T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CDTE KUANTUM NOKTA NANOPARTİKÜLLERİNİN KARACİĞER VE BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE SİLİMARİN VE MİTOKİNONUN (MİTOQ) ANTİOKSİDAN ETKİSİ

Seda ŞİMŞEK

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CDTE KUANTUM NOKTA NANOPARTİKÜLLERİNİN KARACİĞER VE BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE SİLİMARİN VE MİTOKİNONUN (MİTOQ) ANTİOKSİDAN ETKİSİ

Seda ŞİMŞEK

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

(Bu araştırma, Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)

Koordinatörlüğü tarafından 2018-ÖYP-012 proje numarası ile desteklenmiştir.)

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitim sürecimin her aşamasında engin bilgi, deneyim ve görüşleri ile beni yönlendiren, akademik kariyerime rehberlik eden ve anlayışlı ve tüm ilgisiyle her zaman yanımda olan, danışmanım olmasından onur duyduğum hocam, Sayın Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a, ilgi, alaka ve bilgisi ile her zaman yanımda olan, güler yüzü, anlayışı ve pozitif ruhu ile her zaman destek olan, birlikte çalışmaktan olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL'a, güler yüzü ile her koşulda desteğini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çözümler üreten, örnek aldığım çok sevdiğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU'a

Tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından, ilgi ve alakasından dolayı değerli hocam, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Muslu Kazım KÖREZ'e

Tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, tüm zorlukları birlikte aştığımız meslektaşım araştırma görevlisi Dr. Merve SOLMAZ'a, yardım ve desteklerinden dolayı bölümümüz araştırma görevlileri Dr. Ümmügülsüm ÖNAL, Dr. Aliye Esma ÖVET ve Dr. Özge ERYİĞİT'e, bölümümüz doktora öğrencisi Sibel GÜÇLÜ'ye, bölümümüz yüksek lisans öğrencileri Seda ANİÇ ve Öğr.Gör. Özkan ÜZÜM'e, laboratuvar süreçlerinde yardım ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK ve Fatma BATIRBEK'e,

Çalışmamı maddi olarak destekleyen Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordünatörlüğü'ne ve doktora eğitimi süresince TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı'ndan aldığım burs desteğinden dolayı TÜBİTAK-BİDEB'e,

Her konuda her zamanda arkamda olduklarını bildiğim, destekleri ve varlıkları ile güç ve huzur bulduğum annem Figen ATAY ve babam İlhan ATAY ile canım kardeşim Simay ATAY'a ve özellikle tez çalışmamda bana çok yardımı dokunan canım kardeşim Simge ATAY'a, verdiği destek ve cesaretle her zaman elimi tutan, gurur kaynağım çok sevdiğim sevgili eşim Murat ŞİMŞEK'e ve varlıklarına her gün şükrettiğim canım kızım Mirel Ada'ya ve canım oğlum Arel Han'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR v

1. GİRİŞ 1

1.1. Nanomalzemeler ve Nanoparçacıklar 1
1.1.1. Kuantum Noktaları Nedir? 3
1.1.2. Kuantum Noktalarının Uygulama Alanları 7

1.2. Kuantum Noktalarının Toksisitesi 12
1.2.1. İn Vitro Toksisite ve Önerilen Mekanizmalar 12
1.2.2. İn Vivo Toksisite 16

1.3. Karaciğer ve Hepatotoksisite 17

1.4. Böbrek ve Nefrotoksisite 20

1.5. KN'ların İn vivo Bağışıklık Hücreleri Üzerindeki Etkisi 22

1.6. KN'ların Sitokinler Üzerindeki Etkisi 23

1.7. Silimarin 24

1.8. Mitokinon (Mito Q) 27

2. GEREÇ VE YÖNTEM 31

2.1. Deney Hayvanları 31

2.2. Silimarin ve Mitokinonun Hazırlanması 31

2.3. CdTe Kuantum Noktanın Hazırlanması 32

2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması 33

2.5. Doku ve Kanların Temini ve Saklanması 34

2.6. CdTe Kuantum Nokta Nanopartiküllerinin Dokularda Birikim Analizi 35
2.6.1. İn vivo hiperspektral flüoresan görüntüleme 35
2.6.2. Konfokal mikroskopi 35
2.6.3. ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP)ve Kütle Spektroskobisi (MS) 36

2.7. Histolojik çalışmalar 37
2.7.1. Hematoksilen & Eozin Boyama 37
2.7.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar 37

2.8. Biyokimyasal Çalışmalar 42
2.8.1. Serum Biyokimyasal testler 42
2.8.2. Serum Total Oksidan (TAS) ve Antioksidan Seviyesi (TOS) 43
2.8.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) 43
2.8.4. Doku Katalaz (CAT), Superoksit Dismutaz 1 (SOD1) (Cu-Zn) ve Malondialdehid (MDA) Seviyelerinin Belirlenmesi 43

2.9. İstatistiksel Analiz 44

3. BULGULAR 46

3.1. İn Vivo Hiperspektral Görüntü Analizi 47

3.2. Dokularda KN birikiminin Konfokal Mikroskop Analizi 48
3.3. ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP)ve Kütle Spektroskobisi (MS) Sonuçları 50
3.4. Histolojik Bulgular 50
3.4.1. Hematoksilen& Eozin Sonuçları 50
3.4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular 53
3.5. Biyokimyasal Bulgular 102
3.5.1. Biyokimyasal parametrelerin sonuçları 102
3.5.2. TAS, TOS ve OSI Sonuçları 103
3.5.3. Doku Katalaz (CAT), Superoksit Dismutaz 1 (SOD1)(Cu-Zn) ve Malondialdehid (MDA) Seviyeleri 103
4. TARTIŞMA 107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 138
6. KAYNAKLAR 141
7. EKLER 158
EK-A: Etik Kurul Kararı 158
EK-B: Turnitin Raporu 159
8. ÖZGEÇMİŞ 163

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT: Serum Alanin Transaminaz

AST: Aspartat Aminotransferaz

ATP: Adenozin Trifosfat

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

Bax: Bcl-2-ilişkili X proteini

Ca^{++}: Kalsiyum

CAT: Katalaz

Cd^{+2}: Kadmiyum

CdTe : Kadmiyum Tellürid

DAPI: 4,6-diamidin-2'-fenil indol

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

ELISA: Enzime Bağlı İmmunosorbanTahlili (Enzyme Linked Immünosorbent Assay)

ER: Endoplazmik Retikulum

FITC: Flüoresan izotiyosiyanat

FL: Fotolüminesan

FRET: Förster Rezonans Enerji Transferi

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GR: Glutatyon Redüktaz

GSH: Redükte Glutatyon

H&E: Hematoksilen & Eosin

IL-10: İnterlökin 10

IL-1β: İnterlökin 1β

İF: İmmünflüoresan

İv: İntravenöz

İp: İntraperitonal

NP: Nanopartikül

KN: Kuantum Nokta

LD 50: %50 letal/öldürücü doz

LDH: Laktat dehidrojenaz

MDA: Malondialdehit

MitoQ: Mitokinon

MMP : Matriks metalloproteinaz

MT: Metallotionin

Na^+: Sodyum

NP: Nanopartikül

NO: Nitrik oksit

O_2: Oksijen

OSİ: Oksidatif stres indeksi

pH: Hidrojenin gücü

ROS: Reaktif oksijen türleri

SEB: Stafilokokal enterotoksin B

SOD: Süper oksit dismutaz

SLY: Silimarin

SLT-1: Shiga benzeri toksin 1

TAS: Total antioksidan seviyesi

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α

TOS: Total oksidan kapasitesi

TRITC: Tetramethylrhodamine-isothiocyanate

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dNTP ucu etiketleme

Zn: Çinko

ZnSe: Çinko Selenit

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CdTe Kuantum Nokta Nanopartikülünün Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi Üzerine Silimarin ve Mitokinonun (MitoQ) Antioksidan Etkisi

Seda ŞİMŞEK
Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2023

Kuantum noktalarının kullanımının artması ve insan vücuduna artan maruziyeti sonucu partiküllerin toksisitesinin incelenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Bu çalışmada CdTe kuantum nokta nanopartikülleri uygulanmış farelerde görülen histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere antioksidan özelliği bilinen Silimarin ve Mitokinonun etkinliği araştırılmıştır.

4 gruptan oluşan çalışmada 26 erkek swiss fare kullanıldı. G1-Kontrol (n=5); G2-CdTe Kuantum Nokta (KN) (10mg/kg) Uygulanan grup (n=7); G3-Silimarin (100 mg/kg) + KN (10mg/kg) Uygulaması (n=7); G4-Mitokinon (MitoQ) (5 mg/kg) + KN (10mg/kg) Uygulaması (n=7). Etken maddeler tek doz şeklinde CdTe KN uygulamasından 2 saat önce ip olarak uygulandı. 2 saatin sonunda kontrol grubu hariç tüm gruplara tek doz CdTe KN iv olarak kuyruk veninden uygulandı. Kontrol grubuna aynı şekilde fizyolojik salin uygulandı. Enjeksiyonlardan 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı.

Dokuların hiperspektral mikroskop görüntüleri ve konfokal mikroskop görüntüleri elde edildi, ICP-MS analizi ile Cd^{+2} ölçümü yapıldı. Genel histopatolojisi değerlendirildi, Anti MT-2A antikoru ile Cd^{+2} birikimi, Anti MT-MMP 2 ve anti MMP 9 antikorları ile Anti IL-10, anti IL- 1β ve anti TNF α antikorları ile inflamatuvar yanıt, Anti Ki-67 ile proliferatif yanıt, anti kaspaz-8 ve anti kaspaz-9 antikorları ve TUNEL yöntemiyle apopitoz değerlendirmesi flüorensan mikroskop ile yapıldı. Serum örneklerinden toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS), albümin, direkt bilirubin, total bilirubin, üre, kreatinin, ALT, AST, LDH seviyeleri incelendi. Dokularda MDA, SOD ve CAT seviyelerinin ELİSA analizi yapıldı.

Karaciğer ve böbrek dokularında CdTe KN uygulanan grupta artmış dejenerasyon ve inflamasyon gözlenirken silimarin ve mitokinon uygulaması yapılan gruplarda bu dejenerasyonun azaldığı görülmüştür. İmmünflüoresan değerlendirme sonuçları ile kontrol grubuna göre KN grubunda artan inflamasyon ve apoptoz gösterildi. Silimarin ve mitokinonun dokularda MMP 9, IL-10, IL-1β ve TNF α, Kaspaz 9, TUNEL pozitif hücre oranını, MDA'yı ve serum ALT, AST ve LDH seviyelerini azalttığı, SOD ve CAT seviyelerini ise arttırdığı gözlenmiştir. KN uygulaması ile artan MT-MMP2 ve Kaspaz 8 seviyelerine antioksidanlar anlamlı düzeyde etki edemedi ($p<.001$). TAS ($p=.509$), TOS ($p=.588$) ve OSİ ($p=.491$) açısından çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Bu sonuçlara göre, CdTe KN uygulaması ile silimarin ve mitokinon ön tedavisinin karaciğer ve böbrek dokusunda bazı parametreler üzerinde oksidatif stresi azaltabildiği, apopitozu ve inflamasyonu azaltarak koruyucu etki sağlayabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: antioksidan; kuantum nokta; mitokinon; oksidatif stres; silimarin

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Antioxidant Effect of Silymarin and Mitoquinone (MitoQ) on Liver and Kidney Toxicity of CdTe Quantum Dot Nanoparticles

Seda ŞİMŞEK
Department of Histology and Embryology (Medicine)

PhD THESIS / KONYA-2023

As a result of the increasing use of quantum dots and their increased exposure to the human body, the investigation of the toxicity of the particles has become an important issue. In this study, the effectiveness of Silymarin and Mitoquinone, which are known to have antioxidant properties, on the histopathological and biochemical changes observed in mice treated with CdTe quantum dot nanoparticles were investigated.

In the study consisting of 4 groups, 26 male Swiss mice were used. G1-Control (n=5); G2-CdTe Quantum Dot (QD) (10mg/kg) Applied group (n=7); G3-Silymarin (100 mg/kg) + QD (10mg/kg) Administration (n=7); Administration of G4-Mitoquinone (MitoQ) (5 mg/kg) + QD (10mg/kg) (n=7). Ip was applied 2 hours before the CdTe QD application of the active substances in a single dose. At the end of 2 hours, a single dose of CdTe QD was administered iv from the tail vein to all groups except the control group. Physiological saline was applied to the control group in the same way. Animals were sacrificed 24 hours after the injections and tissue samples were taken.

Hyperspectral microscope images and confocal microscope images of the tissues were obtained, Cd^{+2} measurement was made by ICP-MS analysis. General histopathology was evaluated, Cd^{+2} accumulation with Anti MT-2A antibody, inflammatory response with Anti MT-MMP 2 and anti MMP 9 antibodies, Anti IL-10, anti-IL- 1β and anti TNF α antibodies, proliferative response with Anti Ki-67, apoptosis evaluation by anti-caspase-8 and anti-caspase-9 antibodies and TUNEL method were performed with fluorescent microscope. Total antioxidant (TAS) and total oxidant (TOS), albumin, direct bilirubin, total bilirubin, urea, creatinine, ALT, AST, LDH levels were analyzed from serum samples. ELISA analysis of MDA, SOD and CAT levels in tissues was performed.

While increased degeneration and inflammation were observed in the liver and kidney tissues in the CdTe QD applied group, it was observed that this degeneration decreased in the silymarin and mitoquinone application groups. With the results of the immunofluorescence evaluation, increased inflammation and apoptosis were observed in the QD group compared to the control group. It was observed that silymarin and mitoquinone decreased MMP 9, IL-10, IL-1β and TNF α, Caspase 9, TUNEL positive cell rate, MDA and serum ALT, AST and LDH levels, while increasing SOD and CAT levels in tissues. Antioxidants did not have a significant effect on MT-MMP2 and Caspase 8 levels, which were increased by QD application ($p<.001$). There was no significant difference between study groups in terms of TAS ($p=.509$), TOS ($p=.588$) and OSI ($p=.491$).

According to these results, it has been shown that CdTe KN application and silymarin and mitoquinone pretreatment can reduce oxidative stress on some parameters in liver and kidney tissue, and provide prophilactic effect by reducing apoptosis and inflammation.

Key Words: antioxidant; quantum dot; mitoquinone; oxidative stress; silymarin

1. GİRİŞ

1.1. Nanomalzemeler ve Nanoparçacıklar

Nanobilim ve nanoteknolojinin arkasındaki fikir ve kavramlar, fizikçi Richard Feynman'ın 1959'da California Institute of Technology'de (CalTech) Amerikan Fizik Derneği'nin bir toplantısında yaptığı "altta çok yer var" başlıklı konuşmasıyla başlamış ve Feynman bu toplantıda bilim adamlarının tek tek atomları ve molekülleri manipüle edip kontrol edebilecekleri bir süreci anlatmıştır. Profesör Norio Taniguchi, on yıldan fazla bir süre sonra, ultra hassas işleme araştırmalarında nanoteknoloji terimini ortaya atmıştır. 1981 yılına kadar tek tek atomları "görebilen" taramalı tünelleme mikroskobunun geliştirilmesiyle, modern nanoteknoloji başlamıştır (Forti ve ark 2020).

Nanomalzemeler, fiziksel boyutlarından en az bir boyutu 1 ile 100 nm arasında değişen yapılardan oluşan veya bunları içeren malzemelerdir (ISO 2010). Nanomalzeme sentezi ve nanoteknoloji araştırmalarındaki yeni gelişmeler, bilim, mühendislik ve sağlık hizmetlerinin tüm alanlarında derin bir etki göstermektedir (Farré ve ark 2011).

Tasarlanmış nanopartiküllerden (NP'ler) oluşan nanomalzemeler, daha büyük boyutlu aynı malzemeye (yığın malzeme) göre gelişmiş manyetik, elektriksel, mekanik, optik, termal ve yapısal özelliklere yol açan benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (Nel ve ark 2006). Bu özellikler malzemenin kimyasal reaktivitesinde artışa sebep olan artmış yüzey-hacim oranı ve şeffaflık ile iletkenliği etkileyen fiziksel kuantum etkilerinin fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Nel ve ark 2006).

Tasarlanmış NP'lerin yaygın sınıflandırılması şu şekilde yapılmıştır; 1 fullerenler, karbon nanotüpler, karbon siyahı gibi karbon bazlı malzemeler, 2 nanogold, nanogümüş, metal oksitler, kuantum noktaları (KN'ler) gibi metal bazlı malzemeler ve 3 dendrimerler, nanokiller, polistiren, silikon oksit vb. dahil diğerleri (Nowack ve Bucheli 2007).

NP'ler tıp, kozmetik, elektronik, tekstil, mühendislik ve tüketici ürünleri dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmakta ve kullanım alanı hızlı bir şekilde genişlemektedir. Bu durum her yıl NP üretiminin ve kullanımının artmasına neden

olmakta ve bu malzemelerin insan sağlığı için potansiyel riskler oluşturabileceğine dair endişeleri arttırmaktadır (Dreher 2004). Gerçekte, nanoteknolojinin insan sağlığı için potansiyel risklerini değerlendirmeye yönelik herkese uyan tek bir yaklaşım mümkün değildir. Çünkü boyut, yüzey yükü, liganda bağlanma veya ligandın türü gibi çoklu parametreler bu durumu etkilemektedir (Hillyer ve Albrecht 2001).

NP'lerin insan vücuduna bilinçli veya bilinçsiz bir şekilde alınabileceği olası yollar; inhalasyon yoluyla akciğerler, sindirim yoluyla gastrointestinal sistem, tanı ve tedavi uygulamalarında intravenöz enjeksiyon (IV) yoluyla cilt ve kan damarlarıdır (Oberdörster ve ark 2005).

Havadaki NP'ler solunum yolunun nazal ve trakeal/bronşiyal bölgelere kolayca girebilir ve alveollere nüfuz edebilir (Oberdörster ve ark 2005). Gıda, gıda ambalajı, ilaç dağıtımı ve kozmetiklerdeki kullanımlarına bağlı olarak, NP'ler yutulma ve GI sisteme geçme potansiyeline sahiptir (Oberdörster ve ark 2005). Kozmetiklerde, güneş kremlerinde, yara bantlarında, giysilerde vb. kullanımları ile dermal NP maruziyeti insidansı hızla artmaktadır (Liang ve ark 2013). NP'lere iv yoluyla maruz kalma, NP'lerin teşhis araçları veya ilaç taşıyıcıları gibi biyomedikal uygulamaları için kullanıldığında gerçekleşir (Stern ve McNeil 2008).

Genellikle belirli bir organı veya dokuyu hedef alan iv uygulama, NP'lerin kanla doğrudan temasıyla sonuçlanır ve bunun üzerine partikül yüzeyi, mononükleer fagositik sistem hücrelerinin tanımasını ve alımını arttıran çok sayıda proteinle kaplanır (Lacerda ve ark 2010). NP'lerin iv uygulaması, organ düzeyinde ve sistemik toksisiteye yol açabilir ki bunların biyogüvenlik değerlendirme çalışmalarının iyi yapılması gerekir (Hahn ve ark 2011)

Nanotoksikoloji üzerine yapılan çalışmalar, boyut, şekil, yüzey alanı, kimyası ve yükü, aglomerasyon durumu, kristal yapı ve kimyasal bileşim dahil olmak üzere hem fiziksel hem de kimyasal faktörlerin NP toksisitesinin önemli belirleyicileri olduğunu göstermiştir (Sajid ve ark 2015).

NP boyutunun biyolojik sistemlerde NP davranışını etkileyen ve dolayısıyla toksisitelerini etkileyen en önemli özelliklerden biri olduğu gösterilmiştir (Donaldson ve ark 2004). Küçük boyutları nedeniyle, NP'ler hücre zarları boyunca taşınabilir veya hedef hücrelere alınabilir. NP boyutu küçüldükçe, yüzey/hacim oranı katlanarak artar

ve bu da bu parçacıkları daha reaktif ve toksik hale getirerek, subselüler yapılarda ve aktivitede değişikliklere neden olur (Nel ve ark 2006).

NP'ler vücutta dağılma ve kan dolaşımına geçtikten sonra hayati organlara ulaşmak için birçok fizyolojik engeli aşma yeteneğine sahiptir (Sajid ve ark 2015). Reaktif NP'ler, hücreler içinde katalitik reaksiyonları indükleyebilir ve biyolojik sistemler içinde serbest radikal türevlerinin üretilmesine neden olabilir.

NP'lerin yükünü ve reaktivitesini tanımlayan yüzey kimyası (yani bir parçacık yüzeyindeki reaktif gruplar), NP toksisitesini etkileyen bir başka önemli özelliktir (Lai 2012). NP yapısında, farklı fonksiyonel gruplar NP yüzeyleri üzerinde farklı yükler oluşturur. Örnek olarak, karboksilik asit (–COOH) ile fonksiyonelleştirilmiş NP'ler negatif yüklü olarak kabul edilirken, amin (–NH2) ile işlevselleştirilmiş NP'ler pozitif yüklü olarak kabul edilir (Lai 2012).

NP'lerin küresel, çubuk, tüp vb. çeşitli şekillere sahip olduğu bilinmektedir ve bu şekillerin vücutta birikme ve emilim kinetiği üzerine etkileri farklıdır (Sajid ve ark 2015).

Son on yıldan bu yana, hem in vitro hücre kültüründe hem de in vivo hayvan modellerinde NP'lerin toksisitesini gösteren giderek artan sayıda çalışma bulunmaktadır (Boczkowski ve Hoet 2010). Mevcut nanotoksikoloji literatürü, şu anda kullanımda olan birçok NP ile ilişkili toksisiteyi öne sürmektedir (Xia ve ark 2006). Çok sayıda çalışmaya rağmen, NP toksisitesinin mekanizmalarına ilişkin kesin bilgiler eksik olduğundan, nanomalzeme toksikolojisinde hala büyük bir boşluk bulunmaktadır (Sajid ve ark 2015).

1.1.1. Kuantum Noktaları Nedir?

Kuantum noktaları (KN'ler), flüoresan yarı iletken nanokristaller olarak da bilinen tasarlanmış NP'lerdir. KN'ler yaklaşık 2–10 nm'dir ve yaklaşık 200–10.000 atom içerirler (Smith ve ark 2008). İlk olarak 1980 yılında Alexey Ekimov ve Louis Brus tarafından bir cam matriste ve koloidal solüsyonda keşfedilmiştir (Smith ve ark 2008). Kadmiyum sülfürün ilk kolloidal kuantum noktası 1983 yılında yeniden yayınlanmıştır (Cayuela ve ark 2016).

Katı hal fiziğine göre, malzemeler elektron iletkenliğine dayalı olarak iyi bilinen üç kategoriye ayrılır; iletkenler (metaller), yarı iletkenler ve yalıtkanlar.

Katı malzemelerin iletkenliği, denge ve iletim bantları arasındaki enerji seviyesindeki farkla belirlenir. Denge bandı, oda sıcaklığında elektronların bulunduğu en yüksek elektronik enerji seviyesidir, iletim bandı ise elektronların bulunmadığı en düşük elektronik enerji seviyesidir. Değerlik bandındaki bir elektron ya bir fotonun soğurulmasıyla ya da termal yollarla enerji kazanır ve iletim bandına girerek, denge bandında pozitif yüklü bir boşluğa neden olur. Bant aralığı enerjisi olarak adlandırılan denge ve iletim bantları arasındaki enerji farkı, elektron volt (eV) cinsinden ifade edilen bir elektronun iletim bandına girmesi için kazanması gereken enerjiyi belirler.

