

Bakır Oksit Nanopartikülü Etkisinde Kalan Memelilerde (*Rattus norvegicus* var. *albinos*) Bazı Metabolik Tepkilerin İncelenmesi

Esin G. CANLI

Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Sarıçam Adana /Türkiye

<https://orcid.org/0000-0002-0132-3712>

✉: egcanli@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, dişi sıçanlara 14 gün boyunca oral gavaj ile farklı dozlarda (kontrol (0), 0.5, 5, 50 mg/kg/gün) CuO nanopartikülü (NP) verildi. Bunu takiben böbrek, beyin ve ince bağırsak dokularında ATPaz aktiviteleri ve beyin dokusunda asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ölçüldü. Ayrıca, karaciğerde farklı glutatyon formları (toplam GSH, rGSH, GGSG) ve lipid peroksidasyonu ürünü olan TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri) düzeyleri de ölçüldü. Diğer yandan, dokularda CuO NP birikimi bir transmisyon elektron mikroskobu (TEM) yardımıyla görüntüledi. Sonuçlar, beyin AChE aktivitesinde anlamlı ($P<0.05$) azalmalar olduğunu göstermiştir. Beyin ve ince bağırsak ATPaz aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermezken ($P>0.05$), böbrek ATPaz aktivitesinde istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı azalışlar olmuştur. Farklı glutatyon formlarının düzeyleri en yüksek doz haricinde anlamlı bir şekilde değişmemiştir. Benzer şekilde, TBARS düzeyleri sadece en yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) artışlar göstermiştir. TEM görüntüleri CuO NP'lerin sıçan dokularda birikebileceğini göstermiş olup, bu görüntüler sıçanlarda enzimatik ve enzimatik olmayan biyobelirteçlerde meydana gelen değişikliklerin dokularda CuO NP birikmesinden kaynaklandığını vurgulamıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 15.05.2019

Kabul Tarihi : 08.11.2019

Anahtar Kelimeler

Metal

Bakır oksit

Nanopartikül

Memeli

Biyomarkır

TEM

Investigation of Some Metabolic Responses in Mammals (*Rattus norvegicus* var. *albinos*) Exposed to Copper Oxide Nanoparticles

ABSTRACT

In this study, different doses (control (0), 0.5, 5, 50 mg/kg b.w./day) of CuO nanoparticle (NP) were administered to female rats via oral gavage for 14 days. Following the exposures, the activities of ATPases in the kidney, brain and small intestine and activity of acetylcholinesterase (AChE) in the brain were measured. Levels of different glutathione forms (total GSH, rGSH, GGSG) and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) were also measured in the liver of rats. The accumulation of CuO NPs in the tissues were demonstrated following capture of tissue images by a transmission electron microscope (TEM). Data demonstrated that activity of AChE in the brain decreased significantly ($P<0.05$). ATPase activity in the brain and small intestine did not change significantly ($P>0.05$), though there were significant decreases ($P<0.05$) in ATPase activity in the kidney. Levels of glutathione forms did not change significantly, except the highest dose. Similarly, levels of TBARS increased significantly ($P<0.05$) at the highest dose. TEM images showed that CuO NPs were able to accumulate in the tissues, emphasizing occurred alterations in enzymatic and non-enzymatic biomarkers were due to CuO NP accumulation in the tissues.

Research Article

Article History

Received : 15.05.2019

Accepted : 08.11.2019

Keywords

Metal

Copper oxide,

Nanoparticle

Mammale

Biomarker

TEM

GİRİŞ

Son yıllarda ağır metallerin nanoteknolojide kullanımları hız kazanmıştır. Nanopartikül denen bu maddeler 1-100 nm arasında olup, çeşitli, metallerle (Ag, Cu, Ti, Zn vb.) oluşturulan özgün kristallerdir. Metal-oksit nanopartikülleri üstün fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde nanoteknoloji alanında aranan maddeler haline gelmiştir. Nanopartikülleri özgün yapan özellikler arasında geniş yüzey alanlarına sahip olmaları, özgün yüzey yapıları, şekilleri, fonksiyonel grupları, reaktiviteleri, elektronik ve kristal özellikleri sayılabilir (Handy ve Shaw, 2007; Bahadar ve ark., 2016). Bu özellikleri sayesinde nanopartiküller ilaç endüstrisi, beyaz eşyalar, güneş kremi, besin endüstrisi, dokuma sanayi, diş macunu, filtreler, nemlendirici, çocuk oyuncakları, paketleme ürünleri ve elektronik cihazlar gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Diğer yandan, bazı metal nanopartikülleri (AgO ve CuO) çeşitli antimikrobiyal ürünlerde istenmeyen mikroorganizmaların üremelerini durdurmak için de sıklıkla kullanılmaktadır (Handy ve Shaw, 2007; Asharani, ve ark., 2008; Schrand ve ark., 2010). Metallerin nano teknolojik amaçlar için kullanımı önemli ekonomik sonuçlar ve yenilikler sunarken, içermiş oldukları toksik metaller sebebiyle çevreye ve insanlara yapacakları olumsuz etkiler de çevrecileri düşündürmektedir (Auffan ve ark, 2011; Canli ve ark. 2019a; Canli ve ark., 2019b). Bu nedenle, nanopartiküllerin çevresel risklerinin ve toksisitelerinin farklı hayvan gruplarında erken belirlenmesi daha sonra meydana gelebilecek büyük felaketlerin önlenmesi bakımından önemlidir.

Yapılan çalışmalar nanopartiküllerin hem sucul, hem de karasal hayvanların biyolojik zarlarından geçerek kan yoluyla taşınabildiğini ve hedef dokularda birikerek toksik etkiler yaptığını göstermiştir (Hagen ve ark., 2007; De Jong ve Borm, 2008; Canli ve ark., 2018; Canli ve ark. 2019a; Canli ve Canli, 2019). Bu nedenle, her yaşta insan nanopartiküllere maruz kalabilir ve bunun sonucu olarak hayati organlar olumsuz yönde etkilenebilir. NP'ler bir kere vücuda girdikten sonra, yarılanma ömürleri uzun olduğundan vücuttan atılmaları oldukça zordur. Ayrıca, aynı metal NP'leri karşılaştırıldığında daha küçük boyutlu olan NP'lerin büyüklere oranla daha toksik oldukları gösterilmiştir (Yang ve Watts, 2005; Mostafalou ve ark., 2013). Nanopartiküllerin metal içeriği toksisiteleri bakımından önemlidir. Örneğin ZnO, Al₂O₃, TiO₂ nanopartiküllerinin farelerde farklı düzeylerde doku hasarlarına neden olduğu, benzer şekilde farklı düzeylerde oksidatif strese yol açtıkları gösterilmiştir (Shrivastava ve ark. (2014). Benzer şekilde, Canli ve ark. (2017) oral yolla verilen nanopartiküllerin (Al₂O₃, CuO ve TiO₂) sıçanların serum değerlerinde farklı biyokimyasal etkilere neden olduklarını göstermişlerdir. Gerçekte, çevreye bir

şekilde yayılan nanopartiküller bütün organizmaları değişik düzeylerde etkileyebilmektedir (Bondarenko ve ark. 2013). Araştırmacılar farklı nanopartiküllerin (AgO, CuO, ZnO) algler, mantarlar, protozoanlar, kabuklular, nematodlar, balıklar ve memeliler üzerinde toksik etkileri olduğunu gösterirken, organizmaların etkilenme düzeylerinin de farklı olabileceğini vurgulamışlardır.

