir elektron molekülüne geçmesidir. Oksijen molekülünün normal metabolizma sonucu indirgenmesi ile de serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Bunların dışında organik maddelerin çürümesi, endüstride plastik maddelerin işlenmesi, boyaların kuruması ve kısmi oksijen redüksiyonu ile de serbest radikaller oluşabilir. Klinik uygulamalarda kullanılan bazı kanser ilaçlarında radikal oluşumunu artırdığı gözlenmiştir (Thomas, 1995). Ayrıca, toksinler, hava kirliliği ve çevre kirleticiler ile radyasyona maruz kalma sonucu hücrelerde radikallerin çoğaldığı görülmüştür (Sencer ve diğ, 2005). Serbest radikal oluşumunu etkileyen diğer faktörler arasında enflamasyon, yaşlanma, ısı, ağır egzersiz, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $PO_2$ ) ve travma gibi durumlar sayılabilir (Sies, 1991).

Serbest radikaller hücre ortamında başlıca metabolik işlevler sırasında üretilirler. Mitokondride gerçekleşen elektron transport zinciri sonrasında serbest radikal oluşumunun artmasına bağlı olarak hücrede denge bozulur. Bozulan denge ile birlikte hücrede üretimi

artan serbest radikaller en çok hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımı olarak bilinen lipid peroksidasyonuna (LPO) yol açmakta bu da hücre zarının geçirgenliğine etki ederek hücreyi risk altına sokmaktadır. LPO sonucu hücrede geri dönüşümsüz hasar meydana gelir. Alkoksil radikallerinin  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$  formlarının varlığında LPO kırılır. Antioksidanlar LPO oluşumunu engeller. Malondialdehit (MDA), LPO sonucu oluşan en önemli üründür. MDA hücre zarlarındaki iyon dengesini etkileyerek hücre zarının yapısındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olur ve enzim aktivitesinin bozulması ile iyon geçirgenliği gibi olumsuz sonuçlar meydana getirir. Bu özelliklerinden dolayı MDA mutajeniktir (Vengerovski, 1996).

Her ne kadar organizmada oksidatif strese neden olan serbest radikaller meydana geliyor olsa da bunların etkilerini ortadan kaldırmak için sitoplazmada, mitokondride ve hücre dışı sıvılarda bulunan antioksidan enzimlerden olan glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler ile antioksidanlar olarak bilinen transferrin, seruloplazmin, glutatyon (GSH), askorbik asit ve alfatokoferol gibi antioksidanlar tarafından gerçekleştirilen bir savunma sistemi ile yıkıma uğratılırlar (Valko ve diğ, 2007). Bu nedenle serbest radikal oluşumu ile antioksidanlar arasındaki dengenin sağlanması çok önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman organizmada oksidatif stres başlar.

## **1.5 Antioksidanlar**

Antioksidanlar, canlı metabolizmasının meydana getirdiği serbest radikallerin oluştuğu oksidatif stresi ortadan kaldırmada görevli en önemli savunma sistemleridir. Diğer bir deyişle serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek bu maddelerin meydana getirebileceği zararları önlemek ve toksik maddeleri ortamdan uzaklaştırmak üzere görev yapan savunma sistemleridir (Şener ve diğ, 2009). Hücre metabolizması sonucu meydana gelen ve toksik yan ürünler olarak bilinen serbest radikaller ile kolayca birleşebilen antioksidanlar hücrelerin zarar görmesini engellerler (Dündar ve diğ, 1999).

Antioksidanlar ya dışarıdan doğrudan hazır olarak alınırlar veya vücut tarafından doğal olarak üretilirler. Vücut tarafından üretilen antioksidanlar endojen, dışarıdan hazır olarak alınanlar ise eksojen antioksidanlar olarak adlandırılır (Shinde ve diğ, 2012). Antioksidanların detaylı sınıflandırılması aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 1.1).



**Çizelge 1.1:** Antioksidanların sınıflandırılması (Aydemir ve diğ, 2009; Sen ve diğ, 2011)

<b>ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR</b>		
<b>ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR</b>	<b>NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR</b>	
Süperoksit dismutaz(SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz(CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz(GPx)	Ürik asit	$\alpha$ -lipoik asit
Glutasyon redüktaz(GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albumin	Seruloplazmin

<b>EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR</b>	
<b>VİTAMİN ANTİOKSİDANLAR</b>	<b>İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR</b>
$\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
$\beta$ -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Sitokinler (TNF ve IL-1)
	Barbitüratlar
	Demir şelatörleri

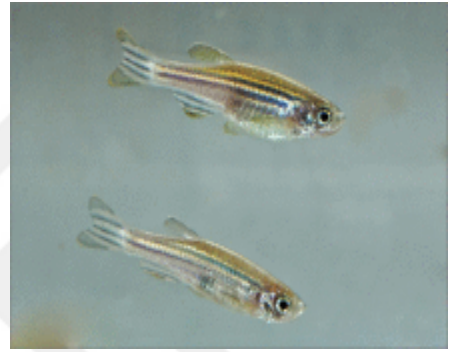
Canlı sistemlerde sürekli olarak metabolik olaylar sonucu madde alışverişi devam ettiğinden kimyasal tepkimeler sonucu oksidasyon meydana gelmekte ve dışarıdan alınan veya organizma tarafından oluşturulan serbest oksijen radikalleride bu oksidasyon olaylarını hızlandırmaktadır. Bu olaylar sonucunda meydana gelen serbest radikallerin organizmada birikmesi sonucu hücrelerde hasarlar meydana gelmekte ve bu hasarlar sağlık açısından önemli sorunlar oluşturabilmektedir. Çünkü serbest radikallerin vücutta artması yaşlanma, kas hastalıkları kanser, diyabet, kalp hastalıkları, solunum ve boşaltım sisteminde bozukluklar gibi birçok rahatsızlığa yol açabilir. Vücutta biriken serbest radikaller ile doğrudan ilişkili olan bu tür hastalıkların önlenmesi için oksidan maddelerin antioksidan maddeler ile bir denge içinde olması gerekmektedir. Dengeli ve düzenli beslenme ile yeterli miktarda

antioksidan alımı, serbest radikallerin olumsuz etkilerinden bizi koruyabilir. Tüm bu açıklamalara bakığımızda oksidan kaynaklı hastalıklardan korunmak, bu hastalıkların görülme riskini azaltmak, daha kaliteli ve uzun yaşamak için antioksidanlar önemli bir savunma mekanizması olarak tavsiye edilebilir (Shinde ve diğ, 2012).

## 1.6 Çalışmada Kullanılan Test Organizması, *Danio rerio*

**Çizelge 1.2:** Zebrabalığının (*D. rerio*) sistematikteki yeri

Kategori	Takson	Otör
Regnum	Animalia	
Subregnum	Bilateria	
İnfraregnum	Deuterostomia	
Filum	Chordata	
Subfilum	Vertebrate	
İfracilum	Gnathostomata	
Superklasis	Actinopterygii	
Klasis	Teleostei	
Takım	Cypriniformes	
Familya	Cyprinidae	
Genus	<i>Danio</i>	Hamilton, 1822
Spesiyes	<i>Danio rerio</i>	Hamilton, 1822



\*: Belirtilen internet sitesinden alınmıştır (Son erişim: 10 Ekim 2021)

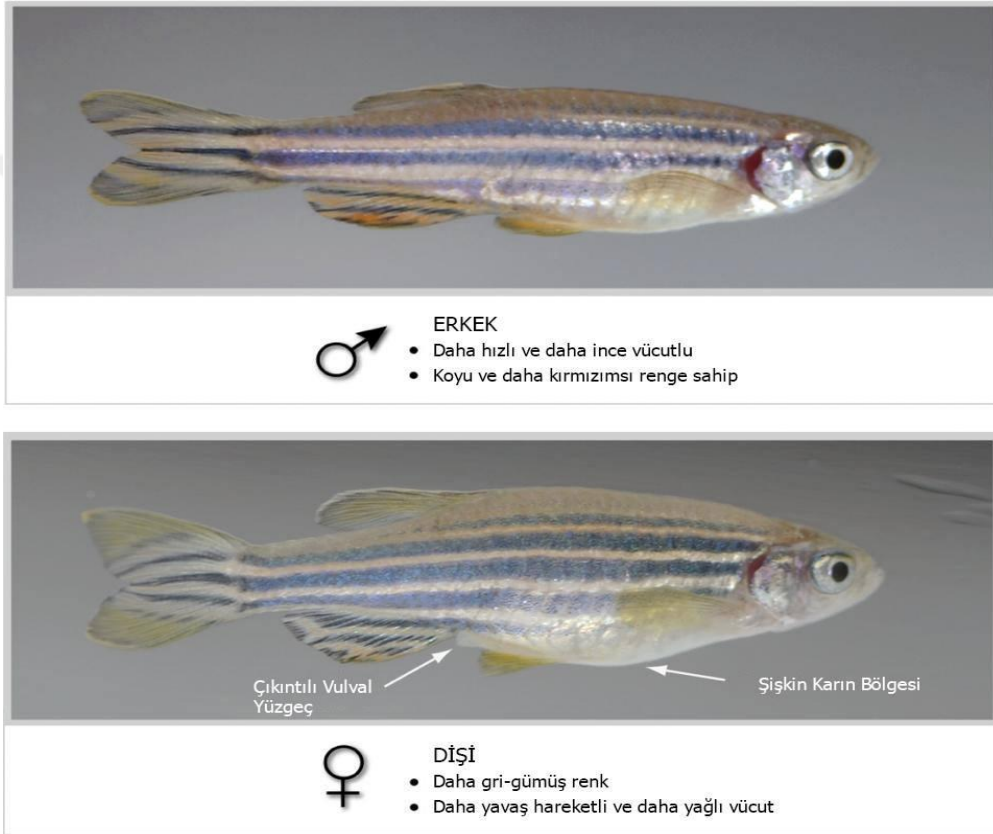
[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=163699](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163699)

### 1.6.1 Zebrabalığının genel özellikleri

Zebrabalıkları, bol yağış alan muson iklimine sahip bölgeler olan Nepal, Hindistan, Bangladeş, Pakistan ve Myanmar gibi Güney Asya ülkelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Lawrence, 2007). Yağışların bol olması, su kaynaklarındaki bolluğunu artırdığı gibi su rezervlerinin kimyasında da değişikliklere neden olabileceğinden zebrabalıklarının yaşayacakları bölgeleri tercih etmesinde önemli bir etkendir. Zebrabalıkları böyle iklime sahip bölgelerde rahatlıkla göç edebilmekte, göllerde, nehirlerde ve pirinç tarlalarında yaşamaktadırlar (Menon, 1999; Bhat, 2003). Zebrabalıklarının yaşam alanlarının bilinmesi bunlar için yapay olarak oluşturulacak laboratuvar ortamlarının oluşturulmasını da kolaylaştırmıştır.

Bu canlılara zebrabalığı denmesinin nedeni üzerlerinde zebra çizgilerine benzeyen ve kuyruk yüzgecinin sonuna kadar uzayan 5-9 adet mavi renkli çizgilere sahip olmalarıdır.

Dişilerde boy uzunlukları 5 cm'ye kadar ulaşabilirken erkekler dişilere göre daha küçük vücut büyüklüğü gösterirler. Erkekler düz bir karına sahip iken dişilerde karın bölgesi daha şişkindir. Yetişkin erkeklerde dişi bireylere göre daha büyük anal yüzgeç vardır. Dişilerde genital papilla daha belirgindir. Erkek bireylerde mavi çizgiler arasında altın sarısı renginde çizgiler bulunurken, dişi bireylerde gümüş grisi çizgiler daha yaygın bulunur (Şekil 1.5). Dişi ve erkek bireyler arasında ki bu farklılıklar deneysel çalışmalarda eşey ayırımlarını yapmak bakımından kolaylık sağlar. Ancak yetişkin olmayan bireylerde erkek ve dişi ayırımı zordur. (Spence ve diğ, 2007; Westerfield, 2007).



**Şekil 1.6:** Dişi ve erkek zebra balıkları (ELLS, 2013)

Zebrabalıkları ortalama 2-3 yıl kadar yaşarlar ancak iyi optimize edilmiş ortamlarda yaşam süreleri 5 yıla kadar uzayabilmektedir. Zebrabalıkları için en iyi sıcaklık 24-28°C'dir, ideal pH aralığı ise 6.5-7.5'tir. 3-4 aylık olan zebra balıkları üreme davranışı göstermeye başlarlar. Dişiler birkaç gün ara ile her çiftleşmede yüzlerce yumurta bırakabilir. Yumurtaların sayısı ve niteliğini besin bolluğu, kalitesi ve ortam koşulları etkilemektedir. Döllenen yumurtalarda embriyonik gelişim hemen başlar. Embriyolar suyun sıcaklığına ve kimyasına bağlı olarak, 2-5 gün aralığında yumurtadan çıkarlar (Spence ve diğ, 2006).

Zebrabalıkları omnivordur. Doğal yaşam alanlarında en çok canlı yiyecekleri tercih ederler. Bu yiyeceklerin en başında ise *Artemia* ve bazı rotiferler (*Brachionus* sp.) bulunmakla birlikte fitoplanktonlar, zooplanktonlar, böcekler, böcek larvaları, küçük kabuklular ve kurtçuklar da tercih ettikleri besinler arasındadır (Smith ve diğ, 2007).

### **1.6.2 Zebrabalığının deneysel çalışmalarda kullanılmasının sebepleri**

Dayanıklı bir tür olmaları, laboratuarda kolay beslenmesi ve üretilmesi, dış döllenme ile üremesi, gelişme zamanının kısa olması, embriyolarının ve larvaların şeffaf olması, yumurta ve larva gelişimlerinin kolaylıkla gözlenebilmesi, genetik yapısının diğer omurgalı canlılara ve insan genetik yapısına benzer olması, metabolizma faaliyetlerinin ve embriyonik gelişim aşamalarının benzerlik göstermesi, embriyonik gelişimin mikroskop altında kolaylıkla gözlenebilir olması ve daha birçok özellik bu canlıların deneysel çalışmalarda model organizma olarak tercih edilmesi sebepleri arasında sayılabilir (Lawrence, 2007). Zebrabalıklarının embriyolarının toksik maddelere karşı aşırı duyarlı olması bu canlıları toksikoloji çalışmalarında sık kullanılan bir model organizma haline getirmiştir.

## **1.7 Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılacak Biyokimyasal belirteçler**

### **1.7.1 Glutatyon S-transferaz (GST)**

Glutatyon S-transferaz (GST) ksenobiyotiklerin vücuttan uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar. Ksenobiyotikler genellikle lipofilik olduğundan hücre zarından kolayca difüze olabilirler. Ksenobiyotiklerin vücuttan uzaklaştırılması ise iki aşamada meydana gelir. Faz I ve faz II reaksiyonları ile lipofilik özellikteki ksenobiyotikler daha hidrofilik özelliğe doğru bir takım değişikliğe uğrarlar. Genel olarak çoğu ksenobiyotik sadece faz I reaksiyonları ile tamamen vücuttan uzaklaştırılacak forma dönüşemez ve daha lipofilik olan ksenobiyotiklerin ileri reaksiyonlara uğratılması gerekir. Bu amaçla, Faz II detoksifikasyon enzimlerinden olan GST'ler endojen ve eksojen kaynaklı ksenobiyotiklerin glutatyon ile birleşimini sağlayarak vücuttan daha kolay uzaklaştırılabilmesini ve toksisitelerinin azaltılması bakımından maddelerin yeniden dönüşümünü katalize ederler (Halliwell, 2009; Mazzetti ve diğ, 2015).

GST'nin, hücreleri serbest radikallerden korumak, ksenobiyotikleri vücuttan uzaklaştırmak, hücre zarı dengesini sağlamak, hücre içi redoks dengesini korumak gibi görevlerinin yanısıra DNA'nın korunmasında, LPO sonucu oluşan ürünlere karşı savunmada ve oksidatif hasar oluşumunu önlemede önemli görevleri olduğu ileri sürülmektedir (Van der Oost ve diğ, 2003).

GST aktivitesinin özellikle karaciğerde daha yüksek olduğu biliniyor olsa da sucul canlılarda solungaç, bağırsak ve böbrek gibi organlarda da Faz II biyotransformasyonu gerçekleşebilir ve bu dokularda yüksek GST aktivitesi sergilerler. GST substratı olabilmesi için bir madde şu özelliklerde olmalıdır; GSH ile non enzimatik reaksiyona girebilmeli, lipofilik olmalı ve elektron alıcı ve verici olmalıdır. Balıklarda GST aktivitesi ölçümünde substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNP)'in konjugasyon reaksiyonu kullanılabilir (Van der Oost ve diğ, 2003).

### **1.7.2 Glutasyon redüktaz (GR)**

Glutasyon redüktaz (GR), NADPH varlığında yüksek molekül ağırlıklı glutasyon formunun (GSSG) düşük molekül ağırlıklı glutasyon formuna (GSH) dönüşümünü katalizler. Oksidatif stres ortamında GSH/GSSG dengesini sağlamada önemli rol oynar. GR, GSH'ın hücre içindeki düzeyi azalınca devreye girerek GSH'ın organizmada belirli bir düzeyde kalmasını sağlar (Van der Oost, 2003).

Bir flavoprotein olan Glutasyon redüktaz (GR), hücrede önemli bir enzimdir ve serbest radikallerin ve reaktiflerin temizlenmesinde görev alır. Glutasyon hücrede normal olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunur. Bununla birlikte, hücrenin oksidatif stres durumunda tepki olarak hızlı bir şekilde GSSG'ye oksitlenebilir. Buna rağmen GR, NADPH ile GSSG'yi GSH'ye indirger ve GSH / GSSG'nin hücre içi mol oranını %99'un üzerinde tutar. GSH'nin sayısız hücresel süreçteki kilit işlevi nedeniyle, GSH seviyeleri ve GSH / GSSG oranı, AIDS, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve alzheimer gibi sayısız hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Pastore ve diğ, 2003; Biot ve diğ, 2004).

GSH, serbest radikallerin detoksifikasyonunda iki şekilde rol alır. Bunlar; metabolizmadaki reaksiyonlar sonucu oluşan süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ), nitrojenoksit (NO) radikali gibi serbest radikaller ile etkileşime girerek veya GPx tarafından redüklenen peroksitlerde elektron alıcısı olarak gerçekleşmektedir. Bu sebeple GSH değerinde meydana gelen bir azalma ve GSSG değerlerinde bir artış meydana gelmesi oksidatif stres belirleyicisi olarak kabul edilir (Camera ve diğ, 2002).