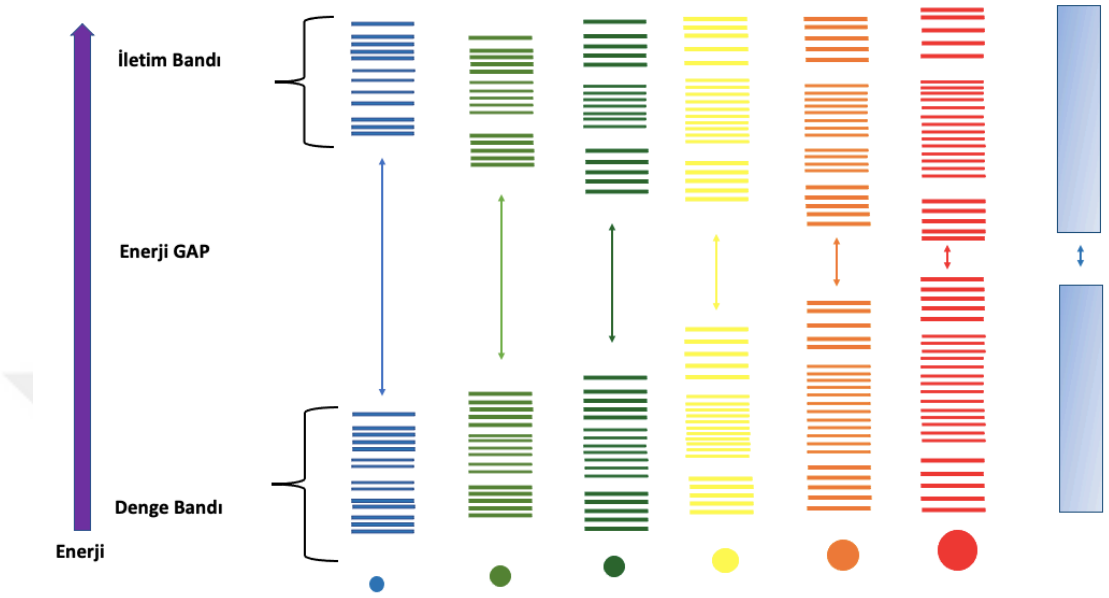
Yığın yarı iletkenlerde, denge ve iletim bantları, metal iletkenler ve yalıtkanlar arasındaki ara bant aralığı ile ayrılır. Işığa maruz kalındığında, ışık emilir ve denge bandından iletim bandına elektron uyarılması meydana gelir ve bu da denge bandında boş bir elektron çifti deliğine (H^+) neden olur. Elektronlar denge bandına döndüğünde flüoresans yayılır.

Işık absorpsiyonunun dar zaman aralığında, elektronlar ve boşluklar birbirini tanır ve yığın malzeme içinde hareket eder. Bohr atom modelinde olduğu gibi, elektron deliğin yörüngesinde ortalama bir mesafede döner ve onları kolombik çekimle bir arada tutar. 'Eksiton' olarak adlandırılan elektron deliği çifti arasındaki mesafe, eksiton Bohr yarıçapı olarak bilinir. Yığın yarı iletken malzemenin üç boyutu nanometre ölçeğine indirgendiğinde, parçacıklar Bohr yarıçapından daha küçük hale gelir ve elektron deliği çiftlerinin sıkışması nedeniyle enerjinin hapsedilmesine neden olur.

Sonuç olarak, kuantum sınırlama durumu elde edilir ve enerji daha yüksek bir seviyeye kayar. Sentezlenen KN'ler ne kadar küçük olursa, elektron deliği çiftlerinin daha fazla sıkışması meydana gelir ve bu da daha yüksek enerji seviyesine ve daha kısa dalga boyunda bir emisyona (mavi) yol açarken, daha büyük KN'ler kırmızı renk yayar.

Kuantum hapsetme derecesi, KN'lerin yarıçapının toplu eksitonik Bohr yarıçapına oranıyla doğrulanabilir. 'Kutudaki parçacık' modeli Brus (Brus 1986) tarafından geliştirilen temel kuantum mekaniği modelidir (Şekil 1.1). KN'lerin boyutu

ayarlanabilir optik özelliklerinin arkasındaki kuantum mekaniği, bu temel modelle benzerliğe sahiptir.



Şekil 1.1. Artan KN boyutu ve bant aralığı enerjisi arasındaki ilişki (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

KN'ler, elektron deliği çiftlerinin (eksitonlar) nanokristallerin tane sınırı içinde hapsolması nedeniyle benzersiz optik özellikler sergilerler. Ayarlanabilir emisyon dalga boyu, geniş bant absorpsiyon spektrumu ve fotostabilite dahil olmak üzere benzersiz optik ve elektronik özelliklere sahiptir (De Wild ve ark 2003).

Spesifik olarak, KN'ler, malzeme bileşimine özgü ayrı enerji seviyelerine sahiptir (Alivisatos 1996). Bu enerji seviyelerinin sınırları, KN'lerde belirli atomların eklenmesi veya çıkarılmasıyla hassas bir şekilde ayarlanabilir. Bu kuantum sınırlandırma etkisi, KN'lere çekirdek boyutları ve bileşimleri değiştirilerek manipüle edilebilen dar emisyon spektrumları ve ayarlanabilir emisyon dalga boyu sağlar (Michalet ve ark., 2005).

Daha da önemlisi, KN'ler UV'den yakın kızılötesi bölgeye kadar değişen emisyon yaymak üzere ayarlanabilir (Smith ve diğerleri, 2006). KN'ler, geniş bir dalga boyu aralığındaki ışıkla uyarılmalarına izin veren geniş absorpsiyon spektrumlarına sahiptir (Michalet ve ark 2005). Böylece tek bir uyarım kaynağı kullanılarak çoklu

görüntüleme için farklı emisyon spektrumlarına sahip KN'ler aynı anda uyarabilir (Mukundan ve ark 2010).

KN'lerin mükemmel sinyal yoğunluğu ve uzun emisyon ömürleri, uzun vadeli hücre içi tespit için oldukça çekici flüoresan problar olarak geleneksel organik floroforlara göre dikkate değer bir üstünlüğe sahip olmalarını sağlar (Zhu ve ark 2013).

Yapısal olarak, KN'ler, rengini belirleyen metaloid kristal çekirdek, stabilite ve parlaklığı artırmaya yardımcı olan inorganik bir kabuk ve suda çözünürlüğü ve konjugasyon kapasitesini artıran bir polimer tabakası veya fonksiyonel gruptan oluşur (Michalet ve ark 2005).

Geleneksel olarak KN çekirdekleri, grup II-VI serisi öğelerden oluşur. Bu gruptan oluşturulan KN'ler arasında kadmiyum selenit (CdSe), kadmiyum tellürid (CdTe), çinko sülfit (ZnS) ve çinko selenit (ZnSe) bulunur. III-V serisi elementlerden oluşturulan diğer bir KN grubu galyum arsenit (GaAs), galyum nitrür (GaN), indiyum fosfat (InP) ve indiyum arsenattır (InAs) (Kim ve ark 2003).

KN'lerin çekirdekleri, kararlılığı artırmak ve KN'lerin kuantum verimini korumak için genellikle ZnS, ZnSe, CdS veya InP'den yapılan bir kabukla kaplanabilir (Wang ve ark 2009).

KN'ler hazırlanırken daha yüksek esneklik sağlayan organik çözücü veya sulu çözelti içinde doğrudan sentezlenebilirler. Bununla birlikte, organik çözücüdeki KN'ler, sulu çözeltidekilere kıyasla önemli ölçüde farklı yüzey özelliklerine sahiptir. Organik KN'ler, hidrofobik ligandlara sahiptir ve bu da onları organik fazda çözünür hale getirir. Bu arada, organik KN'lerin yüzeyi hidrofilik ligandlarla modifiye edilerek suda çözünebilir ve biyouyumlu hale getirilebilirken, sulu KN'ler herhangi bir yüzey modifikasyonu olmadan doğası gereği suda çözünür.

KN'lerin yüzey modifikasyonunu gerçekleştirebilecek çeşitli yöntemler vardır. Örneğin, KN'lerin yüzeyi polieter veya oktadesilamin polimerleri gibi amfipatik moleküllerle konjuge edilebilir, merkaptoasetik asit gibi iki işlevli moleküllerle kaplanabilir ve misellerin içinde kapsüllenebilir (Hu ve ark 2016).

Ek olarak, KN'lerin yüzeyi, KN'leri hücrelerdeki belirli konumlara veya vücuttaki belirli organlara doğrudan yönlendirmek için oligonükleotidler, polipeptitler veya antikorlar gibi hedef ligandlarla daha fazla modifiye edilebilir (Mo ve ark 2017).

1.1.2. Kuantum Noktalarının Uygulama Alanları

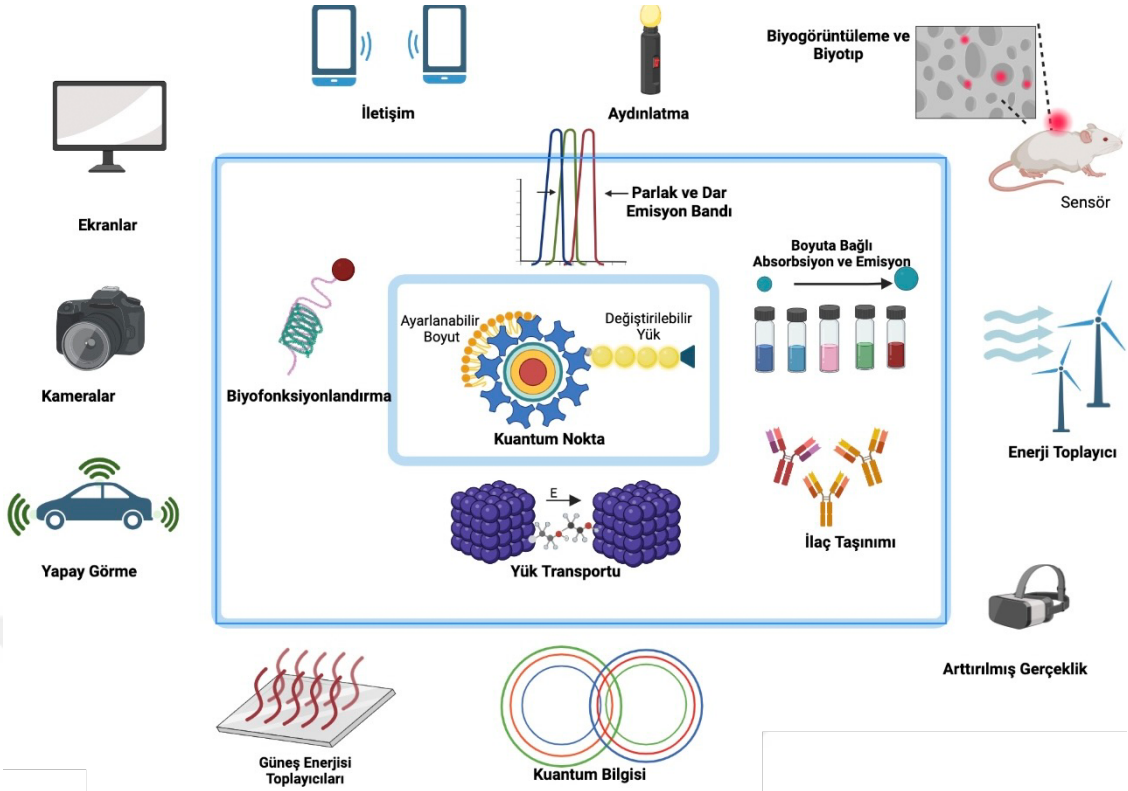
1980'lerde kadmiyum bazlı KN'lerin keşfinden bu yana, çeşitli kadmiyum ve kadmiyum bazlı olmayan KN'ler araştırılmış ve sentezlenmiştir. Şekilleri ve boyutları ayarlanarak KN'lerin elektriksel ve optik özelliklerinde önemli iyileştirmeler yapılmış ve ışık yayan diyotlardan (LED'ler), fotovoltaiklere, fotodedektörlere, lazerlere ve alan etkili transistörlere kadar önemli bir elektronik malzeme sınıfı olarak ortaya çıkmışlardır.

QD'ler, LED cihazlarda ışık yayan katmanlarda kullanım için oldukça avantajlıdır. Görünür kuantum noktalarına dayalı LED, yüksek renk saflığı, yüksek parlaklık ve daha düşük güç tüketimi sergilediği için yeni nesil bir ekran teknolojisi olarak kabul edilmektedir (Dai ve ark 2014).

Geleneksel likit kristal tabanlı ekranlarda (LCD), arkadan aydınlatma için LED'lerden gelen beyaz ışık kaynağı kullanılırken yeni nesil LCD'lerde arka aydınlatma sistemi mavi LED'ler ve bir KN filtresinden oluşmaktadır. Filtre yeşil ve kırmızı kuantum noktaları içerir ve mavi ışığın bir kısmını yeşil ve kırmızıya dönüştürür. Bu da ekranlarda daha parlak ve daha kontrastlı görüntüler sağlayan geniş bir renk skalası sunmaktadır. Ayrıca, bu düzenleme enerji tüketimini önemli ölçüde azaltır (Kim ve ark 2013).

CdTe kuantum noktaları, solar fotovoltaik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. CdTe, geniş güneş spektrumu aralığında kuantum boyut etkisi ayarlamasını mümkün kılan bir yarı iletken malzemedir. Ayrıca bu malzemeden boyut etkili bant aralığı ayarlanabilirliği yoluyla tek bir malzemeden tandem ve çok bağlantılı güneş pilleri elde etmemizi sağlar (Chuang ve ark 2014).

KN'ler, fotodedektörlerde de kullanılabilir. Kızılötesi ışık için fotodetektörler, gece görüş kameralarında, gaz tespiti için atmosferik spektroskopide, biyomedikal görüntülemede, kalite kontrolde ve ürün denetiminde kullanılmaktadır. Görünür ışık fotodetektörleri, görüntü sensörlerinde gelen ışığı elektronik sinyallere dönüştürmek için kullanılır (Konstantatos ve Sargent 2010).



Şekil 1.2. KN'lerin özellikleri ve kullanım alanlarından bazıları (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Biyomedikal kullanım alanı

Nanometre boyutundaki bu yapılar biyolojik, biyokimyasal ve biyomedikal alanlarda önemli uygulamalara sahiptir. KN'lerin benzersiz optik özellikleri, onları in vitro ve in vivo görüntüleme için organik boyalara göre oldukça avantajlı duruma getirmektedir. KN'lerin biyolojik araştırmalarda işaretleyici/etiket olarak uygulanması ilk kez 1998'de rapor edilmiştir (Bruchez Jr ve ark 1998, Chan ve Nie 1998).

KN'ler proteinlerin, DNA ve diğer biyomoleküllerin tespiti gibi biyoanalitik amaçlar için hücresel etiketlemede ve Förster rezonans enerji transferi (FRET) kullanarak yapılan deneyler için çeşitli flüoresan etiketler olarak hücrelerde başarıyla kullanılmaktadır (Goldman ve ark 2002). Biyomedikal flüoresan görüntüleme en gelişmiş uygulama olmaya devam etmektedir.

In vitro görüntüleme

İn vitro flüoresan görüntüleme, temel olarak hücresel görüntülemeyi ve biyomolekülerin izlenebilmesini içerir.

Boyuta bağlı difüzyon avantajı sebebiyle hücre altı etiketleme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin; streptavidin ve IgG'ye bağlı KN'lerin, farklı hücre altı konumlarda (hücre dışı, hücre içi ve çekirdeğin içinde) farklı hedef türlerini (mikrotübül ve aktin lifleri, meme kanseri belirteci Her2 ve nükleer antijenler) ve farklı numune türlerini (kültürlenmiş sabit hücreler, canlı hücreler ve doku kesitleri) etiketlemek için kullanılmıştır. Hedefe özel kararlı ve oldukça parlak görüntüler elde edilmiştir (Chen ve ark 2008).

Kanser hücrelerinin ve dokularının yüzeyinde aşırı eksprese edilen biyobelirteçlerin saptanması ve kantifikasyonu, kanserin erken teşhisi, sınıflandırılması ve tedavisi için oldukça önem taşımaktadır.

Bir çalışmada kültüre edilmiş insan meme kanseri hücrelerinde ve parafine gömülmüş klinik doku kesitlerinde ER, PR ve Her2 reseptörlerinin eş zamanlı ölçümü için KN'lerin, potansiyel uygulamasını gösterilmiştir. KN tabanlı teknolojinin, tümör biyobelirteçlerinin in vitro moleküler profillemesi için uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır (Zheng ve ark 2007).

KN tabanlı flüoresan biyoalgılama, KN aracılı Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET) mekanizmasına dayanır. FRET, donör ve alıcı arasındaki mesafe Forster yarıçapı olarak bilinen kritik bir yarıçaptan daha küçük olduğunda flüoresan enerjisinin bir donör partikülden bir akseptör partiküle transferini içerir. Bu, donörün emisyonunun ve uyarılmış durum ömrünün azalmasına ve alıcının emisyon yoğunluğunun artmasına neden olur.

FRET, protein konformasyonel değişikliklerini ölçen protein etkileşimlerini izlemek, enzim aktivitesini test etmek ve çeşitli immünoanalizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin; DNA mikrodizileri, sinyal probları olarak DNA ile işlevselleştirilmiş KN'ler kullanılarak gösterilmiştir (Bruchez Jr ve ark 1998).

İn vivo görüntüleme

İn vivo görüntüleme uygulamaları KN'lerinin in vivo biyolojik dağılımının izlenmesi, in vivo vasküler görüntüleme, KN'lerin izlenmesi ve tümör görüntülemeyi içermektedir.

Çözünürlük, doku penetrasyon derinliği, iyonize olmayan uyarım enerjisi, biyouyumluluk ve algılama eşiği gibi özellikler görüntüleme tekniğinde oldukça önemlidir.

Diğer görüntüleme teknikleriyle karşılaştırıldığında, flüoresan görüntüleme daha az tehlikeli iyonize olmayan radyasyon kullanır. KN'ler ile derin dokuların görüntülenmesi yapılabilmektedir.

Gen Taşıyıcı

RNA interferansı (RNAi), kanserle savaşmak için büyük fırsatlara sahip uygun bir tekniktir. Bu tekniğin başarısı, esas olarak verimli uygulama ve terapötik hedeflerin etkinliğine bağlıdır.

SiRNA'lar, RNaz tarafından kolayca bozundukları için kısa yarı ömre sahiptirler ve negatif yükleri nedeniyle hücre zarını geçemezler.

KN'ler gen terapisi çalışmalarında taşıyıcı olarak kullanılabilmektedirler. Çok sayıda nanoparçacık arasında, flüoresan KN'lerin geniş yüzey alanları ve kararlı kimyasal özellikleri sayesinde gen moleküllerinin yüklenmesi için potansiyel taşıyıcılar olarak araştırılmaktadır (Mansoori ve ark 2014).

Patojen ve Toksin Tespiti

KN'ler, patojenlerin ve toksinlerin saptanmasında ve virülans gibi özelliklerin tanımlanmasında uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin; KN'ler, Giardia lamblia ve Cryptosporidium parvum (Tully ve ark 2006), Salmonella Typhi ve Escherichia coli 0157:H7 ve Listeria monocytogenes (Yang ve Li 2006) gibi birkaç farklı patojeni hedeflemek için kullanılmıştır.

Stafilokokal enterotoksin B (SEB), Shiga benzeri toksin 1 (SLT-1), kolera toksin (CT) ve risini etiketlemek için yine KN'ler kullanılmıştır. 3 ng/ml kadar düşük

SEB konsantrasyonu, KN'ler tarafından tespit edilebilmiş ve dört toksinin çoklu tespiti de mümkün hale getirilmiştir. İnsan transferrinin varlığı virülans ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve transferrine bağlı KN'lerin patojenik virülansın tespitinde kullanılabilirliği gösterilmiştir (Yang ve Li 2006)

Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapide ışığa duyarlaştırıcılarla birleştirilmiş KN'ler ile Forster Rezonans Enerji Transferi (FRET) yoluyla kolayca ROS üretilebilmektedir. Lazer radyasyonunun bir sonucu olarak KN'ler tarafından üretilen atomik oksijen, normal hücrelere göre kanser hücreleri tarafından daha fazla alınır.

Geleneksel ışığa duyarlaştırıcı organik boyalar sitotoksik ROS üretimi yapabilir. Ancak fotodinamik terapi için KN'lerin benzersiz fotofiziksel özellikleri, onların bu alandaki kullanımını oldukça çekici hale getirmektedir (Samia ve ark 2006).

Terapötik ve teşhiste KN'ler (Teranöstik)

Teşhis ve terapötiklerin kombinasyonu olarak tanımlanan "teranostik" terimi, ilaç salımının anlık değerlendirmesini içerir.

Teranostik ajan olarak kullanılan KN'ler, hedefleyici bir ligand (antikor, peptit veya protein) ve terapötik bir ajan içermektedir. Başarılı bir teşhis ve tedavi süreci için hücreye özgü hedefleme ve sonraki alım oldukça önemlidir.

KN'ler ile kanser, akciğer hastalıkları ve inflamasyon gibi hastalıkların tedavisi için uygulanan ilaçların yolunu, hedeflenen hücre veya organ alımını ve terapötik etkinliğini izlemek mümkündür. KN'ler, görüntüleme uygulamalarında son derece başarılıdır.

Biyouyumluluk endişesi yönetilebilirse, partikül dağıtım araçları olarak da kullanılabilirler. Ligand ile fonksiyonlaştırılmış KN hedef hücre ile etkileştikten sonra sıcaklık, pH veya enzim gibi uyaranlar tarafından tetiklenerek ilacın, ilaç yüklü vezikülden hücre içine salınmasını amaçlar (Ho ve Leong 2010).

1.2. Kuantum Noktalarının Toksisitesi

KN'lerin artan kullanımı ve üretimi, insanların mesleki, tıbbi ve çevresel kaynaklardan maruz kalmasında potansiyel artışlara yol açarak, bu NP'lerin çevresel ve sağlık riskleri hakkında endişelere yol açmaktadır.

KN'lere nanometre boyutu, ağır metal çekirdek, yüksek yüzey alanı gibi benzersiz özellikler kazandıran aynı özellikler, çevre ve halk sağlığı üzerindeki uzun vadeli, potansiyel olarak zararlı etkilerine ilişkin belirsizliğe yol açmaktadır. Bu tür endişeler, KN'lerin klinik ortama dahil edilmesinde bir dezavantaj olmaktadır. Bu nedenle, KN'lerin toksisitesinin araştırılması, bu umut verici nanoteknolojinin kaderini belirlemede kritik öneme sahiptir.

KN'lerin toksisite değerlendirmelerinin çoğu in vitro koşullarda yapılır ve in vivo çalışmalar sınırlıdır. KN'lerin kan dolaşımına girerek hedef organlara ve ikincil organlara ulaşma süreci oldukça karmaşık ve tam olarak anlaşılamamıştır.

İn vivo deneyler zaman alıcıdır, maliyetlidir ve genellikle etik sorunlar içerir. Biyotıpta KN'lerin uygulama alanını genişletmek için KN'lerin in vivo toksisite çalışmaları esastır (Liang ve ark 2022).

1.2.1. İn Vitro Toksisite ve Önerilen Mekanizmalar

İn vitro KN toksisitesini araştıran çok sayıda çalışma, KN'lerin sitotoksik olabileceği, bağışıklık tepkilerini etkileyebileceği ve hücre stresine neden olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, hücrelerdeki morfolojik değişiklikler, hücre zarı bütünlüğü ve laktat dehidrogenaz ve adenosin trifosfat gibi belirli hücre içi maddelerin ortama salınması genellikle KN'lerin toksik etkilerini yansıtmak için ölçülür.

Bununla birlikte, in vitro çalışmalardan elde edilen bilgiler, çeşitli hücre hatlarında KN aracılı toksisitenin altında yatan mekanizmaların iyi anlaşılmadığını düşündürmektedir (Yong ve ark 2013).

Kadmiyum bazlı KN'lerin toksisitesinin, KN çekirdeğinden serbest Cd^{2+}'nın sızması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu veya boyut ve yüzey reaktivitesi ve yüksek hücre içi Ca^{2+} seviyeleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Yong ve ark 2013).

Kadmiyum içeren kuantum noktalarından Cd^{2+} salınımı

KN metal çekirdeğinde kadmiyum varlığının, KN toksisitesinin birincil kaynağı olduğunu düşünülmektedir (Derfus ve ark 2004).

KN'ler, hücreler tarafından alındıktan sonra lizozomlar gibi asidik organeller tarafından parçalanabilir ve Cd^{2+} hücre içi proteinlerin tiyol gruplarıyla birleşerek proteinlerin yapısını ve işlev bozukluğunu bozabilir (Mo ve ark 2017).

Bazı araştırmalar, KN'lerin HepG2 hücrelerinde ve zebra balığı karaciğer hücrelerinde metallothionein (MT) gen ekspresyonunun arttırabileceğini göstermiştir. MT gen ekspresyonunun yukarı regülasyonu, ağır metallere karşı bir stres tepkisi olarak bilinmektedir (Klaassen ve ark 2009).