Na-K-ATPaz hücre zarında bulunan bir enzim olup 2 K iyonunun hücre içine girişini ve diğer yandan 3 Na iyonunun hücre dışına atılmasını katalizleyerek ozmoregülasyonda önemli görevleri olan bir enzimdir. İyon taşınımı ozmotik gradientin tersi yönde yapıldığından (aktif taşıma) çok miktarda ATP harcanmış olur. Şöyle ki, hücrelerin ihtiyaç duyduğu toplam enerjinin yaklaşık %30 u Na,K-ATPaz tarafından kullanılmaktadır. Mg-ATPaz ise sitoplazmada ve mitokondride bulunur ve hücre içindeki Mg iyon konsantrasyonunu düzenler ve mitokondride oksidatif fosforilasyonda kullanılır (Howarth ve ark., 2012). ATPaz grubu enzimlerin çevresel kirleticilere karşı duyarlı oldukları gösterilmiştir (Guo ve ark., 2013; Singh ve ark., 2013; Canli ve Canli, 2017; Canli ve ark. 2019a; Canli ve Canli, 2019b). AChE sinir sisteminde görev alan ve impuls iletimi sırasında en fazla aktivite gösteren bir enzimdir. Bu enzimin görevi nörotransmitter madde olan asetilkolinin asetat ve koline parçalanmasının sağlanmasıdır. Yapılan çalışmalar, bu enzimin de çevre kirleticileri tarafından olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir (Durmaz ve ark., 2006; Piner and Uner, 2012; Silva-Herdade ve Saldanha, 2013; Yılmaz ve ark. 2015; Canli ve ark., 2019a; Canli ve ark., 2019b).

Enzimatik biyobelirteçler gibi, enzimatik olmayan biyobelirteçler de nanopartiküller dahil çevre kirleticilerin etkilenmektedir. En çok kullanılan biyobelirteçler arasında metabolizmada etkili bir antioksidan olduğundan farklı glutatyon ürünleri (GSSG, rGSH, tGSH) sayılabilir. Glutatyon doğal olarak veya kirletici etkisiyle oluşan serbest radikalleri yok eden indirgeyici bir tripeptit olarak bilinmektedir (Pena-Llopis ve ark 2001; Hidalgo ve ark, 2002; Kanak ve ark, 2014; Canli ve ark 2017; Canli ve ark, 2019b). Organizmalarda normal şartlarda antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki bir denge vardır. Bu dengenin antioksidanların lehine bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelir (Winston, 1991). Nanopartiküllerin oksidatif strese neden olduğuna ilişkin çalışmalar mevcut olmasına karşın, yeterli bilgi henüz elde edilememiştir (Canli ve ark. 2019b). Syama ve ark. (2013) nanopartiküllerin memelilerde oksidatif strese yol açtığını ve antioksidan sisteminin nanopartiküller tarafından olumsuz etkilendiğini belirtmişlerdir. Hücre zarları da serbest radikaller nedeniyle hasar görebilmektedir. Bunun sonucu zar lipidlerden elektronlar çalınmakta

ve böylece lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Çevre kirleticilerinin lipid peroksidasyonuna neden olup olmadığını belirlemek için MDA (malondialdehit) veya TBARS seviyeleri ölçülmektedir. Böylece, bu veriler organizmanın yaşadığı oksidatif stres için önemli belirteç olmaktadır (Wang ve ark., 2009; Lei ve ark., 2015; Hong ve ark., 2015; Yılmaz ve ark. 2017; Canli ve ark., 2019b).

Bu çalışma CuO NP etkisinde kalan albino Wistar sıçanlarının farklı sistemlerinin vermiş olduğu tepkiler belirlenmiştir. Bunun için, yetişkin dişi sıçanlar 14 gün boyunca farklı dozlarda NP'lere (0, 0.5, 5, 50 mg/kg/gün) maruz bırakılmış ve farklı metabolik sistemlere ait enzimatik ve enzimatik olmayan biyobelirteç değerleri ölçülmüştür. Diğer yandan, CuO NP'lerin dokularda birikimi TEM ile görüntülenerek meydana gelen toksik etkilerin NP etkisi ile olduğu vurgulanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Dişi albino sıçanlar (*Rattus norvegicus* var. albino) Çukurova Üniversitesi DETAUM Merkezinden temin edildi ve laboratuvar şartlarına uyum sağlamaları için bir hafta süreyle 12 saat aydınlatması ve 22 ± 1.5 °C sıcaklığa sahip (nem % 50) deney odasında bekletildi. Deneylerin yapılabilmesi için Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 26.09.2017 tarih ve 8 sayılı toplantı kararı ile izin alınmıştır. Deneylerde ağırlıkları 195-206 g arasında değişen yetişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçan ağırlıkları kontrol ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark ($P>0.05$) göstermemiştir.

Deneylerin Yapılışı

Deneyler biri kontrol grubu ve üçü CuO NP grupları olmak üzere 4 grup halinde yürütülmüştür. Hayvanlar hem adaptasyon süresince, hem de deneyler sırasında normal sıçan yemi ile beslendi ve kısıtlamasız bir şekilde su erişimi sağlandı. Deneylerde kullanılan CuO nanopartikülü Sigma-Aldrich (Germany) şirketinden temin edilmiştir. Nanopartikül deneylerde kullanılmadan önce 20 dakika süre ile buz içerisinde sonikasyona (Bandelin HD2200, Germany) maruz bırakılmıştır. Deneylerde kullanılacak son NP derişiminin (0.5, 5, 50 mg/kg/gün) sağlanması için bir stok hazırlanmıştır. Bu derişimlerin sıçanlar için aynı deneysel şartlar altında on dört gün süre sonunda lethal olmadığı daha önceki çalışmamızda gösterilmiştir (Canli ve Canli, 2017). Sıçanlara bakır NP oral olarak (200 µl su ile) verilmiş olup, kontrol hayvanlar sadece aynı miktarda su almışlardır. On dört gün süren deney sonrası bütün sıçanlar güçlü bir anestezi ile (ketasol 10%, Harson Lab. India) öldürüldü ve dokuları alınarak -80 °C derin dondurucuda (Esco UUS-480A) bir ay kadar saklandı.

Dokuların Homojenizasyonu

Analizi yapılacak olan doku derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra buzun çözülmesi beklendi ve 90 saniye süre ile buz içinde homojenizde (9500 rpm) edildi. Homojenizasyon tamponu (100 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA) kullanılan doku ağırlığına göre (1:10 w/v) kullanıldı. Homojenize edilen dokular daha sonra soğutmali (+4 °C) santrifüjde (Hettich Universal 30 RF) 30 dakika süre ile 10,000 g de santrifüj edildi. Üst kısmında bulunan kısım (supernatant) dikkatli bir şekilde başka tüplere aktarılarak bütün analizlerde kullanıldı.

Biyobelirteç Analizleri

Dokulardaki ATPaz ($\mu\text{mol Pi/mg/protein/h}$) ve AChE (U/mg protein) aktiviteleri sırasıyla Atkinson ve ark. (1973) ve Ellman ve ark. (1961) metotlarına göre yapıldı. Dokulardaki TBARS (U/mg protein) ve glutasyon (U/mg protein) düzeyleri ise sırasıyla Ohkawa ve ark. (1979) ve Griffith (1980) metotları kullanılarak yapıldı. Bütün dokularda protein analizleri ise Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) kullanılarak yapıldı ve protein değerleri biyomarkır değerlerini normalize etmek için kullanıldı.