### **1.7.3 Glutasyon peroksidaz (GPx)**

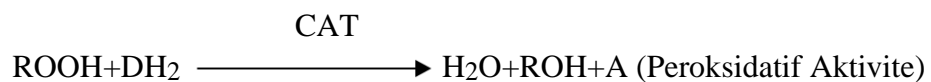
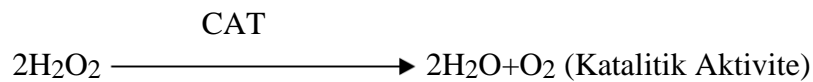
Glutasyon peroksidaz (GPx), mitokondride bazende sitozolde  $H_2O_2$ 'yi redükleyerek suya parçalayan en önemli antioksidan bir enzimdir. Dört selenyum atomu içeren GPx

sitozolda yoğunlaşmıştır. Kaslardaki aktivitesi düşüktür, en iyi aktiviteyi karaciğerde gösterir. Kalp, beyin ve akciğerde de önemli etkiler gösterir. GPx'in birincil görevi glutasyonu katalize etmesidir. Bu işlemin sonucunda yüksek miktarda hidrojen peroksite ihtiyaç vardır ve ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi kullanarak suya indirger ve böylece detoksifikasyon işlemi gerçekleştirilmiş olur. GPx' in aktivitesi çoğunlukla ortamdaki selenyum varlığına bağlıdır. Bu nedenle selenyuma bağlı ve bağlı olmayan GPx diye iki gruba ayrılabilir. GPx' in en önemli rolü hücreyi serbest radikallerden ve oksidatif stresten korumasıdır. GPx miktarının düşük olması antioksidan sistemin bozulmasına neden olur. İki substrat ile çalışan GPx enziminde GSH yükseltgenirken (GSSG) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise alkole kadar indirgenir. Hidrojen kaynağı GSH olduğundan dolayı GSH varlığı enzimin aktivitesini doğrudan ilgilendirmektedir (Terada, 2005).

#### 1.7.4 Katalaz (CAT)

Glikoprotein yapısında olan katalaz dört adet 'hem' grubuna sahip bir hemoproteindir. Katalazın asıl görevi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi parçalayarak su ve O<sub>2</sub> molekülüne kadar parçalamaktır. Bilindiği üzere biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi canlılar için zararlıdır ve hücrede bir serbest radikal olan OH<sup>-</sup> artırmaktadır. Bu nedenle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücreden uzaklaştırılması gereklidir ve bu görevde katalaz enzimi yerine getirmektedir. Katalaz aktivitesi daha çok karaciğer ve böbreklerde görülürken daha az olarak da aktivite destek dokularında görülmektedir (Prieto ve diğ, 1993).

Katalazın aktivitesi iki yönlüdür. Bunlar; katalitik aktivite ile peroksidatif aktivitedir. Katalitik reaksiyon sonucu moleküllerden biri H vericisi olarak davranırken, diğeri oksidant olarak davranmakta ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü sonuçta H<sub>2</sub>O ve O'ya parçalanırken peroksidatif aktivitede ise fenoller, aminler, etanol ve metanol gibi redüktant maddeler H verici olarak görev alırlar ve sonuçta H<sub>2</sub>O, OH<sup>-</sup> radikali ve bir diğ ürün ortaya çıkar. Katalitik aktivite peroksidatif aktivite göre daha hızlı gerçekleşir (Kelly ve diğ, 1998).



### 1.7.5 Karboksilesteraz (CaE)

Karboksilesteraz (CaE), birçok kimyasalın hidrolizinde yer alan bir faz I enzimi olarak sınıflandırılan, alkol bağlarının hidrolizini katalizleyen serin hidrolazlar sınıfında yer alan ve detoksifikasyonda önemli bir role sahip olan enzimdir. CaE, beyin, karaciğer, akciğer, kalp, kas dokusu, ince bağırsaklar, böbrekler, testisler, yağ dokusu, solunum organları, lökositler ve kan dahil olmak üzere birçok dokuda bulunur ancak, CaE ekspresyonu ve aktivitesi dokuya ve organizmaya bağlıdır ve seviyeler ve aktiviteler çok değişkendir (Wheelock ve diğ., 2008).

CaE aktivitesi omurgalı ve omurgasız türlerin birçoğunda vardır ve geniş substrat özelliğine sahiptir. CaE'ler özgül lipidlerin taşınmasında ve depolanmasında, ksenobiyotiklerin vücuttan uzaklaştırılmasında ve düzenleyici olarak özgül hormonların inaktivasyonunda görev almaktadır (Wheelock ve diğ., 2005).

CaE, piretroidler, organofosfatlar ve karbamatlar dahil olmak üzere birçok tarımsal kimyasalın detoksifikasyonunda rol oynar (Wheelock ve diğ., 2005). Nano boyutlu olmayan metal tuzlarının *X. laevis* iribaşlarında CaE aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Gungordu ve diğ., 2010; Yologlu ve Ozmen, 2015).

## 2. KAYNAK ÖZETİ

Balıklar sucul ekosistemler üzerine insan aktivitelerinin etkisini değerlendirmek amacıyla yaygın kullanılan bir omurgalıdır. Bununla birlikte, özellikle son yıllarda alternatif bir model organizma olarak da ön plana çıkmaktadır. Literatür incelendiğinde laboratuvar hayvanı olarak balıkların birçok ajanın etkisini test etmek amacıyla yaygın kullanılan modellerden biri olduğu, özellikle *D. rerio* modelinin öne çıktığı görülmektedir (Weltje ve diğ, 2013).

### 2.1 Seryum Oksit ile İlgili Çalışmalar

Canlılarda meydana gelen oksidatif stres sonucu oluşan bozukluklar için yeni tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu anlamda CNP'ler, antioksidan ve rejeneratif özellikleri sayesinde,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  seviyelerini azalttığını, aynı zamanda bazı çalışmalar OH olarak ROS oluşumunu engellediğini göstermiştir. CNP'lerin bu olağanüstü kapasitesi, bunların oksidatif stres ile ilgili hastalıklar ve bozukluklar için bir alternatif tedavi veya tedaviye yardımcı maddeler olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir (Nelson ve diğ, 2016).

CNP'lerin antioksidan özellikleri ile ilgili olarak özellikle kanser tedavisi başta olmak üzere farklı alanlarda, nörolojik ve kardiyovasküler gibi çeşitli hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılabilirliğine yönelik çalışmalara odaklanılmıştır (Estevez ve diğ, 2014). Colon ve arkadaşları (2010) CNP'lerinin radyasyondan koruma yeteneğini araştırmak için gastrointestinal epitelyum üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda CNP'lerin gastrointestinal epiteli serbest radikaller tarafından radyasyonun meydana getireceği zararlı etkilerden koruduğunu ve radyasyona maruz kalmadan önce  $SOD_2$  üretimini artırdığını göstermişlerdir.

Xue ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada CNP'lerin antioksidan aktivitesi olduğunu ileri sürmüş, özellikle CNP'lerin parçacık boyutu küçüldükçe daha iyi radikal süpürücü etki gösterdiğini belirtmişlerdir. CNP'lerin  $Ce^{+4}$  ve  $Ce^{+3}$  değerlilikleri arasında kolayca geçiş yapmaları bunların iyi bir ROS süpürücü olmalarını sağlayabilir. Özellikle nano boyuttaki CNP'lerin daha fazla  $Ce^{+3}$  değerlilikte olduğu bilindiğinden NP'lerin normal boyuta göre daha antioksidan olduğu söylenebilir.



Roberta ve arkadaşları (2021) sucul ortamda CNP'lerin toksik olup olmadığını araştırmak için 3 farklı CNP (6.8 nm, 11.3 nm, 50 nm) ile zebrabalığı embriyoları üzerinde 96 saatlik embriyo toksisite testi çalışmasıyla yapmış oldukları araştırmalarda CNP'lerin zebrabalığı üzerinde ölümcül etki yapmadığı, ölüm oranının %2'yi geçmediği, yumurtadan çıkma süresini etkilemediği, kalp atım hızını etkilemediğini ve herhangi bir malformasyona neden olmadığını rapor etmişlerdir.

Başka bir çalışmada CuO-CNP karışımına maruz kalma sırasında zebrabalığı embriyolarında büyüme geriliği ve bazı malformasyonlar meydana geldiği ve yine *Daphnia magna* üzerinde hareketsizlik meydana getirdiği ancak öldürücü olmayan etkiler gösterdiğini gözlemlenmiştir. Sonuçta bu maddelerin embriyoların ölümüne neden olmadığı, ancak yumurtadan çıktıktan sonra larvalar üzerindeki etkilerin bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bir süre sonra ortamdaki bu maddelerin giderilmesinden sonra bu olumsuz etkilerin birçoğunun da ortadan kalktığı görülmüştür (Jemec ve diğ., 2012).

Yapılan çalışmalar beyin dokusuna CNP'lerin kolayca taşınmadığını göstermektedir. Heckman ve arkadaşları (2013), CNP'lerin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için kullanımı üzerine çalışmalar yürütmüşler ve fareler üzerinde etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada Multiple Skleroz-(MS) hastalığının tedavisinde kullanılan fingolimod ile CNP'ler karşılaştırılmıştır. CNP'ler, hem önleyici tedavi olarak hem de hastalık sonrası terapötik tedavi amacıyla kullanılmıştır. Sonuç olarak CNP tedavilerinin hastalığın başlangıcını geciktirdiği ve özellikle CNP'lerin tedavi öncesi dozunun, aynı konsantrasyonda fingolimod ile karşılaştırılabilir etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca CNP'ler ile muamele edilen farelerin motor fonksiyonlarında, kontrol ve fingolimod ile tedavi edilenlere kıyasla daha fazla iyileşme ve ROS seviyelerinde yaklaşık %31'lik bir azalma gözlenmiştir.

CNP'lerin sağlık alanında kullanımı gittikçe artmaktadır. Culcasi ve arkadaşları (2012) radyasyona ve toksik maddelere maruz kalma sonucu meydana gelen nörolojik bozukluklar, görme problemleri, kardiyotoksisite gibi hastalıklara ve bu hastalıkların oluşturduğu hasarlara karşı CNP'lerin koruyucu etkiler gösterdiğini rapor etmiştir.

Das ve arkadaşları (2013) oküler hastalıkların tedavisi ile ilgili olarak, CNP'lerin birkaç farklı hayvan modelinde yapılmış çalışma sonucunda radikalleri temizleyerek ROS aktivitesinden kaynaklanan patolojik körlüğe doğru ilerlemeyi önlemede veya yavaşlatmada son derece etkili olduğunu göstermişlerdir.

CNP'lerin ayrıca hamile kalamayan kadınların %25-30' unda görülen endometriozise karşı umut verici bir etkinlik gösterdiğini ve serbest radikallerin patolojik anjiyogenezde önemli bir rol oynadığını belirten bir çalışmada farelerde CNP'lerin endometriumda oluşan lezyonları hafiflettiği, oksidatif stresi azalttığı ve patolojik anjiyogenezi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca başarılı ve sağlıklı bir gebelik için kritik olan endometriozise bağlı oositleri olumsuz etkilere karşı koruduğunu gözlemlenmiştir (Chaudhury ve diğ, 2013).

Nanocerallerin (5 nm CNP) hücre içinde ROS oluşumunu engellediği özelliğinden yola çıkarak retinadaki fotoreseptör hücrelerinin yüksek oksijen metabolizması nedeniyle sürekli olarak yüksek seviyelerde ROS üretiminin engellenmesini sağlamak amacıyla sıçan retinalarında çalışma yapan Chen ve arkadaşları (2008), CNP'lerin retinada oluşan ROS birikimini azalttığını ve hücre dejenerasyonundan kaynaklanan görme kaybını önlediğini göstermiştir. CNP'lerin kanser tedavisinde kanserli hücrelerde toksisite göstererek onları radyasyon tedavisine daha duyarlı hale getirdiği de bildirilmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada CNP etkisine maruz bırakılan Tekir balığında (*Catostomus commersoni*) kalp atım sayıları değişimi takip edilmiş, çalışma sonucunda CNP'lerin antioksidan etkilerinin gözlenmediği, serbest radikal oluşumuna neden olmadığı ve oksidatif stresin gerçekleşmediği bildirilmiştir (Rundle ve diğ, 2016).

CNP'lere maruz kalma sonucunda serbest radikal oluşumunun önlenmesi, hücreleri koruma, oksidatif stresi azaltarak radikal süpürücü olarak görev yapmak, antioksidan etkiler göstermesi ve sitotoksisiteyi azaltma gibi olumlu etkilerinin yanında farklı koşullar altında oksidatif strese neden olduğuda (Park ve diğ, 2008) bildirilmektedir. Park ve arkadaşları insan bronşiyal epitel hücreleri üzerinde farklı boyutlara sahip (15, 25, 30, 45 nm) CNP'lerin sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Hücre kültürü ortamında yapmış oldukları çalışmada CNP'lerin 5, 10, 20 ve 40 µg/ml miktarlarına maruziyet sonucu hücre ölümü, serbest radikal artışı, GSH seviyesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca oksidatif stresle ilgili genlerin indüklenmesine yol açtığı rapor edilmiş olup, bu durum CNP'lerin sitotoksik etkisine atfedilebilir.

Lin ve diğerleri (2006) insan akciğer hücrelerinde yapmış oldukları bir çalışmada 20 nm boyuttaki CNP'lerin farklı dozlarına maruz kalması sonucu hücre canlılığının CNP'lere maruziyet süresince doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı, maruziyet sonucu ROS oluşumunu tetiklediğini göstermişler ve elde edilen sonuçlara göre CNP'lerin hücrede oksidatif stresi artırdığını bildirmişlerdir.

Başka bir çalışma ile biri nano boyutta diğeri mikro ölçekli 2 farklı CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan sıçan karaciğer hücreleri ve gökkuşuğu alabalık gonodal hücrelerinde standart sitotoksikite testleri sonucunda mikro ölçekli CeO<sub>2</sub>'de bir farklılık meydana gelmezken nano boyuttaki CeO<sub>2</sub>'ye maruziyet sonrası konsantrasyon ve parçacık büyüklüğüne bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuca göre nanoparçacıkların mikroparçacıklara göre erken ve belirgin bir toksik cevaba neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca CNP'lerin toksik mi yoksa faydalı mı olacağı yönündeki etkisinin CNP'lerin bulunduğu hücre bölümlerinin pH değeri ile ilgili olduğunu ileri sürülmüştür (Rosenkranz ve diğ, 2012). Ortam pH'sının nasıl bir etki yapacağını araştıran başka bir çalışmada da Gao ve arkadaşları (2014), CNP'lerin nötral pH'da antioksidan özellik gösterirken asidik pH değerlerinde sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada, 7 nm boyuttaki CNP'lerinin insan deri hücrelerine sitotoksik ve genotoksik etkileri gösterilmiş olup, CNP'lerin düşük dozda bile kromozom ve DNA hasarları meydana getirdiği, bunun nedeninin oksidatif strese bağlı olarak yüzey atomlarının bir kısmının indirgenmesinden dolayı meydana gelmiş olabileceği belirtilmiştir (Auffen ve diğ, 2009).

Agar ortamında yetiştirilen bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* üzerinde CNP'nin etkilerini çalışan Yang ve arkadaşları (2017), düşük konsantrasyonlarda CNP'in bitkinin büyümesinde olumlu etkilerinin olmasına rağmen yüksek konsantrasyonda (2000-3000 mg/L) büyümeyi baskıladığı ve olumsuz etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte CNP toksisitesinin çözülmüş Ce iyonlarından çok NP'lerden kaynaklandığını göstermişlerdir.

CeO<sub>2</sub>'nin atık sularla birlikte doğaya karışarak buradan su kaynaklarında birikim gösterebileceği ve organizmalara zarar verebileceğini ileri süren Johnston ve diğerleri (2010) zebra balığı üzerinde yaptıkları çalışmada TiO<sub>2</sub>, ZnO, CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılması sonucunda 500 µg/L konsantrasyondaki CeO<sub>2</sub>'nin karaciğerde birikim yaptığını, ancak diğer konsantrasyonlar ve diğer dokularda (deri, beyin, solungaç) anlamlı bir birikim olmadığını bulmuşlardır.

Üç farklı boyuttaki (14, 20 ve 29 nm) CNP'nin toksisitesini incelemek için zebra balığı embriyolarında, su piresi ve *Thamnocephalus platyurus* kabuklusunda ve tek hücreli bir alg olan *Pseudokirchneriella subcapitata*'da çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar zebra balığında ve *T. Platyurus*'da toksik etkisinin olmadığını ancak parçacık boyutu azaldıkça tek hücreli algde toksisitenin belirgin bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir (Van Hoecke ve diğ, 2009).

Lee ve diğeri (2009), TiO<sub>2</sub>, ZnO ve CeO<sub>2</sub>'nin genotoksik etkisini araştırırken çalıştıkları iki tür üzerinde (*D.manga* ve *Cophilaxus riparius*) CNP'lerin DNA iplik kırılmalarına sebep olduğu yani genotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. NP boyutu küçüldükçe DNA kırıklarında arttığı görülmüştür.

## 2.2 DOX ile İlgili Çalışmalar

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre DOX, bir yandan serbest radikal oluşumunu artırırken diğeri yandan da antioksidan enzimlerin (GPx, CAT, SOD v.d) değerlerinde azalmaya nedem olarak kardiyotoksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir. Bu da DOX toksisitesine karşı antioksidan tedavi denemelerini akla getirmiştir (Singal ve diğ, 1997).

Yapılan bir çalışmada DOX'a bağlı kardiyotoksisite ve patolojik etkiler araştırılmış ve melatoninin DOX toksisitesine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve tavşanlar üç ayrı gruba ayrılmış, birinci gruba 15 gün boyunca toplamda 15 mg/kg olacak şekilde periton içine DOX uygulanmıştır. İkinci gruba 10 mg/kg/gün olacak şekilde periton içine melatonin uygulaması ile birlikte 15 mg/kg DOX uygulamasında yapılmış, üçüncü grup ise kontrol grubu olarak planlanmıştır. Kardiyotoksisiteye bağlı patolojik etkileri belirlemek için GPx, SOD, NO ve MDA düzeyleri ile serumdaki kardiyotoksisite tanısında kullanılan troponin I ve kreatinin kinaz (CK-MB) değerleri takip edilmiştir. Değerlendirmeye histolojik açıdanda bakılmış olup kalp kaslarında ki hücrelerde meydana gelen değişikliklerde incelenmiştir. Yanlızca DOX'a maruz kalan birinci grupta kalp kası hücrelerinde hasarlar oluştuğu, GPx'in azaldığı, MDA ve NO değerlerinde artış meydana geldiği rapor edilmiştir. DOX ile beraber melatonin uygulanan ikinci grupta melatoninin kalp kası hücrelerindeki hasarı önlediği, GPx ve SOD değerlerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca troponin I ve CK-MB değerlerinin birinci grupta yükseldiği ancak DOX ile birlikte melatonin uygulanan ikinci grupta değişmediği tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalar göstermiştir ki, DOX'a maruziyet sonucu kardiyotoksisite gelişmekte, bunun nedeninin ise antioksidan enzimlerde meydana gelen azalma ile birlikte artan serbest radikaller ve LPO sonrası meydana gelen metabolitlerin artmasına bağlı olarak geliştiği ifade edilmekte ve melatoninin, oluşan bu kardiyotoksisiteyi önleyebildiği gösterilmiştir (Demir ve diğ, 2004).