Vücuttaki kadmiyumun çoğu, metallothionein (MT) adı verilen küçük, sistein açısından zengin, metal bağlayıcı bir proteine bağlıdır (Klaassen ve ark 1999).

KN çekirdeğine bir kabuk veya polimer bazlı bir malzemenin eklenmesinin oksidasyon seviyesini azaltarak KN toksisitesi azaltılabilir (Derfus ve ark 2004).

Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres

Metal bazlı birçok NP türünde olduğu gibi ROS üretimi, KN'nin neden olduğu hücresel hasarın en önemli nedenidir (Samia ve ark 2006).

Hücrelerde üretilen ROS, tekli oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu ($-O^{2-}$), hidroksil radikalleri (-OH) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) içerir. NP'ler tarafından indüklenen bu reaktif türlerin üretimi için kesin mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır. KN'lerin elektron konfigürasyonları nedeniyle kendiliğinden ROS üretimini indükleme yeteneğine sahip oldukları düşünülmektedir (Maysinger ve Lovrić 2007).

Hücrelerde ROS üretimi, oksidatif strese neden olabilir ve hücre hasarına yol açan ve apopitozu tetikleyen farklı hücresel süreçleri kontrol eden hücresel sinyal kaskadlarını etkileyebilir (Simon ve ark 2000).

Çalışma sonuçları, CdTe KN'lerin ve kadmiyum klorürün zebra balığı karaciğer hücrelerinde ROS'un önemli ölçüde artmasına neden olduğunu ve bunun da DNA sarmal kırılmalarına yol açtığını, bu arada antioksidan genlerin ve DNA onarım gen ekspresyonunun önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermiştir (Tang ve ark 2013).

Başka çalışma CdTe KN'ler ile muamele edilen hücrelerde, CdTe'in ROS artışına neden olduğunu ve antioksidan seviyelerini değiştirdiğini, ardından oksidatif stresi indüklediğini ve son olarak apoptotik yolu aktive ettiğini de doğrulamıştır (Nguyen ve ark 2013).

Mitokondri

Fazla aktif oksijen hücre altı seviyede, esas olarak mitokondriye verilen KN hasarından kaynaklanmaktadır. KN'ler mitokondri morfolojisine ve yapısına zarar verebilerek, mitokondriyal membran potansiyel kaybına ve mitokondriyal geçirgenlik geçişinin (MPT) kaybına neden olabilir ve mitokondriyal elektron solunum zinciri üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilir, solunum sürecini bozabilir ve sonuçta aşırı ROS üretimine yol açabilir.

Mitokondri, hücrelerde ROS üretiminin ana organeli olup kompleks I ve III, ROS üretiminin birincil bölgeleridir (Li ve ark 2011). CdTe KN'lerin mitokondriyal elektron transfer zinciri (ETC) kompleksi II, III ve IV'ün seviyelerinde ve aktivitesinde azalmaya neden olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Nguyen ve ark 2015).

CdTe KN'lerin hem elektron transfer zincirini hem de mitokondriyal iç zarın taşınmasını etkilemesi aşırı ROS üretimine ve mitokondriyal zarların lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Li ve ark 2011). Sonuç olarak da apopitotik süreç tetiklenir.

Hücre içi yüksek Ca^{+2} seviyeleri

Yapılan bazı çalışma sonuçları, KN'lerin hücre içi Ca^{2+} iyonlarının artışı otofaji ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin artmasına yol açabileceğini göstermiştir (Paesano ve ark 2016). Mevcut araştırmalar, ER'nin temel olarak hücre içi Ca^{2+}'nın dinamik dengesinden sorumlu olduğunu gösterdiğini ve zararlı faktörlerin ER stresini tetikleyerek Ca^{2+} dengesinin bozulmasına yol açabileceğini göstermiştir (Richter ve ark 2016)

Ca^{2+}, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apopitoz gibi birçok biyolojik süreçte yer alan bol miktarda farklı protein kinazları aktive edebilir. Yüksek Ca^{2+} seviyeleri mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak sitokrom c salınımına ve indüklenmiş apopitoza yol açar (Richter ve ark 2016).

Bazı araştırmacılar, KN'lerin HepG2 hücrelerinde yüksek hücre içi Ca^{2+} seviyelerine neden olabileceğini açıklamıştır (Paesano ve ark 2016). Yine aynı şekilde CdTe KN'lerin Ca^{2+} seviyelerinde 7,4 kat artışa yol açtığın başka bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu arada, yüksek seviyelerde Ca^{2+} konsantrasyonları, ROS üretimini daha da arttırmış ve oksidatif stresi şiddetlendirmektedir (Nguyen ve ark 2015).

Diğer potansiyel mekanizmalar

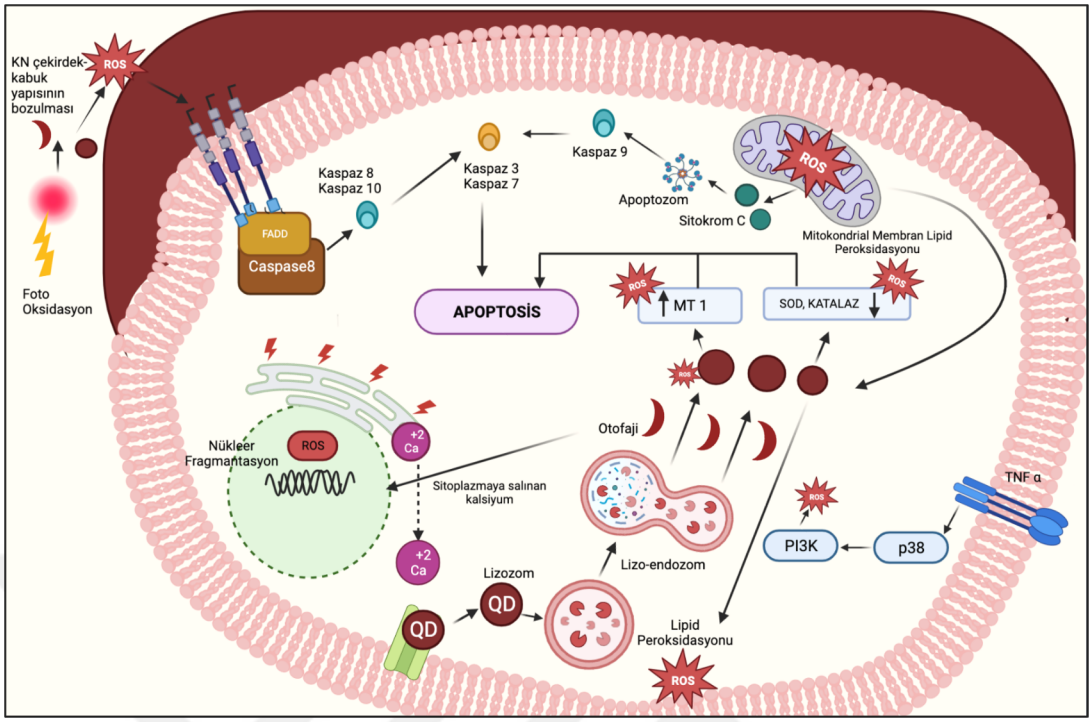
ER, ökaryotik hücrelerde protein sentezi, katlanması ve salgılanmasında ve hücre içi Ca^{2+} rezerv havuzunda önemli bir organeldir. Pek çok toksik faktör, homeostazın ER dengesizliğine yol açarak ER stresini tetikleyerek ER'de katlanmamış proteinlerin veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilir. Uygun ER stresi, hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir ve işlevinin bozulması hücresel apopitozu tetikler (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo 2016).

Yapılan çalışmalar, nanomateryal kaynaklı ER stresinin sitotoksisitede önemli bir rol oynadığını açıklamıştır (Brun ve ark 2014, Cao ve ark 2017).

Otofaji, ökaryotik hücrelerde temel bir fizyolojik olgudur ve hücre homeostazının sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Aşırı otofaji hücre ölümüne yol açarken, beslenme eksiklikleri, hipoksi veya diğer zararlı faktörler koşullarında hücre hayatta kalma oranını artırmak için hasarlı organelleri ve proteinleri temizler (Tanida 2011).

Nanomalzemelerin neden olduğu sitotoksisitenin otofaji aracılı olduğunu doğrulayan bazı çalışmalar vardır (Paesano ve ark 2016, Zhang ve ark 2017). CdTe KN'lerin toksisitesinin boyut, kimyasal bileşim ve yüzey kaplama bileşenleri gibi çeşitli içsel özelliklerden de kaynaklanmaktadır (Hardman 2006). Negatif yüklü KN'lerin pozitif yüklü KN'lere kıyasla daha az toksitir (Hoshino ve ark 2004). Daha küçük yeşil KN'lerin çekirdeğe nüfuz edebildiği, muhtemelen hücrelerin deoksiribo nükleik asit (DNA) içeriğine zarar verdiği ve bu nedenle gözlenen artan sitotoksisiteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Lovrić ve ark 2005).

Çeşitli hücre hatlarında KN'lerin toksisitesini bildiren çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bu NP'lerin hücre hasarına ve ölüme neden olduğu altta yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamış olup, bilinen potansiyel mekanizmalar, Şekil 1.3 'te resmedilmiştir.

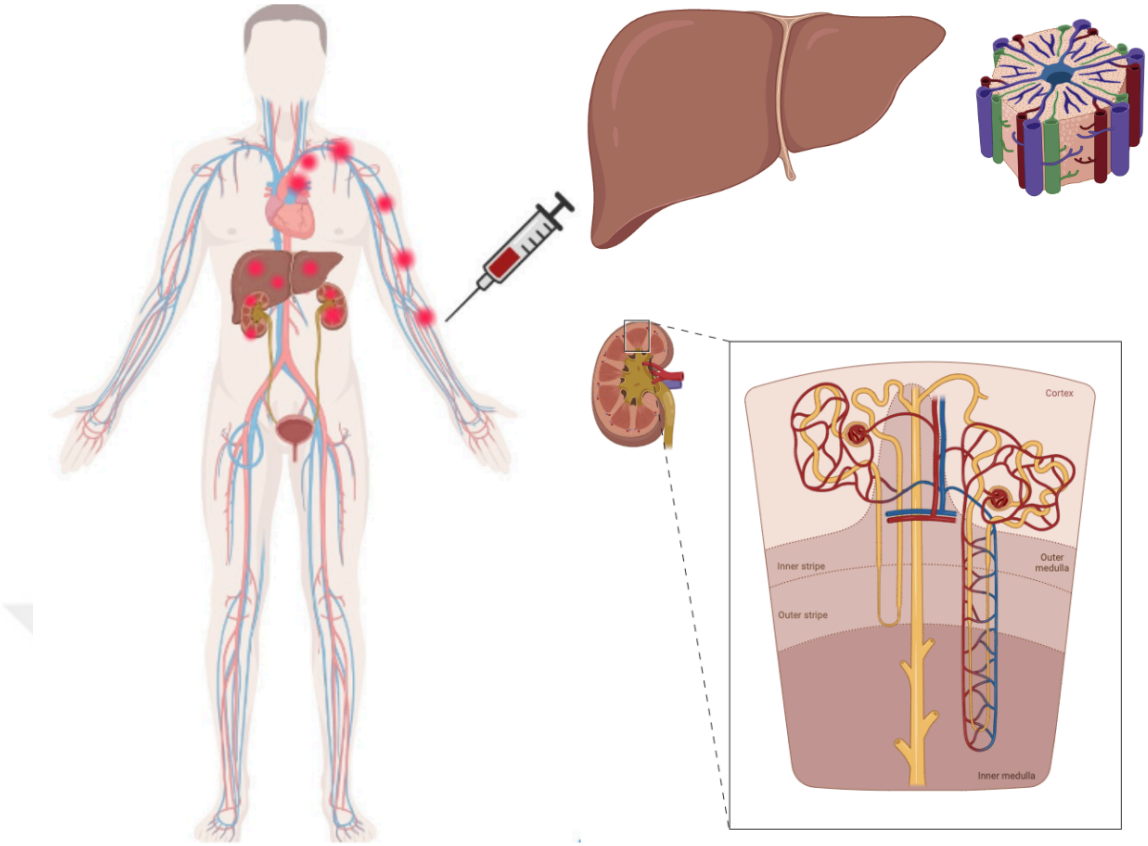


Şekil 1.3. Nanopartiküllerin hücresel toksisite mekanizmaları (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

1.2.2. İn Vivo Toksisite

KN'ler genellikle tıbbi uygulamalarının bir parçası olarak veya mesleki durumlarının bir parçası olarak vücuda inhalasyon, yutma veya IV enjeksiyon yoluyla maruz kalırlar.

Enjekte edilen QD'ler, toksikokinetik ve toksikodinamik profillerinin yanı sıra hematoloji, klinik kimya ve histopatoloji dahil olmak üzere geleneksel toksikolojik uç noktalar kullanılarak potansiyel sistemik toksisite açısından incelenmekte olup karaciğer ile böbrek KN'lerin ana birikim organı olarak belirlenmiştir (Pelley ve ark 2009, Yong ve ark 2013).



Şekil 1.4. İntravenöz uygulanan KN'lerin dokularda birikimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur) (Yong ve ark 2013).

1.3. Karaciğer ve Hepatotoksisite

Karaciğer, çok sayıda metabolik, endokrin ve immünolojik fonksiyonu olan vücuttaki en büyük solid organdır. Karaciğerin başlıca görevleri safra üretimi ve salgılanması, vitamin, demir ve eser elementlerin depolanması, karbonhidrat metabolizması ve glikojen depolanması, kan için hacim deposu ve filtre, hormonal denge ve detoksifikasyon, patojenlere karşı enfeksiyonla savaşmak için bağışıklık faktörlerinin üretimi ve atık ürünlerin böbrekler ve bağırsaklar tarafından atılmak üzere dönüştürülmesidir.

Kan karaciğerden hepatik ven yoluyla inferior vena kava yönünde akar. Hepatik lobül, histolojik olarak bir santral ven, santral venin etrafında radyal olarak sıralanan hepatosit plakaları ve onu çevreleyen dört ila altı portal triaddan oluşan altıgen bir bölge olarak tanımlanır. Portal triad hepatik arteriyol, portal ven ve safra kanalından oluşur. Karaciğere giren kanın çoğu, portal venden giren ve radyal olarak

hizalanmış hepatositler arasındaki sinüzoidal boşluktan geçen bağırsaktan gelir. Kalpten gelen oksijenli kan da bu şekilde hepatik arteriyoller yoluyla portal triadlara girer. Her iki durumda da kan, hepatositlerden süzülür ve merkezi damarlar yoluyla karaciğerden çıkar. Aynı zamanda safra, hepatositlerde sentezlenir ve merkezi damardan kanaliküller yoluyla dışarı akar (MacSween 1987).

Karaciğerin fonksiyonel birimi asinüs olarak tanımlanır ve üç bölgeye ayrılır: 1. bölge periportal bölgeye, 2. bölge orta zonal bölgeye ve 3. bölge sentrilobüler bölgeye karşılık gelir. Bu üç bölge, yerelleştirme ve işlevsellik açısından farklılık gösterir.

Genel olarak, birinci bölge hepatositleri, portal triada yakınlıkları nedeniyle oksijen ve safra tuzu bakımından zengin bir ortamda bulunurlar. Bu bölgede, hepatositler, faz I ilaç metabolizmasına önemli katkı sağlayan sitokrom P450 (CYP450) enzimlerinin yüksek ekspresyonuna sahiptir. Buna karşılık, bölge üç hepatositler, portal venden en uzakta oldukları için oksijen açısından fakir bir ortamda bulunurlar. Üçüncü bölgede, hepatositler mitokondri açısından zengindir ve yüksek konsantrasyonlarda glutatyon (GSH) içerir (Treinen-Moslen 2001). Bu özellikler, bir bölgenin tercihen hasar gördüğü hepatotoksik maddelere maruz kalmanın ardından yaygın olarak görülen karaciğer hasarının bölgesel modellerine katkıda bulunur.

Karaciğerin birbiriyle ilişkili hücrelerden oluşan kompozit ağı ve hücrelerin yaklaşık %60-80'i, özelleşmiş parankimal epitel hücreleri olan hepatositlerdir. Karaciğerin metabolik ve salgılama aktivitelerinin çoğu karaciğerin bu fonksiyonel parenkim birimleri olan hepatositler tarafından gerçekleştirilir.

Tamamlayıcı hücreler arasında; fagositik Kupffer hücreleri ile hareketli makrofajlar, hepatik stellat hücreler (HSC'ler), karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC'ler), safra epitel hücreleri (kolanjiyositler), yerleşik bağışıklık hücreleri (lenfositler, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler) ve karaciğerden geçiş halinde olan dolaşımdaki kan hücreleri bulunur (Bertrand ve Leroux 2012).

KN'lerin vücuda giriş yolları ne olursa olsun, kan dolaşımına girebildikleri ve en sonunda karaciğer gibi ikincil dokulara ulaşmaktadırlar. Karaciğer vücudun metabolik merkezidir. Yağların, karbonhidratların ve vitaminlerin depolanması, sentezi, metabolizması ve yeniden dağılımından sorumlu olduğu için metabolik homeostazda hayati bir role sahiptir. Aynı zamanda bir dizi serum proteini ve çok sayıda enzim ve sitokini üretir.

Karaciğer kanla taşınan toksik maddeleri toplar ve diğer organlara kıyasla çok daha büyük hacimlerde materyal biriktirir. Bu da karaciğeri toksik maddelerin ana hedef organı yapar. Bu nedenle hepatotoksisite, ilaç ve kimyasal kaynaklı toksisitelerde önemli bir sorundur. Bu nedenle karaciğer rejenerasyon kapasitesine rağmen, yaralanmaya karşı da oldukça hassastır ve kimyasal kaynaklı karaciğer toksisitesi ciddi endişelere neden olabilir (O'Brien ve ark 2006).

Karaciğer patofizyolojisi, karaciğer hasarını tanımlamak ve karakterize etmek için önemli bir araç olarak hizmet eder. Nekroz, hepatit, kolestaz, steatoz, fibroz, granülom, vasküler lezyonlar veya neoplazm dahil olmak üzere kimyasalların neden olduğu çok çeşitli karaciğer patofizyolojileri bildirilmiştir (Kaplowitz 2004).

Hepatotoksisitenin patolojik semptomları, etkilenen hücre içi organellerle ilgili olabilir. Hepatotoksisite mekanizmaları karmaşıktır ve etkileşim halindeki farklı yolları içerebilir. Halihazır, kimyasal ve ilaca bağlı hepatotoksisitenin genel biyokimyasal mekanizmalarına ilişkin makul bir açıklama eksikliği vardır. Hücresel stres, mitokondriyal işlev bozukluğu, bağışıklık reaksiyonları, spesifik enzimlerin veya taşıyıcıların inhibisyonu ve biyotransformasyon ve reaktif metabolitlerin oluşumu dahil olmak üzere rapor ediilen bazı genel mekanizmalar bulunmaktadır (Pandit ve ark 2012).

Vücudumuzda aşırı ROS üretimine direnen endojen bir antioksidan sistem mevcuttur. Antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilen ve hayati moleküller zarar görmeden serbest radikal zincirleme reaksiyonunu sonlandıran moleküllerdir. Artan ROS seviyesi, hücrenin bozulmasına neden olur. Aşırı ROS üretiminin, hücre içi Ca^{2+} seviyelerinin artmasının ve kadmiyum içeren KN'lerde Cd^{2+} salınımının karaciğer toksisitesinin ana moleküler mekanizmaları olarak kabul edilmektedir (Wang ve ark 2007).

Farelere iv olarak enjekte edilen CdSe/ZnS KN'ler, karaciğerde inflamasyona ve işlev bozukluğuna sebep olmuş ve karaciğer toksisitesini indüklemiştir (Liu et al., 2011).

TGA/TGH-CdTe KN'lerin neden olduğu bariz karaciğer hasarı, hepatositlerin şişmesini, hepatositlerin sitoplazmasındaki yağın azalmasını, nükleer piknozu ve kılcal damarlarda kolestazı içermektedir. MDA gibi lipid peroksit seviyelerinin artması ve antioksidan sistemin değişmesi nedeniyle karaciğerin oksidatif stresi indüklenir ve bu da karaciğer hasarına yol açar (Sun ve ark 2011).

SOD, süperoksit radikalinin sıradan moleküler oksijene veya hidrojen perokside dönüşümlü olarak dismutasyonunu katalize edebilen önemli antioksidan savunma sistemleridir. Azalmış SOD, oksidan hücre hasarına neden olur. CdTe KN'lerin karaciğer dokusunda MDA içeriğini artırdığı bulunmuştur. KN'lerin karaciğerin antioksidan sistemini aktive edebileceğini ve dokularda oksidatif hasara neden olabileceğini bilinmektedir (Zhang ve ark 2015).

Birkaç çalışma, KN'lerin ciddi karaciğer hasarına, karaciğer dokusu hastalığına ve hatta karaciğer fibrozuna neden olabileceği sonucuna varmıştır. Karaciğer hücresinin dejenere olduğu, ALT ve AST'nin karaciğer fonksiyon indekslerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Fan ve ark 2016).

Mitokondriler KN kaynaklı karaciğer toksisitesinin ana hedefidir. Mitokondriyal disfonksiyon, bozulmuş enerji metabolizmasına yol açar ve fare karaciğer hücrelerinde oksidatif stresi indükler. Bu da fare karaciğer dokusunda oksidatif hasara neden olur.

Yakın tarihli bir çalışma, CdTe KN'lerin farelerin karaciğerinde oksidatif stres ve apoptoz arasında bir bağlantı oluşturduğunu bulmuştur. CdTe KN, elektron transfer zinciri enzimlerinin aktivitesini azaltır. Böylece oksidatif fosforilasyon sürecini zayıflatır ve ROS birikimine yol açarak ATP tüketimine ve oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres ve ATP tükenmesi, apopitoz yolunu daha da aktive eder (Nguyen ve ark 2020).

1.4. Böbrek ve Nefrotoksisite

Böbrekler kanın süzülmesinden sorumludur. Korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kan filtrasyonu, kortekste, işlevsel birim olan nefronlardaki kapiller ağdan oluşan bir yapı olan glomerullar aracılığıyla gerçekleşir.

İntravasküler ajanların renal klerensi, glomerüler filtrasyon, tübüler sekresyon ve son olarak molekülün idrar yoluyla atılımını içeren çok yönlü bir süreçtir. İntravasküler ajanların glomerüler kapiller yatağa ulaşması ile, moleküller ya glomerüler kapiller duvardan proksimal tübüle süzülür ya da vasküler kompartıman içinde kalır (Deen ve ark 2001).

NP'nin renal klirensi, olası yan etkilerden kaçınmak için insan vücudundan minimum katabolizma veya parçalanma ile NP'nin uzaklaştırılması için arzu edilen yoldur. Saptanabilir miktarda KN, IV enjeksiyondan 28 gün sonra karaciğer ve

böbrekte (Yang ve ark 2007) ve enjeksiyondan 133 gün sonra farelerin kemik iliğinde ve lenf düğümlerinde bulunabildiği rapor edilmiştir (Hardman 2006).

Kadmiyum içeren KN'lerin ana hedef organı olan böbrek, çok sayıda fonksiyonla metabolizma ve oksidatif-redüksiyon ve immünolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Su ve ark 2011). Böbrek, metabolik atıkların atılımında, asit-baz dengesinde ve elektrolit bileşiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığından, memeli böbreğinin fonksiyonel bütünlüğü tüm vücudun homeostazı için önemlidir (Wu ve Tang 2018).

KN'lerin boyutunun böbrek filtrasyon boyutu sınırları içinde olması nedeniyle, neredeyse tüm KN'lerin, özellikle kuyruk damarından enjekte edilenlerin, böbrek atılımı ile atılır. Hidrodinamik çapı 4.36 ile 5.52 nm arasında değişen KN'ler için birincil boşaltım yolu renal klirens olup, KN boyutu arttıkça renal klirens azalır. Büyük boyutlu KN'lerde renal klirensi zordur ve karaciğer, dalak, akciğerlerde birikebilirler.

Ayrıca QD'lerin yükü de renal klirensini etkiler. KN'lerin tamamen anyonik ve katyonik yükleri, KN'lerin yüzeyine serum proteinlerinin adsorpsiyonunu artırır ve bu da boyutun artmasına neden olur. Artan KN boyutunun bir sonucu olarak, atılım yolu renalden hepatik klirense kayar (Nguyen ve ark 2019). Bu nedenle de, KN'lerin böbreklerde birikme ve olumsuz etkilere neden olma olasılığı çok yüksektir.