Nanopartikül Karakterizasyonu ve TEM analizleri

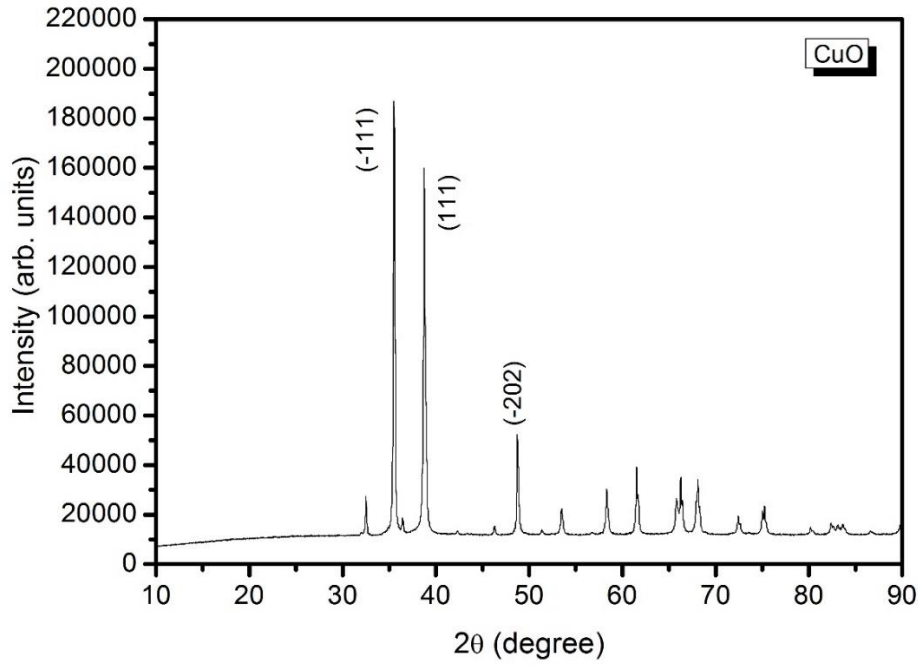
Deneylerde kullanılan CuO NP'lerin boyutu (~40 nm), saflığı (>99 %), yüzey alanı (>20 m²/g) ve yoğunluğu (6.50 g/cm³) olarak belirtilmiştir. Daha detaylı analizler için TEM, XRD ve EDX cihazları kullanılmıştır. Bakır NP'lerin geçirimli TEM görüntüsü Jeol JEM-1010 TEM (80kW) (GATAN 782 ES500W Erlangshen kameralı) cihazı ile elde edilmiştir (Şekil 1a). XRD analizleri Rigaku RadB SmartLab marka bir diffraktometre cihazı kullanılarak (CuK α 1, $\lambda=1.5405$ Å, 30 kV, 15 mA, $2\theta=10^\circ-90^\circ$, scanning rate 2°/min) yapılmıştır. XRD analiz verilerine göre CuO NP'leri polikristal yapıda ve monoklinik fazdadır (Şekil 1b). EDX analizleri ise FE-SEM (taramalı elektron mikroskobu) (Zeiss/Supra 55 VP) ile elde edilmiştir (Şekil 1c). Buna göre CuO NP'lerinde Cu atomları %48.74 olarak bulunmuştur. Ağırlık olarak hesaplandığında CuO NP'lerinde Cu atomları %79.06 olarak bulunmuştur. Geri kalan kısmın sadece oksijen atomlarından ibaret olduğu belirlenmiştir. Dokularında nanopartikül birikiminin belirlenmesi için de aynı TEM cihazı kullanılmış olup, doku görüntüleri Şekil 2-5 de verilmiştir.

İstatistiksel Analizler

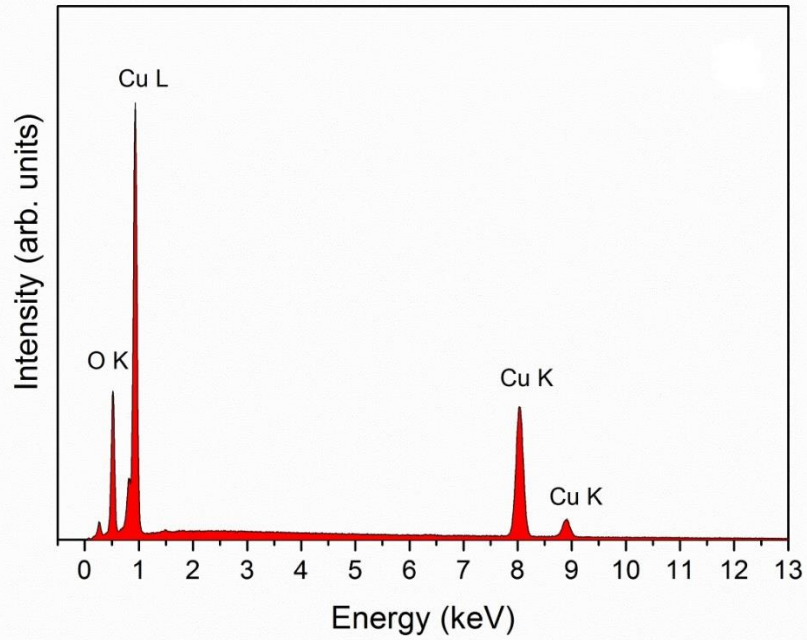
Biyomarkır verilerinin analizinde SPSS istatistiksel paket program kullanılmıştır (SPSS 20, Chicago, IL, ABD). Veri dağılımına bağlı olarak istatistiksel karşılaştırmalar için One-way ANOVA veya Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli düzeylerde fark ($P<0.05$) bulunan veriler, farklılığa neden olan

grupları belirlemek için bir post-hoc testi ile yeniden analiz edilmiştir. Bütün biyomarkır verileri şekil 6-9 da verilmiştir. Bu veriler 6 sıçandan elde edilen

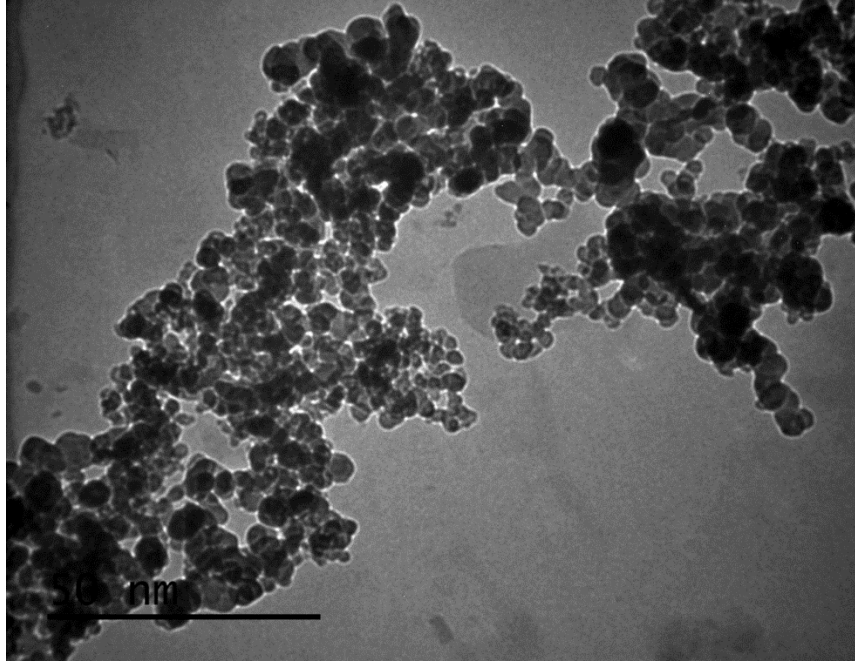
rakamlar (ortalama ± standart hata) olup, kontrolden anlamlı düzeyde ($P<0.05$) farklı olanlar işaretlenmiştir.



1a.