Chang ve arkadaşları (2014) DOX'un gelişimsel toksik etkilerini araştırmak üzere DOX'un etkilerinin hızlı ve kolay bir şekilde gözleyebilmek için zebra balığı embriyoları ve larvaları üzerinde embriyotoksik ve teratojenik etkiler de dahil olmak üzere çalışmalar

yapmışlardır. Çalışmada zebrabalığı embriyoları döllenmeden 4 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) DOX' a maruz bırakılmış ve 120 saat boyunca gözlenmiştir. Yüksek DOX konsantrasyonlarının akut ölümcül etkilere neden olurken, düşük DOX konsantrasyonlarının ise çoklu malformasyonlara yol açtığı rapor edilmiştir. Ayrıca, DOX konsantrasyonunun artmasıyla malformasyon oranının arttığı ve malformasyonların daha erken gelişim döneminde görülmeye başladığı bildirilmiştir. Malformasyon oranı ve ölüm yüzdesi 10 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda keskin bir şekilde artarken 100 mg/L tedavi grubunda %100 olarak tespit edilmiştir. Embriyoların kalp atım hızının düşük DOX konsantrasyonlarında ( $\leq 10$  mg/L) artarken, yüksek konsantrasyonlarda ( $\leq 25$  mg/L) ise yavaşladığı bulunmuştur. 10 mg/L'ye kadar olan tedavi gruplarında taşikardi ve 25 mg/L ve daha büyük tedavi gruplarında bradikardi rapor edilmiştir. Zebra balığı vücut uzunluğu 72 hpf'de ölçülerek kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 1 mg L ve daha düşük konsantrasyonların tedavisinde vücut uzunluğu bakımından önemli bir fark oluşturmadığı, 10 mg/L ve daha yüksek DOX konsantrasyonlarına maruziyetin ise embriyolarda vücut uzunluğunu azalttığı saptanmıştır.

Seryum oksit ile DOX'un birlikte kullanıldığında balık embriyolarında nasıl bir etki yapacağını belirlemek için yapılmış olan bir çalışmada düşük konsantrasyonlarda saf CNP'ler ile saf DOX'un zebrabalığı embriyolarının gelişimi üzerinde önemli bir etki göstermediği ancak ikisinin birlikte kullanımında embriyo malformasyonların kontrol grubuna kıyasla önemli bir artışa yol açtığı gözlenmiştir (Krysanow ve diğ, 2012). Çalışmada; 10 ila 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  arasındaki konsantrasyonlarda saf DOX'un perikard ödemine, bradikardiye ve diğer morfolojik anormalliklere neden olduğu, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'den daha yüksek konsantrasyonda, ise zebra balığı embriyoları üzerinde akut toksik etki yaparak tümünün öldüğü ve bu nedenle sonraki yapılacak olan çalışmalarda önemli teratojenik etkilere neden olmayan 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik DOX konsantrasyonu kullanılmıştır. Kullanılan tüm konsantrasyonlarda CNP'ler veya saf DOX, anormal gelişim gösteren embriyo yüzdesinde kontrole göre artışa yol açmazken, 0.001, 0.01, 0.1 ve 1 mg/L konsantrasyonlarda ki CNP'lerin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX ile karışımında, bu tür embriyoların yüzdesi saf DOX'den önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. CNP'lerin ve DOX'un birlikte meydana getirdiği bu etkinin mekanizmalarından birinin NP'lerin yüksek oranda adsorbe edilmesi nedeniyle oluşabileceği rapor edilmiştir (Zhang ve diğ, 2007).

Bazı NP türleri için, organik ve inorganik maddelerin hidrobiyont cisimlere nüfuz etmesini destekleyebilecekleri yapılan bir araştırma ile gösterilmiştir. Örneğin,  $\text{TiO}_2$  NP'lerin varlığının sazan balığı dokularında arsenik ve kadmiyum birikimini arttırdığı ve

fullerenlerinde Daphnia'da organik kirleticilerin biyolojik birikimini arttırdığı gözlenmiştir (Baun ve diğ, 2008). Buna bağlı olarak araştırmacılar CNP, parçacıkların yüzeyindeki emilimi yoluyla balık embriyolarında DOX birikimi teşvik edebileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle düşük konsantrasyonlarda saf CNP'ler ve saf DOX'un, zebra balığı embriyolarının gelişimi üzerinde önemli bir etkiye neden olmadığı, bununla birlikte embriyo malformasyonlarının insidansında önemli bir artışa yol açabileceği iddia edilmiştir. Bu etkinin olası mekanizması için DOX moleküllerinin CNP'ler üzerinde absorpsiyonu ve nanoparçacıklar ile DOX'un sinerjistik etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Krysanow ve diğ, 2012).

Sangomla ve arkadaşları (2018) DOX kaynaklı kardiyotoksisitede CNP'nin olası koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladığı çalışmada DOX kaynaklı kardiyotoksisite modeli kullanmıştır. Bu amaçla Swiss albino fareler i.p. yolla DOX uygulamasına maruz bırakılmış ve kardiyotoksisite indüklenmiştir. Tek başına DOX ile yapılan çalışmada 7 ve 14 gün sonra önemli kardiyotoksisite belirteçlerinden olan CK-MB ve LDH seviyelerinde 3 kattan fazla artışa neden olduğu, DOX ile birlikte CNP uygulan grupta ise CK-MB ve LDH seviyelerinde önemli bir azalış gözleendiği rapor edilmiştir. DOX'un kalp hücrelerinde hücrel ROS seviyelerinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Sadece DOX ile 7 ve 14 günlük tedaviden sonra normal kontrol kalp dokularına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ( $p < 0.01$ ) MDA seviyeleri bulunmuştur. CNP ile tedavi sonrası DOX kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA seviyeleri önemli seviyelerde azalış göstermiştir. Hücrel hasarı önleyebilen endojen bir antioksidan olan GSH ve Katalaz sadece DOX uygulan gruplarda normal değerinden altında iken CNP ile birlikte uygulanan gruplarda önemli bir artışa neden olmuştur. Çalışmada CNP'lerin tek başına toksik bir etkisinin olmadığı buna karşın DOX'un kardiyotoksik potansiyelini azalttığı, yükselen CK-MB, LDH ve MDA seviyelerini azalttığı, endojen antioksidanlardan olan GSH ve Katalaz seviyelerini artırdığı, kalbin histolojik yapısında meydana gelen değişiklikleri önlediği için DOX kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı CNP'lerin koruyucu etkilerini gösterdiği iddia edilmiştir.

CNP'lerin klasik bir kanser tedavi yöntemi olan kemoterapiyi destekleyip desteklemediğini ve böylece normal hücrelere zarar vermeden ilacın etkinliğini artırıp artırmadığını inceleyen bir araştırmada insan melanom hücrelerinde DOX uygulaması yapılırken CNP'ler ile birlikte kullanımı sırasında tümör hücrelerinde sitotoksisite, ROS üretimi ve oksidatif hasar üzerinde sinerjik etkiler gözlenmiştir (Sack ve diğ, 2014). Araştırmacılar CNP'lerin DOX'un anti-tümör aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Ayrıca CNP'lerin DNA hasarına neden olmadığı gibi DOX'un insan dermal fibroblastlarında neden

olduğu sitotoksisteden de koruduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, CNP ve DOX insan melanom hücrelerinin (A375) ve insan dermal fibroblastlarının (HDF) canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. DOX A375 hücrelerinde çok düşük konsantrasyonda ve kısa inkübasyon sürelerinden sonra güçlü sitotoksik etkiler göstermiş 0.5 µM DOX ile 24 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla %40-50'ye düşmüştür. DOX sitotoksitesinin, inkübasyon süresi ile arttığı, 0.5 µM maruziyetten 72 saat sonra tüm hücrelerin öldüğü rapor edilmiştir. 150-300 µM CNP'ye maruz kalan hücrelerde %50-55 canlılık saptanmıştır. Bu çalışmada özellikle tümör hücrelerinde CNP ve DOX'un sitotoksiste üzerinde sinerjik bir etkisinin olup olmadığı konusu ele alınmış ve bu nedenle, A375 melanom hücreleri, tek başına veya kombinasyon halinde 48 saat süreyle 300 µM CNP veya 24 saat süreyle 0.5 µM DOX ile inkübe edilmiştir. Melanom hücrelerinin 48 saat boyunca 300 µM CNP ile maruz kalmasının kontrole kıyasla hücre canlılığını %88'e düşürdüğü bulunmuştur. CNP ve DOX'un birlikte inkübasyondan sonra hücre canlılığı %20'ye düşmüştür. Halbu ki tek başına Doksorubisin ile inkübasyondan sonra hücre canlılığı %40-50 idi. Sonuçların CNP ve DOX maruziyetinin melanom hücrelerinde sitotoksiste üzerinde sinerjik bir etkisi olduğu yönünde yorumlanmıştır (Sack ve diğ, 2014).

Kanser tedavisinde DOX kullanımının en önemli yan etkilerinden biri olan kardiyotoksik etki sonucu kardiyomiyositler zarar görür. Tedavi sırasında meydana gelen bu hasarlara karşı geliştirilen koruyucu yöntemlerden biri de kardiyoprotektif ajanlardır. Bilindiği kadarıyla klinikte bu alanda kullanılan tek önlem Dexrazoxane'dir. Dexrazoxane, Topoizomeraz II'yi inhibe ederek veya serbest radikal üretimini bloke ederek DOX'un sitotoksitesini inhibe eder. Ancak, Dexrazoxane, DOX'un anti-kanser aktivitesini azaltabildiğinden dolayı kullanımı sınırlandırılmıştır (Carvalho ve ark, 2013). Sonuç olarak, DOX ile meydana gelen bu hasarlara karşı yeni koruyucu ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Jayachandra ve arkadaşları (2019) yapmış oldukları çalışmada Isosteviol'ün zebrabalığı embriyolarında DOX ile indüklenen kardiyotoksisteye karşı potansiyel bir koruyucu etki gösterdiğini, zebrabalığı kalbinde meydana gelen morfolojik bozulmaları ve buna bağlı kardiyak bozuklukları önlediğini bildirmişlerdir. Çalışmada test edilen DOX'un %50 öldürücü konsantrasyonu (LC<sub>50</sub>) 51.56 µM'dır. ISV-1 ile muameleden sonra LC<sub>50</sub> değerinin önemli ölçüde artarak 92.61 µM'a çıktığı bildirilmektedir. DOX'a maruz bırakıldıktan sonra ortaya çıkan kardiyotoksik yan etkilerin ISV-1 ile maruziyetten sonra normale döndüğü, kalp hızındaki artışın azaldığı, boy kısalığının normale döndüğü, perikardiyal ödemlerin azaldığı da bildirilmektedir.

DOX'un toksisitesinin azaltmanın bir diğer yolu da ilacın manyetik nanoparçacıklar (MNP) ile kanserli hücreye direk olarak nüfuz etmesi ve çevre dokulara daha az temas ederek etkisinin daha az olmasını sağlamaktır. Bu amaçla yapılan bir araştırmada kanser hücrelerinin ilaç alımını daha etkin hale getirebilecek özelliğe sahip olan folik asit (FA) ile MNP'leri modifiye etmişler ve bu taşıyıcıya DOX'uda ilave ederek hedeflenen dokuya iletimini gözlemlenmişlerdir. Bu amaçla bir model organizma olarak zebrafalığı embriyo ve larvaları kullanılarak DOX ve MNP@FA@DOX'nun invivo toksisitesini ve biyouyumluluğunu incelemeyi amaçlamışlardır. Ölüm oranı, gelişimsel toksisite, spontan hareketlilik (nörotoksisite), kalp ritmindeki değişiklikler (kardiyotoksisite) ve DOX alımının etkinliği incelenmiştir. 50 µg/mL DOX ile 48 saatlik tedavi %30 larva ölümü ve önemli morfolojik anormalliklerin gelişimi ile sonuçlanırken, MNP@FA@DOX kombinasyonunun kardiyotoksisiteyi azalttığı ve DOX'un zebrafalığı larvaları tarafından daha hızlı bir şekilde alımını gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Igartua ve diğ, 2018).

Yukarıdaki çalışmaya benzer bir çalışmayı da Calienni ve arkadaşları (2018) DOX'un yine taşıyıcı bir sistem kullanmak, karışık polimer miseller ile kapsüllenerek hedef dokuya gönderilmesi amaçlanmış ve bu amaçla zebrafalığı kullanılmış ve sonuçta aynı şekilde serbest DOX ile kapsüllenmiş DOX arasında bariz fark olduğu gözlenmiştir. Serbest DOX ve DOX yüklü nanoformülasyonların klinik öncesi zebrafalığı modeli üzerindeki ana toksik yan etkilerinin değerlendirilmesi sonucunda DOX'un karışık misellerle kapsüllenmesinin ölümcül etkiyi, morfolojik değişiklikleri ve ilacın nörotoksik etkilerini azalttığı gözlenmiştir. Karışık misel formülasyonun DOX ile ilişkili toksisitesi, serbest DOX'a kıyasla önemli bir azalma göstermiştir (Calienni ve diğ, 2018).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edilen firma bilgileri aşağıda verilmiştir.

Doksorubisin, Sigma-Aldrich Cat No: BD32885, CAS : 25316-40-9

Cerium (IV) oxide, (Bulk), Sigma-Aldrich Pcode: 1006010003

Cerium(IV) oxide, Nanopovder <50 nm, Sigma-Aldrich Pcode: 1002946686

Cerium(IV) oxide, Nanopovder <25 nm, Sigma-Aldrich Pcode: 1002894964

Cerium(IV) oxide, Nanopovder <5 nm, Sigma-Aldrich Pcode: 1002806898

#### 3.2 Test Organizmalarının Sağlanması

Kimyasal maddelerin toksisitesini belirlemek için zebrabalığı (*D. rerio*) embriyoları kullanıldı. Testte kullanılan embriyolar laboratuvarımızda, zebrabalığı sisteminde (ZebTec Active Blue, Tecniplast, İtalya) koloniye dönüştürülen ve üretimi yapılan yabancı tip zebra balıklarından (Singapur kökenli) sağlandı. Balıklar 14:10 h gündüz-gece fotoperiyodu döngüsünde, pH 7.25±0.15, iletkenlik 540±20 µS/cm ve 28.0±0.2 °C'de yaşatılmaktadır. Ergin 4-8 aylık balıklar günde iki kez artemia ve sprulina karışımından (%50:%50) oluşan yem ile (Bio-Marine Aquafauna, ABD) beslendi. Embriyo eldesi için, balık kolonisinden alınan ergin balıklar, yumurtlama sisteminde (iSpawn, Tecniplast, İtalya) bir araya getirildi ve gece boyunca karanlıkta tutuldu. Laboratuvar ortamının fotoperiyoda bağlı olarak saat 05:00 aydınlatılması ile bırakılan döllenmiş yumurtalar en geç 3 saat sonra toplandı. Normal gelişen embriyolar mikroskop altında seçildi. Embriyolar, Westerfield (2007) tarafından tarif edildiği gibi yumurtlamadan 6-8 saat sonraya (hpf) kadar petri kaplarında, metilen mavisi içermeyen standart embriyo ortamında (E2: 15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.7 mM NaHCO<sub>3</sub> ve 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2) ve 28.5±0.1°C'de inkübatörde tutuldu. Deneyin başlangıcında tüm embriyoların 6-8 hpf'de normal şekilde geliştikleri belirlendi. Zebrabalığı embriyonik toksisite testleri, revers-ozmos suyuna

60 mg/L deniz tuzu eklenerek iletkenliği 450-650  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'e yükseltilmiş “balık suyu” kullanılarak hazırlanan test çözeltileri ( $\text{CeO}_2$  NPler; DOX; karışımlar) kullanılarak yapıldı. Toksikite testi standart test protokollerine göre gerçekleştirildi (Nagel,2002; OECD, 2013). Kontrol gruplarında solüsyon olarak E2 embriyo suyu kullanıldı. Çalışmanın başlangıcında NP konsantrasyonlarının pH'ları 7.2-7.4 aralığına ayarlandı.

### **3.3. ZebraBalığı Embriyo Toksikite Testi**

Toksikite testlerinde 96 çukurlu mikrolakalar kullanıldı. Kontrol gruplarında 40 diğer her bir konsantrasyon için 24 çukur ve her çukurda 1 embriyo olacak şekilde test düzeneği düzenlendi. Yetişkin zebra balıklarından elde edilen embriyolar mikroskop altında seçildi. Yapılan ön çalışmaları sonuçlarına göre belirlemiş olduğumuz konsantrasyonlarda taze olarak hazırladığımız DOX,  $\text{CeO}_2$  ve DOX- $\text{CeO}_2$  karışımı çözeltileri mikrolakalardaki her bir çukura 250  $\mu\text{l}$  olacak şekilde dolduruldu ve her bir çukura 1 adet zebra balığı embriyosu yerleştirildi. Deney düzeneği 28°C'lik etüvde 120 saat boyunca hergün aynı saate 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde mikroskop altında kontrol edilerek ölüm ve malformasyonlar kaydedildi. Ayrıca 48.saate mikroskop ile embriyolarda kalp atımı sayımı yapıldı. 120 saatin sonunda ise her bir bireyin mikroskop altında fotoğrafı çekildi ve daha sonra toplam vücut uzunlukları kaydedildi. Bu amaçla Euromex NexiusZoom 1000x mikroskop CMEX-10PRO kamera sistemi ve bu sistem ile uyumlu ImageFocusAlfa yazılımı kullanıldı. 120 saat boyunca mikroskop altında gözlenen zebra balığı embriyolarındaki gelişimsel süreç ve bozukluklar (embriyonun koryondan çıkma süresi, hareketlilik, yolk sack ödem ve perikardiyal ödem, kuyruk eğriliği, omurga eğriliği) tespit edilerek kaydedildi. Ayrıca 48 hpf bireylerde kalp atım sayısı ve 120 hpf bireylerde total vücut uzunlukları da kaydedildi.

### **3.4 Toksikite Testlerinin Uygulanması**

#### **3.4.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin $\text{LC}_{50}$ değerlerinin ve uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi**

Çalışmada kullanılacak olan kimyasal maddeler için  $\text{LC}_{50}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla ön çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda  $\text{CeO}_2$  nin ölümcül etkisi gözlenmediği için  $\text{LC}_{50}$  değeri tespit edilemedi. DOX için zebra balığı embriyoları üzerinde doz çalışmaları yapıldı. İlk denemelerden elde edilen bilgiler ışığında DOX için  $\text{LC}_{50}$  değerini saptamak amacıyla 40-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında çalışma yapılmış olup Probit analizi

(probit v3.3 programı, EPA 2013) sonucuna göre DOX için 120 saatlik LC<sub>50</sub> değeri; 74 µM olarak hesaplandı. Ön çalışmalar sonucu elde edilen bulgular ışığında doz oranı belirlenerek diğer çalışmalar yapıldı.