CdTe KN'lerin akut böbrek hasarına neden olur. Yüksek doz da IV uygulanan CdTe şiddetli renal tübüler epitel hücre nekrozu, vakuolar dejenerasyon, gerilmiş sitoplazma ve yoğunlaşmış çekirdek, böbrekte hasarlı glomerulus ve tübül yapıları oluşturur (Yang ve ark 2018).

Ayrıca ürik asit doza bağlı bir şekilde azalır ve kreatinin ile kan üre azot (BUN) seviyeleri önemli ölçüde artar. H&E boyamasında glomerüler kapiler kan damarlarının çoğalması ve şişmesi de gözlenmiştir (Tang ve ark 2013).

KN'lerin neden olduğu böbrek hasarı ile oksidatif stres arasında kesin ve doğrusal bir ilişki vardır. Böbrek, KN'lerin önemli bir boşaltım organıdır ve özel bir antioksidan işlevi vardır. Çünkü KN'ler tarafından üretilen aşırı serbest radikalleri uzaklaştırmak için çeşitli antioksidan maddeler üretebilir. Ancak KN'ler, böbreklerin hidroksil ve süperoksit anyon radikallerini ortadan kaldırma özelliğine sahip redükte glutatyon (GSH) seviyelerini azaltarak tükettiğinde, dokularda oksidatif hasara neden olur.

CdTe KN'leri birincil böbrek hücrelerinin redoks dengesini bozarak böbrek hücrelerini olumsuz etkiler (Zhao ve ark 2019). Böbrekte renal tübüler epitel

hücrelerinin boyutunun arttığı, sitoplazmanın eosinofilik boyandığı, lümen düzensizliği ve hatta hücre nekrozu görülmüştür.

Maruz kalınan CdTe KN konsantrasyonunun artmasıyla, karaciğer ve böbrekte serbest radikallerin süpürülme oranı kademeli olarak azalır (Du ve ark 2019).

SOD, CAT, GPX ve MDA aktivitesi ve seviyesi anlamlı olarak artarken, GSH aktivitesi azalmıştır. CdTe KN'lerin GSH'yi tüketebileceği ve dokularda oksidatif hasara yol açan hidroksil ve süperoksit anyon radikallerini ortadan kaldırmak için karaciğer ve böbreklerin süpürme yeteneğini azaltabileceği öne sürülmüştür (Wang ve ark 2017).

Proksimal tübül, tüm böbrek fonksiyonları için kritik olup ve nefrotoksik ajanlar için en önemli hedeflerden biridir. Amino asitlerin, glukozun, küçük çözünen maddelerin ve suyun yeniden emilmesi, ilaçların ve ksenobiyotiklerin salgılanması, D vitamininin en aktif formunun üretilmesi, ayrıca immünomodülatör ve metabolik fonksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli roller oynar (Ribeiro ve ark 2017)

In vivo çalışmalarda KN'lerinin böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinde belirli mitokondriyel değişiklikler yaptığı bulunmuştur. Kadmiyum zehirlenmesinde veya kadmiyum nefropatisinde olduğu gibi, KN'ler hücrelerde mitokondriyal oryantasyon kaybına ve mitokondriyal şişmeye sebep olmaktadır. Bu değişiklikler genellikle mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişikliklerin ve proksimal tübüldeki bazal kıvrımların kaybının bir işaretidir. Önemli miktarda sitokrom c oksidaz (CCO) tükenmesi mitokondriyal aktivitede azalmaya yol açar.

Ayrıca CdTeSe gibi komplekslerin parçalandığını ve salınan serbest kadmiyumun yakalanması için böbrek epitel hücreleri içindeki MT1 düzeyinin in vivo olarak yükseldiği bilinmektedir (Akerman ve ark 2002).

1.5. KN'lerin İn vivo Bağışıklık Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Bağışıklık hücreleri esas olarak kan dolaşımında ve dokularda bulunur. Vücut KN'lere maruz kaldığında, hızlı bir şekilde bağışıklık tepkisi oluşturmak ve vücuda zarar vermelerini önlemek için önce bağışıklık hücreleri tarafından tanınır ve fagosite edilir.

Fareler nazal damlatma, IP enjeksiyon ve iv enjeksiyon yoluyla KN'lere maruz bırakıldığında, organlarda nötrofillerin infiltrasyonu ve proinflamatuar sitokinlerin artan ekspresyonu en çok gözlemlenenlerdir.

Hayvan çalışmaları, en yüksek dozda (24 saatte 48 mg/kg) KN iv enjeksiyonundan 1 hafta sonra, karaciğerde enflamatuar hücrelerin multifokal infiltrasyonunun gözlendiğini ve infiltrasyonun esas olarak makrofajlar ve nötrofillerden oluştuğu bulunmuştur (Yaghini ve ark 2021).

Çalışmalar, KN'lerin makrofajları aktive etme ve enflamatuar faktörlerin ekspresyonunu artırma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, KN'lerin ip enjeksiyonunun nötrofillerin infiltrasyonuna neden olarak farelerde akut inflamasyona yol açtığını göstermiştir (Chen ve ark 2019).

1.6. KN'lerin Sitokinler Üzerindeki Etkisi

Bağışıklık sistemi, tek tek hücrelerden, lenfoid dokulardan ve organlardan ve hücre kümelerinden oluşan karmaşık bir ağdır. Koordine bir bağışıklık tepkisi elde etmek için, ağlar arasında sitokinler aracılığıyla sağlanan etkili iletişim gereklidir (Brodin ve Davis 2017).

Antiinflamatuar reaksiyon, KN'lerin immün hücreler üzerindeki etkilerinin iyi bir yansıması olduğundan serumda, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α gibi inflamatuar sitokinlerin salgılanmasında kendini gösterir.

KN'lerin karaciğer fonksiyonu veya patolojik hasar üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını, ancak karaciğer dokusunda hafif inflamasyona neden olabileceğini gösteren bazı çalışmalar vardır (Stanca ve ark 2013, Lu ve ark 2016). Örneğin; CdTe/ZnS IV olarak enjekte edilen ICR (Institute of Cancer Research) farelerin incelendiği bir çalışmada sonuçlar, KN'lerin karaciğerde herhangi bir histopatolojik değişikliğe neden olmadığını, ancak IL-6 ve TNF-α gibi bazı proinflamatuar faktörlerin ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (Lin ve ark 2011).

IL-6, B hücrelerinin farklılaşmasını indükleyebilen, koloni uyarıcı faktör ile ilkel kemik iliği kaynaklı hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını teşvik edebilen ve doğal öldürücü hücre aktivitesini artıran bir sitokindir (Vallières ve Rivest 1999).

TNF-α, esas olarak monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan, doğrudan tümör hücresi ölümüne neden olabilen ve nötrofil fagositozunu teşvik edebilen proinflamatuvar bir sitokindir (Del Campo ve ark 2018).

Ayrıca çalışmalar, Si KN'lerin proinflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri ve tümör promotörleri tarafından indüklenen ve her zaman enflamasyon bölgesinde

bulunan siklooksijenaz 2 aktivitesini arttırabildiğini göstermiştir (Serban ve ark 2015). Aynı zamanda MMP seviyelerindeki değişiklikler inflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir (Castillo-Briceño ve ark 2010).

KN'lerin IP enjeksiyonu, akut bir bağışıklık tepkisini aktive edebilir ve akut bir enflamatuar tepkiye yol açabilir. Çalışmalar, yüzey kaplamalarının, daha düşük bağışıklık toksisitesi göstererek, KN'lerin konağın doğuştan gelen bağışıklık sisteminden kaçmalarına yardımcı olabileceğini göstermiştir (Chen ve ark 2019).

Genel olarak KN'lerin neden olduğu sitotoksik süreç, hücresel antioksidasyon savunması yoluyla hücrelerin yabancı maddelere verdiği ilk tepki ile başlayıp, esas olarak oksidatif hasar ve inflamasyonun meydana gelmesiyle birlikte aşırı ROS üretimi nedeniyle hücresel savunma sisteminin başarısızlığı ve hücresel hasar, mitokondriyal disfonksiyon ve apopitoz nedeniyle sitotoksisitenin indüklenmesidir (Lin ve ark 2011). Bununla birlikte, diğer bazı çalışmalar, ROS üretimini engellemenin, hücreleri KN'lerin neden olduğu oksidatif strese veya DNA hasarına karşı korumanın tek yolu olduğunu göstermiştir (Sharma ve ark 2012).

Bu çalışmada KN sitotoksisitesini azaltmanın farmakolojik bir yolunu keşfetmek için doğal antioksidanlar olan silimarin ve mitokinonun etkilerini araştırdık. In vivo olarak tasarlanan bu çalışmamızda; KN'lerinin hem hücresel ve doku düzeyinde hem de inflamutuvar yanıt oluşturması ile ilişkilendirilmiş toksisitesi ve asıl toksisite sebebi olarak görülen ROS'un zararlı etkilerini silimarin ve mitokinon antioksidanları ile azaltmaya yönelik sonuçlar elde etmeye çalıştık.

Antioksidan seçiminde dikkat ettiğimiz ana etken, birçok farklı yoldan oksidatif hasarı engelleyebilen bir antioksidan olan silimarin özellikle mitokondrideki ROS oluşumu ve bundan kaynabilecek hasarları engelleyebilecek mitokinon seçilmiş olup, sonuçlar doku ve hücresel düzeyde incelenerek toksisite mekanizmalarına dair literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

1.7. Silimarin

Bitkisel ilaçlar, dünya genelinde çok çeşitli rahatsızlıkların tedavisi ve yönetimi için terapötik enstrümanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tıptaki büyük ilerlemelere rağmen, tıbbi bitkiler hala insanların refahında önemli bir rol oynamaktadır. Antik çağlardan beri, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için dünya çapında çok sayıda yerli bitki kullanılmıştır.

Tıbbi bitkilerin çeşitliliği arasında, en eski ve sistematik olarak araştırılan bitkilerden biri olan *Silybum marianum*, eski çağlardan beri çeşitli karaciğer hastalıkları ve üst gastrointestinal sistemin bazı sindirim sorunları için doğal ve geleneksel bir ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Saller ve ark 2007). Asteraceae/Compositae familyasına ait olan *S. marianum,* yapraklarında kırıldığında sütsü bir özsuyu serbest bırakan süt beyazı damarların varlığından dolayı genellikle 'süt devedikeni, deve kengeli veya sütlü kengel' olarak adlandırılır.

Bu bitki; özellikle Akdeniz'de, tüm Kuzey Afrika, Avrupa, Orta Doğu ve hatta Hindistan'da, Jammu ve Keşmir'de 1800–2400 m irtifada bile bulunur.

Süt devedikeninin standartlaştırılmış tohum özü olan Silimarin, çok uzun bir süredir geniş spektrumlu bir şifalı bitki özü olarak iki yüzyıldan fazla bir süredir karaciğeri çeşitli toksik maddelerden korumak, hepatik hasarı tedavi etmek ve hepatit ve siroz tedavisinde geleneksel/bitkisel bir tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır. Silimarin ayrıca böcek ve yılan sokmaları, mantar ve alkol zehirlenmeleri için panzehir olarak da kullanılmıştır (Flora ve ark 1998).

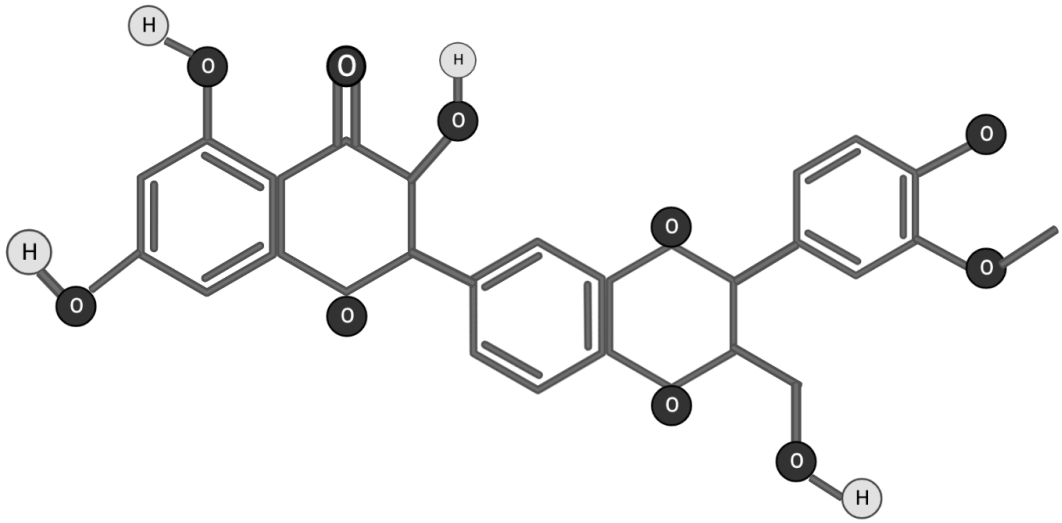


Şekil 1.5. Deve dikeni (Silybum Marianum)

Kimyasal olarak silimarin, polifenolik bir flavonoid özü olup, % 20-35 yağ asitleri ve diğer bazı polifenolik bileşenlerle birlikte yaklaşık %70-80 silimarin flavonolignanlardan oluşur.

Silimarinin flavonolignanları arasında yaklaşık % 60-70 oranında bulunan silibinin (silybin), (2R,3R)-3,5,7-trihidroksi-2-[(2R,3R)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2(hidroksimetil)- 2,3-dihidrobenzodioksin-6-il] kroman-4-on, silibin A ve silibin B diastomerlerinden oluşan en aktif bileşiktir.

Silimarinde bulunan diğer flavonolignanlar izosilibin (%5), silikristin (%20) ve silidianindir (%10). Silimarinde de bulunan bazı minör flavonolignanlar arasında silimonin ve isosilikristin bulunur. Taksifolin silimarinde bulunan temel bir flavonoiddir (Dixit ve ark 2007). Silimarinin yapısal formülü Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



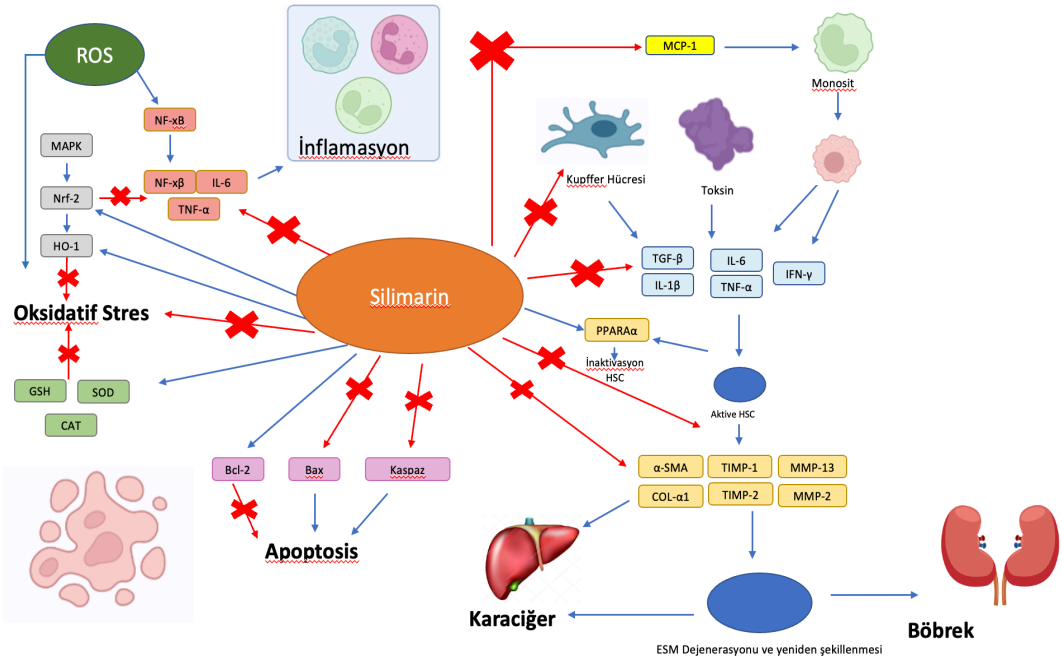
Şekil 1.6. Silimarinin yapısal formülü (Biorender.com ile oluşturulmuştur).

Preklinik ve klinik araştırmalardan elde edilen kanıtlar, silimarin ve onun flavonolignanlarının önemli ölçüde antioksidan, antiinflamatuar ve proapoptotik özellikler kazandırdığını ortaya koymuştur.

Kardiyo-protektif, foto-protektif, hepato-protektif, nöro-protektif, immünomodülatör, antikanser ve antidiyabetik özellikler gibi çok farklı biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahiptir.

Kanıtlanan terapötik etkinlikleri nedeniyle, en yaygın kullanılan diyet takviyelerinden biridir ve piyasada farklı formlarında (tabletler, kapsüller, şuruplar, vb.) (Livergol®, Silipide®, Carsil® tabletler, Legalon® kapsüller ve Alrin-B® şurubu vb gibi) bulunur. Vietnam İlaç İdaresi tarafından onaylanan nano silymarin OIC, karaciğer fonksiyonunu iyileştirmek için kapsül şeklinde bir besin takviyesi olarak ticari olarak temin edilebilen tek patentli nanoformülasyondur (Javed ve ark 2018).

Silymarin, Şekil 1.7'de gösterildiği gibi, transkripsiyon faktörleri, inflamatuar mediatörler, protein kinazlar, reseptörler ve enzimler dahil olmak üzere çeşitli moleküler hedeflerle doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girerek muazzam bir biyolojik ve farmakolojik potansiyel dizisine sahiptir.



Şekil 1.7. Silimarinin dolaylı veya dolaylı yoldan etkileşime girdiği moleküler hedefler (Biorender.com ile oluşturulmuştur).

1.8. Mitokinon (Mito Q)

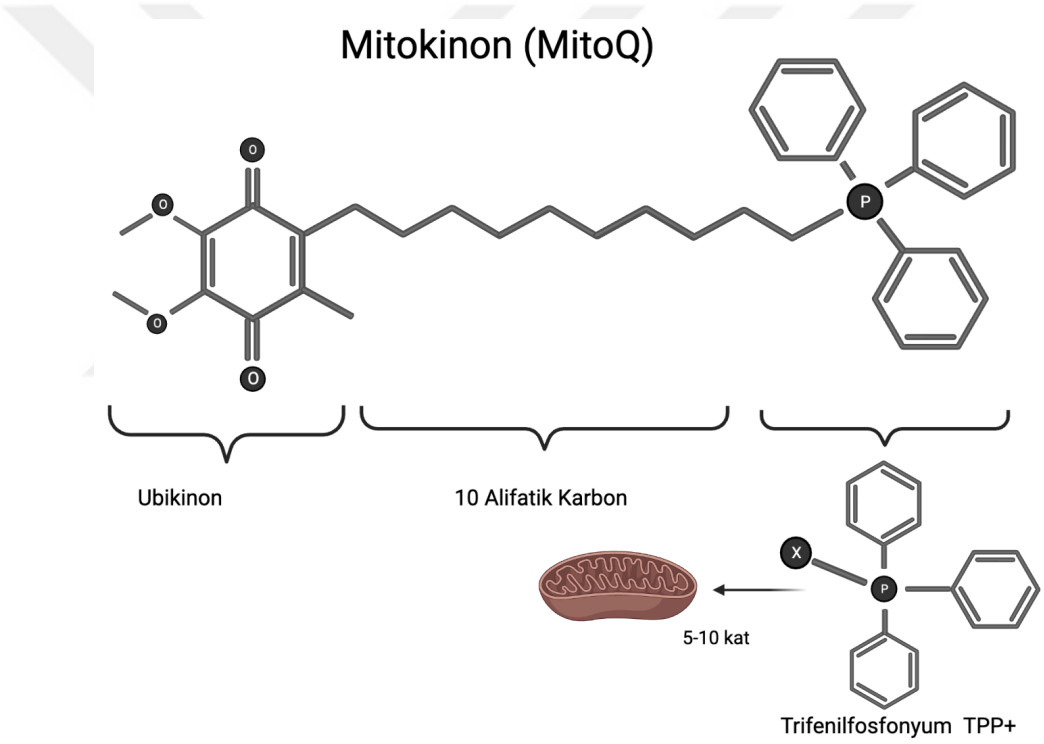
Mito Q, mitokondriyi hedefleyen ve yaygın olarak kullanılan antioksidanlar arasındadır. 1990'larda, yerel anti-oksidatif kapasiteye aracılık ettiği mitokondri içinde

birkaç yüz kat yoğunlaştığı kan-beyin bariyeri ve nöronal zarlara kolayca nüfuz etmesi için geliştirilmiştir.

Mito Q, endojen bir antioksidan ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin (ETC) bir bileşeni olan ubikinon veya koenzim Q'nun, trifenilfosfonyum (TPP^+) iyonlarına kovalent olarak bağlanmasıyla oluşturulmuştur.

TPP^+, negatif elektrokimyasal potansiyel ile ubikinon parçasını iç mitokondriyal zara iten lipofilik bir katyondur (Smith ve ark 2003).

Mitokinonun yapısal formülü Şekil 1.8'de gösterilmiştir. Trifenilfosfonyum (TPP^+) lipofilik katyonunun yapısı aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Mitokinonun yapısal formülü (Biorender.com ile oluşturulmuştur).

ETC içinde, süksinat dehidrojenaz olarak da bilinen kompleks II, Mito Q'nun ubikinon kısmını aşırı ROS'u temizleyen aktif antioksidan ubikinole indirger. ROS'u indirgedikten sonra ubikinol, ubikinona oksitlenir ve daha sonra kompleks II tarafından geri dönüştürülür. Mito Q, kompleks I ve III için zayıf bir substrattır. Bu

nedenle endojen ubikinon'un yerine geçemez ve bu nedenle mitokondriyal solunumda yer almaz, böylece yenilenebilir bir antioksidan görevi görür (James ve ark 2005).

Mito Q10 (MitoQ), hem hayvan hem de insan hücrelerinde Koenzim Q10'a benzer işleve sahiptir. MitoQ'nun lipid peroksidasyonunu önleme, protein karbonilasyon içeriğini azaltma, ROS seviyesini düşürme ve apopitozu önleme ile karakterize edilen in vitro özellikleri hakkında birçok veri vardır (Murphy ve Smith 2007).

MitoQ, mitokondride hızlı birikme göstererek hızla hidrokinon formu ($MitoQH_2$)'na indirgenir. $MitoQH_2$'nin rolü, mükemmel serbest radikal süpürme aktivitesidir. Aslında, darbeli radyoliz çalışmaları, MitoQ H_2'nin peroksil radikalleri için iyi bir temizleyici olduğunu göstermiştir

İn vivo olarak, kapsamlı çalışmalar bunların mitokondriye oral uygulama veya enjeksiyon yoluyla iletilebileceğini göstermiştir (Snow ve ark 2010).

Lipofilik TPP bazlı bileşiklerin iv uygulamadan sonra 5 dk içinde kandan dokulardaki mitokondriler tarafından çok hızlı bir şekilde alınmaktadır (Porteous ve ark 2010). Bununla birlikte, farklı organlarda TPP bazlı bileşiklerin alımı farklıdır.