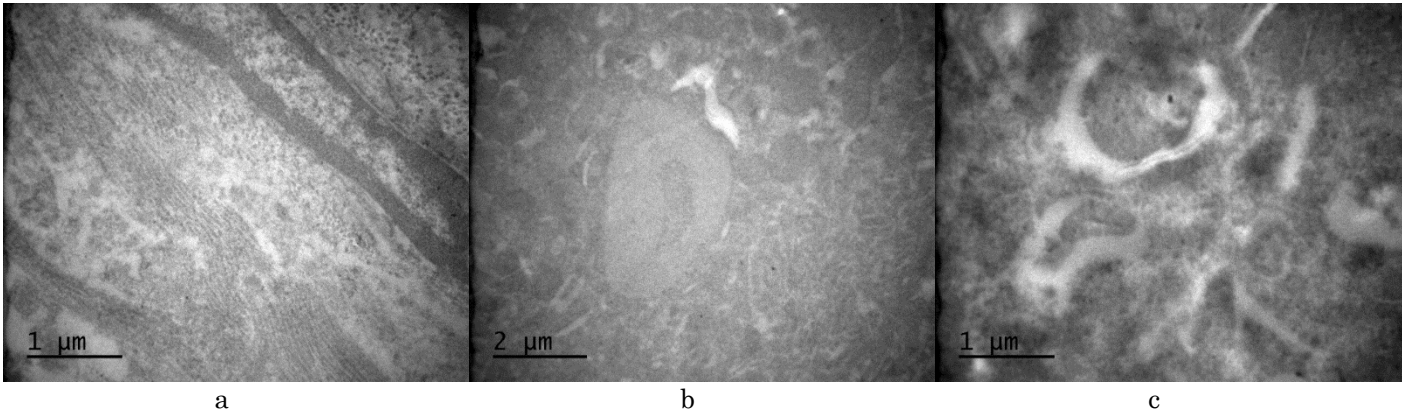
1b.



1c.

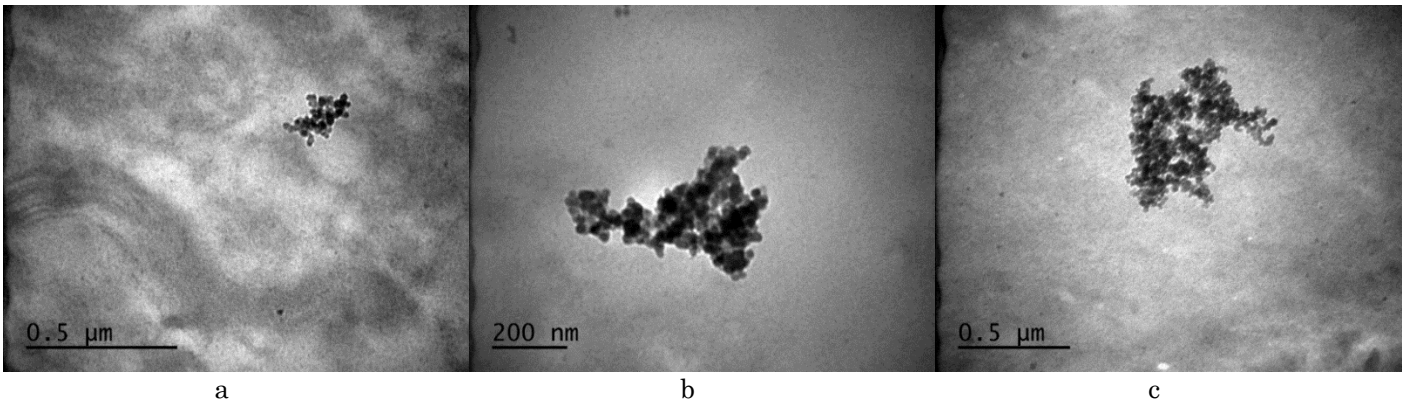
Şekil 1. CuO nanopartikülünün karakterizasyonu. CuO nanopartikülünün XRD deseni (a), EDX spektrumu (b) ve TEM görünümü (c) verileri.

Figure 1. Characterization of CuO nanoparticle. XRD pattern (a), EDX spectra (b) and TEM image (c) of CuO nanoparticle.



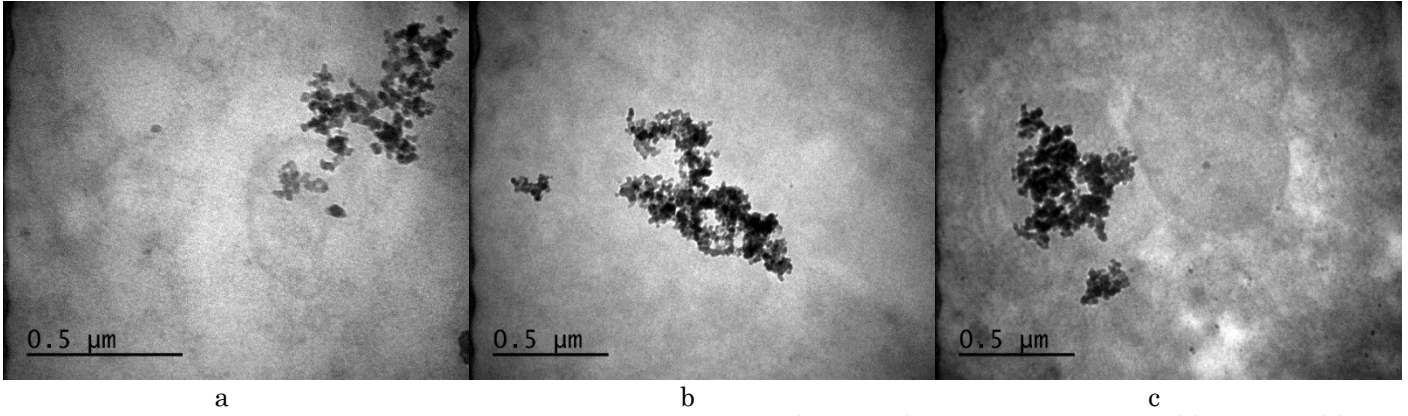
Şekil 2. Kontrol sıçanda beyin (a), böbrek (b) ve karaciğer (c) dokusunun TEM görüntüleri.

Figure 2. TEM images of brain (a), kidney (b) and liver (c) of control rats.

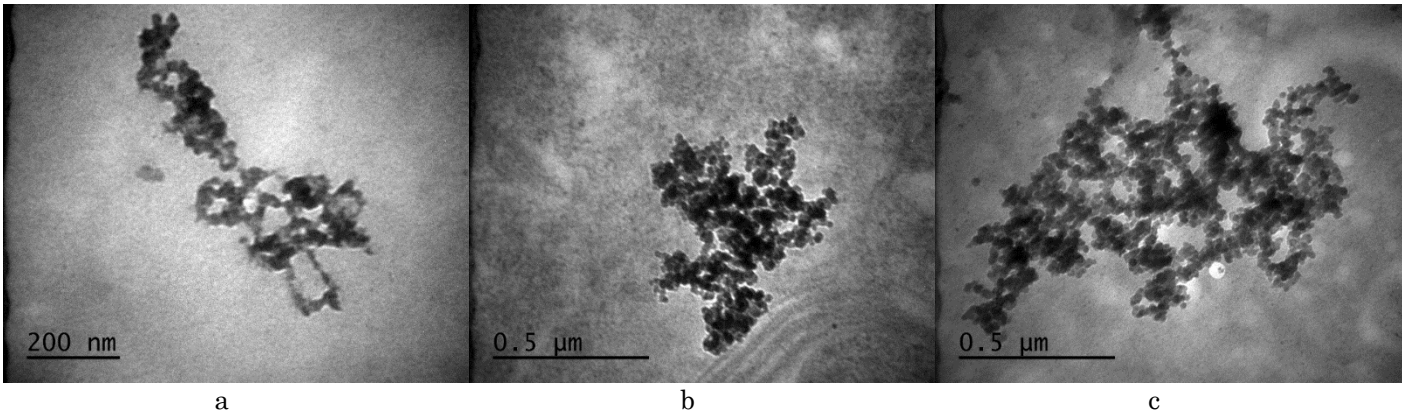


Şekil 3. On dört gün süresince oral olarak en düşük dozda CuO NP (0.5/kg/gün) alan sıçanda beyin (a), böbrek (b) ve karaciğer (c) dokusunda nanopartikül birikimini gösteren TEM görüntüleri.