### 3.5 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzim ölçümünde, DOX ve CeO<sub>2</sub>'nin biyokimsal etkilerini ölçmek amaçlı bir enzim deneyi düzeneği kuruldu. Kontrol grubu ile birlikte 9 farklı grup yapıldı. Seryum grubundan ise CNP-25 ile CeO<sub>2</sub>-B çalışma için seçildi. Ön çalışmalara dayalı olarak belirlediğimiz konsantrasyonlardaki kimyasallar (Sadece DOX için 7.4 µM ve 37 µM, sadece CeO<sub>2</sub>-B ve CNP-25 için 100mg/L, karışım için 7.4 µM DOX + 100 mg/L CeO<sub>2</sub>-B, 7.4 µM DOX + CNP-25, 37 µM DOX + 100 mg/L CeO<sub>2</sub>-B, 37 µM DOX + CNP-25) standart embriyo suyu ile çözelti haline getirildi. Her bir petri kutusuna 20ml çözelti (10µl DOX + 10µl CeO<sub>2</sub>) eklendi ve bir kaptaki 23'er birey olacak şekilde ve her bir madde için 7 ayrı kaptaki toplam 161 birey, olacak şekilde deney çalışması yapıldı. Maddeler önce saf olarak sonra da karışım halinde çalışıldı. Kontrol grubu içinde standart embriyo suyu (E2) kullanılarak çalışma aynı şekilde yapıldı. Deney, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde kontrol edildi, ölen bireyler diğer bireyleri etkilemesin diye deney ortamından uzaklaştırıldı. 120 saatin sonunda her bir petri kutusundaki sağ kalan bireyler (birey sayısı hiçbir deney kabında 20'nin altına düşmediğinden mikrosantrifüj tüpüne toplanırken ölçüm sırasında eşitlik olsun diye 20 tane olacak şekilde toplanmıştır) ayrı ayrı tüplerde toplanarak -80°C'de derin dondurucuda ölçümlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi. Enzimlerin ölçümlerinin yapılacağı zaman, balıklar derin dondurucudan çıkarılarak buz üzerinde balıkların homojenizasyonu ve sonrasında santrifüj yapıldı. Örnekler bekletilmeden ölçümlerin yapılabilmesi için mikropilaka okuyucu sistem kullanıldı (Versamax, Molecular Devices Corp, USA). Enzimlerin ölçümü sırasında her bir örnek için okuma üç kez tekrarlandı. Ölçülen üç değer arasındaki fark %10 ve üzerinde olduğunda okuma işlemi tekrarlandı. Bütün enzimlerin değerleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite cinsinden ifade edildi (nmol/dk/mg protein).

#### 3.5.1 Balıkların homojenizasyonu ve santrifüj işlemleri

Enzim aktivitesi ölçümleri için gerekli ön hazırlıklar yapıldı. Balıkların homojenizasyonu için, derin dondurucudaki saklama tüpleri içerisinde bulunan bireyler alınarak çözünmesi sağlandı. Homojenizasyon işlemi için taze olarak hazırladığımız tampondan (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde: 0.15 M KCl; 1 mM EDTA; 0.05

mM 1,4-Dithiothreitol) 300 µl alınarak içerisinde her bir mikrosantifüj tüpünde 20 adet birey bulunan mikrosantifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler buz kabı içerisinde mikrosantifüj tüpleri ile uyumlu bir el homojenizatörü vasıtası 40sn süre ile parçalandı. Homojenizasyon işleminden sonra mikrosantifüj tüplerindeki homojenatlar 4°C'de 16.000 xg devirde 20 dakika santrifüj edildi (Sigma 2-16k). İşlem sonrası süpernatant kısım alınarak temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Çalışma boyunca örneklerin değerlerinde bozulma meydana gelmemesi için buz kabı içerisinde bekletilerek çalışma yapıldı.

### **3.5.2 Glutasyon S-transferaz aktivitesi (GST)**

GST aktivitesi ölçümünde mikrolaka okuyucu sistemi kullanıldı. Bu çalışmada Habig ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanıldı. substrat olarak %96'lık etanolde hazırlanan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Bu çalışmaya göre 10 µl süpernatant alınarak mikrolaka kuyucuklarına yerleştirildi. Sonra sırası ile bu kuyucuklara hazırlanan fosfat tamponundan 100 µl (0.1 M, pH 6.5), 100 µl GSH karışımı (2 µM GSH) ve 10 µl CDNB (20 µM) eklenerek karışım mikrolaka okuyucu sisteme yerleştirildi. 15 sn süre ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 344 nm dalga boyunda 2 dakika süreyle absorbans okuması yapıldı.

### **3.5.3 Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR)**

GR aktivitesinin belirlenmesinde Stephensen ve diğerleri (2000) tarafından belirlenen yöntem kullanıldı. Ölçüm yapılacak karışımı hazırlamak için 20 µl örneğimizin üzerine 20 µl NADPH (1.2 µM) ve 150 µl DTNB (Nitrobenzoik asit, 0.1 µM) eklendi. Karışımın üzerine 20 µl GSSG'de eklenerek reaksiyon başlatıldı. Ölçümler 25°C'de 405 nm dalga boyunda 3 dakika süre ile yapıldı, ölçümler kaydedildi. Hazırlanan bütün çözeltilerde pH 7.4 e ayarlandı.

### **3.5.4 Glutasyon peroksidaz aktivitesi (GPx)**

GPx aktivitesinin belirlenmesinde Bell ve diğerlerinin (1985) geliştirdiği spektrofotometrik yöntemin mikrolaka okuyucu sisteme uyarlanmış şekli kullanıldı. GPx enzimin belirlenmesinde substrat olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz inhibitörü olarak ise sodyum azid (NaN<sub>3</sub>) kullanıldı. İlk olarak hazırladığımız süpernatanttan 10 µl mikrolaka kuyucuklarına ekledik ve yine daha önce hazırladığımız pH 7.4 olan fosfat tamponundan (1 µM GSH, 0.1 µM NADPH, 0.32 ünite GSH-redüktaz, 1 µM EDTA, 2 mM NaN<sub>3</sub> içeren 50 µM) 160 µl ekledikten sonra bu karışımı 20°C'de 6 dakika süre ile inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.67 µM) eklendi ve reaksiyon başlatıldı. Ölçümler oda

sıcaklığında 340 nm dalga boyunda 3 dakika süre ile gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerleri kaydedilerek GPx aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

### **3.5.5 Katalaz aktivitesi (CAT)**

CAT aktivitesi belirlenmesinde Aebi (1974) tarafından belirtilen bir metod olan ve önerilen spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Burada substrat olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kullanılır. Enzim aktivitesini ölçmek amacı ile 1 ml'lik kuvartz küvete, hazırlanan örnekten 20  $\mu$ l, ve pH 7.0 olarak hazırladığımız potasyum fosfat tamponundan (12.5  $\mu$ M  $H_2O_2$  içeren 50  $\mu$ M) 480  $\mu$ l küvete eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika süreyle 240 nm'de ölçülen absorbans değerleri kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

### **3.5.6 Karboksilesteraz aktivitesi (CaE)**

Karboksilesteraz aktivitesi ölçümü için Santhoshkumar ve Shivanandappa (1999) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemin mikropleyt okuyucu sisteme uyarlanması ile oluşturulan yöntem kullanıldı. CaE enzim aktivitesinin ölçümünde substrat olarak *p*-nitrofenolasetat (PNPA) kullanıldı. Bu yöntemde göre mikropleyt okuyucularına hazırlanan örneklerden 5  $\mu$ l eklendikten sonra ortama pH 7.4 olan trizma solüsyonundan (0.05 M) 250  $\mu$ l eklendi. Karışım 3 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulduktan sonra üzerine 5  $\mu$ l PNPA (karışımdaki konsantrasyonu 0.5  $\mu$ M olacak şekilde) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Karışım 2 dakika süre ile 405 nm'de absorbans değeri ölçümü yapıldı.

### **3.6 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar:**

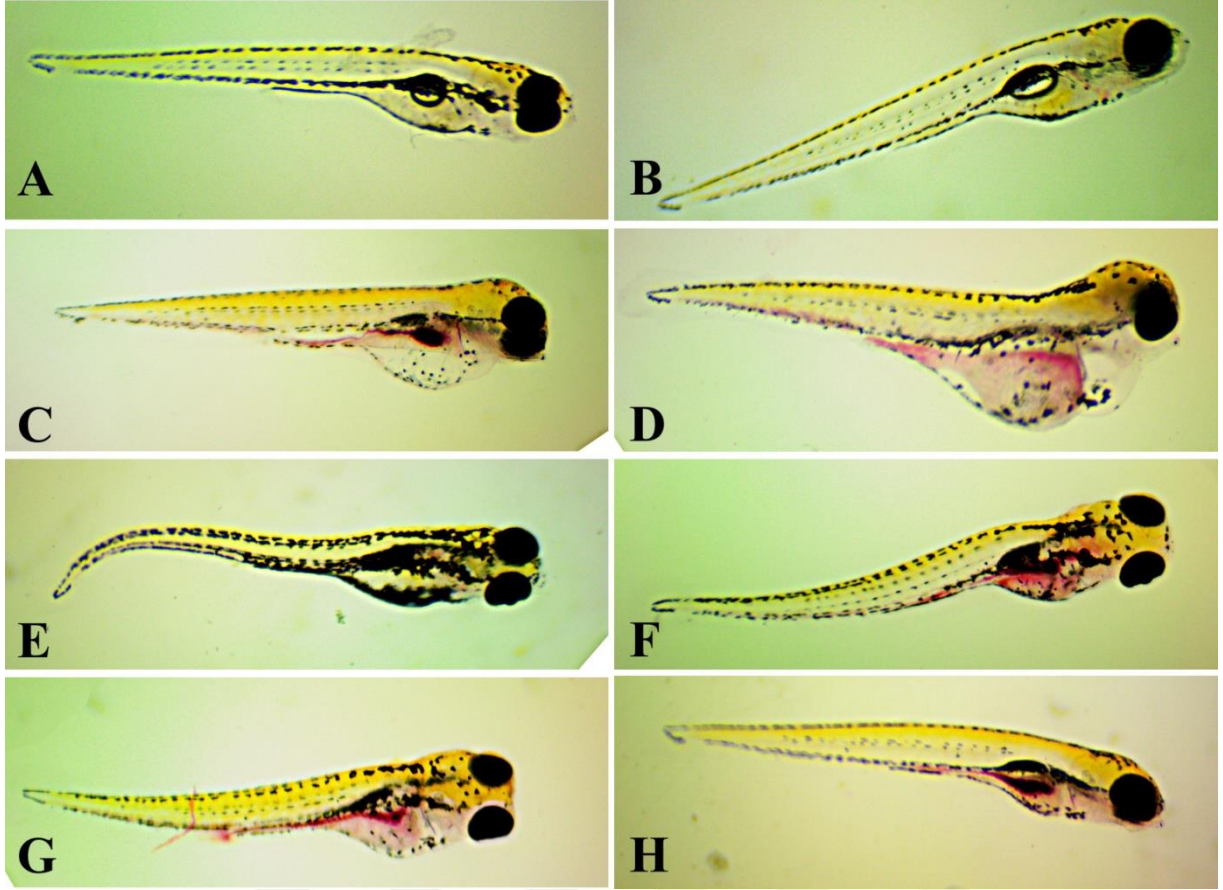
Elde edilen bulguların istatistiksel analizi için GraphPad Prism 5 programı (USA) kullanıldı. Biyobelirteçlerin istatistiksel analizi için, veriler başlangıçta sırasıyla Bartlett ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile varyansların homojenliği ve normallik dağılımları açısından test edildi. Parametrik olmayan veriler Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi ve ardından Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Parametrik veriler, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 DOX Toksisitesi ile İlgili Bulgular

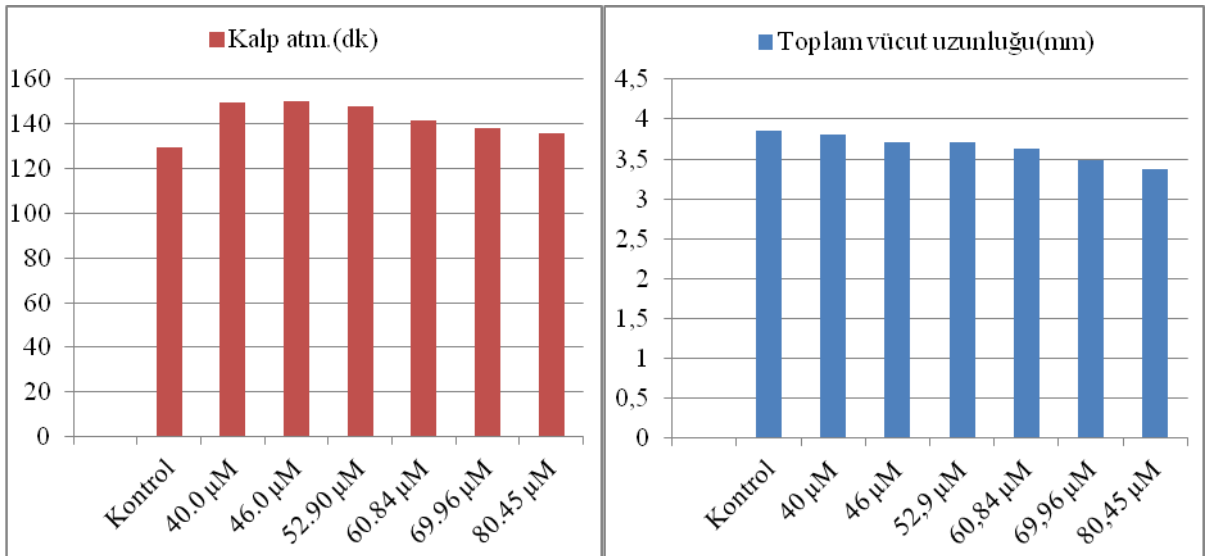
DOX toksisitesini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda yapılan ön çalışmalar sonucunda DOX'a maruz kalan embriyolar üzerinde toksisitenin görülmeye başladığı değer  $>40 \mu\text{M}$  olarak belirlendi. Embriyo ölümleri  $>50 \mu\text{M}$  konsantrasyonda başladı ve  $>90 \mu\text{M}$  konsantrasyonda ise %100 olarak tespit edildi. Embriyonik gelişimsel anomaliler de  $\geq 40 \mu\text{M}$  konsantrasyonda görülmeye başlanmış olup konsantrasyon oranı arttıkça malformasyonların şiddeti ve sayısı artarken, meydana gelme sürelerinin kısaldığı görüldü. Malformasyonların en belirgin olanı perikarkiyal ödem olmakla beraber omurga eğriliği, bükülmüş kuyruk, pigment eksikliği, gelişme geriliği yaygın olarak görülenlerdir (Şekil 4.1). Zebrabalığı gelişiminde 120 hpf için hesaplanan  $LC_{50}$  değeri  $74 \mu\text{M}$  olarak tespit edildi. Bu nedenle sonraki çalışmalar 40-106.40  $\mu\text{M}$  arasındaki konsantrasyonlara maruz kalan embriyolar ile yürütüldü.

Önceki çalışma verilerine dayanarak DOX'un ölümcül ve malformasyona bağlı bir etkisinin gözlenmediği en yüksek konsantrasyon olan  $40 \mu\text{M}$  den başlayarak ( $40 - 46 - 52.90 - 60.84 - 69.96 - 80.45 - 92.52 - 106.40 \mu\text{M}$ ) 8 farklı konsantrasyon belirlendi. 120 saat süre ile DOX'a maruz bırakılan embriyolarda  $40 \mu\text{M} - 60,84 \mu\text{M}$  arasında önemli oranda bir ölüm meydana gelmezken  $80.45 \mu\text{M}$  konsantrasyonda ölüm oranı %70.8,  $>92.52 \mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonda ise %100 olarak tespit edildi. Ayrıca embriyoların gelişim sürecinde 120 hpf embriyolarda toplam vücut uzunlukları  $46-80.45 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir azalış gösterdi ( $p<0.05-0.001$ ). Ayrıca toplam vücut uzunluklarında saptanan azalma konsantrasyon artışı ile paralellik gösterdi. En düşük boy uzunluğu  $80.45 \mu\text{M}$  konsantrasyonda  $3.37 \text{ mm}$  olarak belirlendi ( $p<0.001$ ). Diğer yandan, embriyonal gelişim sürecinde 48 hpf embriyolarda kalp atım sayılarına baktığımızda  $40-50 \mu\text{M}$  arası maruziyet konsantrasyonlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir artış belirlendi ( $p<0.05-0.001$ ). En yüksek kalp atım sayısı  $46 \mu\text{M}$  konsantrasyonda  $150 \text{ atım/dk}$  olarak belirlendi ( $p<0.001$ ).  $46 \mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlarda ise konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak kalp atım hızının azaldığı tespit edildi ( $p<0.05-0.001$ )(Çizelge 4.1).



A - B: Kontrol grubu zebrabalığı, C : Kardiyak ödem, D : Yolk salk ödem, E : Kuyruk eğriliği, F : Omurga eğriliği, G : Gelişme geriliği, H : Pigment eksikliği

**Şekil 4.1:** 72 hpf embriyoda DOX maruziyetine bağlı olarak gözlenen malformasyonlar



**Şekil 4.2:** DOX'a maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları (Çizelge 4.1'de verilen verilerden hazırlanmıştır)

**Çizelge 4.1:**120 saat süre ile 40-106.4  $\mu\text{M}$  DOX'a maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları

Uygulama	Konsantrasyon ( $\mu\text{M}$ )	Canlı birey	Ölü birey	Kalp atım sayıları (60 sn'de) <sup>a</sup>	T. Vücut Uzunluğu (mm) <sup>b</sup>
Kontrol	Kontrol	40	0	129.2 $\pm$ 4.02	3.85 $\pm$ 0.08
DOX	40	24	0	149.4 $\pm$ 3.35 ***	3.81 $\pm$ 0.06
	46	24	0	150.0 $\pm$ 3.75 ***	3.71 $\pm$ 0.08 ***
	52.90	23	1	147.8 $\pm$ 4.53 ***	3.71 $\pm$ 0.11 **
	60.84	22	2	141.7 $\pm$ 4.27 **	3.63 $\pm$ 0.10 ***
	69.96	17	7	138.3 $\pm$ 5.50 *	3.49 $\pm$ 0.11 ***
	80.45	7	17	135.7 $\pm$ 5.13	3.37 $\pm$ 0.05 ***
	92.52	-	24	- -	- -
	106.40	-	24	- -	- -

Kontrol grubunda 40 birey, diğer uygulama gruplarından her biri için 24 birey kullanıldı.

<sup>a</sup>Kalp atımları 48. saatte sayılmış olup, değerler ortama $\pm$ standart sapma cinsinden ifade edildi.

<sup>b</sup>Toplam vücut uzunlukları 120. saatte ölçülmüş olup, değerler ortama $\pm$ standart sapma cinsinden ifade edildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  düzeyinde önemliliğini göstermektedir.