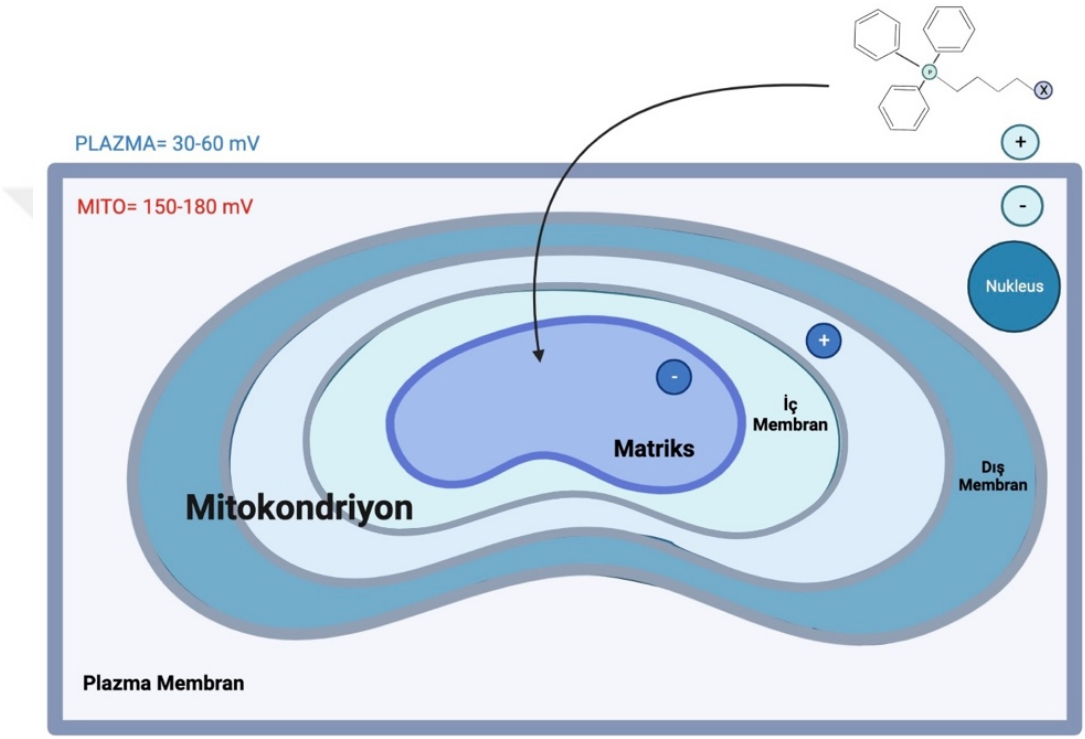
MitoQ gibi, oral uygulama veya iv enjeksiyondan sonra, esas olarak kalp, karaciğer ve böbrekte yoğunlaşmaktadır. MitoQ'nun ubikinol kısmı sülfasyon veya glukuronidasyon ile modifiye edilir ve daha sonra safra ve idrarla atılır. Organlara alınan TPP bazlı bileşikler bu organlardan kademeli olarak ortalama 2-15 saat sonra atılmaktadır. Örneğin, dokular tarafından biriken MitoQ daha sonra karaciğer için ~ 2 saat, böbrekler için ~ 4 saat ve kalp içinde ~ 15 saatlik bir yarı ömürlerle kademeli olarak atılır (Smith ve ark 2011).

TPP bazlı mitokondri hedefli bileşiklerin kapsadığı alanlar antikanser, antifungal, antiparazitik, antioksidanlar vb. içerir. Lipofilik bir katyon olarak TPP, yüksek mitokondriyal membran potansiyeline (150 ~ 180 mV) bağlı olarak verimli alım ve birikim sağlayabilir (Zielonka ve ark 2017).

Bir membran potansiyeline yanıt olarak TPP alımı, Nernst denklemi ile açıklanabilir; burada TPP katyon alımı, 37 °C'de her 61,5 mV için 10 kat artar ve TPP

katyonunun sitozolik konsantrasyonu ve mitokondride ~100- 1000 kat artış gösteririr (Zielonka ve ark 2017).

Antioksidanların mitokondride verimli bir şekilde birikmesi, şüphesiz bunların biyoyararlanımlarını artırmaya ve zararlı yan etkileri azaltmaya yardımcı olacaktır (Jauslin ve ark 2003). Şekil 1.9'da TTP katyonunun mitokondriye alımı gösterilmiştir.



Şekil 1.9. TPP katyonun mitokondriye alımı (Biorender.com ile oluşturulmuştur).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜDAM) Etik Kurulu'nda alınan 20.01.2021 tarih ve 2021-2 numaralı kurul izni ile gerçekleştirildi. Çalışmadaki histolojik değerlendirmeler Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, Hiperspektral in vivo görüntülemeler Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Laboratuvarı'nda, ICP-MS ölçümü Gıda Tarım Üniversitesi SAGEM'in anlaşmalı labrotuvarında hizmet alımı olarak, Biyokimyasal Analizler Kitlerin Temini sonrası Özel Sistem Merkezi Biyokimya Laboratuvarında hizmet alımı şeklinde, Konfokal Mikroskop görüntüleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (SÜ-İLTEK) elde edilmiştir.

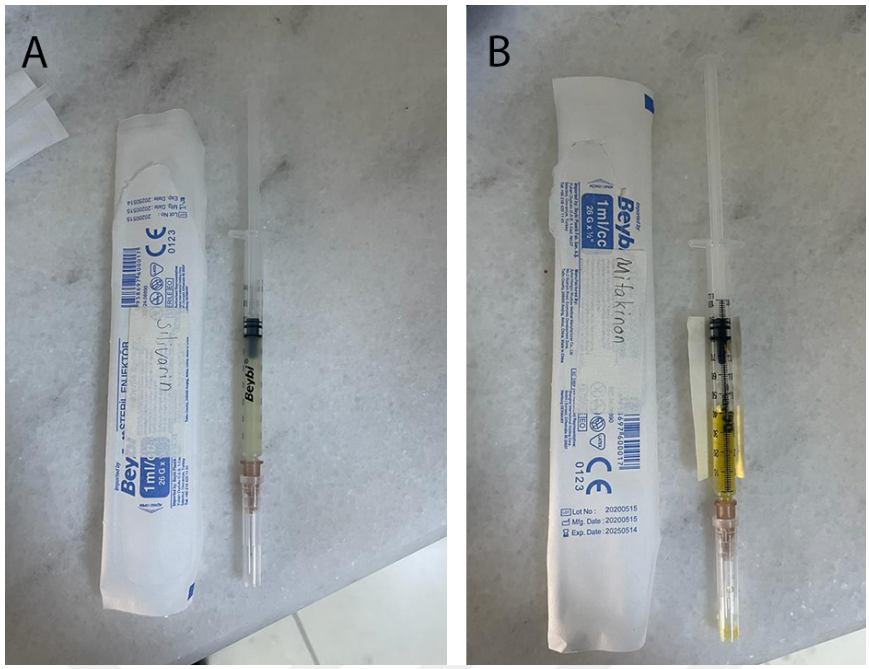
Çalışmada 8 haftalık, ortalama ağırlıkları 27,6 (25–30 gr) olan, 26 adet erkek Swiss albino fare kullanıldı. Deney süresince tüm hayvanların bakımı Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde SÜDAM Etik Kurulu hayvan bakım yönergelerine uygun olarak yapıldı.

2.2. Silimarin ve Mitokinonun Hazırlanması

Silimarin (S0292, Sigma-Aldrich, USA) 7 adet Swiss albino erkek fareye, Silimarin + CdTe KN grubunu oluşturmak için %0,1 DMSO içerisinde çözdürdükten sonra etanol/distile su (1:1) ile dilüe edilerek 100 mg/kg'lık tek doz ip olarak uygulandı.

Mitokinon (31702, Thermo Fisher) 7 adet Swiss albino erkek fareye, Mitokinon+CdTe KN grubunu oluşturmak için etanol/distile su (1:1) ile dilüe edilerek son konstrasyonun 5mg/kg olacak şekilde hazırlandı ve ip olarak tek doz uygulandı.

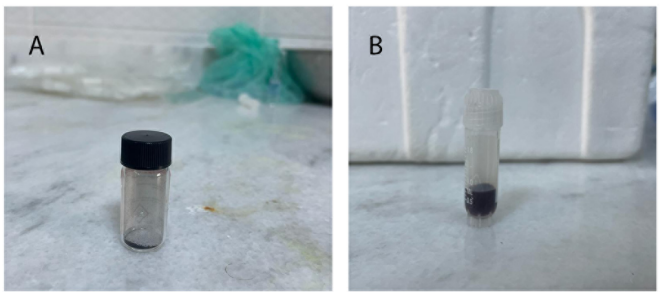
Silimarin ve Mitokinonun uygulanan dozları şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1. A: Silimarinin 100 mg/kg dozunda DMSO'da çözündürülmüş ve distile su ve alkolde sulandırılarak hazırlanmış formu **B:** Mitokinon'nun 5mg/kg etanol/distile su ile dilüe edilerek hazırlanmış formu. Hayvanlara tek doz ip uygulamaları bu enjektörlerle yapılmıştır.

2.3. CdTe Kuantum Noktanın Hazırlanması

Kullandığımız CdTe kabuk tipi (777978, Sigma-Aldrich, USA) -COOH (karboksil) ile işlevselleştirilmiş hidrofilik kuantum noktaları, 705-715 nm spektral emisyona sahiptir. 7 adet Swiss erkek fareye apirojen suda çözündürülerek hazırlanan CdTe-QD son konstrasyon 10 mg/kg olacak şekilde kuyruk veninden iv olarak uygulandı.



Şekil 2.2. CdTe Kuantum Nokta Nanopartiküllerin **A:** Toz Formu (siyah renkli), **B:** Sulandırılmış Formu (10 mg/kg dozu distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır). Sulandırılmış formundan her hayvana 100 µl kuyruk veninden iv enjeksiyon yapılmıştır. Toz ve sulandırılmış formu siyah gözüken CdTe KN'leri floresan mikroskop altında kırmızı renkli görülmektedir.

2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

8 Haftalık 26 Adet Swiss albino erkek fare rastgele olarak gruplara ayrıldı;

1. Grup (G1): Kontrol grubu: (n=5)

2. Grup (G2): CdTe toksisite grubu: (n=7)

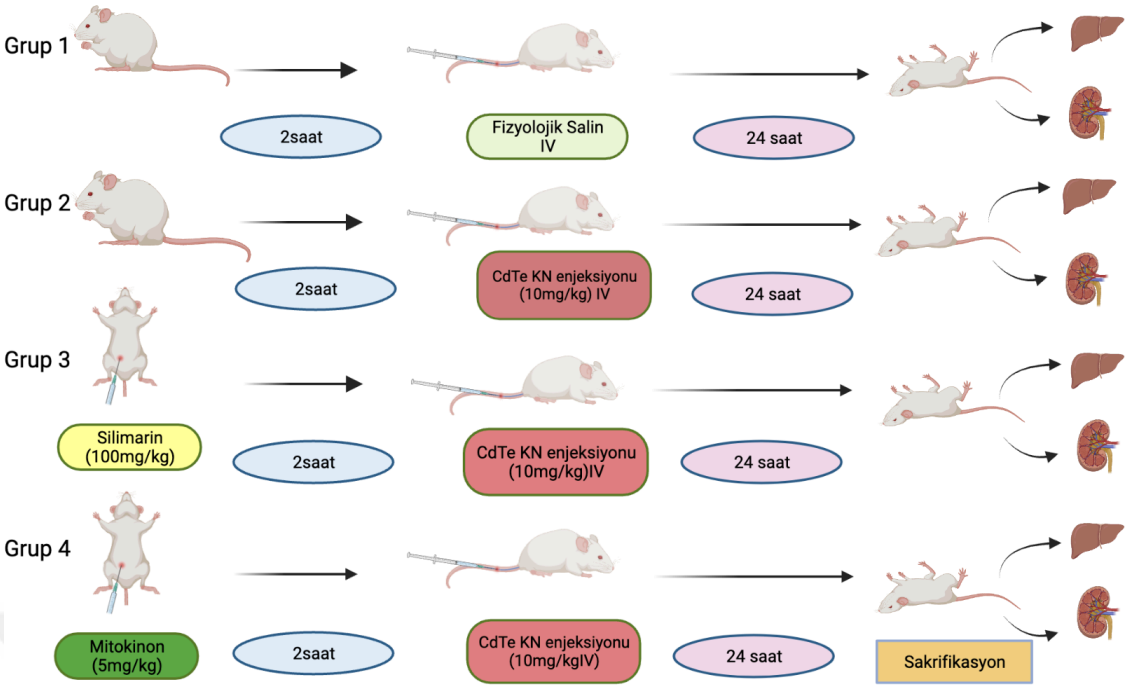
3. Grup (G3): Silimarin (2 saat önce) + CdTe grubu: (n=7)

4. Grup (G4) Mitokinon (2 saat önce) + CdTe grubu: (n=7)

Gruplar oluşturulurken ilk olarak CdTe'in Silimarin (G3) ve Mitokinon (G4) ile birlikte uygulandığı gruplardan başlanıldı. Silimarin ve mitokinonun dozları ayarlanıp, hazırlandıktan sonra 7'şer hayvana olmak üzere toplam 14 hayvana ip olarak 100 mikrolitre/hayvan olacak şekilde daha önce hazırlanmış olan konsantrasyonlarda silimarin (100 mg/kg) ve mitokinon (5 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyondan sonra hayvanlar 2 saat bekletildi.

2 saatin sonunda silimarin (G3) ve mitokinon (G4) grubundaki farelere 100 mikrolitre/hayvan olacak şekilde CdTe kuantum nanoparçacıklar 10mg/kg dozunda kuyruk veninden iv enjeksiyonu yapıldı. Hazırlanan CdTe KN, aynı konstrasyon ve miktarda CdTe toksisite grubuna da uygulandı.

Kontrol grubuna ise; yanlızca 100 μL/hayvan fizyolojik salin uygulaması kuyruk veninden iv olarak yapıldı. 24 saat beklenildi. Oluşturulan deney grupları ve yapılan işlemler Şekil 2.3'te ayrıntılı olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Deney gruplarının oluşturulması (BioRender.com ile oluşturulmuştur). Grup1: Kontrol grubudur. Yalnızca 100 µL/hayvan fizyolojik salin uygulaması yapılmış ve 24 saatin sonunda sakrifiye edilmiştir. Grup2: CdTe KN 10 mg/kg dozunda 100 µL/hayvan kuyruk veninden enjeksiyonu yapılmış toksisite grubudur. 24 saatin sonunda sakrifiye edilmiştir. Grup 3: 100 mg/kg dozunda 100 µL/hayvan ip olarak silimarin uygulanmıştır. 2 saat sonra CdTe KN (10mg/kg dozunda) 100 µL/hayvan kuyruk veninden enjeksiyon yapılmıştır. 24 saatin sonunda sakrifiye edilmiştir. Grup 4: 5 mg/kg dozunda 100 µL/hayvan ip olarak mitokinon uygulanmıştır. 2 saat sonra CdTe KN (10 mg/kg dozunda) 100 µL/hayvan kuyruk veninden enjeksiyon yapılmıştır. 24 saatin sonunda sakrifiye edilmiştir.

2.5. Doku ve Kanların Temini ve Saklanması

Hayvanların 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) ip injeksiyou ile anestezi altında in vivo kayıtları alındı. Daha sonra intrakardiyak olarak kanları alınarak sakrifiye edildi.

Karaciğer ve böbrek dokuları travmatize edilmeden çıkarılarak önce hasas terazide tartımları yapıldı ve histoloji incelemelerin yapılabilmesi için PBS taze hazırlanmış ve soğutulmuş %4'lük parafolmaldehit içine doku fiksatif oranı 1/10 olacak şekilde alındı. 24 saat +4ºC'de fikse edildikten sonra %30'luk sükroz

solüsyonuna alındı. Dokular yeterli sükroz doygunluğuna erişip dibe çökünceye kadar en az 24 saat sükrozda bekletildi.

ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) ve Kütle Spektrometresi (MS) analizi ve MDA, SOD ve CAT seviyelerinin ELİSA analizi için karaciğer ve böbrek dokularının bir kısmı kriyotüplere ayrıldı ve analiz yapılana kadar -80 C^0'de bekletildi.

İntrakardiyak olarak alınan kanlar sarı kapaklı jelli tüplere alınarak altüst edildi. Daha sonra 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Numunelerin analizi yapılana kadar -80 ºC'de saklandı.

2.6. CdTe Kuantum Nokta Nanopartiküllerinin Dokularda Birikim Analizi

2.6.1. İn vivo hiperspektral flüoresan görüntüleme

In vivo hiperspektral flüoresan görüntüleme için CdTe KN enjekte edilen gruptaki hayvanlardan Syngene GBOX-XRQ (Cambridge, UK) cihazı ile, anestezi altında dijital görüntüler alındı. Anesteziye bağlı herhangi bir anormal davranış gözlenmedi. Syngene sistemi Epi-NIR, Epi-UV ve Epi-RGB uyarma kaynaklarına ve ayrıca tüm emisyon filtrelerine sahiptir.

Ayarlanabilir filtre, 20-30 saniyelik bir maruz kalma süresiyle otomatik olarak 500'den 800 nm'ye 10 nm'lik artışlarla adımlandı. CdTe KN emisyonu 720 ile 715 nm arasında olduğundan 740 nm NIR uyarma ve 705 nm- LY 705 -LY800 nm dalga boyundaki filtreleri seçildi.

İlk olarak hayvanın anestezi altında tüm vücut görüntüsü alındı. Sakrifiye edildikten sonra da dokular görüntü tablasına sırası ile yerleştirilerek görüntüler alındı. Görüntüleri işlemek ve analiz raporlarını almak için cihazın yazılım programı kullanıldı.

2.6.2. Konfokal mikroskopi

Konfokal mikroskopik görüntülerin eldesi için Nikon Eclipse marka cihaz kullanıldı. Sakrifikasyon sonrası çıkarılıp fikse edilip sükroz solüsyonuna alınan karaciğer ve böbrek dokuları kriyomatriks (Epredia™ 6769006) içine gömülerek -

$20C^{0}$'de kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) cihazı ile 50 µm kalınlığındaki kalın kesitler lizin ile kaplanmış pozitif yüklü lamlara alındı.

İlk olarak kontrol (Grup 1) ve CdTe (Grup 2) grubundan sadece DAPI (nükleer işaretleyici)'li medyumu (Fluoroshield with DAPI, F6057, Sigma-Aldrich, USA) ile kapatılmış kesitlerin konfokal mikroskop görüntüleri 10X ve 40X'lik objektif büyütmelerinde alındı. Aynı zamanda 40X yağlı objektif ile, 50 µm kesitlerden 2 µm aralıklarla optik kesitler 25 adımda taranarak 3 boyutlu görüntüler elde edildi.

DAPI çekirdek boyasını görüntüsü için UV filtresi uygulanırken, CdTe kuantum nanopartikül için 650 nm'den büyük emisyon pikine uygun bir filtre uygulandı. İki filtre çakıştırılarak çekirdek ve KN'lerin aynı anda görüntüsü elde edildi.

Daha sonra tüm gruplar dahil olmak üzere immunflüoresan boyamalar yapılarak konfokal mikroskopik görüntüleri elde edildi. Burada da aynı şekilde DAPI için UV filtre CdTe için ve immün işaretlemede kullanılan her antikor için seçilen sekonder antikora uygun filtre kullanılarak görüntüler çakıştırıldı ve çoklu (double, triple) işaretli görüntüler elde edildi.

2.6.3. ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP)ve Kütle Spektroskobisi (MS)

24 saat sonunda karaciğer ve böbrek dokusunda CdTe KN partiküllerinin birikiminin kantitatif ölçümünün analizi için ICP-MS (Agilent 7500A, Tokyo, Japonya) kullanılmış olup Nordic Committee on Food Analysis (NMKL, 186) metoduyla yapılmıştır (Analysis 2007).

İz metal analizi için nitrik asit, Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO) satın alındı. Standartlar ve reaktifler Milli-Q (Millipore, Etobicoke, ON) kullanılarak hazırlandı. Numuneler, USEPA yöntemleri 200.2 revizyon 2.8'den uyarlanan doku sindirimi için DigiPrep uygulama notu izlenerek sindirildi.

Kısaca, kan ve doku numuneleri 95°C'de 60 dk boyunca 2 ml 10.3 M HNO_3 ile homojenize edildi. Numuneler, MilliQ® su ile 5 ml'lik nihai bir hacme kadar doldurulduu. Numuneler daha sonra Agilent 7700x ICP-MS kullanılarak analiz edildi.

2.7. Histolojik çalışmalar

Taze hazırlanmış ve soğutulmuş %4'lük parafolmaldehitte +4ºC'de 24 saat fikse edilen dokular %30'luk sükroz içerisine alındı. Doku dibe çökene kadar -en az 24 saat- bekletildi. Dokular kriyomatriks içine gömüldü ve kriyostat cihazı (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 µm kalınlığında ince kesitler alındı.

2.7.1. Hematoksilen & Eozin Boyama

İnflamasyon ve genel histolojik değerlendirme için her denekten rastgele seçilen kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanarak incelendi. H&E boyama Tablo 2.1'deki protokole uygun olarak yapıldı.

Her denekten boyanan karaciğer ve böbrek kesitleri genel histopatolojik değerlendirme için doku bütünlüğü, ödem, inflamasyon yönünden incelendi.

Tablo 2.1. Frozen kesitler için H&E protokolü.

	Frozen kesitler için H&E protokolü
1	%99,9 Absolü alkol 5 sn (2x)
2	Çeşme suyu 5 sn
3	Harris Hematoksilen 2 dk
4	Çeşme suyu 5 sn (2x)
5	%99,9 Absolü alkol 5 sn
6	Eozin 1 dk
7	Çeşme suyu 5 sn (2x)
8	%99,9 Absolü alkol 5 sn (3x)
9	Ksilen 5sn (2x)
10	Entellan ile kapatma

2.7.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Metallotionin Değerlendirmesi

Dokuda kadmiyuma bağlanan metallotheoninin sentezindeki değişikliklerin tayini için kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 µm kalınlığında alınan karaciğer ve böbrek frozen kesitleri poliklonal anti MT2A primer antikoru

(DF6755 Affinity Biosciences, Japan) ile immunflüoresan olarak işaretlendi. Sekonder antikor olarak Donkey anti-rabbit IgG-FITC kullanıldı. Uygulanan protokol tablo 2.2'de gösterilmiştir.

İşlemler karanlık ortamda nem odası oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede karaciğer ve böbrek preparatlarından rastgele 5 alan alan seçilerek DP72 dijital kamera ile kaydedildi. Kaydedilen görüntülerde işaretli alanın total alana oranı Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2.2. Anti-MT2A antikoru işaretleme protokolü.

Anti-MT2A antikoru işaretleme protokolü	
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
3	%5 BSA ve %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile 30 dk inkübasyon
4	PBS ile 3x5dk yıkandı.
5	Protein Blok (Ab 64226, Abcam, UK) solüsyonuyla 30 dk inkübasyon
6	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
7	MT2A Antibody (#DF6755 Affinity Biosciences, Japan) (1/200 dilüe edilmiş) antikoru ile 24 saat, +4°C'de muamele edildi.
8	PBS ile 3x5dk yıkandı.
9	Donkey anti-rabbit IgG-FITC: (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) sekonder antikor ile 3 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyon
10	PBS ile 3x5dk yıkandı.
11	Kesitler DAPI'li floresan kapatma medyumu ile kapatıldı.

Proinflamasyon ve akut faz yanıtları

CdTe KN Nanopartiküllerinin indüklediği inflamasyon ve bu inflamasyon üzerine silimarin ve mitokinon antioksidanlarının etkisinin değerlendirilmesi için kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 μm kalınlığında alınan karaciğer ve böbrek kesitleri anti MT-MMP2 (sc-80213, Santa Cruz Biotechnology,USA), anti MMP9 (sc-10737, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti Ki-67 (AF0198, Affnity Bioscience, Japan), anti TNF alfa (ABIN343428, Antibodies.com,UK) , konjuge anti IL-10 (A-2) (Alexa Fluor 594, sc-365858, Santa Cruz Biotechnology,USA), konjuge IL-1 beta (E7-2-hIL1β) (Alexa Fluor 594, sc-32294, Santa Cruz Biotechnology,USA) antikorları ile işaretlendi.

Tüm antikorlar farklı her doku için farklı kesitlerde uygulanmıştır. Uygulanan protokol basamakları ve antikor seyreltme oranları konjuge ve konjuge olmayan antikora göre Tablo 2.3 ve Tablo 2.4'te özetlenmiş olup konjuge olmayan primer antikorların kullanıldığı protokollerde flüoresan işaretli sekonder antikorlar kullanılmıştır.

İşlemler karanlık ortamda, kapaklı nemli ortam oluşturulan kutularda yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede karaciğer ve böbrek preparatlarından rastgele 5 alan alan seçilerek DP72 dijital kamera ile kaydedildi.

Kaydedilen görüntülerde işaretli alanın total alana oranı Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2.3. Konjuge olmayan antikorların işaretleme protokolü.