Figure 3. TEM images of brain (a), kidney (b) and liver (c) tissues of rats received the lowest dose of CuO NP (0.5 mg/kg/day) for 14 days.



Şekil 4. On dört gün süresince oral olarak orta dozda CuO NP (5/kg/gün) alan sıçanda beyin (a), böbrek (b) ve karaciğer (c) dokusunda nanopartikül birikimini gösteren TEM görüntüleri.
Figure 4. TEM images of brain (a), kidney (b) and liver (c) tissues of rats received the medium dose of CuO NP (5 mg/kg/day) for 14 days.



Şekil 5. On dört gün süresince oral olarak en yüksek dozda CuO NP (50/kg/gün) alan sıçanda beyin (a), böbrek (b) ve karaciğer (c) dokusunda nanopartikül birikimini gösteren TEM görüntüleri.
Figure 5. TEM images of brain (a), kidney (b) and liver (c) tissues of rats received the highest dose of CuO NP (50 mg/kg/day) for 14 days.

BULGULAR ve TARTIŞMA

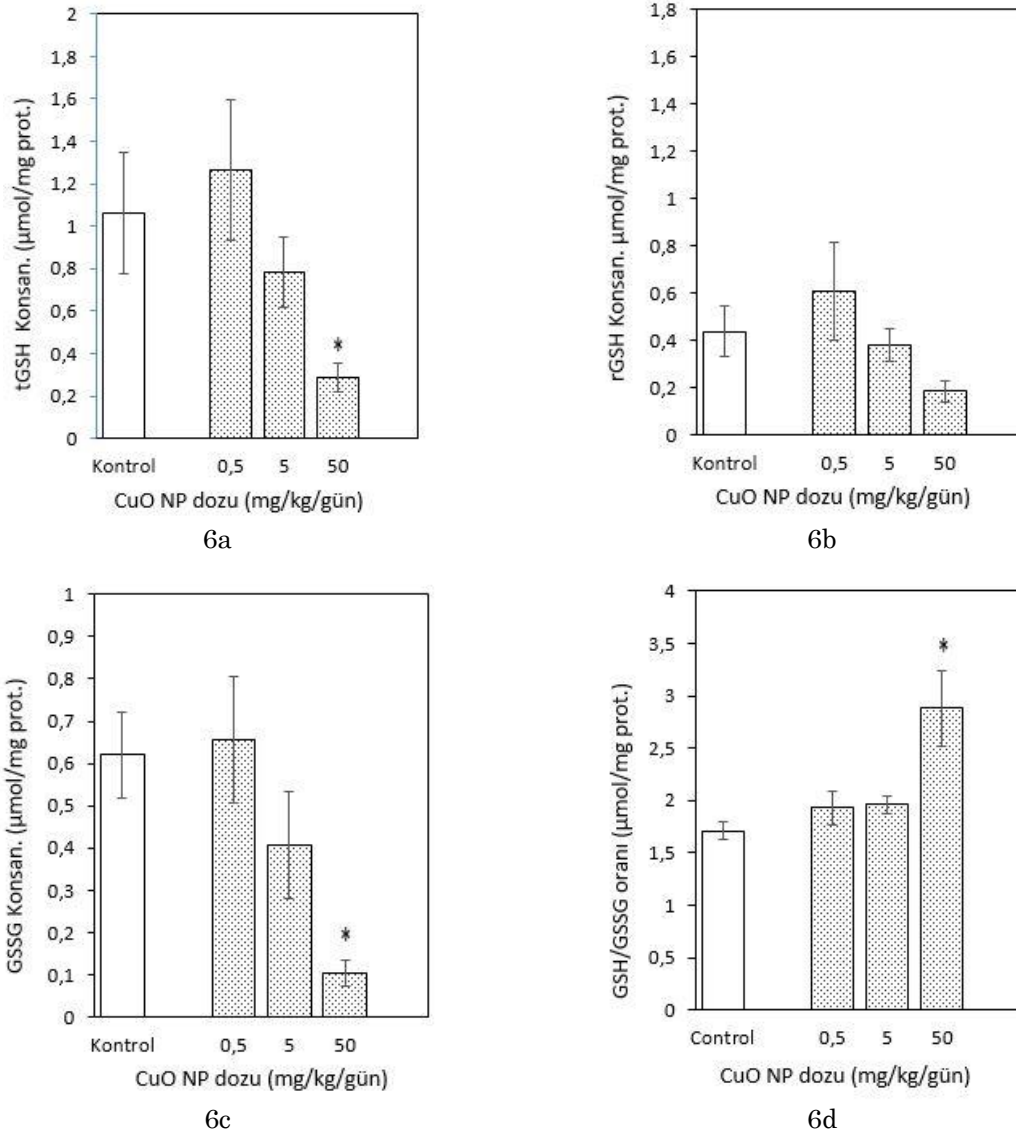
Bakır oksit NP dozlarının (0, 0.5, 5, 50 mg/kg/gün) hiçbiri 14 gün içinde sıçanları öldürmemiş olup, aynı zamanda deneyler sırasında görünür bir sağlık sorunu da (örneğin göz rengi, beslenme alışkanlığında değişim, aktivite azlığı veya fazlalığı) olmamıştır. Bu nedenle, çalışılan CuO NP dozları, 14 gün oral uygulama için subletal olarak kabul edilmiştir. TEM görüntülerine bakıldığında kontrol hayvan dokularında herhangi NP varlığına rastlanmazken, NP verilen sıçanların dokularında TEM görüntüleri doza bağlı olarak CuO NP varlığını göstermiştir (Şekil 2-5). Bu görüntülerden de görüleceği üzere dokulardaki CuO NP birikimi en düşük doza göre yüksek dozlarda daha yoğun olarak belirlenmiştir. Bu görüntüler oral yolla verilen CuO NP'lerin bağırsak duvarından geçtiğini ve damarlara geçip oradan kan yoluyla dokulara ulaşarak dokularda biriktiğini göstermektedir. Literatür verileri incelendiğinde bezer durumlara rastlanmıştır (Meena ve Paulraj, 2012; Shrivastava ve ark., 2013; Jovanovic, 2015; Canli ve ark., 2018; Tang ve ark., 2019; Canli ve ark., 2019b). Aynı metalin NP formu ile iyonik formu arasında

toksosite bakımından ciddi farklar olabileceği bildirilmiştir (Ema ve ark., 2016). Literatür verileri ayrıca NP toksisitesinin uygulama süresi ve dozundaki artışlarla artabileceğini göstermektedir (Janrao ve ark., 2014; Rizk ve ark., 2017; Chen ve ark., 2019).

Dokularda nanopartikül birikimi ve doz arasındaki pozitif ilişki genellikle biyomarkır düzeylerinde meydana gelen anlamlı değişimlere de yansımıştır. Biyomarkır tepkileri genellikle en yüksek dozda daha fazla görülmüştür. Örneğin karaciğer tGSH, rGSH ve GSSG düzeyleri sadece en yüksek dozda anlamlı azalmalar gösterirken, bunun sonucu olarak GSH/GSSG oranı da yine en yüksek dozda değişmiştir (Şekil 6a-d). Bilindiği gibi glutatyon bir tripeptit olup, serbest radikallere karşı iyi bir indirgen ve güçlü bir antioksidan olarak bilinmektedir (Hidalgo ve ark., 2002; Kanak ve ark., 2014; Canli ve ark., 2017). Bu nedenle, glutatyon düzeyinde meydana gelebilecek artış veya azalışların organizmanın yaşadığı oksidatif stresin göstergesi olabildiği çeşitli araştırmalarda vurgulanmıştır (Yu ve ark., 2014; Hu ve ark., 2015; Lei ve ark., 2015; Rizk ve ark., 2017; Canli ve ark., 2019a).