## 4.2 Seryum Oksit Toksikitesi İle İlgili Bulgular

Gelişimsel etkilerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan ön çalışmalarda test edilen her bir  $\text{CeO}_2$  (5 nm, 25 nm, 50 nm ve bulk) için 5-100 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda zebra balığı embriyonik gelişimini etkilemediği saptandı. Test edilen maddeler ile kontrol grubu bireyleri karşılaştırıldığında, embriyoların hayatta kalma oranında önemli bir farklılık saptanmadı.  $\text{CeO}_2$  maruziyetinin embriyoların koriyon kesesinden çıkma süresini etkilemediği ve 48 saat sonunda tüm embriyoların koryondan çıkarak serbest yüzmeye başladıkları tespit edildi. Ön çalışmalara bağlı olarak daha sonraki çalışmalarda 0.78-50 mg/L arasında belirlenen CNP konsantrasyonları ile çalışmalar sürdürüldü. Çalışmada  $\text{CeO}_2$ 'ye maruz bırakılan *D. rerio* embriyolarında toplam ölüm sayıları, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunluğu ölçümü değerlendirmeleri yapıldı.

CNP-5 ile yapılan çalışmalarda tüm konsantrasyonlar için 120 hpf sonuna kadar embriyolarda ölüm oranı %4'ü geçmediğinden önemli bir letal etki gözlenmedi ve tüm embriyolar normal gelişim süreci sergiledi. CNP-5 etkisine maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 0.78 mg/L konsantrasyon uygulanan embriyo grubu bakımından istatistiksel açıdan önemli düzeyde azalma saptandı ( $p < 0.05$ ). Diğer yandan, 0.78-12.5 mg/L konsantrasyon aralığındaki uygulama gruplarında kalp atım sayılarında önemli bir artış belirlendi ( $p < 0.05-0.01$ ). En



yüksek kalp atım sayısı 6.25 mg/L CNP-5'e maruz bırakılan embriyolarda 149.3 atım/dk olarak saptandı ( $p<0.001$ )(Çizelge 4.2).

CNP-25 ile yapılan çalışmada 120 hpf sonuna kadar embriyolarda ölüm oranı en yüksek konsantrasyon olan 50 mg/L için % 8 olarak belirlenirken, diğer konsantrasyonlar için %4'ü geçmedi. Toplam vücut uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3.125 mg/L ve 25 mg/L için istatistiksel açıdan önemli düzeyde azaldığı tespit edildi ( $p<0.05-0.01$ ). Kalp atım sayıları yönünden kontrol grubu ile kıyaslandığında, 1.56 mg/L ile 6.25 mg/L arasındaki konsantrasyonlara maruz kalan embriyolar için önemli düzeyde arttığı saptandı ( $p<0.001$ ). En yüksek kalp atım sayısı 3.125 mg/L CNP-25'e maruz bırakılan embriyolarda 147 atım/dk olarak belirlendi ( $p<0.001$ ), (Çizelge 4.2)

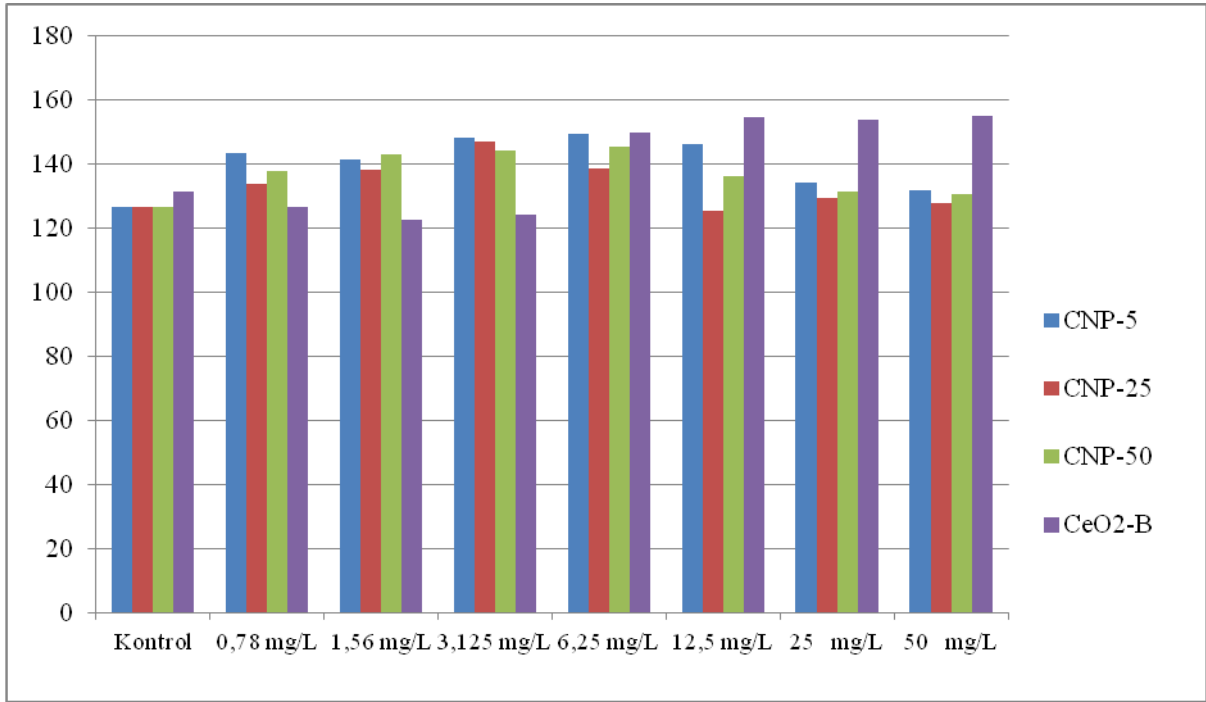
CNP-50 ile yapılan çalışmada embriyolarda ölüm oranı en yüksek konsantrasyon olan 50 mg/L için %16 olarak belirlenirken diğer konsantrasyonlar için %4'ü geçmedi. Toplam vücut uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6.25 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyon uygulanan gruplar için istatistiksel açıdan önemli düzeyde azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). Kalp atım sayıları bakımından kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, 0.78 mg/L ile 12.5 mg/L arasındaki konsantrasyonlara maruz kalan embriyolar için önemli düzeyde arttığı bulundu ( $p<0.01-0.001$ ). En yüksek kalp atım sayısı 6.25 mg/L CNP-50'ye maruz bırakılan embriyolarda 145.5 atım/dk olarak belirlendi ( $p<0.001$ ), (Çizelge 4.2).

CeO<sub>2</sub>-B ile yapılan çalışmalarda embriyolarda ölüm oranı en yüksek konsantrasyon olan 50 mg/L için %8 olarak belirlenirken diğer tüm konsantrasyonlarda %4'ü geçmedi. CeO<sub>2</sub>-B etkisine maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma olduğu saptandı ( $p<0.05-0.01$ ). Kalp atım sayıları yönünden değerlendirmede 1.56 mg/L ve 3.125 mg/L konsantrasyona maruz kalan embriyolarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Diğer yandan 6.25 mg/L ile 50 mg/L arasındaki konsantrasyonlara maruz kalan embriyolarda ise kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış meydana geldiği belirlendi ( $p<0.001$ ). En yüksek kalp atım sayısı 50 mg/L CNP-B'ye maruz bırakılan embriyolarda 155.0 atım/dk olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

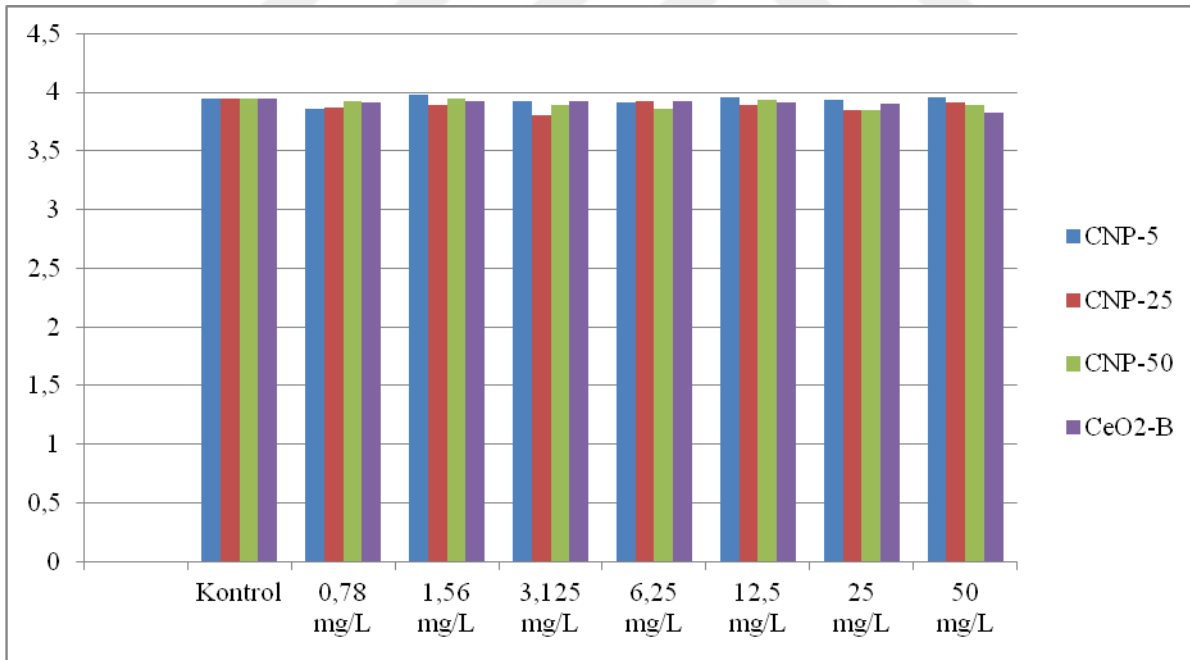
**Çizelge 4.2:** 120 saat süreyle 0.78-50 mg/L CeO<sub>2</sub>'ye (CNP-5, CNP-25, CNP-50 ve CeO<sub>2</sub>-B) maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları

Madde	Konsantrasyon (mg/L)	Canlı	Ölü	Kalp atım sayıları (60sn'de) <sup>a</sup>	Boy (mm) <sup>b</sup>
<b>5 nm CNP</b>					
Kontrol	Kontrol	40	-	126.5 ± 7.03	3.95 ± 0.05
CNP-5	0.78	24	-	143.5 ± 7.34 **	3.86 ± 0.28 *
	1.56	24	-	141.5 ± 6.27 **	3.98 ± 0.11
	3.125	24	-	148.0 ± 7.38 ***	3.92 ± 0.10
	6.25	24	-	149.3 ± 7.45 ***	3.91 ± 0.10
	12.5	24	-	146.0 ± 9.64 ***	3.96 ± 0.21
	25	23	1	134.0 ± 7.43	3.93 ± 0.11
	50	24	-	131.8 ± 7.35	3.96 ± 0.06
<b>25 nm CNP</b>					
Kontrol	Kontrol	40	-	126.5 ± 7.03	3.95 ± 0.05
CNP-25	0.78	24	-	133.6 ± 6.37	3.87 ± 0.16
	1.56	24	-	138.0 ± 7.03 ***	3.89 ± 0.11
	3.125	24	-	147.0 ± 9.81 ***	3.80 ± 0.18 **
	6.25	24	-	138.5 ± 6.93 ***	3.92 ± 0.11
	12.5	23	1	125.5 ± 5.33	3.89 ± 0.12
	25	23	1	129.5 ± 7.39	3.85 ± 0.10 *
	50	22	2	127.8 ± 5.21	3.91 ± 0.08
<b>50 nm CNP</b>					
Kontrol	Kontrol	40	-	126.5 ± 7.03	3.95 ± 0.05
CNP-50	0.78	24	-	137.6 ± 6.19 **	3.92 ± 0.11
	1.56	24	-	143.0 ± 9.00 ***	3.95 ± 0.16
	3.125	24	-	144.3 ± 7.71 ***	3.89 ± 0.13
	6.25	23	1	145.5 ± 7.86 ***	3.86 ± 0.11 *
	12.5	24	-	136.1 ± 6.68 **	3.93 ± 0.12
	25	23	1	131.5 ± 6.15	3.85 ± 0.16 *
	50	20	4	130.5 ± 6.72	3.89 ± 0.11 *
<b>Bulk CeO<sub>2</sub></b>					
Kontrol	Kontrol	40	-	131.3 ± 7,10	3.95 ± 0.05
CeO <sub>2</sub> -B	0.78	24	-	126.7 ± 5,00	3.91 ± 0.11 *
	1.56	24	-	122.5 ± 6,21 *	3.92 ± 0.09
	3.125	23	1	124.0 ± 6,23 *	3.92 ± 0.10
	6.25	24	-	149.7 ± 6,27 ***	3.92 ± 0.11
	12.5	24	-	154.5 ± 5,20 ***	3.91 ± 0.12 *
	25	23	1	153.7 ± 6,08 ***	3.90 ± 0.12 *
	50	22	2	155.0 ± 4,40 ***	3.82 ± 0.16 **

Kontrol grubunda 40 birey, diğer uygulama gruplarından her biri için 24 birey kullanılmıştır. <sup>a</sup>Kalp atımları 48.saatte sayılmış olup değerler ortama±standart sapma cinsinden ifade edilmiştir. <sup>b</sup>Toplam vücut uzunlukları 120.saatte ölçülmüş olup, değerler ortama±standart sapma cinsinden ifade edildi. \*,\*\* ve \*\*\* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<\*0.001 düzeyinde önemliliğini göstermektedir.



**Şekil 4.3:** CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan embriyolarda kalp atım sayıları(dk), (Çizelge 4.2'de verilen verilerden hazırlanmıştır)



**Şekil 4.4:** CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan embriyolarda toplam vücut uzunlukları(mm), (Çizelge 4.2'de verilen verilerden hazırlanmıştır)

### 4.3 Test Materyallerinin Karışımları ile İlgili Bulgular

#### 4.3.1 DOX-CeO<sub>2</sub> karışımının gelişimsel etkileri

Gelişimsel etkilerin değerlendirilmesi amacıyla maddelerin tek başına iken oluşturdukları genel toksisite bulguları da göz önüne alınarak DOX'un 20 µM konsantrasyonu ile test edilen her bir CeO<sub>2</sub> için (5 nm, 25 nm, 50 nm ve bulk) 25 ve 50 mg/L konsantrasyonların karışım etkileri değerlendirildi. Embriyolarda hpf 120 için gözlenen toplam ölüm sayıları ve toplam vücut uzunlukları ile 48. saatte tespit edilen kalp atım sayıları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

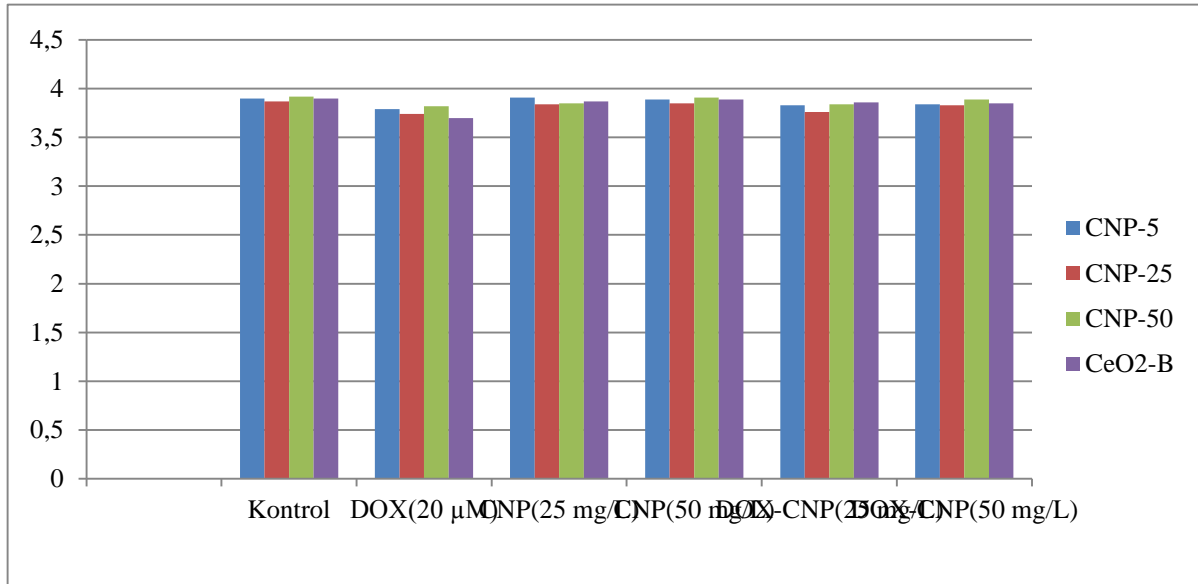
DOX ve CNP-5 ile yapılan karışım etkisi çalışmalarında embriyolarda gözlenen genel ölüm oranları hiçbir grupta %4'ü aşmadığından önemli bir letal etki olarak değerlendirilmedi. En düşük toplam vücut uzunluğu sadece DOX etkisine maruz kalan embriyolarda gözlenirken (3.79 mm), karışımlara maruz kalanlarda önemli bir etki saptanmadı. Buna göre, DOX'a maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma saptandı ( $p<0.05$ ). Diğer yandan kalp atım sayılarına baktığımızda en yüksek kalp atım hızı sadece DOX'a maruz kalanlarda 145.1 atım/dk olarak belirlendi ve bu durum kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterdi ( $p<0.05$ ). DOX ile 50 mg/L CNP-5 karışımında ise kalp atım sayıları sadece DOX maruziyeti ile kıyaslandığında önemli bir azalış gösterdi ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.3).

DOX ve CNP-25 karışımı için yapılan çalışmalarda embriyolarda gözlenen genel ölüm oranları hiçbir grupta %4'ü aşmadığından önemli bir letal etki olarak değerlendirilmedi. En düşük toplam vücut uzunluğu sadece DOX etkisine maruz kalan embriyolarda gözlenirken (3.74 mm), karışımlara maruz kalanlarda önemli bir etki saptanmadı. Buna göre, DOX'a maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma saptandı ( $p<0.05$ ). Diğer yandan kalp atım sayılarına baktığımızda en yüksek kalp atım hızı sadece DOX'a maruz kalanlarda 145.5 atım/dk olarak belirlendi ve bu durum kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterdi ( $p<0.05$ ). DOX ile 25 mg/L ve 50 mg/L CNP-25 karışımında ise kalp atım sayıları sadece DOX maruziyeti ile kıyaslandığında önemli bir azalış gösterdiği buna karşılık sadece 25 mg/L CNP-25'e maruz kalanlara kıyasla önemli bir artış olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Çizelge 4.3).

DOX ve CNP-50 karışımı için yapılan çalışmalarda embriyolarda gözlenen genel ölüm oranları hiçbir grupta %4'ü aşmadığından önemli bir letal etki olarak değerlendirilmedi. En

düşük toplam vücut uzunluğu sadece DOX etkisine maruz kalan embriyolarda gözlenirken (3.82 mm), karışımlara maruz kalanlarda önemli bir etki saptanmadı. Buna göre, DOX'a maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma saptandı ( $p<0.05$ ). 48 hpf embriyolarda kalp atım sayılarına baktığımızda ise, en yüksek kalp atım hızı sadece DOX'a maruz kalanlarda 147.6 atım/dk olarak belirlendi ve bu artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli bulundu ( $p<0.05$ ), (Çizelge 4.3).