Konjuge olmayan antikorların işaretleme protokolü.	
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
3	Kesitler %5 BSA ve %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile 30 dk inkübe edildi.
4	PBS ile 3x5dk yıkandı.
5	Protein Blok (Ab 64226, Abcam, UK) solüsyonuyla 37^0C'de 30 dk
6	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
7	Anti-MT-MMP2 (sc-80213, Santa Cruz Biotechn,USA) (1/200 dilüe edilmiş) Anti MMP9 (sc-10737, Santa Cruz Biotechnology, USA) (1/200 dilüe edilmiş) Anti Ki67 (AF0198, Affnity Bioscience, Japan) (1/200 dilüe edilmiş) Anti TNF alfa (ABIN343428, Antibodies.com,UK) (1/200 dilüe edilmiş) antikoru ile 24 saat, +4°C'de muamele edildi. Tüm antikorlar farklı kesitlerde boyandı.
8	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
9	Anti- MT-MMP2 antikoru ile işratlenen kesitler Goat Anti-Mouse IgG H&L (DyLight® 488) (ab96871, Abcam, UK) Diğer antikorlar ile işaretlenmiş kesitler Donkey anti-rabbit IgG-FITC: (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) sekonder antikor ile 3 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
10	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
11	Kesitler DAPI'li floresan kapatma medyumu ile kapatıldı.

Tablo 2.4. Konjuge antikorların işaretleme protokolü.

Konjuge antikorların işaretleme protokolü	
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
3	Kesitler %5 BSA ve %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile 30 dk inkübe edildi.
4	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
5	Protein Blok (Ab 64226, Abcam, UK) solüsyonuyla 37^0C'de 30 dk inkübasyon
6	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
7	Kesitler ayrı ayrı Konjuge anti IL-10 (A-2) (Alexa Fluor 594, sc-365858, Santa Cruz Biotec, USA) Konjuge IL-1 beta (E7-2-hIL1β) (Alexa Fluor 594, sc-32294, Santa Cruz Biotechnology,USA) antikorları ile 24 saat +4 ^{0}C'de inkübe edildi
8	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
10	Kesitler DAPI'li floresan kapatma medyumu ile kapatıldı.

Apoptotik Değerlendirme

KASPAZLAR

Apoptotik yolakların değerlendirilmesi için Kriyostat (Thermo Shandon Cryostat 210160GB) ile 4 µm kalınlığında alınan karaciğer ve böbrek kesitleri anti kaspaz-8 (ab4052, Abcam, United Kingdom) ve anti kaspaz-9 antikoru (ab4053, Abcam, United Kingdom) ile işaretlendi.

Uygulanan protokol Tablo 2.5'te gösterilmiştir. İşlemler karanlık ortamda nem ortamı oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede karaciğer ve böbrek preparatlarından rastgele 4'er alan seçilerek DP72 dijital kamera ile kaydedildi.

Kaydedilen görüntülerde anti Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 işaretli hücrelerin alan yüzdeleri Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2.5. Kaspazların işaretleme protokolü.

Anti-Kaspazların işaretleme protokolü	
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
3	Kesitler %5 BSA ve %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile 30 dk inkübe edildi.
4	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
5	Protein Blok (Ab 64226, Abcam, UK) solüsyonuyla 37^0C'de 30 dk inkübasyon
6	Yıkama yapmadan pipet ile blok solüsyonu uzaklaştırıldı.
7	Kesitler ayrı ayrı Anti kaspaz-8 (ab4052, Abcam, UK) ve Anti kaspaz-9 antikoru (ab4053, Abcam, United Kingdom) ile 24 saat, +4°C'de muamele edildi.
8	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
9	Donkey anti-rabbit IgG-FITC: (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) sekonder antikor ile 3 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
10	PBS ile 3x5 dk yıkandı.
11	Kesitler DAPI'li floresan kapatma medyumu ile kapıtıldı.

TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı dNTP ucu etiketleme)

DNA hasarı göstergesi olarak TUNEL Andy Fluor™ 488 Apoptosis Detection Kit (ABP Biosciences, Cat No. a050, Lot No. AB2150A2) ile işaretlendi.

Uygulanan protokol Tablo 2.6'da kısaca özetlenmiş olup, pozitif ve negatif kontroller de protokolde belirtildiği gibi yapıldı. İşlemler karanlık ortamda nem odası oluşturularak yapıldı. Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. 40X büyütmede karaciğer ve böbrek preparatlarından rastgele 4'er alan seçilerek DP72 dijital kamera ile kaydedildi.

Kaydedilen görüntülerde TUNEL (+) işaretli hücreler ve DAPI (+) işaretli hücreler Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı kullanılarak sayıldı. Apopitotik indeks (AI) "toplam apopitotik hücre/toplam hücre X 100" formülüne göre hesaplandı.

Tablo 2.6. TUNEL protokolü.

TUNEL protokolü	
1	Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
2	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
3	Oda sıcaklığında 30 dk %0,2 Triton X-100 içeren PBS ile inkübe edildi.
4	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
5	Oda sıcaklığında 30 dk proteinaz K solüsyonu inkübe edildi.
6	PBS ile 2x5 dk yıkandı.
Pozitif kontrol için (7, 8, 9. Basamaklar uygulandı.)	
7	Örnekler DNAase I tamponu ile 10 dk inkübe edildi.
8	DNAase I solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
9	Deiyonize su ile bir kez yıkandı.
TUNEL Reaksiyonu	
10	Örnekler TdT reaksiyon tamponu ile 10 dk inkübe edildi.
11	Taze hazırlanmış TdT reaksiyon kokteyli ile 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
Negatif kontrol örneklerine, 11. basamak yerine TdT enzim içermeyen 50 µl TdT reaksiyon kokteyli eklendi.	
12	%3 BSA'lı PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
13	Andy FluorTM 488-Streptavidin solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon
14	%3 BSA'lı PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
15	Kesitler DAPI'li flüoresan kapatma medyumu (Fluoroshield with DAPI, F6057, Sigma-Aldrich, USA) ile kapatıldı.

2.8. Biyokimyasal Çalışmalar

2.8.1. Serum Biyokimyasal testler

Serum albümin (BioSystems, albümin 11573), Direkt bilirubin (BioSystems, Bılırubın (Dırect) [DPD] 21504), total bilirubin (BioSystems, Bılırubın (Total) [Dpd] 21506) , üre (BioSystems, urea/bun – uv 21516, kreatinin (BioSystems,Creatınıne 21502) ile serum AST (BioSystems, Aspartate Aminotransferase, 11531), ALT (BioSystems, Alanine Aminotransferase, 11533) ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) (BioSystems, Lactate Dehydrogenase (LDH) 21580) aktiviteleri spektrofotometrik olarak ticari kitler yardımıyla Chebios, Optimum- One UV-VIS spektrofotometrede ölçüldü.

2.8.2. Serum Total Oksidan (TAS) ve Antioksidan Seviyesi (TOS)

TAS seviyeleri ticari olarak temin edilen TAS (RL0017) Rel Assay Diagnostics marka kit (Relassay, Türkiye) kullanılarak Beckman Coulter AU5800 Series (Japan) cihazında çalışılmak üzere aplike edildi.

Otomatik yöntem, daha kararlı bir ABTS' 2,2′-Azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)'nin karakteristik renginin açılmasına dayanan fotometrik yönteme dayanmaktadır. Assay, %3'ün altında olan mükemmel hassaslık değerlerine sahiptir. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edildi.

TOS seviyeleri ticari olarak temin edilebilen TOS (RL0024) Rel Assay Diagnostics (Turkey) marka kit (Relassay, Türkiye) kullanılarak Beckman Coulter AU5800 Series (Japan) cihazında çalışılmak üzere aplike edildi.

Numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona oksitledi. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirildi. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkilidir.

Assay, hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri (μmol H_2O_2 eşdeğeri/L) cinsinden ifade edildi.

2.8.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) değeri TAS ve TOS değerlerinin % oranı olarak kabul edilir ve oksidatif stres yükünü göstermektedir.

OSI = [TOS (μmol H_2O_2/L) /TAS (μmol Trolox equivalent/L)] X 100 formülüne göre hesaplandı.

2.8.4. Doku Katalaz (CAT), Superoksit Dismutaz 1 (SOD1) (Cu-Zn) ve Malondialdehid (MDA) Seviyelerinin Belirlenmesi

Karaciğer ve böbrek dokusunda antioksidan enzimler olan Superoksit dismutaz (Mouse SOD1 ELISA KIT, Fine Test EM0419-, China) ve katalaz (Mouse CAT ELISA KIT, Fine Test EM0357-, China) ile yağ asidi oksidasyonunun kantitatif

indikatörü olan malondialdehit'in (Mouse MDA ELISA KIT, Fine Test EM1723-, China) ölçümünde ELISA kitleri kullanılmıştır.

Ölçümler için doku homojenizatları hazırlandı. Hemoliz kanının tahlil sonucuyla bir ilişkisi olduğundan, dokuyu ön soğutmalı PBS tamponu (0,01M, pH=7,4) ile yıkayarak kalıntı kan uzaklaştırıldı.

Dokuyu tarttıktan sonra homojenizatör yardımıyla doku parçalanarak, 1 gram doku parçası 9 ml PBS'de homojen hale getirildi. Homojenatlar daha sonra süpernatanı elde etmek için 5 dakika 5.000 x g'de santrifüj edildi.

Toplam protein konsantrasyonu BCA kiti ile belirlendi ve her kuyu örneğinin toplam protein konsantrasyonu 0.3 mg'ı geçirilmedi. Numune seyreltme tamponu ile uygun seyreltmeler yapıldı.

Sonuçlar, AMR-100 Microplate Reader marka ELISA mikroplate okuyucuda okutularak kite uygun birimlerde sonuçlar elde edildi.

2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler *R* version 4.2.1. istatistiksel yazılım dili yardımıyla gerçekleştirildi (www.r-project.org). Analizler öncesinde verilerin normalliği Shapiro-Wilk'in normallik testi ve Q-Q grafikleri yardımıyla, grup varyanslarının homojenliği ise Levene testi ile kontrol edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

Çalışma gruplarına göre hayvanların canlı ağırlıkları ve organ ağırlıkları, karaciğer ve böbrekteki MDA, SOD, CAT düzeyleri, biyokimyasal parametreleri ve immünhisto-kimyasal boyama sonuçları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı verilerin normal dağılıma uygun ve grup varyasnlarının homojen olması durumunda Tek Yönlü Varyans analizi; verilerin normal dağılıma uygun fakat grup varyanslarının homojen olmaması durumunda Welch *F* (Robust ANOVA) testi; verilerin normal dağılıma uymaması durumunda ise Kruskal Wallis testi kullanılarak incelendi. Bu testler sonucunda gruplar arasında fark tespit edilen parametreler için çoklu karşılaştırmalar için sırasıyla Tukey HSD, Games-Howell testi ve FDR (false discovery rate) düzeltmeli Dunn testi kullanıldı.

Bütün sonuçlar box-plot grafikleri yardımıyla da şekil olarak sunuldu. Gruplar arasındaki farklar “*” ile gösterildi. Anlam düzeyi %5 alındı. FDR düzeltmesinde ise anlam düzeyi 0.0083 olarak anlam düzeyi düzeltildi.

3. BULGULAR

Kontrol grubunda (G1) 5, diğer gruplarda 7 denek içeren 4 grupta toplamda 26 fare çalışmaya alındı. Hayvanların sakrifikasyon öncesi toplam ağırlıkları ve sakrifikasyon sonrasındaki karaciğer ve böbrek ağırlıklarının çalışma gruplarına göre karşılaştırılması Tablo 3.1'de verildi.

Elde edilen sonuçlara göre, hayvanların sakrifikasyon öncesindeki canlı ağırlıkları gruplar arasında benzerdi (p=.288).

Sakrifikasyon sonrasında ise G2 gruptaki hayvanların karaciğer ağırlıklarının silimarin uygulanan gruptaki (G3) hayvanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptandı (1960.29 ± 46.99 vs. 1605 ± 101.53, düzeltilmiş p=.039).

Ayrıca, sakrifikasyon sonrasında silimarin uygulanan gruptaki hayvanlar ile G2 grubundaki hayvanların sağ ve sol böbrek ağırlıkları kontrol (G1) grubundaki hayvanlardan anlamlı şekilde yüksekken, mito-Q uygulanan gruptaki (G4) hayvanların sağ ve sol böbrek ağırlıkları ise tüm gruplar ile benzerdi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hayvanların sakrifikasyon öncesi toplam ağırlıkları ve sakrifikasyon sonrasındaki karaciğer ve böbrek ağırlıkları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
Toplam ağırlık (g)	30.40 ± 0.75	29.43 ± 0.84	31.43 ± 0.72	30.57 ± 0.37	.288
Karaciğer ağırlığı (g)	1891.40 ± 104.79	1960.29 ± 46.99[b]	1605 ± 101.53[a]	1736.86 ± 59.21	.028
Böbrek ağırlığı (sağ) (g)	218.29 ± 5.83[b]	252.80 ± 9.22[a]	248.43 ± 3.95[a]	228.14 ± 11.21	.028
Böbrek ağırlığı (sağ) (g)	214.71 ± 5.14[b]	252.20 ± 6.42[a]	249.14 ± 7.13[a]	236 ± 10.62	.014

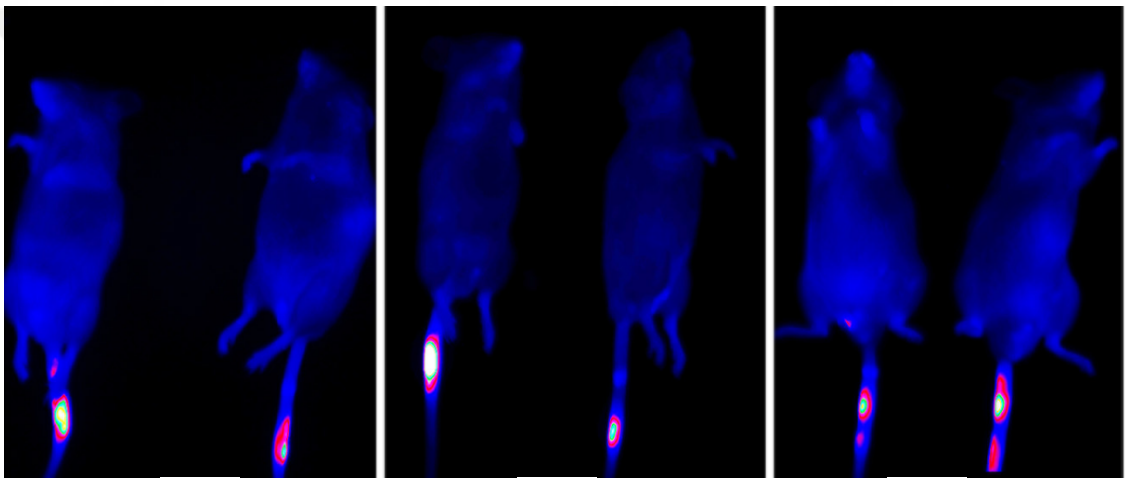
Her bir satırdaki farklı harfler, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı gösterir (FDR düzeltmeli Dunn testi sonuçları).
p-değerleri Kruskal-Wallis testi ile elde edildi.
Kısaltmalar: G2, kadmiyum uygulanan grup; G3, silimarin uygulanan grup; G4, mito-Q uygulanan grup.

3.1. İn Vivo Hiperspektral Görüntü Analizi

Hiperspktral görüntüler 10mg/kg dozda CdTe Kuantum Nokta nanopartikül enjeksiyonu yapılan hayvanlardan 24 saatlik bekleme süresi sonunda anestezi altında elde edildi (Şekil 3.1).

Görüntülerde yoğun parlamanın olduğu yerlerde kuantum noktaların enjeksiyon sonrası vücuttaki dağılımı görülmektedir.

Kalın derileri ve kürkleri sebebiyle sakrifiye edilmemiş hayvanda organlardaki dağılım net görülemezken, kuyruk veninden enjeksiyon bölgesi net görülmektedir.

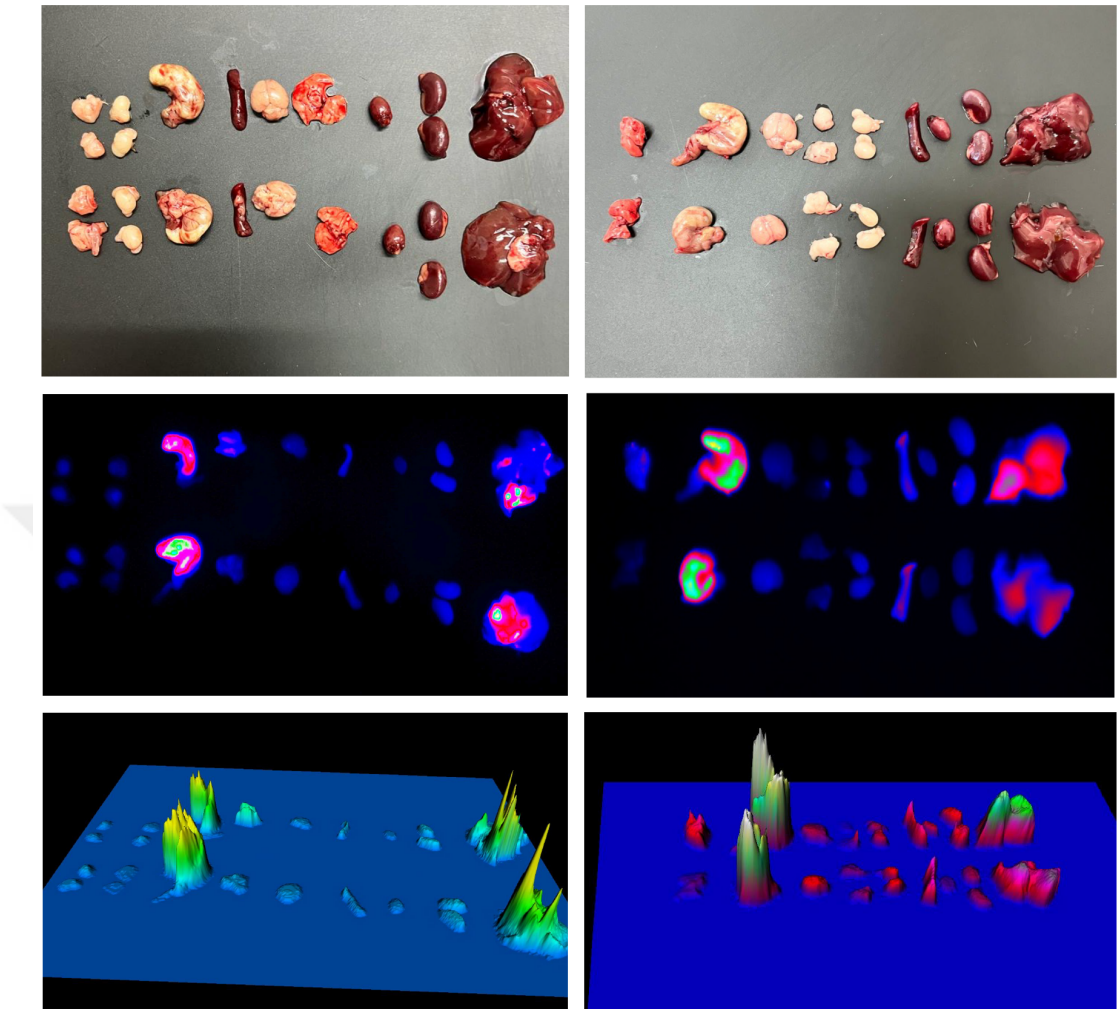


(a) (b) (c)

Şekil 3.1. Anestezi altındaki iki hayvanın (a) sağdan (b) soldan ve (c) sırtüstü hiperspektral mikroskop görüntüleri. Görüntüler anestezi altında çekilmiştir. 740 nm NIR uyarma ve 705 nm- LY 705 -LY800 nm filtreleri uygulandı. Kuyruk veninden yapılan CdTe KN'lerinin uygulandığı bölge ve kuyruk veninden ilerlemesi gözükmektedir. Renk skalası bu şekilde olup renk skalası sarıdan maviye doğru azalmaktadır ( ).

Sakrifiye edilen hayvanların tüm organları görüntü tablasına sırası ile dizilip, organlarda birikim gösteren CdTe kuantum nokta partiküllerinin görüntüsü ve yoğunluk grafiği elde edildi.

Organlar arası flüoresan parlama yoğunluk grafiğine baktığımızda karaciğer, böbrek, dalak ve midede birikimin diğer oranlara göre daha fazla olduğu görülmekte olup, karaciğerdeki yoğun birikim ve biriktiği bölgeler görülmektedir.



(a) (b)

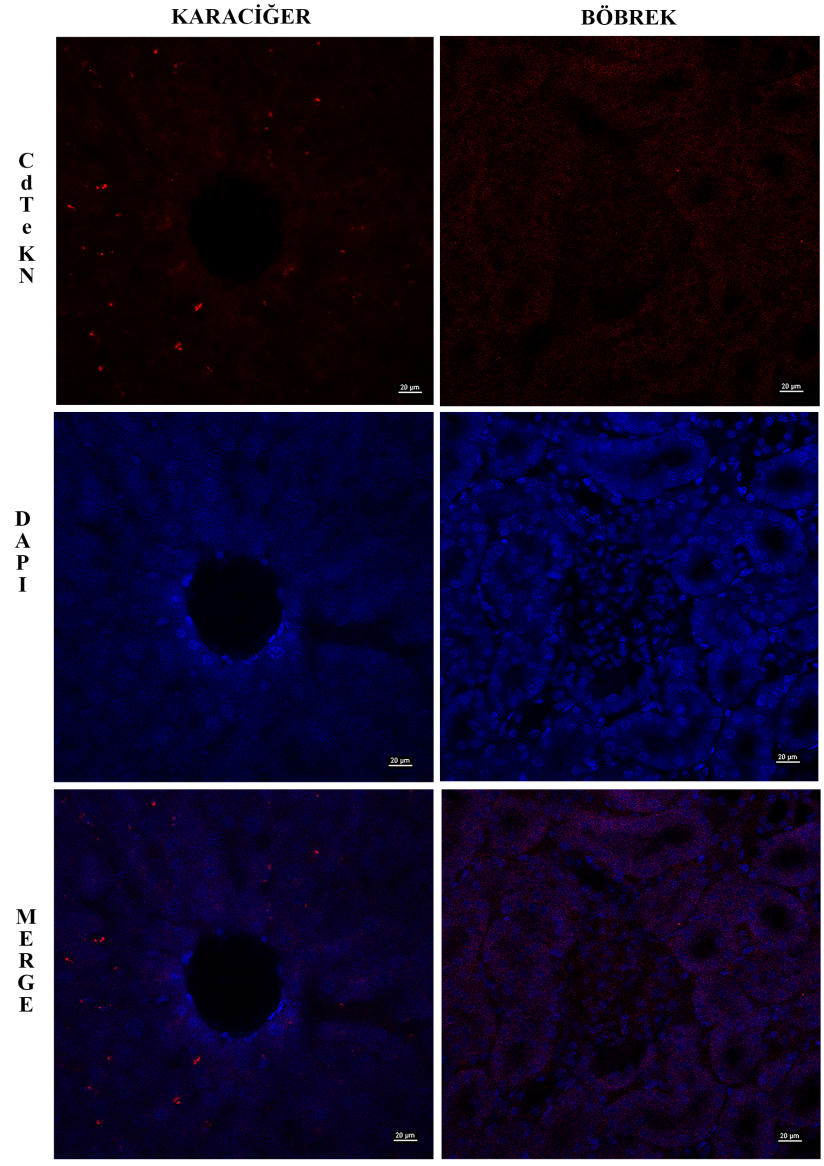
Şekil 3.2. (a) En üst şekil: Sakfirikasyon sonrası farklı iki hayvanın sırasıyla soldan sağa epididimis, testis, mide, dalak, beyin, akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer organları. Ortadaki şekil: Organlardaki CdTe KN nanopartikül yoğunluk grafiği üstten görüntü En alt şekil: Organlardaki CdTe KN nanopartikül yoğunluk grafiği (b) En üst şekil: Sakfirikasyon sonrası farklı iki hayvanın soldan sağa sırasıyla akciğer, mide, beyin, epididimis, testis, dalak, mide, böbrek ve karaciğer organları Ortadaki şekil: Organlardaki CdTe KN nanopartikül yoğunluk grafiği üstten görüntü En alt şekil: Organlardaki CdTe KN nanopartikül yoğunluk grafiği. Yoğunluk grafiğinde kullanılan renkler; sarıdan maviye yoğunluk azalmaktadır ( ).