Bu durum NP'lerin enzimatik reaksiyonlara müdahale ederek veya enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak metabolizmada değişimlere neden olabildiğini göstermektedir. Literatür verileri TiO_2 , CuO , ZnO ve Al_2O_3 NP'lere maruz kalan memeli hayvanlarda serbest radikal artışı ile antioksidan sisteminin yetersizliği arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Buna tepki olarak hayvan metabolizması glutatyon miktarını artırarak oksidatif stresle mücadele etmeye

çalışmaktadır (Yu ve ark., 2014; Hu ve ark., 2015; Lei ve ark., 2015; Park ve ark., 2015; Rizk ve ark., 2017). Diğer yandan, literatür verileri glutatyon düzeylerinin tepkisinin hem artış, hem de azalış yönünde olabileceğini ve her iki durumda da organizmanın antioksidan sisteminin olumsuz etkilendiğini belirtmişlerdir (Rizk ve ark., 2017; Elnagar ve ark., 2018).



Şekil 6. On dört gün süresince oral olarak CuO NP alan sıçanların karaciğerinde toplam glutatyon (a), indirge glutatyon (b), okside glutatyon (c) ve toplam glutatyonun okside glutatyona oranı (d). Veriler 6 sıçanın ortalamasını göstermektedir. (Yıldızlar kontrol ve farklı dozlarda NP alan sıçanlar arasındaki anlamlı ($P<0.05$) farkları göstermektedir).

Figure 6. Levels of total glutathione (a), reduced glutathione (b), oxidized glutathione (c) and the ratio between reduced and oxidised glutathione (d) in the liver of rat orally received $CuONPs$ for 14 days. Data are the mean of 6 rats. Asterisks indicate significant ($P<0.05$) differences between control rats and rats received different doses of NPs).

Ozmoregülatör organlar olan böbrek ve ince bağırsağın CuO NP'lere olan tepkisi farklı yönlerde olmuştur. İncelenen dokular arasında sadece böbrek ATPaz aktiviteleri anlamlı ($P<0.05$) değişime uğramıştır (Şekil 7a-c). İlginç bir şekilde, daha önce yayınlanmış olan verilerimiz, sıçanların eritrositlerinde ATPaz

aktivitelerinin NP etkisinde ciddi azalmalar gösterdiğini vurgulamıştır (Canli ve Canli, 2017). Bezer sonuçları Li ve ark. (2008) beyaz tavşanlarda göstermişlerdir. Araştırmacılar NP'lerin eritrositlein yüzeyine adsorbe olduğunu ve özellikle zar enzimleri inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bilindiği gibi,

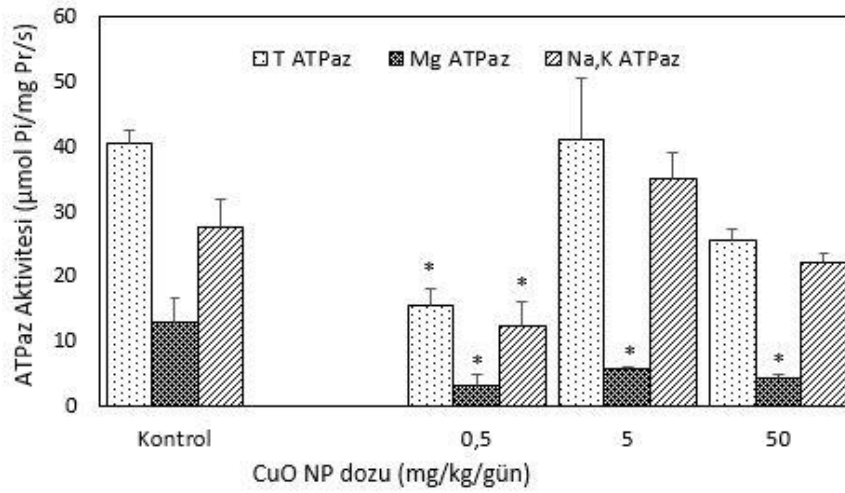
eritrositler kanda serbest dolaşan NP'lerle geniş yüzey alanları sayesinde karşı karşıya gelebilir ve bunun sonucu olarak NP'ler eritrositlerin hücre zarına bağlanarak iyon taşınmasını engelleyebilir. Böylece NP'lerin farklı dokularda farklı etkiler gösterebileceğini sonucu çıkarılabilir (Canli ve Canli, 2017). Kumari ve ark. (2012) Fe-NP verilen sıçanların beyin dokusunda Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Zhou ve ark. (2017) 90 gün süresince burun yoluyla titanyum NP (1-5 mg/kg/gün) verdikleri farelerde Na,K-ATPaz, Ca-ATPaz ve Mg-ATPaz aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğunu belirtmişlerdir. ATPaz aktivitelerinde olan azalmalar Hong ve ark. (2015) tarafından da gösterilmiştir. Araştırmacılar 2 ay süresince 2.5-10 mg/kg/gün dozlarındaki TiO₂ NP alan erkek farelerde Na,K-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğunu gösterirken, altın NP verilen sıçanların beyinde Na,K-ATPaz aktivitesinin % 100 arttığını, buna karşın Mg-ATPaz aktivitesinin ise değişmediğini belirtmişlerdir. Chichova ve ark. (2014), NP'lerin toksik etkilerinin, hücre zarlarından difüzyon kapasiteleri ile ilişkili olduğunu, mitokondrinin iç zarında olan Mg-ATPaz enziminin inhibe olabilmesi için buraya kadar ulaşma özelliğinde olması gerektiğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada, Mg-ATPaz aktivitesinde görülen azalmalar CuO NP'lerin mitokondri iç zarına kadar ulaşabildiğini vurgulamaktadır. Metal toksisitesinde olduğu gibi, nanopartiküllerin toksik etkileri araştırmada deneylerin sonuçları *in vitro* veya *in vivo* özelliklerine göre değişmektedir (Vasic ve ark., 2009). Benzer şekilde, Canli ve Stagg (1996) *in vivo* şartlar altında enzimlerin farklı davrandığını ve *in vitro* şartlarda görülen toksik etkilerin *in vivo* şartlarda görülmeyebileceğini vurgulamışlardır. Buna neden olarak, enzimlerin *in vivo* şartlarda turnover sayılarını artırabilmelerini göstermişlerdir. Bu nedenle, ATPaz grubu enzimler söz konusu olduğunda *in vivo* ve *in vitro* deneylerin sonuçlarının yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiğini belirtmişlerdir.

AChE enzimi her çeşit kas kasılması esnasında oluşan impuls sırasında nörotransmitter olarak görev yapan önemli bir enzim olup hem çevresel, hem de merkezi sinir sistemi için anahtar rolü olan enzimdir. Yapılan çalışmalar bu enzimin çevre kirleticilerine karşı oldukça hassas olduğunu göstermiştir (Frasco et ve ark., 2005; Yılmaz ve ark., 2015; Canli ve ark., 2019a). Memelilerde beyin AChE aktivitesinin nanopartikül etkisinden en fazla etkilenen enzim olduğu görülmektedir. Hem bu çalışmada, hem de daha önceki çalışmalarımızda (Canli ve ark., 2019a) NP'lerin sıçanlarda beyin AChE aktivitesini (Şekil 8) anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. AChE aktivitesinde görülen azalmalar çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