DOX ve CeO<sub>2</sub>-B karışımı için yapılan çalışmalarda embriyolarda gözlenen genel ölüm oranları hiçbir grupta %4'ü aşmadığından önemli bir letal etki olarak değerlendirilmedi. En düşük toplam vücut uzunluğu sadece DOX etkisine maruz kalan embriyolarda gözlenirken (3.70 mm), karışımlara maruz kalanlarda önemli bir etki saptanmadı. Buna göre, DOX'a maruz bırakılan embriyoların toplam vücut uzunlukları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma saptandı ( $p<0.05$ ). DOX ile 25 mg/L ve 50 mg/L CeO<sub>2</sub>-B karışımlarında ölçülen toplam vücut uzunlukları sadece DOX etkisine maruz kalan embriyolara kıyasla önemli düzeyde arttığı tespit edildi. Kalp atım sayılarına baktığımızda ise, en yüksek kalp atım hızı sadece DOX'a maruz kalanlarda 147.3 atım/dk olarak belirlendi ve kalp atım sayısında belirlenen artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli bulundu ( $p<0.05$ ), (Çizelge 4.3).



**Şekil 4.5:** DOX- CeO<sub>2</sub>(5-25-50 ve bulk) karışımlarında toplam vücut uzunlukları (Çizelge 4.3'te verilen verilerden hazırlanmıştır)

**Çizelge 4.3:** 120 saat süre ile DOX ve CeO<sub>2</sub> (CNP-5, CNP-25, CNP-50 ve CeO<sub>2</sub>-B) karışımlarına maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında ölüm düzeyi, kalp atım sayıları ve toplam vücut uzunlukları

Uygulanan Madde	Konsantrasyon ( $\mu$ M - mg/L)	Canlı	Ölü	Kalp atım Sayıları (60sn'de) <sup>x</sup>	Boy (mm) <sup>y</sup>
<b>5-CNP ve DOX</b>					
Kontrol	Kontrol	24	-	133.3 $\pm$ 3.55	3.90 $\pm$ 0.09
DOX	20	24	-	145.1 $\pm$ 6.40	3.79 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
CNP-5	25	24	-	134.3 $\pm$ 5.58	3.91 $\pm$ 0.07
CNP-5	50	23	1	135.1 $\pm$ 4.46	3.89 $\pm$ 0.10
DOX-CNP-5	20 – 25	23	1	139.5 $\pm$ 6.38	3.83 $\pm$ 0.09
DOX-CNP-5	20 - 50	24	-	138.1 $\pm$ 5.81	3.84 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
<b>25-CNP ve DOX</b>					
Kontrol	Kontrol	24	-	132.8 $\pm$ 4.85	3.87 $\pm$ 0.09
DOX	20	24	-	145.5 $\pm$ 6.55	3.74 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
CNP-25	25	24	-	129.6 $\pm$ 5.31	3.84 $\pm$ 0.04
CNP-25	50	24	-	133.0 $\pm$ 3.86	3.85 $\pm$ 0.14
DOX-CNP-25	20 – 25	24	-	137.5 $\pm$ 6.82	3.76 $\pm$ 0.09 <sup>b,c</sup>
DOX-CNP-25	20 - 50	23	1	138.5 $\pm$ 7.53	3.83 $\pm$ 0.04 <sup>b,c</sup>
<b>50-CNP ve DOX</b>					
Kontrol	Kontrol	24	-	131.6 $\pm$ 6.42	3.92 $\pm$ 0.04
DOX	20	23	1	147.6 $\pm$ 6.59	3.82 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
CNP-50	25	24	-	132.6 $\pm$ 5.06	3.85 $\pm$ 0.07
CNP-50	50	24	-	131.5 $\pm$ 5.91	3.91 $\pm$ 0.09
DOX-CNP-50	20 – 25	24	-	141.1 $\pm$ 7.25	3.84 $\pm$ 0.01 <sup>a,c,d</sup>
DOX-CNP-50	20 – 50	24	-	139.8 $\pm$ 6.68	3.89 $\pm$ 0.08 <sup>a,b,d</sup>
<b>CNP-B ve DOX</b>					
Kontrol	Kontrol	24	-	131.5 $\pm$ 6.55	3.90 $\pm$ 0.07
DOX	20	24	-	147.3 $\pm$ 6.94	3.70 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
CeO <sub>2</sub> -B	25	24	-	137.1 $\pm$ 6.95	3.87 $\pm$ 0.05
CeO <sub>2</sub> -B	50	23	1	138.3 $\pm$ 7.42	3.89 $\pm$ 0.07
DOX - CeO <sub>2</sub> -B	20 – 25	23	1	141.1 $\pm$ 6.29	3.86 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
DOX - CeO <sub>2</sub> -B	20 – 50	23	1	139.8 $\pm$ 7.69	3.85 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>

Uygulama gruplarından her biri için 24 birey kullanılmıştır. <sup>x</sup>Kalp atımları 48.saatte sayılmış olup değerler ortama±standart sapma cinsinden ifade edilmiştir. <sup>y</sup>Toplam vücut uzunlukları 120.saatte ölçülmüş olup, değerler ortama±standart sapma cinsinden ifade edildi.

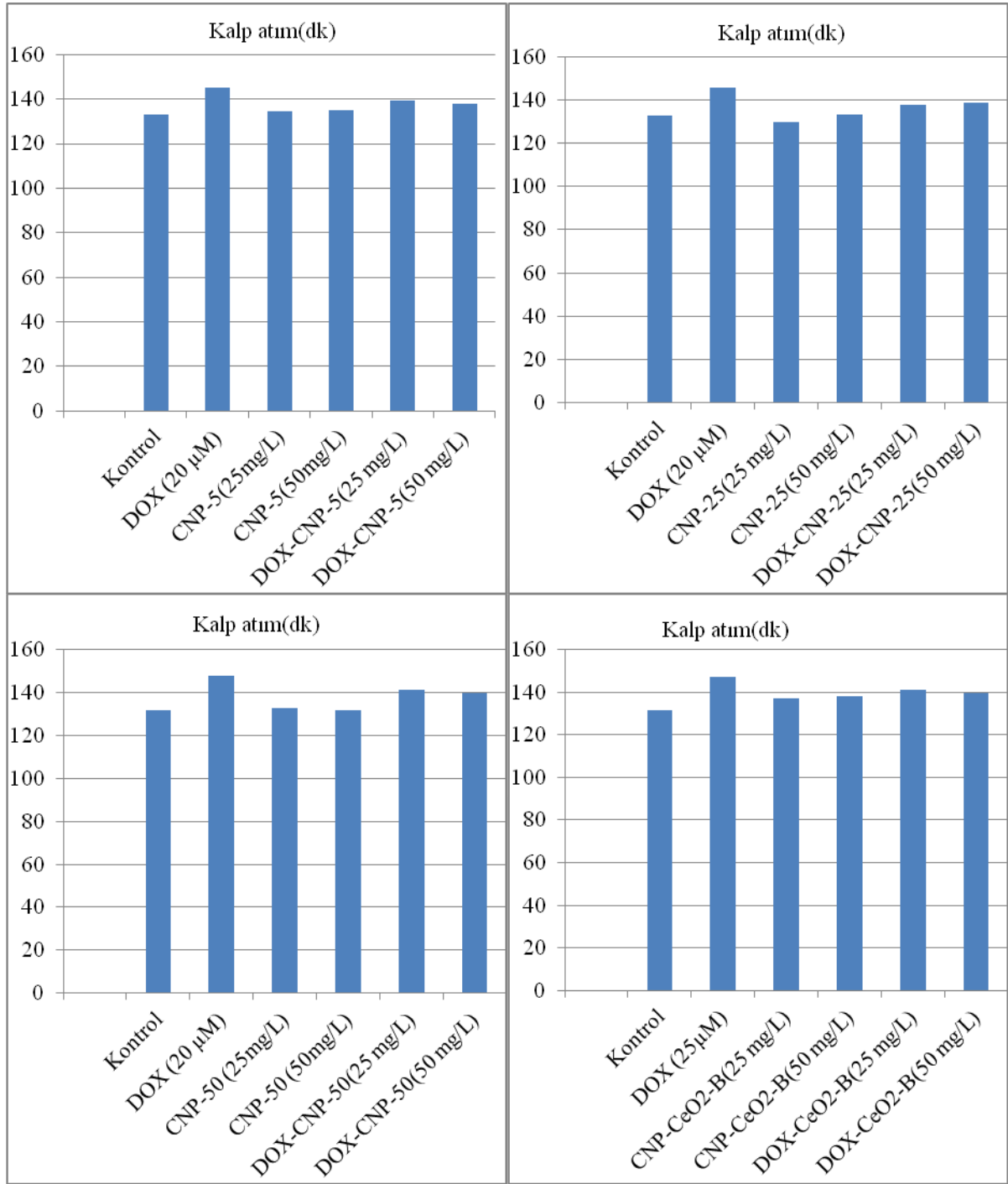
Harfler istatistiksel karşılaştırmalarda,

<sup>a</sup>: Kontrolden farklı,

<sup>b</sup>: Tekli doxorubisinden farklı olduğunu göstermektedir ( $p<0.05$ ).

<sup>c</sup>: Tekli 25 mg/L CeO<sub>2</sub>'den farklı olduğunu göstermektedir ( $p<0.05$ ).

<sup>d</sup>: Tekli 50mg/L CeO<sub>2</sub>'den farklı olduğunu göstermektedir ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.6: DOX- CeO<sub>2</sub> (5-25-50 ve bulk) karışımlarında kalp atım sayıları (Çizelge 4.3'te verilen verilerden hazırlanmıştır)

#### 4.3.2 DOX ve CeO<sub>2</sub> karışımı ile ilgili biyokimyasal bulgular

Biyokimyasal ölçümler yapmak için (GST, GR, GPx, CAT ve CaE) 120 saat süre ile DOX, CNP-25, CeO<sub>2</sub>-B, DOX+CNP-25, DOX+CeO<sub>2</sub>-B karışımlarına maruz bırakılan embriyolarda saptanan ölüm oranları ve embriyonun koriyondan çıkma süreleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4:** Biyokimyasal analizler için 120 saat süre ile DOX ve CNP-25 ile CeO<sub>2</sub>-B'ye maruz bırakılan zebrafalığı embriyolarında ölüm düzeyleri ve koriyondan çıkma durumları

DOX (µM)	CeO <sub>2</sub> (100 mg/L)	n	Letalite		YFA durumu*
			24 saat	120 saat	72 saat
-	-	161	0	0	0
7.4	-	161	0	5	1
37	-	161	0	7	1
-	CNP-25	161	0	2	1
-	CeO <sub>2</sub> -B	161	0	2	0
7.4	CNP-25	161	0	3	1
7.4	CeO <sub>2</sub> -B	161	0	5	0
37	CNP-25	161	0	5	1
37	CeO <sub>2</sub> -B	161	0	6	0

Bütün enzimlerin aktiviteleri spesifik aktivite (nmol/dk/mg total protein) cinsinden ifade edildi. Ölçüm için seçilen enzimler; glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve karboksilesteraz (CaE)'dir. Biyokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen bulgular Çizelge 4.5'de verilmektedir.

Enzim çalışması sonucu yapılan ölçümlerde 7.4 µM DOX'a maruz kalan embriyoların kontrol grubu bireyler ile karşılaştırılması sonucu GST aktivitesinde bir artışa neden olduğu saptanırken (P<0.001), 37 µM DOX'a maruz kalan embriyoların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise CaE ve CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli inhibisyona neden olduğu belirlendi (P<0.01- 0.001).

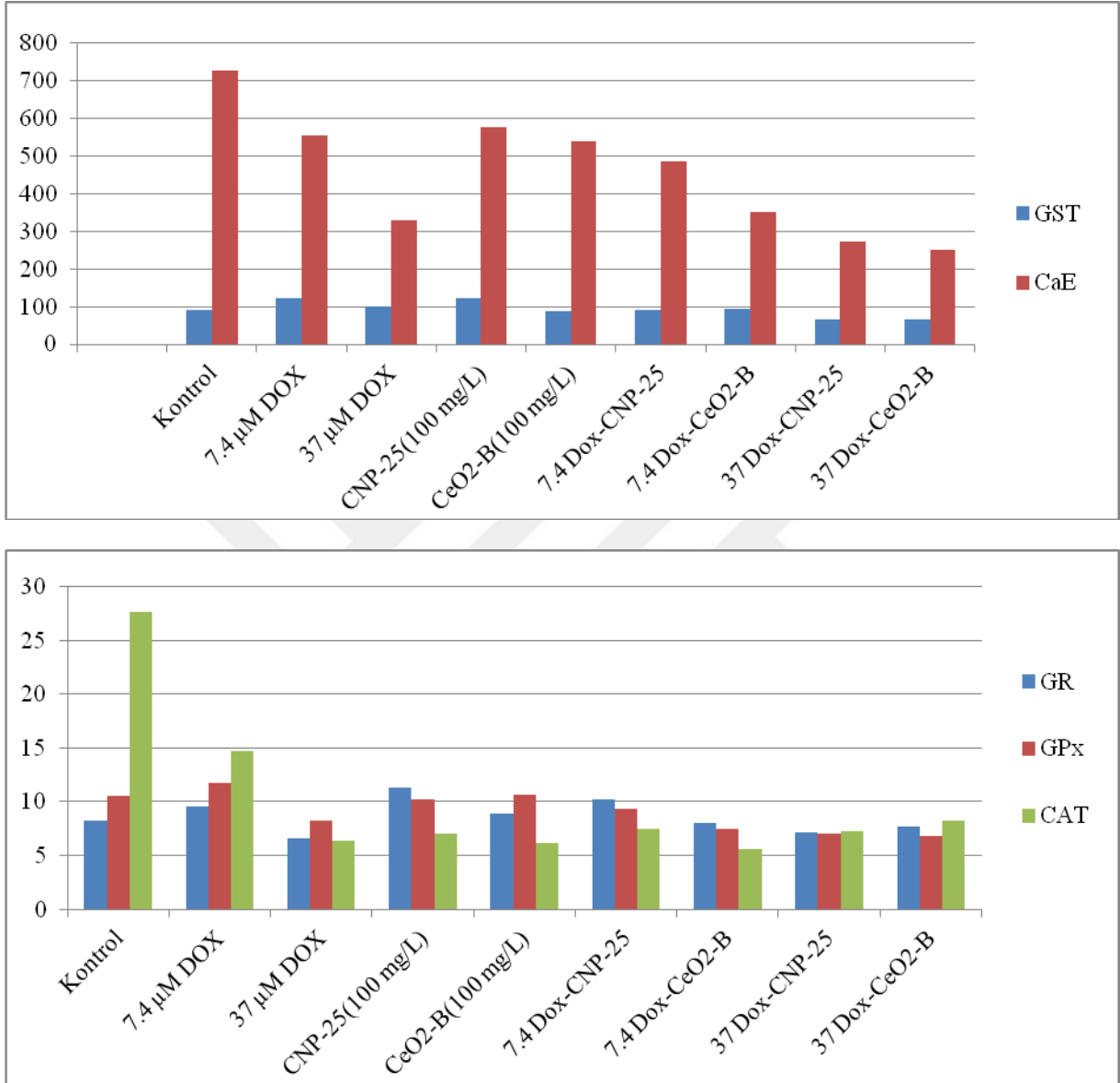
Çalışmada 100 mg/L konsantrasyondaki CNP-25'e maruz bırakılan embriyolar kontrol grubu ile kıyaslandığında GST aktivitesinde önemli bir artışa (P<0.001), CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli bir inhibisyona neden olduğu belirlendi (p<0.05). 100 mg/L konsantrasyondaki CeO<sub>2</sub>-B'ye maruz kalan embriyolarda CaE ve CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli bir inhibisyona neden olduğu saptandı (p<0.05-0.01).

Karışım çalışmasında 7.4 µM DOX+100 mg/L CNP-25 karışımı ve 7.4 µM DOX+100 mg/L CNP-B'ye maruz kalan embriyolar kontrol grubu ile kıyaslandığında kullanılan her iki karışım için de CaE ve CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli inhibisyona neden olduğu tespit edildi (p<0.05-0.001).

37 µM DOX+100 mg/L CNP-25 karışımı ve 37 µM DOX+100 mg/L CNP-B karışımına maruz kalan embriyolar kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki madde için de GST ve CaE



aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli inhibisyona neden olduğu belirlendi ( $P < 0.01-0.001$ ). 37  $\mu\text{M}$  DOX+100 mg/L CNP-25'e maruz kalanlarda GPx ve CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli inhibisyona neden olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.7:** DOX ve CeO<sub>2</sub>'lere (25nm ve bulk) maruz bırakılan *D. rerio* embriyolarının biyokimyasal belirteç düzeyleri (Çizelge 4.5'te verilen verilerden hazırlanmıştır)

**Çizelge 4.5:** DOX ve CeO<sub>2</sub>'lere maruz bırakılan *D. rerio* embriyolarının biyokimyasal belirteç düzeyleri

DOX (µM)	CeO <sub>2</sub> (100 mg/L)		GST <sup>a</sup>	GR <sup>a</sup>	CaE <sup>a</sup>	GPx <sup>a</sup>	CAT <sup>a</sup>
-	-	7	90.50 ± 7.06	8.29 ± 0.82	727.8 ± 68.9	10.54 ± 0.99	27.72 ± 6.18
7.4	-	7	123.62 ± 8.23 ***	9.57 ± 0.92	555.4 ± 49.6	11.79 ± 0.80	14.70 ± 2.86
37	-	7	99.91 ± 2.17	6.60 ± 0.77	327.8 ± 21.3 ***	8.21 ± 0.33	6.35 ± 1.71 **
-	CNP-25	7	123.63 ± 5.05 ***	11.30 ± 0.56	577.9 ± 25.7	10.26 ± 0.67	7.06 ± 1.50 *
-	CeO <sub>2</sub> -B	7	88.79 ± 6.04	8.86 ± 0.40	539.7 ± 101.0 *	10.70 ± 0.82	6.14 ± 1.55 **
7.4	CNP-25	7	90.10 ± 2.80	10.17 ± 0.95	486.8 ± 24.4 **	9.39 ± 1.18	7.44 ± 1.38 *
7.4	CeO <sub>2</sub> -B	7	93.90 ± 4.46	8.06 ± 0.63	351.5 ± 12.0 ***	7.48 ± 0.78	5.59 ± 1.88 **
37	CNP-25	7	64.32 ± 2.23 **	7.16 ± 1.09	273.1 ± 20.5 ***	6.99 ± 0.67 *	7.26 ± 1.33 *
37	CeO <sub>2</sub> -B	7	64.48 ± 2.04 **	7.66 ± 0.38	250.1 ± 27.6 ***	6.83 ± 0.84	8.29 ± 1.63

<sup>a</sup>: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

\*, \*\* ve \*\*\*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$  düzeyinde önemliliği göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

DOX, kemoterapide çok sık kullanılan bir antitümör ajanıdır. Klinikte yaygın olarak kullanılmaya devam edilen DOX'un tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği bilinmekle birlikte, bu etkinin tümör hücrelerine özgü olmamasından dolayı yan etkileri de yüksek olan geniş spektrumlu bir kanser ilacıdır (Carvalho ve diğ, 2013). Uzun süreli DOX tedavisi sonrası gelişen çoklu organ toksisitesi nedenlerinin mekanizmaları tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte birçok teori ileri sürülmüştür (Pugazhendhi ve diğ, 2018). DOX maruziyeti sonucunda hücrede serbest radikal oluşumuna bağlı oksidatif stres, kalp kaslarında antioksidan enzim seviyesinde azalma, hücre zarı  $Ca^{+}$  geçirgenliğinde değişiklik, inflamasyon, LPO' da artış ve apoptoz en sık gözlenen toksik etkiler olarak sayılabilir. Toksik etki nedeniyle görünen en önemli mekanizma, kalp kası hücrelerinde apoptozun uyarılması sonucunda ortaya çıkan oksidatif stresdir. Bunun nedeni ise kalp kası hücrelerindeki (miyositler) antioksidan kapasitesinin serbest radikallerden korunmak için yetersizliğidir (Menna, 2008). Günümüzde DOX'un yan etkilerini önlemek veya azaltmak için çeşitli doz modifikasyonları yapılması, ilaç uygulama şemalarının değiştirilmesi, kalbi koruyacak ilaçların aynı anda uygulanması önerilmektedir. Bu amaçla çok çeşitli çalışmalar yapılmış olup bunlardan bir kısmı da oksidatif stresi ortadan kaldıracak maddeler ile DOX'u birlikte kullanarak DOX toksisitesinin ortadan kaldırılması veya azaltılması amaçlanmıştır (Sack ve diğ, 2014; Sangomla ve diğ, 2018; Jayachandra ve diğ, 2019).