3.2. Dokularda KN birikiminin Konfokal Mikroskop Analizi

Kuyruk veninden enjekte edilen CdTe KN nanopartiküllerinin karaciğer ve böbrek dokularda birikimini göstermek için sakrifiye edilen dokuların fiksasyon

sonrası 50 µm kesitleri lamlara alınarak konfokal mikroskopta incelenmiş ve CdTe KN'lerinin ve DAPI'nin farklı emisyon dalga boyu için kullanılan farklı filtrelerden elde edilen görüntüleri ve ikisinin birleşimi olan merged görüntüleri Şekil 3.3'te görülmektedir.

24 saatlik bekleme sonrası yapılan analizde KN'lerin karaciğer hücre ve sinüzoitlerinde, böbrek tübül hücrelerinde birikimleri görülmektedir.

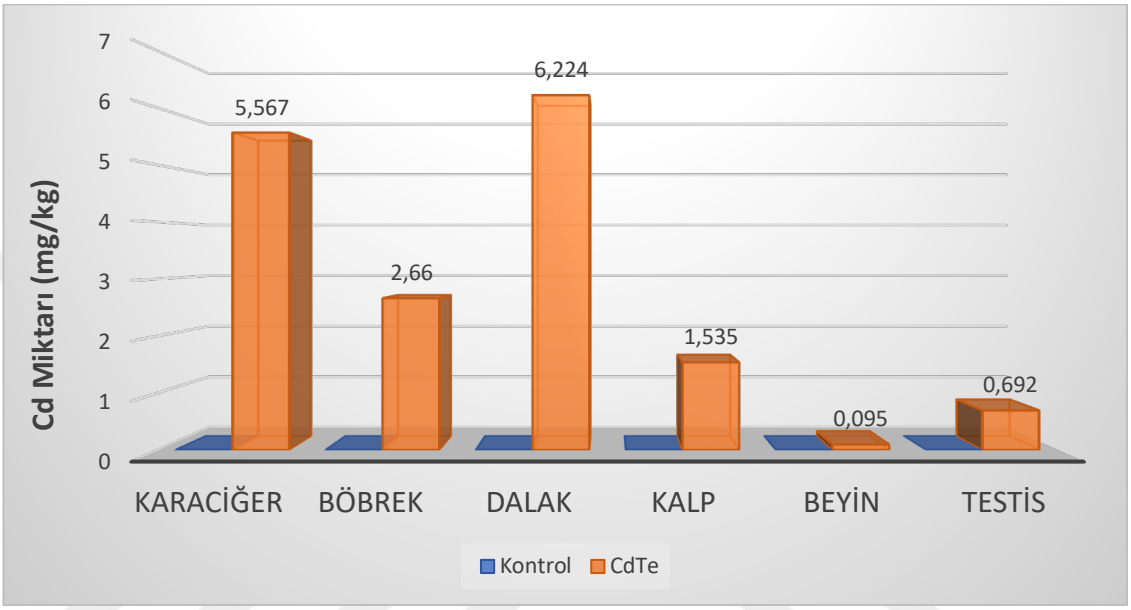


Şekil 3.3. 24 saatin sonunda karaciğer (sol sütun) ve böbrek (sağ sütun) dokularında görülen KN'ler (kırmızı renkli) ve çekirdek boyası olan DAPI'nin (mavi) ve üst üste bindirilmiş merged görüntüleri. Kırmızı rengin görüntüleri Rodamin filtresinde (emisyon aralığı 690 nm-730 nm), Mavi renkli çekirdek görüntüleri DAPI filtresinde (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm, Merged görüntüler iki filtre üstüste çakıştırılarak elde edilmiştir. Görüntüler X40 objektif büyütmede elde edilmiştir (Ölçek 20 µm).

3.3. ICP-MS İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP)ve Kütle Spektroskobisi (MS) Sonuçları

ICP-MS sonucuna göre Cd^{+2}'nin tüm organlar birikimi mg/kg cinsinden verilmiş olup en fazla birikim sırasıyla dalak, karaciğer ve böbrekte görülmüştür.

En düşük birikim beyinde görülürken kalp ve testiste de birikim oldukça azdır.



Şekil 3.4. Karaciğer, böbrek, dalak, kalp, beyin ve testiste biriken Cd^{+2}'un miktarının ICP-MS ile ölçüm sonuçları. Sonuçlar yalnızca CdTe KN uygulanan gruptaki hayvanların karaciğer, böbrek, dalak, kalp, beyin ve testisinden elde edilmiş olup her hayvandan alınan organlar birleştirilerek kümülatif bir değerlendirme yapıldı. Sonuçlar kg organ başına mg Cd^{+2} olarak verildi.

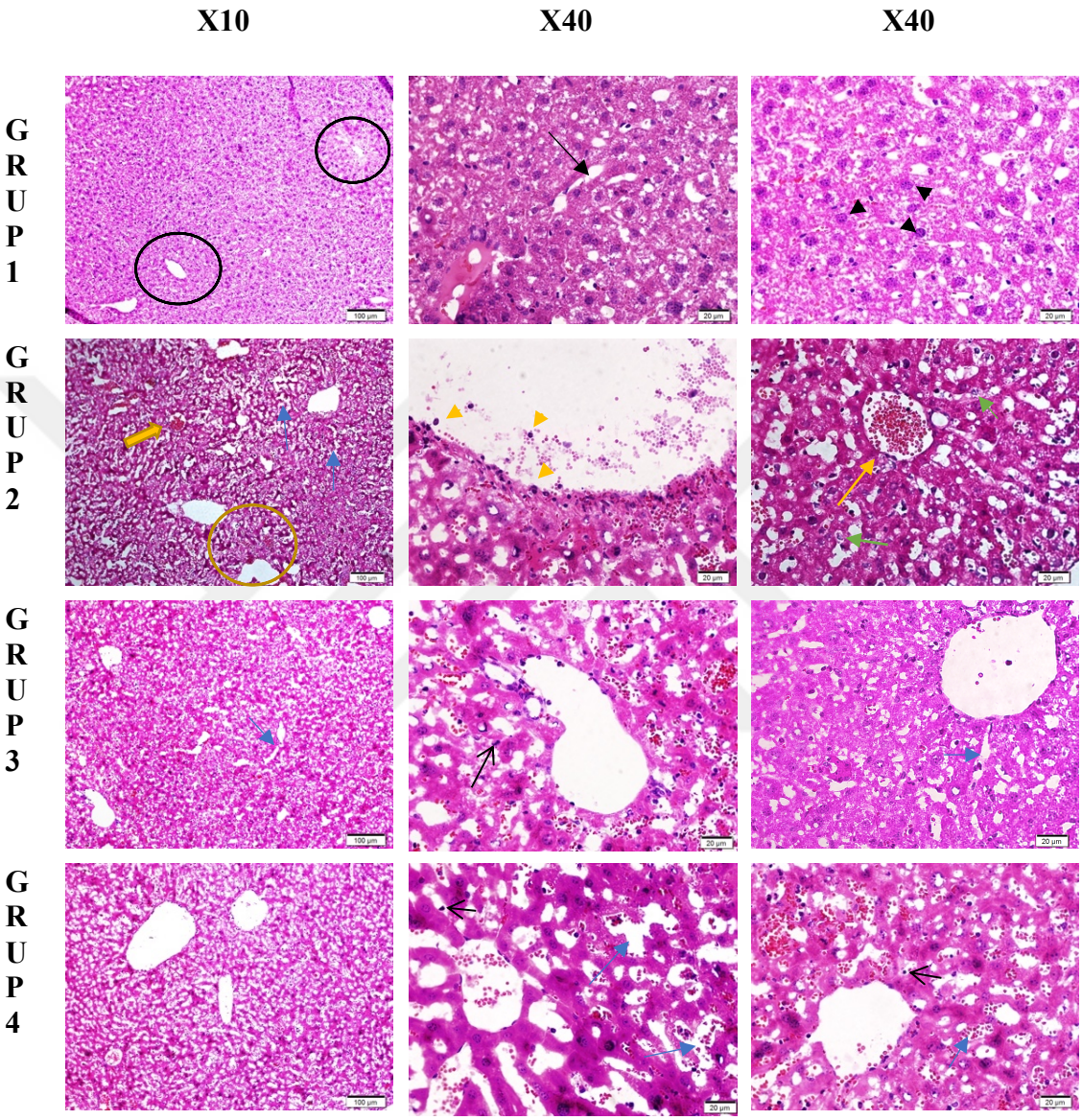
3.4. Histolojik Bulgular

3.4.1. Hematoksilen& Eozin Sonuçları

Kontrol grubu farelerin karaciğerlerinden alınan doku kesitlerinde histolojik olarak normal bir yapı görülmekteydi. Hepatositler, büyük, globüler sentrik nükleuslara sahip, normal hepatik sinüzoidleri ile sentral ven etrafında düzgün ışınsal bir mimari gösteren hücre kordonları şeklinde organizeydi. Bir inflamatuar hücre infiltrasyonu veya nekrozu tespit edilmedi.

CdTe nanopartikül uygulanmış 2. Grupta ise dilate santral ven ve sinüzoidleri, konjesyon ve lobüler yapı kaybı, hepatosit nekrozu ile yer yer inflamatuar hücre

infiltrasyonu gözlenmiştir. Silimarin ve mitokinon antioksidanlarının uygulandığı 3. ve 4 grupta ise dilate sinüzoidler, binükleer hepatositler ve aktive Kuppfer hücreleri dikkat çekmekteydi. Özellikle de silimarin uygulanan grupta mitokinon grubuna göre dilate alanlar daha azdı.

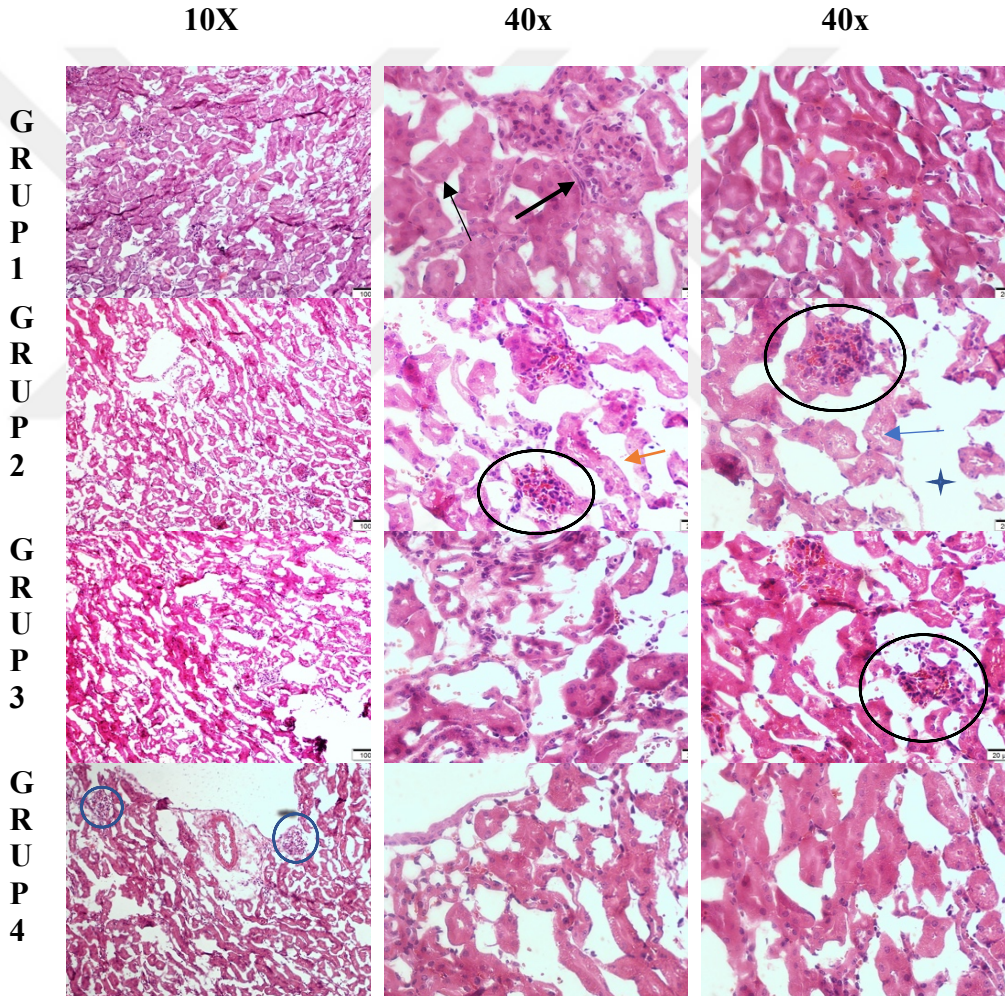


Şekil 3.5. Karaciğer H&E görüntüleri X10'li ve X40'lik objektif büyütmelerdeki görüntüleri. Görüntüler ışık mikroskobu ile elde edildi. Grup 1: Merkezi damar boyunca dizilmiş hepatosit kordonları (siyah daire), hepatik sinüzoidler (siyah ok), düzgün çekirdekli hepatositler (siyah ok başları). Grup 2: Lobüler yapı kaybı (sarı daire), konjesyon (kalın sarı ok), enflamatuvar hücre infiltrasyonu (sarı ok başları), dilate sinüzoidler (mavi ok), hepatosit nekrozu (yeşil oklar), dilate santral ven (sarı ok). Grup 3 ve Grup 4: Dilate sinüzoidler (mavi ok), Aktif kuppfer hücreleri (ince uçlu siyah ok) (Ölçek Çubuğu: 10X=100 µm, 40X=20 µm)

Böbrek dokusu, berrak glomerüler ve renal tübüler yapılar, nispeten az bir hücre proliferasyonu, dar bir mezangial alan ve lümenlerinde eritrositlerin olduğu açık kapiller ile normal bir histopatolojiye sahipti.

Böbrek dokusunda KN uygulanan grupta glomerüler konjesyon ve glomerüler kapiller dilatasyon, renal tübüllerde bulanık şişme, renal tübüler dejenerasyon görüldü.

Silimarin ve mitokinon grupları KN grubuna göre daha korunmuş bir böbrek yapısı sergilemekteydi. Her iki grupta da renal proksimal tübülde bulanık şişme ve renal tübüler dejenerasyon görülmedi. Glomerüler kapiller dilatasyon özellikle mitokinon grubunda oldukça azalmıştı.



Şekil 3.6. Böbrek H&E görüntüleri X10'li ve X40'lik objektif büyütmelerdeki görüntüleri. Grup 1: Berrak glomerüler ve dar mezangial alan (kalın siyah ok) ve renal tübüler yapılar (ince siyah ok). Grup 2: Glomerüler konjesyon (siyah daire), renal tübülde bulanık şişlik (mavi ok), renal tübüler dejenerasyon (turuncu ok), dejenerasyon sonucu tübüllerin ayrışması (mavi yıldız). Grup 3 ve Grup 4: Glomerüller (siyah ve mavi daire) (Ölçek Çubuğu: 10X=100 µm, 40X=20 µm)

3.4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

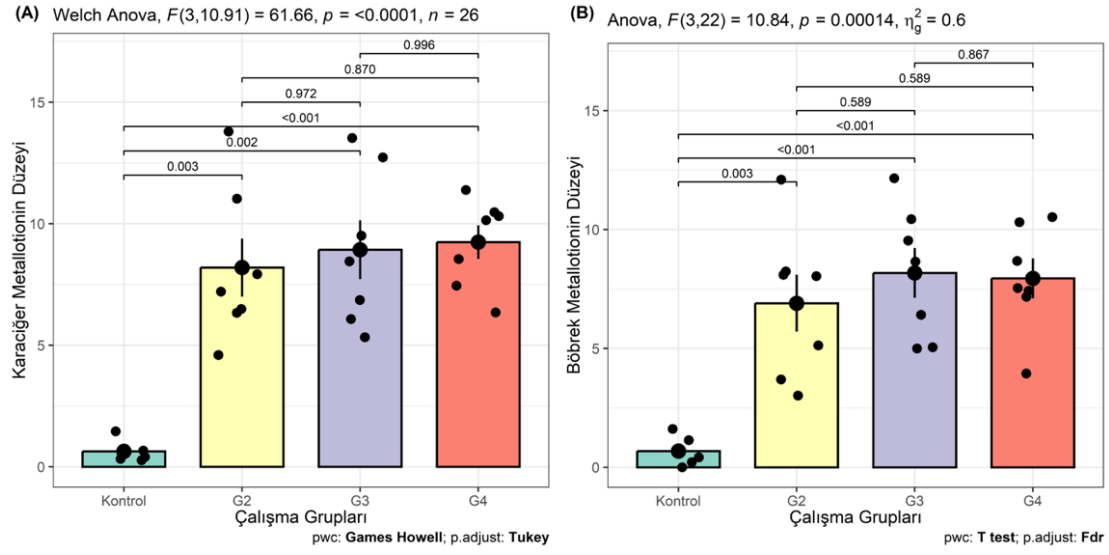
Anti- MT2A (Metallotionin) antikor sonuçları

Karaciğer ve böbrek dokularının anti-MT2A antikor ile işaretlemelerinin hem flüoresan mikroskop hemde konfokal mikroskop görüntüleri alınmış olup Şekil 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10'da gösterilmiştir. Antikorların boyanma yüzdeleri ve gruplar arası istatiksel analiz değerlendirmesi Tablo 3.2 ve Grafik 3.1'de verilmiştir.

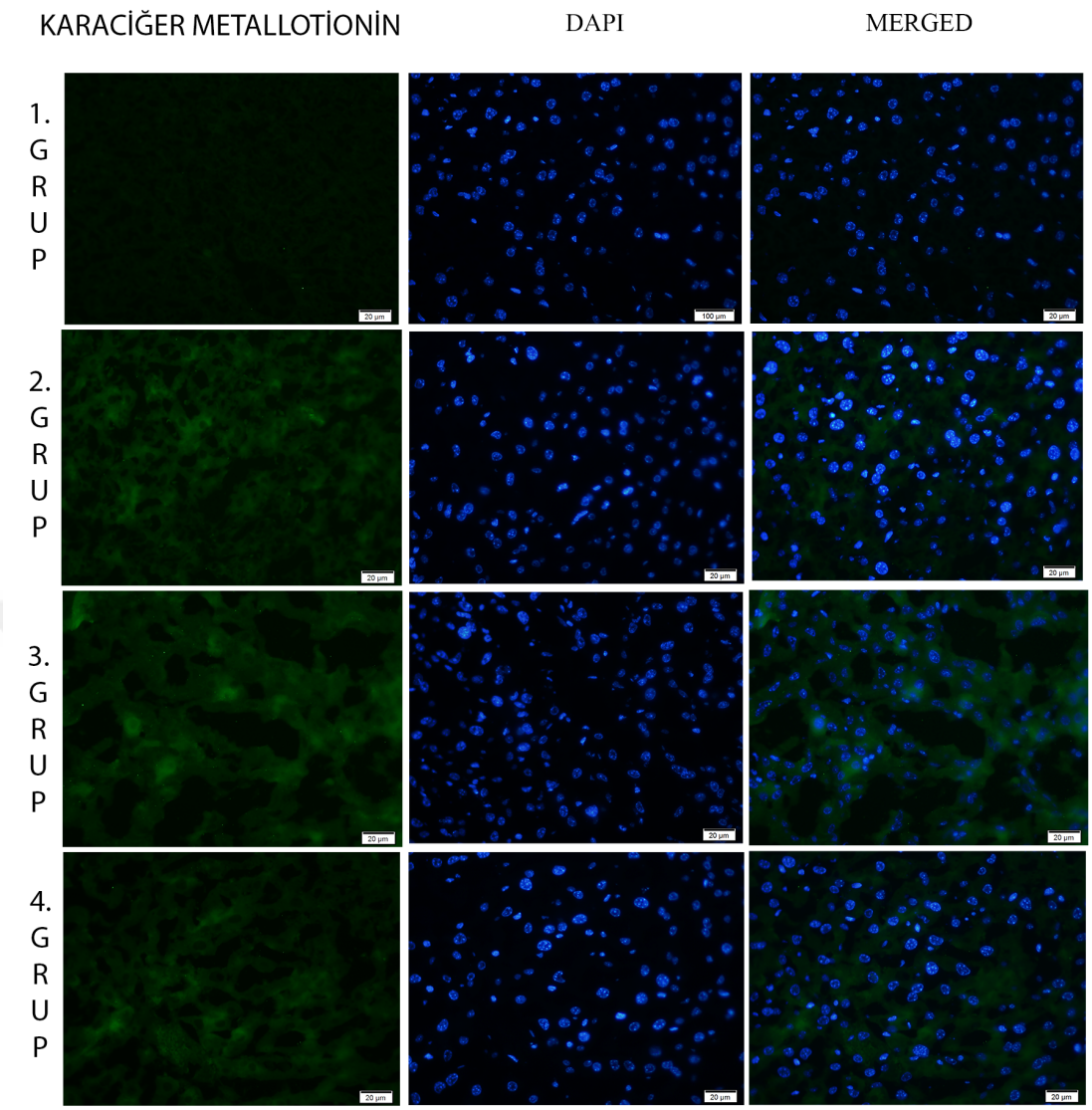
Tablo 3.2. Karaciğer ve böbrek anti- MT2A (metallotionin) antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
METALLOTİONİN	0.68 ± 0.22^{a}	8.20 ± 1.19^{b}	8.93 ± 1.21^{b}	9.25 ± 0.69^{b}	<.001p
BÖBREK					
METALLOTİONİN	0.68 ± 0.30^{a}	6.90 ± 1.20^{b}	8.18 ± 1.05^{b}	7.94 ± 0.84^{b}	<.001p

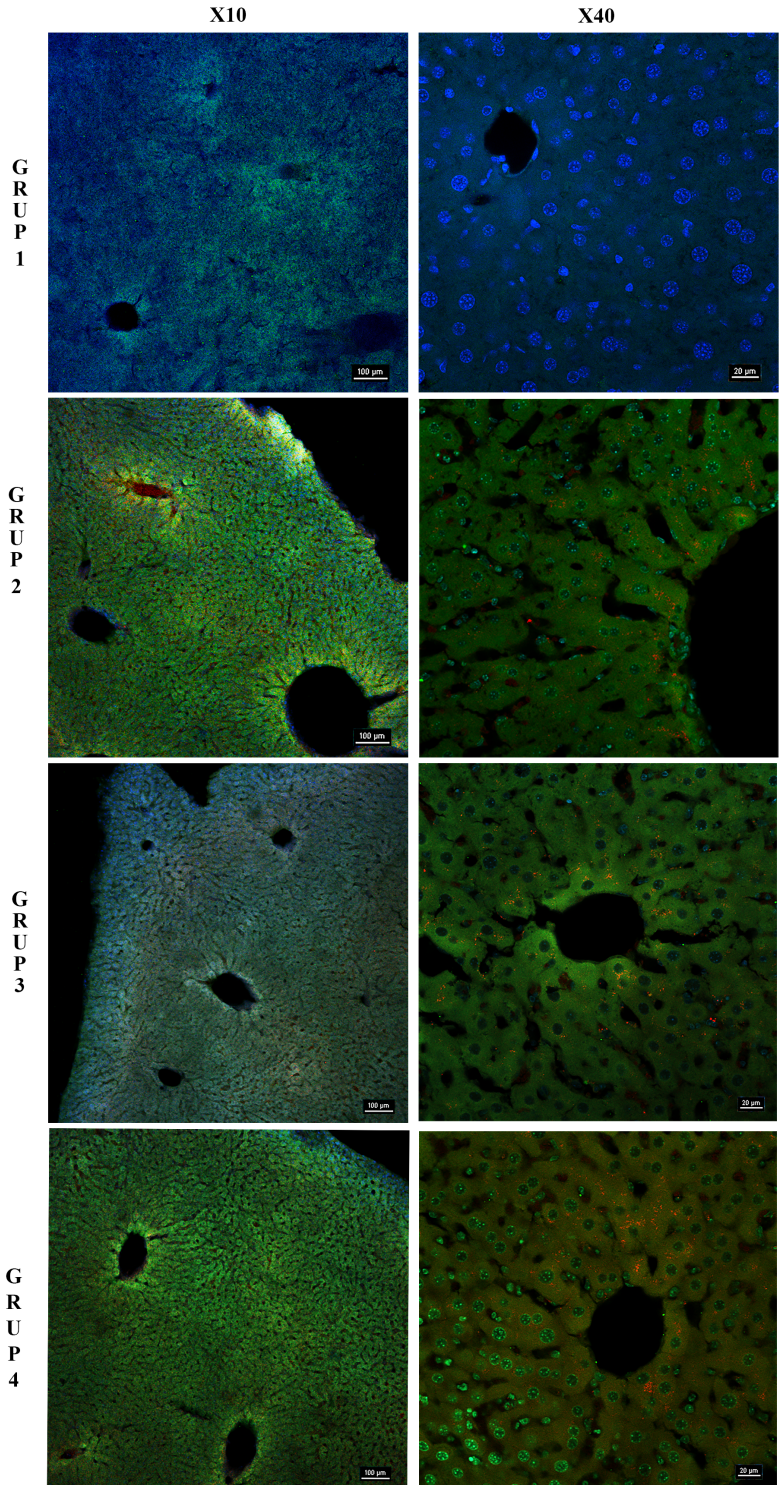
Hem karaciğer hem de böbrek dokuları için, CdTe kuantum nokta nanopartikül uygulanmış grupta (8.20 ± 1.19 vs. 0.68 ± 0.22, düzeltilmiş p=.003) Metallotionin'in işaretlenme yüzdesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksekken, diğer gruplar (G3 için 8.93 ± 1.21, düzeltilmiş p=.972 ve G4 için 9.25 ± 0.69, düzeltilmiş p=.870) ile benzerdi (Grafik 3.1).