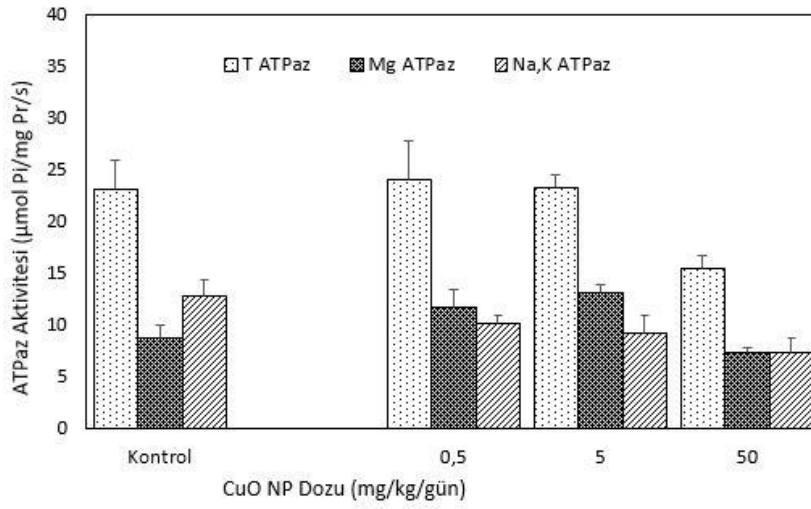
Singh ve ark., (2013) oral olarak yüksek dozda MnO NP verdikleri sıçanlarda AChE aktivitesinin anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, MnO NP'lerin aynı zamanda biyokimyasal, histolojik ve genetik değişimlere de neden olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde altın NP'ler (100 µg/kg) 24 saat içerisinde sıçanların beyin AChE aktivitesinde anlamlı azalmalara yol açtığını belirtmişlerdir. Kumari ve ark. (2012) demir NP verdikleri sıçanlarda eritrosit ve beyin AChE aktivitelerinde önemli değişimlerin olduğunu belirtirken, demir gibi düşük toksisiteye sahip bir metalin NP formunda daha toksik olabileceğini vurgulamışlardır. Demir gibi alüminyum metali de NP formunda memelilerin beyin AChE aktivitesini anlamlı olarak azaltabilmektedir (M'rad ve ark., 2018; Canli ve ark., 2019a). Literatür verileri ve bu çalışmanın sonuçlarına göre, NP etkisinde kalan memelilerde beyin AChE aktivitesi en fazla etkilenen biyomarkırlar olarak göze çarpmaktadır. Özellikle oral yolla alınmasına karşın enzim aktivitesinde anlamlı azalmaların olması insanlar için de bir alarm niteliğindedir. Çünkü insanlar günlük yaşamda nanoteknolojik ürünleri sıkça kullanmaktadır.

Karaciğer TBARS düzeyleri CuO NP etkisinde kalan sıçanlarda genelde bir artış görülmekle birlikte, sadece en yüksek CuO NP dozunda istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmüştür (Şekil 9). Literatür incelendiğinde memelilerde karaciğer TBARS ve MDA düzeyleri lipit peroksidasyonunu göstergesi olarak kullanılmaktadır (Rohner ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009; Yılmaz ve ark., 2015; 2017; Canli ve ark., 2019a). Oksidatif strese neden olan ksenobiyotiklerin aynı zamanda lipit peroksidasyonuna da neden olduğu bilinmektedir. Verilere bu açıdan bakıldığında, glutasyon düzeylerini etkileyen en yüksek CuO NP dozunun aynı zamanda TBARS düzeylerini de etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, en yüksek CuO NP dozunun hem oksidatif strese, hem de lipit peroksidasyonuna neden olduğunu söylemek mümkün gözükmemektedir (Lei ve ark., 2015; Hong ve ark., 2015). Bu çalışma CuO NP'lerin lipit peroksidasyonuna neden olarak muhtemelen zar yapısını bozduğunu göstermektedir. Wang ve ark. (2009) silica NP'lere maruz kalan insanların embriyonik hücrelerinde TBARS düzeylerinin arttığını gösterirken, lipit peroksidasyonuna dikkat çekmişlerdir. Benzer şekilde, alüminyum NP etkisinde kalan sıçanların karaciğerinde TBARS düzeylerinde artışlar olduğu gösterilmiştir (M'rad ve ark., 2018; Canli ve ark., 2019a).

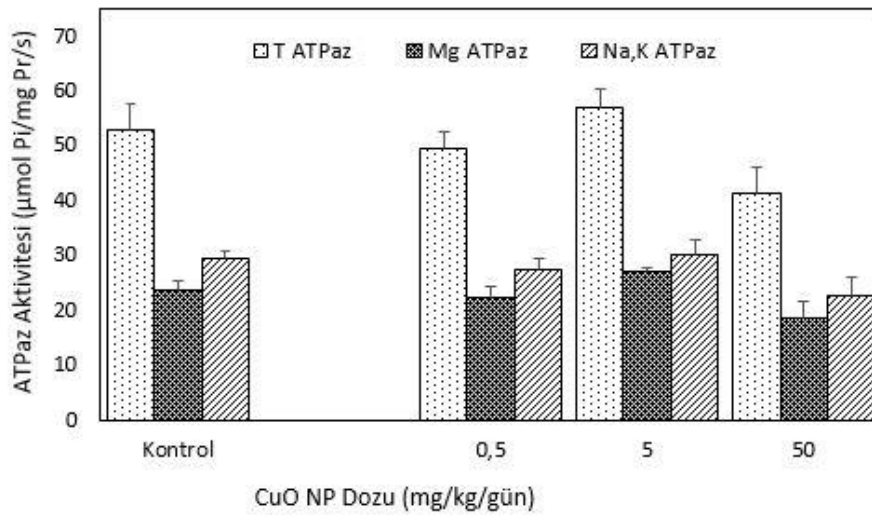
Bu çalışma sıçan metabolizmasına ait enzimatik ve enzimatik olmayan biyomarkırların CuO NP etkisine verdiği tepkileri göstermektedir. Sonuçlar, dokuya özgün ve/veya biyomarkıra bağlı olarak değişen etkilerin olabileceğini vurgulamıştır. Sıçanların beyin ve böbrek dokuları CuO NP'lerden en fazla etkilenmek-



7a



7b



7c.

Şekil 7. Sıçan böbreğinde (a), ince bağırsağında (b) ve beyininde (c) ATPaz aktiviteleri. Detaylar Şekil 6 da verilmiştir.

Figure 7. Activities of ATPases in the kidney (a), intestine (b) and brain (c) of rats. Details are given in Fig. 6.

le beraber, karaciğer dokusu da en yüksek dozda etkilenmiştir. TEM görüntüleri bu etkilerde NP birikiminin rolü olabileceğini net bir şekilde vurguladığından önemli görüntülerdir. Aynı zamanda, sonuçlar NP etkisinin ve etki mekanizmalarının daha kapsamlı olarak araştırılması gerektiğini de vurgulamıştır. Ayrıca, memeli hayvanlarda metal oksit nanopartiküllerinin letal dozlarının ve besin kabul edilebilirlik düzeylerinin belirlenmesi de gereklidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın verilerinin bir kısmı Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen projeye (FDK-2017-8197) aittir. Fizikçi hocam Prof. Dr. Cebraül Gümüş'e nanopartikül karakterizasyonu konusunda ve Doktora Tez Danışmanım Prof. Dr. Hasan. B. İla'ya desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

AshaRani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveettil S 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *Acs. Nano.* 3:279-290.

Atkinson A, Gateby AO, Lowe, AG 1973. The Determination of Inorganic Orthophosphate in Biological Systems. *Biochimica Et Biophysica Acta* 320: 195-204.

Auffan M, Flahaut E, Thill A, Mouchet F, Carriere M, Gauthier L, Bottero JY 2011. Ecotoxicology: Nanoparticle reactivity and living organisms. In *Nanoethics and Nanotoxicology* pp. 325-357. Springer, Berlin, Heidelberg.

Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M 2016. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian Biomed J* 20(1): 1-11.

Bondarenko KJ, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology* 87: 1181-1200.

Canli M, Stagg RM 1996. The effects of in vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 494-501.

Canli EG, Atli G, Canli M 2017. Response of the antioxidant enzymes of the erythrocyte and alterations in the serum biomarkers in rats following oral administration of nanoparticles. *Environ. Toxicol. Phar.* 50: 145-150.

Canli EG, Canli M 2017. Effects of aluminum, copper, and titanium nanoparticles on some blood parameters in Wistar rats. *Turk. J. Zool.* 41: 259-266.