DOX toksisitesine karşı organizmayı tedavi esnasında korumak için kullanılabilecek bu maddelerden birinin de seryum oksit olabileceği düşünülmektedir. CNP'lerin sahip olduğu iddia edilen antioksidan ve rejeneratif özellikleri sayesinde,  $O_2^{-}$  ve  $H_2O_2$  seviyelerini azaltılabileceği, aynı zamanda OH radikallerinin oluşumunu da engelleyebileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Nelson ve diğ, 2016). CNP'lerin sahip olduğu değerlendirilen bu olağanüstü kapasitesi, oksidatif stres ile ilgili hastalıklar ve bozukluklar için bir alternatif tedavi veya tedaviye yardımcı maddeler olarak kullanılabileceğini de akla getirmektedir.

Bu çalışmada zebrabalığı modelinde embriyonal gelişim esnasında etkileri değerlendirilen DOX ve farklı parçacık büyüklüklerine sahip olan  $CeO_2$  parçacıklarının uygun konsantrasyonlardaki karışımının DOX kaynaklı toksisite üzerine olan etkilerinin

değerlendirilmesi ve esas olarak DOX'un kanser hastalarında CNP ile birlikte verilmesi durumunda olası iyileştirici ve/veya koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada ilk aşamada DOX'a ve farklı parçacık büyüklüklerine sahip CeO<sub>2</sub>'ye (5 nm, 25 nm, 50 nm ve Bulk) maruz bırakılan zebrabalığı embriyolarında toksik etkinin meydana gelip gelmeyeceğinin saptanması, ikinci aşamada ise DOX toksisitesi sonrası meydana geldiği düşünülen serbest radikal oluşumu ile ortaya çıkan oksidatif stresi ortadan kaldıracı veya azaltabileceği düşünülen CNP'lerin DOX ile birlikte karışım halinde kullanımı sonrası nasıl bir etkinin meydana geleceği ve CNP'lerin antioksidan bir etkisinin olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan CNP'lerin farklı parçacık büyüklüğüne sahip olmasında ki amaç ise maddelerin farklı büyüklüklerde nasıl bir etki yapacağı yönünde bilgi edinmektir. Maddelerin nano boyutta olduklarında bulk (hacimli) boyutta olanlarından farklı davrandıkları, bulk boyut ile nano boyut arasındaki geçişlerinde kimyasal özellikleri, manyetik özellikleri, iletkenliği ve optik özellikleri gibi birçok özelliği önemli ölçüde değişim gösterdiği de bilinmektedir ( Rao ve diğ, 2007). Boyutlarından dolayı NP'lerin çoğunun hücre zarından taşınabildiği ve NP'lerin boyut, şekil, kimyasal özellik ve yüzey özellikleri gibi birçok faktöre bağlı olarak hücrelere hasar verebildiği, hücrede ROS oluşumunu tetikleyerek toksisiteye neden olabildiği ve hücreyi ölüme götürebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rao ve diğ, 2007).

NP'lerin toksisitesini incelemek için yapılan çeşitli hayvan çalışmaları (*in vivo*) ve hücre kültürü deneylerinde (*in vitro*), şekil, boyut, yüzey özelliği, çözünürlük gibi faktörlerin, NP'lerin toksisitesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Ozmen ve diğ, 2020). Bu amaçla, bu araştırmada olası etkilerin belirlenmesi için basit ve etkin bir test olan zebrabalığı embriyonal gelişim ve malformasyon testi kullanıldı. Organizmada olası antioksidatif etkinin değerlendirilmesi için seçilen biyokimyasal belirteçler (GST, GR, GPx, CAT, CaE) değerlendirildi. Çalışma sonucunda elde edilen gözlemsel bulgular ve biyokimyasal veriler ışığında CNP'lerin ve DOX maruziyetinin ayrı ayrı ve karışım halinde zebrabalığı embriyonal gelişimi üzerindeki etkileri, nanoparçacık büyüklükleri dikkate alınarak değerlendirildi.

Çalışmada DOX maruziyeti sonrası zebrabalığı embriyolarının yumurtadan çıkması, kalp atım hızları, toplam vücut uzunlukları ve malformasyonlar yönünden değerlendirildiğinde beklentilerimize uyan ve konsantrasyon artışı ile orantılı olarak ortaya çıkan toksik etkiler gözlemlendi. Elde edilen gözlemler embriyoların maruz kaldığı DOX konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak koryondan çıkma süresinin 48. saatten 72. saate kadar uzamasına neden olduğunu gösterdi. Ayrıca embriyoların 92.52 µM ve daha yüksek

konsantrasyonlarda DOX etkisine 120 saat süre ile maruz bırakılmaları sonucunda, hiçbir embriyonun 72 saat sonuna kadar koryondan çıkma başarısı gösteremediği tespit edildi. Kalp atım hızlarının konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı, 46  $\mu\text{M}$ 'dan daha düşük konsantrasyonlara maruz kalan bireylerde artışın daha yüksek olduğu, buna karşın maruz kalınan konsantrasyon arttıkça embriyolarda kalp atım hızındaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmakla birlikte, kontrol değerlerine daha yakın olduğu tespit edildi. Bu nedenle gözlenen toksik etkinin nispeten düşük konsantrasyonlarda metabolik faaliyetlerin artışı ile ortaya çıkan toksisiteye karşı bir koruyucu etki olabileceği, buna karşın yüksek konsantrasyonların kalp kasında meydana gelen hasar sonucu kalp etim hızlarının yavaşlamasına neden olan bir etmen olabileceği düşünülmektedir. Artan DOX konsantrasyonlarında gözlenen toksisitenin akut etkiye bağlı olarak nihayetinde embriyoların ölüme gitmesine kadar devam eden bir sürece neden olduğu da değerlendirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, DOX ile folikasit NP'lerine birlikte maruz kalan *D. rerio* embriyoları üzerinde çalışan Igartua ve arkadaşları (2018) DOX kardiyotoksitesini belirlemek için çalışmamıza benzer konsantrasyonlardaki (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) uygulamalarda kalp atım sayılarını ölçtüklerinde 3.12 ve 6.25 konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla bir artış olduğu yönünde benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca toksisitenin 50  $\mu\text{M}$  üzerinde arttığı ve morfolojik anormalliklerin meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Bu bulgular yüksek konsantrasyonda DOX etkisine maruz kalan bireylerde saptadığımız bulgularımızı da desteklemektedir. Benzer şekilde embriyoların artan konsantrasyonlarda DOX'a maruz bırakılmalarının hayatta kalan bireylerde 120 hpf sonunda toplam vücut uzunluklarının da önemli seviyede azalmasına yani gelişimin giderek baskılanmasına neden olduğu bulundu. Bunun nedenlerinin hem toksik etkiye bağlı olarak ortamda biriken serbest radikallerin artışı, hem de kan akışının düzensizliğine bağlı olarak doku ve organların yeterince beslenememesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca DOX konsantrasyonu artışının embriyolarda gelişimsel malformasyonların da artmasına, hatta bireylerde aynı anda birden fazla tipte malformasyona neden olduğu ve sonuçta ölüm oranlarını arttırdığı da gözlenmiştir. Yüksek DOX konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra zebra balığı embriyolarında ölüm oranının artması, kuluçka süresinin uzaması, anormal kalp ritminin meydana gelişi ve bir dizi anormalliklerin ortaya çıkışı DOX toksisitesinin önemli morfolojik etkileri olarak değerlendirilebilir. DOX toksisitesine karşı isosteviol kullanarak toksik etkinin giderilmesi yönünde *D. rerio* embriyoları üzerinde yapılmış olan benzer çalışmada DOX toksisitesi ile ilgili veriler bakımından bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup, literatür verileri ile bulgularımız paralellik göstermektedir. Araştırmacılar DOX'un LC<sub>50</sub> değerini 51.56  $\mu\text{M}$

olarak rapor etmişler, konsantrasyon artışına bağlı olarak meydana gelen malformasyonların şiddeti ve kalp atış hızında artış meydana gelen artışı da bildirmişlerdir (Jayachandra ve diğ., 2019). Elde edilen bulgularımız da literatür verilerini destekler nitelikte bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmalarda 5-100 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda 4 farklı boyuttaki CNP'lerin zebrabalığı embriyonik gelişimini genel anlamda önemli düzeyde etkilemediği ve herhangi bir malformasyona neden olmadığı belirlendi. Ayrıca CNP maruziyetinin embriyoların koriyon kesesinden çıkma oranına önemli bir etkisinin olmadığı ve yumurtadan çıkma oranını da etkilenmediği görüldü. 48 saat sonunda CNP etkisine maruz kalan tüm embriyoların kontrol grubu bireylerinde olduğu gibi, koriyon kesesinden çıkarak serbest yüzmeye başladıkları tespit edildi. En yüksek maruziyet konsantrasyonlarında dahi 120. saatin sonunda dikkate alınacak bir ölüm oranı gözlenmedi. Çalışmamızı destekler nitelikte olan benzer bir çalışmayı Roberta ve arkadaşları (2021) zebrabalığı embriyoları üzerindeki toksisite testi çalışmasıyla yapmışlar ve CNP'lerin (6.8 nm, 11.3 nm, 50 nm) ölümcül etkiye neden olmadığını, CNP maruziyetine bağlı olarak testlerde gözlenen ölüm oranının %2'yi geçmediğini, CNP maruziyetinin yumurtadan çıkma süresini etkilemediğini, kalp atım hızını etkilemediğini ve herhangi bir malformasyona neden olmadığını da rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, çalışmamızda embriyoların farklı parçacık büyüklüklerine sahip olan nano boyutlu CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılmalarının özellikle düşük konsantrasyonlarda (12,5 mg/L'ye kadar) kalp atım hızında önemli seviyede artışa yol açtığı (p<0.05-0.001), buna karşın 25 ve 50 mg/L konsantrasyonlara maruziyet sonucunda kontrol grubu bireylerine yakın değerlerde kalp atım hızı olduğu gözlendi. Gözlenen bu etkinin nano boyutlu parçacıklara düşük konsantrasyonlarda maruziyet sonucunda daha belirgin olarak gözlenmesinin nedeni ortamda oluşabilecek ROS türevlerine karşı fizyolojik bir tepki olarak değerlendirilebilir. Buna karşın, CeO<sub>2</sub>-B etkisine maruz kalan embriyolar ise maruz kalınan tüm konsantrasyonlar için kalp atım sayılarında bir artış göstermiştir (p<0.05-0.001). Bu durum ortamda bulunan serbest radikallerin etkisine bağlanabileceği gibi, parçacık büyüklüğü artışı sonucu meydana gelebilecek partikül kümeleşmesinin de bir sonucu olabilir. Bunun yanı sıra, CeO<sub>2</sub>-B maruziyetinin yüksek konsantrasyonlarda embriyolarda gelişimi de baskılayıcı bir rol oynadığı, bu durumun nispeten 50 nm parçacık büyüklüğüne sahip CNP maruziyeti ile de ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak ortamda bulunan CNPlerin parçacık boyutu ve konsantrasyon ile ilişkili olarak *D. rerio* gelişiminde bir toksik etkisi olduğu ve hacimli CNP'lerin embriyonal gelişim üzerine olan toksisitesinin daha fazla olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

Çalışmalarımızda 20 µM DOX ile (yapılan ön çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara dayanılarak bu konsantrasyon seçilmiştir) 5, 25 ve 50 nm parçacık boyutlarına sahip CNP'lerin 25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonlarının (ön çalışmalar doğrultusunda seçilen konsantrasyonlar) bir karışım halinde bulunmasına bağlı olarak zebrabalığı embriyolarının gelişimine etkileri kontrol grubu bireyler ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde ise, karışımların yumurtadan çıkma süresini etkilemediği, ölüm oranının özellikle sadece DOX etkisine maruz kalanlara kıyasla çok düşük olduğu ve embriyolarda gelişimsel malformasyonların meydana gelmediği görüldü. Bu durum DOX maruziyeti ile meydana gelen toksisiteye karşın CNP maruziyetinin koruyucu ve antagonistik bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. DOX-CNP karışımında gözlenen kalp ritminin normale yaklaşması ve toplam vücut uzunluğunda kaydedilen bulguların kontrol grubu birey değerlerine yakın olması CNP etkisi ile DOX kaynaklı toksisitenin önemli bir seviyede azaltıldığını da düşündürmektedir. Buna karşın, DOX kaynaklı toksik etkinin tümüyle ortadan kalkmadığı da görülmektedir. Bununla birlikte, sadece morfolojik değerlendirmelere dayalı olarak DOX kaynaklı toksisitenin CNP etkisi ile azaltıldığı veya giderildiği yönünden bir değerlendirme yetersiz olabilir. Benzer bir çalışmada CNP'lerin tek başına zebrabalığı embriyolarının üzerinde embriyotoksik veya teratojenik etkilerinin olmadığı rapor edilmiştir (Krysanov ve Demidova 2012). Bu sonuçlar elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Ancak araştırmacılar 10 µg/mL konsantrasyondaki DOX ile birlikte CNP etkisine maruz kalan zebrabalığı embriyolarının kontrol grubu ve sadece 10 µg/mL konsantrasyondaki DOX grubuna kıyasla ölüm oranının ve malformasyonların arttığını, bunun nedenini CNP'lerin DOX ile birlikte uygulanması sonucunda NP'lerin yüksek adsorbe edilebilirliği özelliğinden ötürü CNP'lerin vücutta DOX birikimini artırmasına bağlamışlardır. Buna karşın CNP-DOX karışımlarının DOX toksisitesini azalttığı yönündeki saptamalarımız ileri çalışmalarda sadece kanserli hücre hedef alınarak nanokapsül aracılığı ile hedef odaklı tedavi yöntemlerinde DOX'un CNP ile birlikte kanserli hücreye uygulanabilirliği bakımından değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Bu görüşümüzü destekleyen bir çalışmada (Sack, vd., 2014) CNP'lerin DOX'un antitümör aktivitesini artırdığı yönündeki bulgularda araştırmacılar bu etkiyi DOX-CNP karışımının kanser hücrelerinde apoptozun artması ile oluştuğu bildirilmiştir.

Diğer taraftan, organizmalarda meydana gelen toksik etkiler moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan çeşitli metabolitler ve ROS türevlerinin organizmadan uygun yollarla atılamaması sonucu vücutta birikmesinden kaynaklanabilir

(Valko ve diğ, 2006). Organizmada toksik bir etmene bağı olarak meydana gelen serbest radikallerin vücuttan uzaklaştırılmasında önemli görevi olan enzimler vardır. Bu nedenle biyobelirteç olarak kullanılabilen çeşitli enzim aktivitesi değerlendirmeleri toksisitenin belirlenmesinde önemli göstergeler olabilir (Mazzetti ve diğ, 2015). Organizmalarda çevresel ve organizmanın kendi iç çevresinden kaynaklanan oksidatif stresin ve bu strese karşı savunma mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla GST, GR, GPx, CAT, CaE enzimlerinin aktivitelerinin ölçülebilmesi önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir (Mazzetti ve diğ, 2015; Biot ve diğ, 2004; Terada, 2005; Wheelock ve diğ, 2008). GST'nin, hücreleri serbest radikallerden korumak, ksenobiyotikleri vücuttan uzaklaştırmak, hücre zarı dengesini sağlamak, hücre içi redoks dengesini korumak gibi görevlerinin yanı sıra DNA'nın korunmasında, LPO sonucu oluşan ürünlere karşı savunmada ve oksidatif hasarlara karşı da önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Van der Oost ve diğ, 2003). GR, hücrede önemli bir enzimdir ve serbest radikallerin ve reaktiflerin temizlenmesinde görev alır. Glutatyon hücrede normal olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunur. GR, NADPH varlığında yüksek molekül ağırlıklı glutatyon formunun (GSSG) düşük molekül ağırlıklı glutatyon formuna (GSH) dönüşümünü katalizler. Oksidatif stres ortamında GSH/GSSG dengesini sağlamada önemli rol oynar. GR, GSH'ın hücre içindeki düzeyi azalınca devreye girerek GSH'ın organizmada belirli bir düzeyde kalmasını sağlar (Van der Oost, 2003). GPx, mitokondride, bazende sitozolde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi redükleyerek suya parçalayan önemli bir antioksidan enzimdir. GPx miktarının düşük olması antioksidan sistemin bozulmasına neden olur (Terada, 2005). Bilindiği üzere biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi canlılar için zararlıdır ve hücrede bir serbest radikal olan OH<sup>-</sup> düzeyini artırmaktadır. Bu nedenle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücreden uzaklaştırılması gerekir ve bu görevi de GPx'in yanı sıra katalaz enzimi yerine getirir (Kelly ve diğ, 1998). CaE aktivitesi omurgalı ve omurgasız türlerin birçoğunda vardır ve geniş substrat özgüllüğüne sahiptir. CaE'ler özgül lipidlerin taşınmasında ve depolanmasında, ksenobiyotiklerin vücuttan uzaklaştırılmasında ve düzenleyici olarak özgül hormonların inaktivasyonunda görev almaktadır (Wheelock ve diğ, 2005).