Canli E.G, Dogan A, Canli M 2018. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al₂O₃, CuO, TiO₂) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol. Phar.* 62: 181-187.

Canli EG, İla HB, Canli M 2019a. Responses of biomarkers belonging to different metabolic systems of rats following oral administration of aluminium nanoparticle. *Environ. Toxicol. Pharma.* 69: 72-79.

Canli EG, İla HB, Canli M 2019b. Response of the antioxidant enzymes of rats following oral administration of metal-oxide nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26(1): 938-945.

Canli, E.G., Canli, M., 2019. Nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂) decrease ATPase activity in the osmoregulatory organs of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*); histopathological investigations of tissues by transmission electron microscope. *EC Pharmacology and Toxicology* 7, 909-924

Chen Z, Zhou D, Wang Y, Zhao L, Hu G, Liu J, Jia, G 2019. Combined effect of titanium dioxide nanoparticles and glucose on the cardiovascular system in young rats after oral administration. *J. App. Toxicol.* 39(4): 590-602.

Chichova M, Shkodrova M, Vasileva P, Kirilova K, Doncheva-Stoimenova D (2014). Influence of silver nanoparticles on the activity of rat liver mitochondrial ATPase. *J. Nanopart. Res.* 16: 1-14.

De Jong WH, Borm PJ 2008. Drug delivery and nanoparticles: applications and Hazards. *Int. J. Nanomed.* 3(2): 133-149.

Durmaz M, Sevgiler Y, Uner N 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Phys.* 84: 215-226.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Elnagar AMB, Ibrahim A, Soliman AM 2018. Histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles and the possible protective role of N-acetylcysteine on the testes of male albino rats. *Int. J. Fertil. Steril.* 12(3): 249-256.

Ema M, Hougaard KS, Kishimoto A, Honda K 2016. Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology* 10: 391-412.

Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal

- toxicity. *Biomarkers* 10(5): 360-375.
- Griffith OW 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione-reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.
- Guo D, Bi H, Wang D, Wu Q 2013. Zinc oxide nanoparticles decrease the expression and activity of plasma membrane calcium ATPase, disrupt the intracellular calcium homeostasis in rat retinal ganglion cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 45: 1849-1859.
- Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJ 2007. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicol. Pharma.* 49(3): 217-229.
- Handy RD, Shaw JS 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk and Society* 9: 125-144.
- Hidalgo MC, Exposito A, Palma JM, de la Higuera M 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J Biochem. Cell. Biol.* 34: 183-193.
- Hong F, Si W, Zhao X, Wang L, Zhou Y, Chen M, Ge Y, Zhang Q, Wang Y, Zhang J 2015. TiO₂ nanoparticle exposure decreases spermatogenesis via biochemical dysfunctions in the testis of male mice. *J. Agric. Food. Chem.* 63: 7084-7092.
- Howarth C, Gleeson P, Attwell D 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 32: 1222-1232.
- Hu H, Guo Q, Wang C, Ma X, He H, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N 2015. Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. *J. Appl. Toxicol.* 35: 1122-1132.
- Janrao KK, Gadhave MV, Banerjee SK, Gaikwad DD 2014. Nanoparticle induced nanotoxicity: an overview. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4(32): 1-7.
- Jovanović B 2015. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integrated environmental assessment and management* 11(1): 10-20.
- Kanak EG, Dogan Z, Eroglu A, Atli G, Canli M 2014. Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Fish. Physiol. Biochem.* 40: 1083-1091.
- Kumari M, Rajak S, Singh SP, Kumari SI, Kumar PU, Murty USN, Mahboob M, Grover P, Rahman MF 2012. Repeated oral dose toxicity of iron oxide nanoparticles: biochemical and histopathological alterations in different tissues of rats. *J. Nanosci. Nanotechno.* 12: 2149-2159.
- Lei R, Yang B, Wu C, Liao M, Ding R, Wang Q 2015. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the liver and kidney of rats following exposure to copper nanoparticles for five consecutive days. *Toxicol. Res.* 4(2): 351-364.
- Li SQ, Zhu RR, Zhu H, Xue M, Sun XY, Yao SD, Wang SL 2008. Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 46(12): 3626-3631.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farra NJ, Randall RJ 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Meena R, Paulraj R 2012. Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO₂ nano anatase in liver and kidney of Wistar rat. *Toxicol. Environ. Chem.* 94(1): 146-163.
- Mostafalou S, Mohammadi H, Ramazani A, Abdollahi M 2013. Different biokinetics of nanomedicines linking to their toxicity; an overview. *DARU Journal of Pharmaceutical* 21: 14-18.
- M'rad I, Jeljeli M, Rihane N, Hilber P, Sakly M, Amara S 2018. Aluminium oxide nanoparticles compromise spatial learning and memory performance in rats. *Excli. J.* 17: 200-210.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- Park EJ, Sim J, Kim Y, Han BS, Yoon C, Lee S, Cho MH, Kim JH 2015. A 13-week repeated-dose oral toxicity and bioaccumulation of aluminum oxide nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol.* 89: 371-379.
- Pena-Llopis S, Pena JB, Sancho E, Fernandez-Vega C, Ferrando MD 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere* 45: 671-681.
- Piner P, Uner N 2012. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Phar.* 33: 414-420.
- Rizk MZ, Ali SA, Hamed MA, El-Rigal NS, Aly HF, Salah HH 2017. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice. *Biomed. Pharmacotherapy* 90: 466-472.
- Rohner F, Ernst FO, Arnold M, Hibe M, Biebinger R, Ehrensperger F, Pratsinis SE, Langhans W, Hurrell RF, Zimmermann MB 2007. Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. *J. Nutr.* 137: 614-619.
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Ali SF 2010 Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wires. Nanomed. Nanobi.* 2:544-568.
- Shrivastava R, Raza S, Yadav A, Kushwaha P, Flora SJS 2014. Effects of sub-Acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol.* 37: 336-347.

- Silva-Herdade AS, Saldanha C 2013. Effects of acetylcholine on an animal model of inflammation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 53: 209-2016.
- Singh SP, Kumari M, Kumari SI, Rahman MF, Mahboob M, Grover P 2013. Toxicity assessment of manganese oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral exposure. *J. Appl. Toxicol.* 33: 1165-1179.
- Syama S, Sreekanth, PJ Varma HK, Mohanan PV 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver. *Toxicological and Environmental Chemistry* 95: 495-503.
- Tang T, Zhang Z, Zhu X 2019. Toxic Effects of TiO₂ NPs on Zebrafish. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health.* 16(4): 523-537.
- Vasic VM, Colovic MB, Krstic DZ 2009. Mechanism of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase inhibition by metal ions and complexes. *Hem. Ind.* 63: 499-509.
- Wang F, Gao F, Lan MB, Yuan HH, Huang YP, Liu JW 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol in Vitro* 23: 808-815.
- Winston GW 1991. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharma. Toxicol. Endocrin* 100: 173-176.
- Yang L, Watts DJ 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 158(2): 122-132.
- Yilmaz M, Rencuzogullari E, Canli M 2015. The effects of cyfluthrin on some biomarkers in the liver and kidney of Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 4747-4752.
- Yilmaz M, Rencuzogullari E, Canli M 2017. Investigations on the effects of etoxazole in the liver and kidney of Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24: 19635-19639.
- Yu XH, Zhao XY, Ze YG, Wang L, Liu D, Hong J, Xu BQ, Lin A, Zhang C, Zhao Y, Li BY, Hong FS 2014. Changes of serum parameters of TiO₂ nanoparticle-induced atherosclerosis in mice. *J. Hazard. Mat.* 280: 364-371.
- Zhou Y, Hong F, Wang L 2017. Titanium dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and the underlying mechanism in mouse myocardial cells. *J. Nano. Res.* 19(11): 356-369.