Siklofosfamide maruz kalan farelerde meydana gelen toksisite sonrası karaciğerde alanin amino transferaz (AST) ve aspartat amino transferaz (AST) enzimlerinde ve oksidatif stres göstergesi olan ve LPO'nun son ürünü MDA değerinin yükseldiği, 100 µg/kg CNP uygulaması sonucu AST, ALT ve MDA değerlerinin normale döndüğü ve GSH seviyelerinde bir artış meydana geldiğini rapor etmiştir (Hamzeh ve diğ, 2018). Çalışmalarımızda DOX, CNP ve karışımlarının toksik etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile seçtiğimiz enzimlerin



aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde, 7.4 µM ve 37 µM DOX maruziyetinin ve 100 mg/L CeO<sub>2</sub> uygulamalarının farklı düzeylerde toksisiteye neden olduğu değerlendirilmiştir. Buna karşın, GST aktivitelerinin özellikle karışımda yüksek konsantrasyonlarda DOX bulunduğunda ortaya çıkan toksik etkinin, CeO<sub>2</sub> tarafından azaltılması yönünden bir etkisi olabileceği değerlendirilmektedir. Ancak, CaE aktivitesinde kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında, meydana gelen baskılanmanın hem DOX hem de CeO<sub>2</sub> toksisitesine işaret ettiği değerlendirilmiştir. Ayrıca tüm uygulamalar için CAT aktivitesinde ortaya çıkan baskılanmamının da toksik bir etkiye işaret ettiği değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulgular bütün olarak değerlendirildiğinde DOX maruziyeti sonrası konsantrasyon artışına bağlı olarak toksisitenin arttığı, embriyoların gelişiminin baskılandığı, meydana gelen malformasyonların konsantrasyon artışı ile görölme sıklığının ve şiddetinin arttığı, düşük konsantrasyonlarda kalp atım hızı artarken konsantrasyon artışı ile akut toksit etki meydana getirerek embriyoların ölümüne neden olduğu görölmüştür. Bulk CeO<sub>2</sub> ve CNP'lerin embriyonik gelişimi genel anlamda etkilemediği, herhangi bir malformasyona neden olmadığı ve yüksek konsantrasyonlarda dahi embriyo ölümüne neden olmadığı görölmüştür. Sadece bulk CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan embriyolarda kalp atım hızında bir miktar artış ve gelişiminde kısmen baskılayıcı bir etki gösterdiği görölmüş bu sonuçlara bağlı olarak bulk CeO<sub>2</sub>'nin daha toksik olabileceği düşünölmüştür. Seryum ile DOX karışımına maruz kalan bireylerde ise karışımların yumurtadan çıkma süresi ve oranını etkilemediği, malformasyona neden olmadığı görölmüş, DOX maruziyeti sonucu artan kalp atım hızının DOX-CNP karışımında normale yakınlaştığı ve toplam vücut uzunluğunun kontrol grubu bireylere yakınlaştığı görölmüştür. Bu durum DOX maruziyeti ile meydana gelen toksisiteye karşın CNP maruziyetinin koruyucu ve antagonistik bir etkisi olabileceğini, CNP'nin DOX kaynaklı toksisiteyi önemli ölçüde azalttığını düşündürse de, enzim aktivitelerinde elde edilen bulgular bir toksik etkiye işaret etmektedir. Bu durum DOX-CNP karışımlarının DOX kaynaklı toksik etkinin tümüyle ortadan kalkmasında yeterli olmadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, kanser tedavisinde kullanılan birçok ilacın zayıf seçiciliği ve toksisitesi göz önüne alındığında, hücrelerin antikanser ajanlarının olumsuz etkilerine karşın CNP kullanılarak azaltılmasının mümkün olabileceği düşünölmekle birlikte, bunun daha kapsamlı çalışmalar ile ve moleküler mekanizmaların da değerlendirilmesi ile daha iyi anlaşılması gerektiği düşünölmektedir. Daha kapsamlı araştırmalar DOX'un hücrelerle etkileşiminin tam

mekanizmasının anlaşılması ile birlikte DOX-CNP'nin birleşik etkilerinin de daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Nano formüle edilmiş DOX-CNP molekülleri kanserli hücreye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde katkı sağlayabilir.



## KAYNAKLAR

- Auffan, M., Rose, J., Orsere, T., De Meo, M., Thill, A., Zeyons, O., Proux, O., Masion, A., Chaurand, P., Spalla, O. (2009). CeO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts *in vitro*. *Nanotoxicology*, 3(2): 161-171.
- Aydemir, B., Karadağ, S. E.(2009). Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2): 56-60.
- Baird, D., Nordmann, A., Schummer, J. (2004). Discovering the nanoscale. Amsterdam: *IOS Press*. ISBN: 1-58603-467-7-32, 140-142.
- Baker S.D., Pharm, D. (1997). Drug interaction with the taxanes. *Pharmacotherapy*; 17: 126-132.
- Baun, A., Sorensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N. B., Koch, C. B. (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C<sub>60</sub>. *Aquatic Toxicology*. vol. 86, no. 3, pp. 379–387.
- Bhat, A., (2003). Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environ. Biol. Fishes* 68, 25–38.
- Bielack, S.S., Ertmann, R., Winkler, K., Landbeck, G. (1989). ‘Doxorubicin: effect of different schedules on toxicity and antitumor efficacy. *Eur J Cancer Clin Oncol*; 25: 873-82.
- Biot, C., Bauer, H., Schirmer, R.H., Davioud-Charvet, E. (2004). 5-Substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 5972-5983.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: *Source and toxicity*, 2(4), MR17 - MR172.
- Calienni, M.N., Cagel, M., Montanari, J., Moreton, M.A., Prieto, M.J., Chiappetta, D.A., del Valle Alonso, S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) model as an early-stage screening tool to study the biodistribution and toxicity profile of doxorubicin-loaded mixed micelles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 07.019.
- Camera, E. and Picardo, M., (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781 181–206.
- Carvalho, F. S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A. J., Carvalho, R. A., & Oliveira, P. J. (2013). Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Medicinal Research Reviews*, 34(1), 106–135.

- Chang, C., Wu, S. L., Zhao, X. D., Zhao, C. T., & Li, Y. H. (2014). Developmental Toxicity of Doxorubicin Hydrochloride in Embryo-larval Stages of Zebrafish. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(1), 909–916.
- Chaudhury, K., Babu, N., Singh, A.K. (2013). Mitigation of endometriosis using regenerative cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*; 9: 439–48.
- Chen, B. A., Dai, Y. Y., Wang, X. M., Zhang, R. Y., Xu, W. L., Shen, H. L., Gao, F., Sun, Q., Deng, X. J., Gao, C.(2008). Synergistic effect of the combination of nanoparticulate Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Au with daunomycin on K562/A02 cells. *Int J Nanomedicine*.343-350.
- Chen, J., Patil, S., Seal, S., McGinnis, J.F. (2006). Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature Nanotechnology*, 1: 142-150.
- Chen, J., Patil, S., Seal, S. (2008). Nanoceria particles prevent ROI induced blindness. In: Recent advances in retinal degeneration (pp. 53–9). *New York, NY: Springer*, 613.
- Colon, J., Hsieh, N., Ferguson, A. (2010). Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomed-Nanotechnol*; 6: 698–705.
- Culcasi, M., Benameur, L., Mercier, A., Lucches, Í. C., Rahmoun, H., Asteian, A., Casano, G., Botta, A., Kovacic, H., Pietri, S. (2012). EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: Evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. *Chemico-Biological Interactions*, 199(3), 161-176.
- Demir, F., Narin, F., Akgün, H., Üzümlü, K., Saraymen, R., Baykan, A., Köklü, E. (2004). Effect of melatonin on doxorubicin induced experimental cardiotoxicity. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*; 47: 260-268.
- Drexler, K. E. (2004). Nanotechnology: From Feynman to Funding. *Bulletin of Science, Technology and Society*, 24(1), 21-27.
- Dündar, Y., Aslan, R. (1999). Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*. 2(2): 134-142.
- Erbaş, D. (2002). Nitrik oksit özellikleri ve egzersizdeki rolü. *Journal of Sport Sciences*, 13(1), 33–39.
- Estevez, A.Y., Erlichman, J. S. (2014). The potential of cerium oxide nanoparticles for neurodegenerative disease therapy. *Nanomedicine*; 9: 1437–40.
- Ferrans, V. J. (1983). Anthracycline cardiotoxicity. *Adv Exp Med Biol*;161:519-532.
- Gao, Y., Gao, F., Chen, K., Ma, J. (2014). Cerium oxide nanoparticles in cancer. *OncoTargets and Therapy*, 835.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biol Med*,46(s):531-42.

- Hamzeh, M., Amiri, F. T., Beklar, S. Y., Hosseinimehr, S. J. (2018). Nephroprotective effect of cerium oxide nanoparticles on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity via antiapoptotic and antioxidant properties in BALB/c mice. *Marmara pharmaceutical journal*; 22(2): 180-189.
- Haynes, W. M. (2017). Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 20643.
- Haynes, V. N., Ward, J. E., Russell, B. J., Agrios, A. G. (2017). Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms-Current knowledge and suggestions for future research. *Aquat Toxicol* 185, 138-148.
- Hisaoka, K. K., Battle, H. I. (1958). The Normal Developmental Stages Of The Zebrafish, *Branchydanio rerio*. 102,311-327 *India. Misc. Publ., Occas. Pap.* 175 (366), 234-259.
- Igartua, D. E., Azcona, P. L., Martinez, C. S., del Valle Alonso, S., Lassalle, V. L., Prieto, M. J. (2018). Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Jayachandra, R., Zhao, H., Cheng, Z., Luo, L., Sun, T., & Tan, W. (2019). Synthesis of Isosteviol analogues as potential protective agents against Doxorubicin-induced cardiomyopathy in zebrafish embryos. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.05.033.
- Jemec, A., Djinovi, C.P., Tisler, T. (2012). Effects of four CeO<sub>2</sub> nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish *Danio rerio* and crustacean *Daphnia magna*. *J Hazard Mater*; 219-220:213-20.
- Johal, M. S. (2011). Understanding Nanomaterials. *CRC Press by Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA*, 328 pages.
- Johnston, B. D., Scown, T. M., Morger, J., Cumberland, S. A., Baalousha, M., Linge, K., Van Aerle, R., Jarvis, K., Lead, J.R., Tyler, C.R. (2010). Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, and ZnO to Fish. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 1144-1151.
- Ju-nam, Y., Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, 400: 396-414.
- Kargozar, S., Baines, F., Hoseini, S. J., Hamzehlou, S., Darroudi, M., Verdi, J., Hasanzadeh, L., Kim H.W. and Mozafari M. (2018). Biomedical applications of nanocerium: new roles for an old player. *Nanomedicine*, 13(23), 3051-3069.
- Kelly, S. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., Levin, E. D., (1998). Oxidative Stress in Toxicology Established Mammalian and Emerging Piscine Model System. *Environ. Health Persp.* 106 375-384.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the

- environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27, 1825-1851.
- Krupp, F., June, C. H. (2005). Let's Get Nanotech Right, *The Wall Street Journal*, B2, 14.
- Krysanov, E. Yu., Demidova, T. B. (2012). The Effect of Low Concentrations of Nanocrystalline Cerium Dioxide on the Embryotoxicity of Doxorubicin for Fish. *Doklady Akademii Nauk*, Vol. 443, No. 4, pp. 523–525.
- Lawrence, C., (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, *Aquaculture* 269 1–20.
- Lee, S. W., Kim, S. M., Choi, J. (2009). Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28: 86–91.
- Li, X., Kondoh, M., Watari, A., Hasezaki, T., Isoda, K., Tsutsumi, Y., Yagi, K. (2011). Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *International Journal of pharmaceutical sciences*. 282-286.
- Lide, D. (2007). CRC Handbook of Chemistry and Physics. National Institute of Standards and Technology. *CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL. USA*.88th. 2640.
- Lin, W., Huang, Y. W., Zhou, X. D., MA, Y. (2006). Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. *International Journal of Toxicology*, 25: 451–457.
- Liyang, H. E., Yumin, S. U., Lanhong, J., Shikao, S. H. I. (2015) . Recent advances of cerium oxide nanoparticles in synthesis, luminescence and biomedical studies: a review. *Journal Ofrare Earths*, 33(8), 791-799.
- Malavasi, L., Fisher, C.A.J., Islam, M. S. (2010). Oxideion and proton conducting electrolytematerials for clean energy applications: structural and mechanistic features. *Chemical Society Reviews*. 39(11): 4370–4387.
- Mazzetti, A.P., Fiorile, M.C., Primavera, A., Lo Bello, M. (2015). Glutathione transferasesand neurodegenerative diseases. *Neurochem int.*,82:10-8.
- Menna, P., Salvatorelli, E., Minotti, G. (2008). Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicology*; 21: 978-989.
- Menon, A. G. K., (1999). Check list fresh water fishes of India. *Rec. Zoological Survey of india*. Occ pp. no:175-1-366.
- Molinari, A., Calcabrini, A., Crateri, P., Arancia, G. (1990). Interaction of anthracyclinic antibiotics with cytoskeletal components of cultured carcinoma cells (CG5). *Experimetal Molecular Pathology.*, 53: 11–33.
- Myers, C. E., McGuire, W. P., Liss, R. H. (1977). Adriamycin: The role of the lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*; 197: 165-167.

- Nelson, B. C., Johnson, M. E., Walker, M. L. (2016).. Antioxidant cerium oxide nanoparticles in biology and medicine. *Antioxidants*; 5:15.
- Niki, E. (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem Phy Lipids*; 44: 227- 253.
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L., Wang, X., Kolattukudy, P. (2007). Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 73(3), 549-559.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823-839.
- Ozmen, M., Gungordu, A., & Geckil, H. (2020). Ecotoxicity of Nanomaterials in Aquatic Environment. In D. Thangadurai, J. Sangeetha, & R. Prasad (Eds.), *Nanotechnology for Food, Agriculture, and Environment* (pp. 351-377): Springer, Cham.
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R. (2008). Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive a case study. *Inhal Toxicology*; 20: 547–66.
- Park, E. J., Choi, J., Park, Y. K., Park, K. (2008). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245: 90–100.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinical Chimica Acta*, 333, 19-39.
- Prieto-Alamo, M. J., Abril, N., Pueyo, C., (1993). Mutagenesis in *Escherichia coli* K-12 Mutants Defective in Superoxide Dismutase or Catalase, *Mutat. Res- Fund. Mol. M.* 14 237-244.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sciences*, 200, 26–30.
- Rao, C. N. R., Müller, A., Cheetham, A. K. (2007). Nanomaterials Chemistry. *Federal Republic of Germany*; 18-31.
- Roberta, P., Elena M. S., Carmelo, I., Fabiano, C., Maria T. R., Sara, I., Maria V. B. (2021). Toxicological assessment of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on early development of zebrafish. *Toxicology Research*, 10(3), 570–578.
- Rosenkranz, P., Fernandez-Cruz, M. L., Conde, E., Ramirez- Fernandez, M. B., Flores, J. C., Fernandez, M., Navas, J. M. (2012). Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology. *Toxicology in vitro*, 26: 888–896.
- Rundle, A., Robertson, A. B., Blay, A. M., Butler, K.M.A., Callaghan, N. I., Dieni, C. A. MacCormack, T. J. (2016). Cerium oxide nanoparticles exhibit minimal cardiac and cytotoxicity in the freshwater fish *Catostomus commersonii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 181–182: 19– 26.
- Sack, M., Alili, L., Karaman, E., Das, S., Gupta, A., Seal, S., Brenneisen, P. (2014).

Combination of Conventional Chemotherapeutics with Redox-Active Cerium Oxide Nanoparticles – A Novel Aspect in Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(7), 1740–1749.

- Sangomla, S., Saifi, M. A., Khurana, A., Godugu, C. (2018). Nanoceria ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity: Possible mitigation via reduction of oxidative stress and inflammation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47, 53-62.
- Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A., Syed, A. F. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 544–568.
- Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health., *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*. Chapter 1: 1-37.
- Sencer, E., Orhan, Y. (2005). Klinik Beslenme. *İstanbul Medikal Yayıncılık*; 166-170, 176-187, 208- 212, 435-447.
- Shinde, A., Ganu, J., Naik, P. (2012). Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci*. 1(2): 63-66
- Sies, H. (1991). Oxidative stres: From basic research to clinical application, *Am.J.Med.*, 91.3.31-38.
- Singal, P. K., Iliskovic, N., Li, T., Kumar, D. (1997). Adriamycin cardiomyopathy: *pathophysiology and prevention*. *FASEB J*; 11: 931-936.
- Smith, C., Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., (2007). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews* 83 (1) 13–34.
- Spence, R., Smith, C. (2006). Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology*. 17, 779–783.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34.
- Stamler, J. S., Meissner, G. (2001). Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *American Physiological Society Journals*; 81-1-209-237.
- Sun, C., Hui, R., Roller, J. (2010). Cathode materials for solid oxide fuel cells: a revive. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14(7), 1125-1144.
- Şener, G., Yeğen, B. Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*; 22: 5-13.
- Takemura, G., Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress Cardiovascular Diseases*; 49: 330-352.
- Terada, T. (2005). Role of glutathione S-transferase in lens under oxydative stres. *J. Health Sci*. 51 263-271.



- Thomas, M. J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*35.21-29.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. Journal of Biochemistry cell Biology.* ; 39;44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* ; 160;1-40.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulaen, P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol and Pharmacol.*13 57-149.
- Van hoecke, K., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., De Schampelaere, K.A.C., Elsaesser, A., Meeren, P.V.D., Barnes, C., Mckerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D. ( 2009). Fate and Effects of CeO<sub>2</sub> Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.*, 43: 4537–4546.
- Vaseem, M., umar, A., Hahn, Y.B. (2010). ZnO nanoparticles: growth, properties and applications. Metal Oxide Nanostructures and their Applications. *American Scientific Publishers, Los Angeles, USA*, 1–36.
- Vengerovski, A.T., Baturina, N.O., Saratikov, A.S. (1996). Role of lipid peroxidation in the mechanism of proliferation of hepatic fibrous tissue in experimental chronic hepatitis. *Patol. Physiol. Eksp.* 1996; 2: 37-39.
- Westerfield, M. *The Zebrafish Book* (2007). 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press.
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J. (2005). Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75–83
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., & Hammock, B. D. (2008). Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 117–178
- Yang, X., Pan, H., Wang, P., Zhao, F. J. (2017). Particle-specific toxicity and bioavailability of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Hazardous Materials*, 322(Pt A):292-300.
- Zhang, H. Y., Ji, Z. X., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., Pokhrel, S., Lin, S. J., Wang, X., Liao, Y. P., Wang, M. Y., Li, L. J., Rallo, R., Damoiseaux, R., Telesca, D., Madler, L., Cohen, Y., Zink, J. I., Nel, A. E. (2012). Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation. *ACS Nano* 6, 4349-4368.
- Zhang, X., Sun, H., Zhang, Z. (2007). Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*. vol. 67, no. 1, pp.160-166.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Muhammed Salih AKGÜL

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Ön Lisans** : 2003, Marmara Üniversitesi, M.Y.O, Tıbbi Laboratuvar Bölümü
- **Lisans** : 2010, Anadolu Üniversitesi, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümü
- **Lisans** : 2011, Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Formasyon**: 2012, Fırat Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi

### MESLEKİ DENEYİM:

- 2011- Sağlık Bakanlığında Biyolog olarak görev yapıyor.