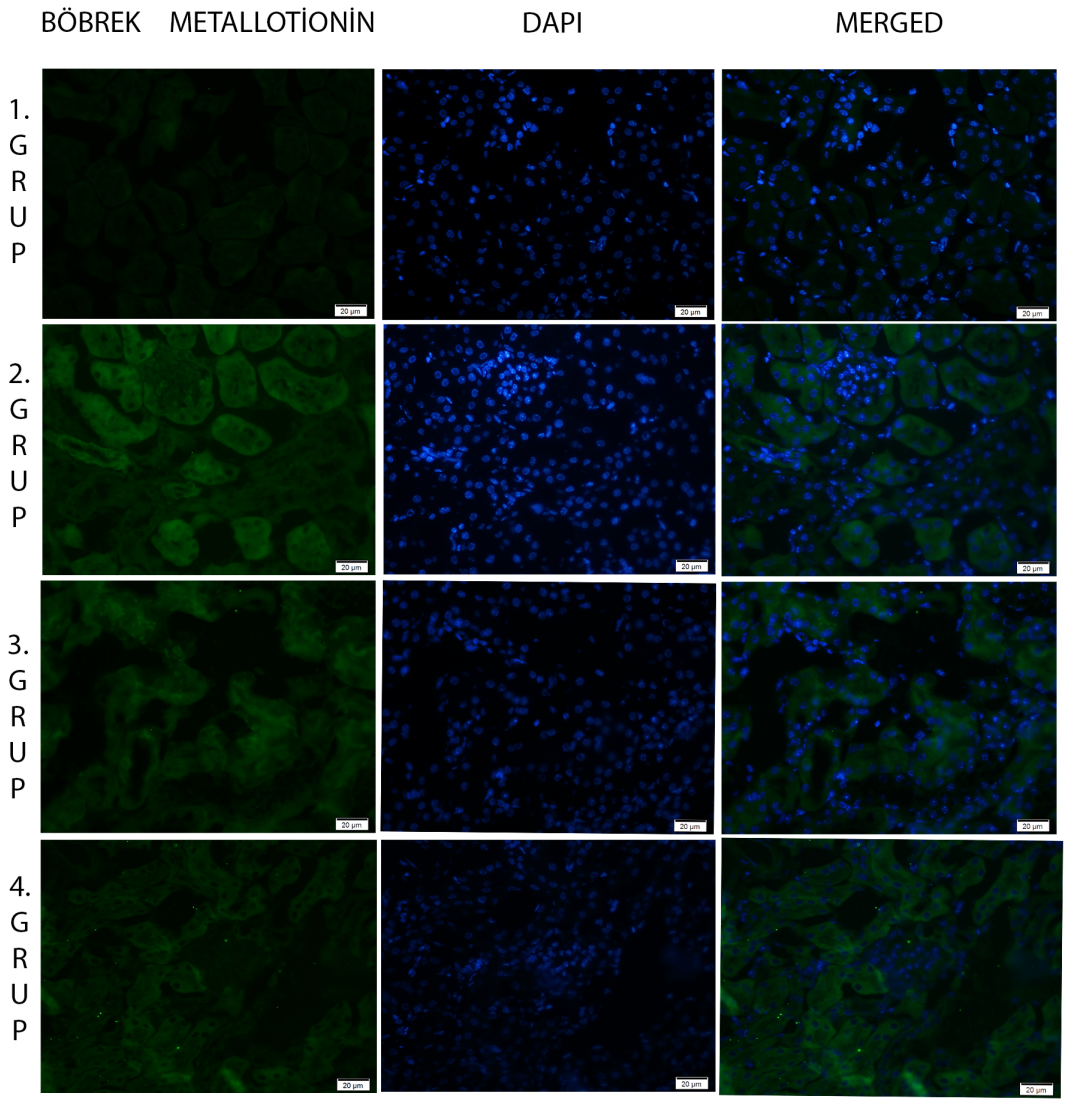
Grafik 3.1. Karaciğer ve böbrek Anti- MT2A (metallotionin) antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları



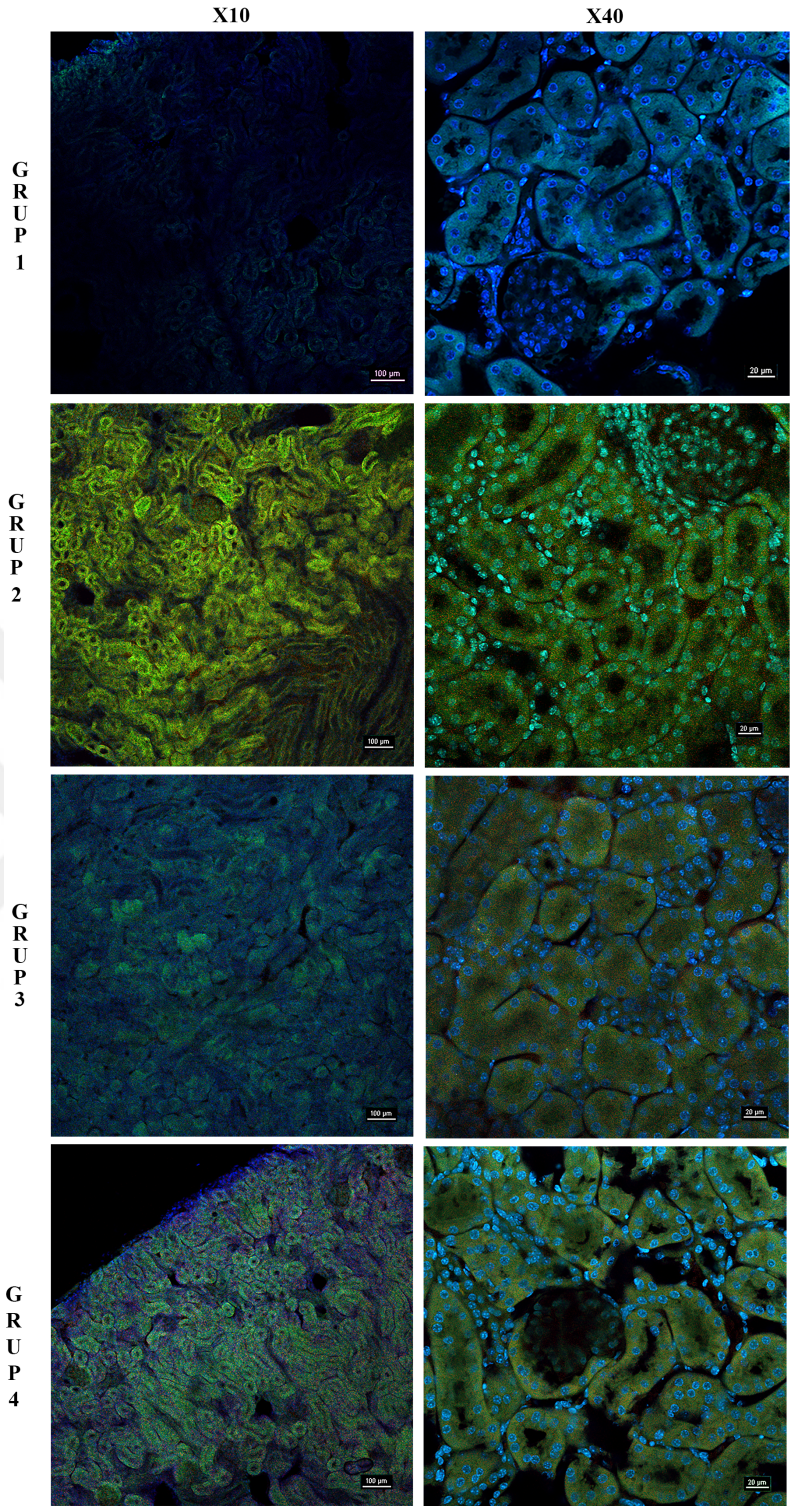
Şekil 3.7. Karaciğer metallotionin flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile metallotionin yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtrenin çakıştırılması ile elde edilmiştir. Kesitler 4 µm kalınlığındadır. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edilmiştir (Ölçek 20 µm).



Şekil 3.8. Karaciğer metallotionin konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile metallotionin yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rhodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alınmıştır. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmelerde elde edilmiştir (Ölçek X10= 100µm, X40= 20µm).



Şekil 3.9. Böbrek metallotionin flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile metallotionin yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merge görüntü iki filtrenin çakıştırılması ile elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40=20µm).



Şekil 3.10. Böbrek metallotionin konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile metallotionin yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alınmıştır. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterilmiştir (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).

Anti MT-MMP2, anti MMP9, anti Ki67, anti TNF- alfa, anti IL-10, IL-1β antikorlar sonuçları

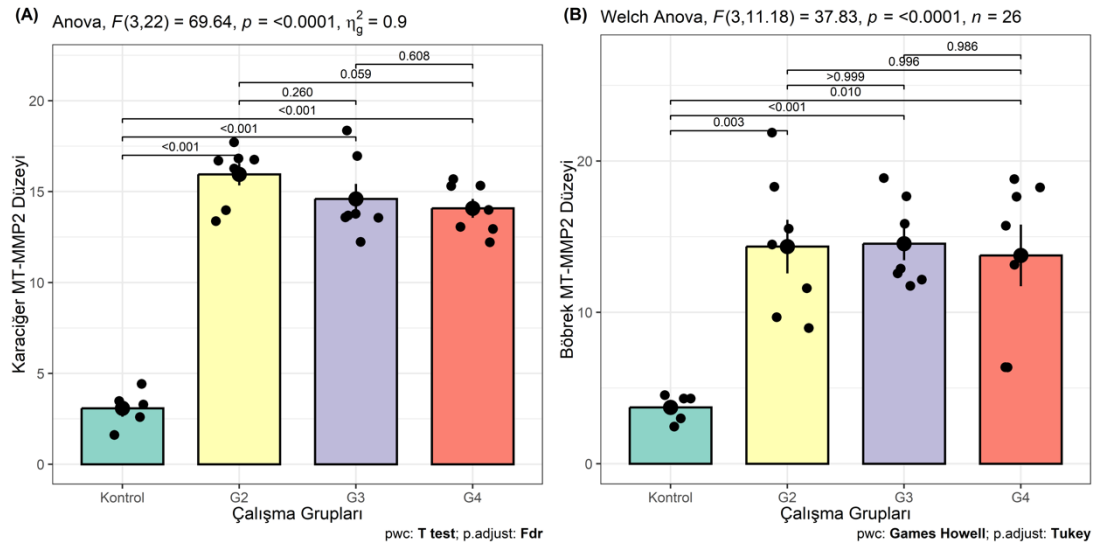
Karaciğer ve böbrekte Anti MT-MMP2 antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.3'te ve Grafik 3.2'de verilmiş olup istatiksel analizleri gruplar arası farklılıklarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 3.3. Karaciğer ve Böbrek MT-MMP2 antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
MT-MMP2	3.09 ± 0.47^{a}	15.95 ± 0.61^{b}	14.60 ± 0.83^{b}	14.08 ± 0.52^{b}	<.001p
BÖBREK					
MT-MMP2	3.73 ± 0.42^{a}	14.35 ± 1.77^{b}	14.54 ± 1.09^{b}	13.76 ± 2.04^{b}	<.001p

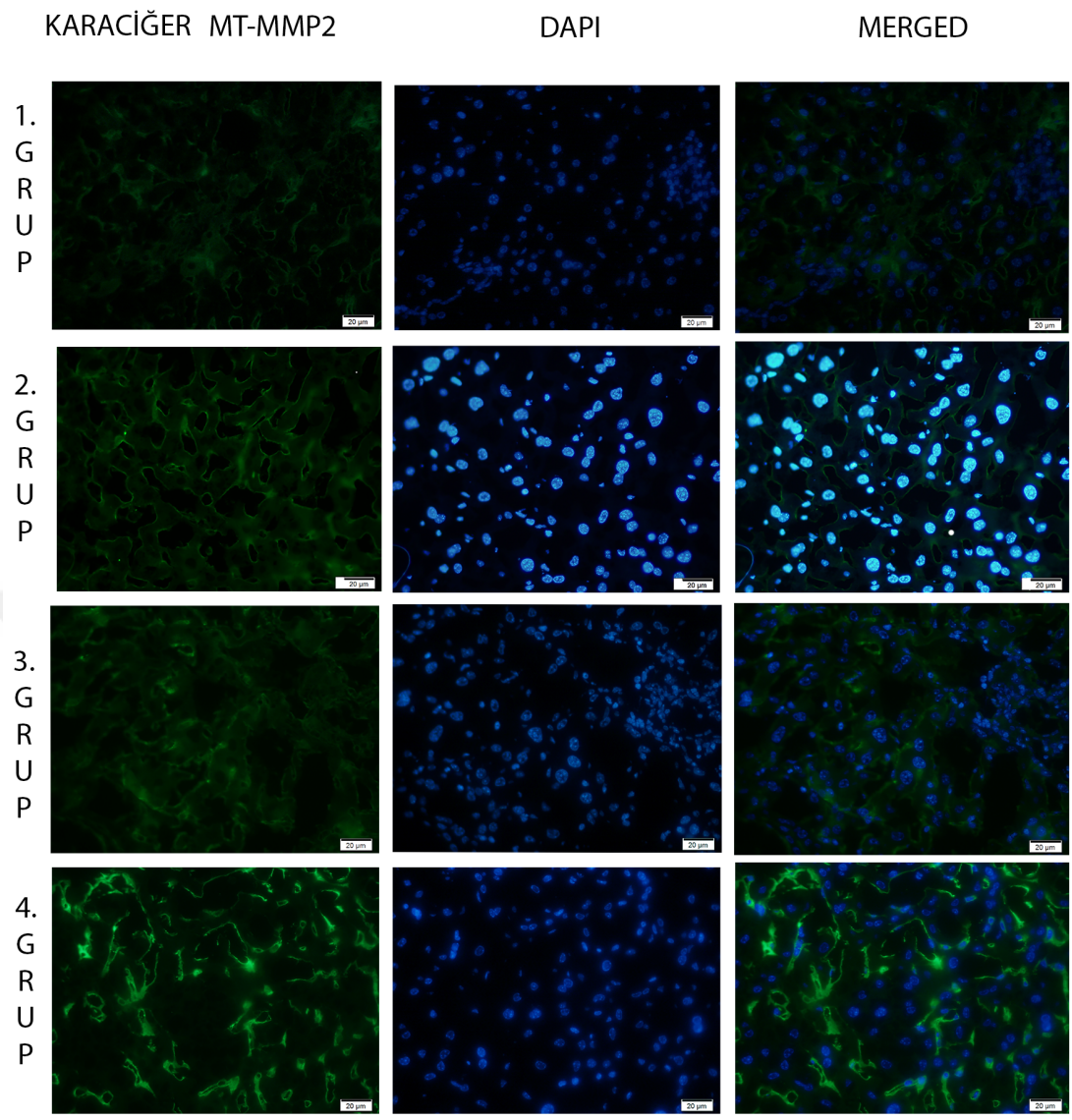
Karaciğer MT-MMP2 düzeyine baktığımızda G2, G3 ve G4 grupları G1 grubu olan kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. KN uygulanan grup ve antioksidanlarla birlikte KN uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Böbrek MT-MMP2 karaciğer ile benzer sonuçlar göstermiş olup tüm gruplar kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. G2, G3 ve G4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

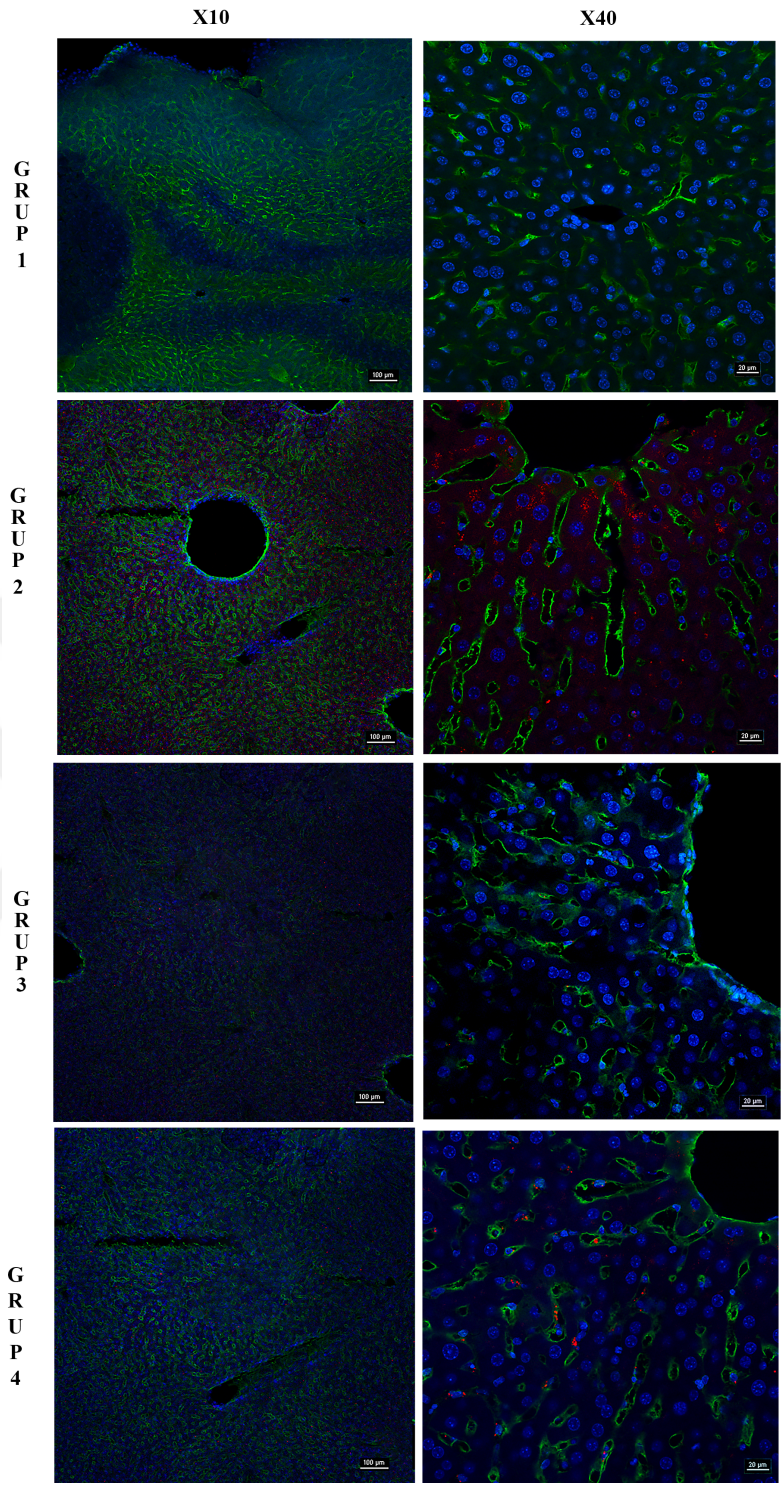


Grafik 3.2. Karaciğer ve böbrek MT-MMP 2 antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

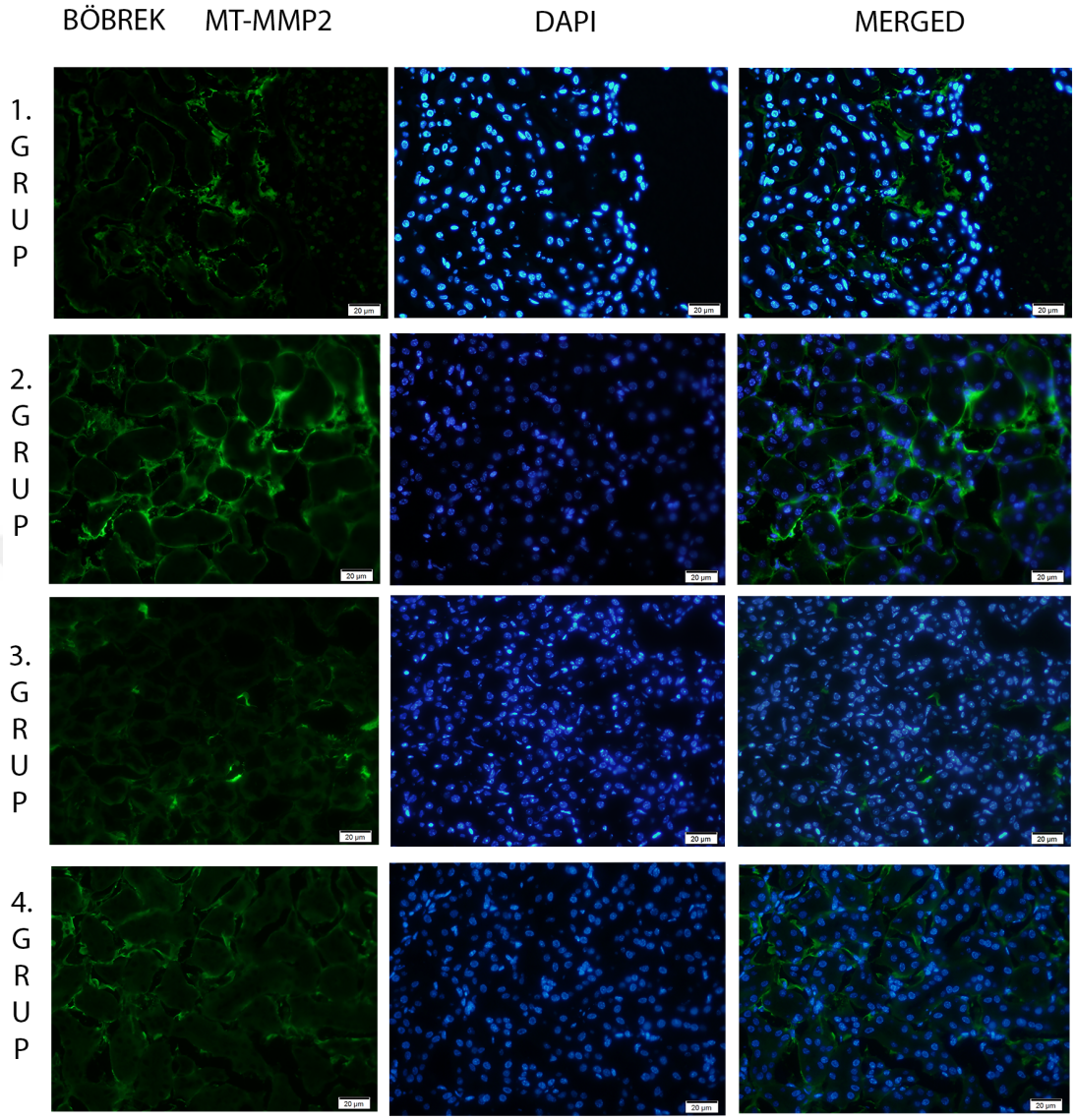
MT-MMP 2 antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.11, 3.12, 3.13, 3.14' te verilmiştir.



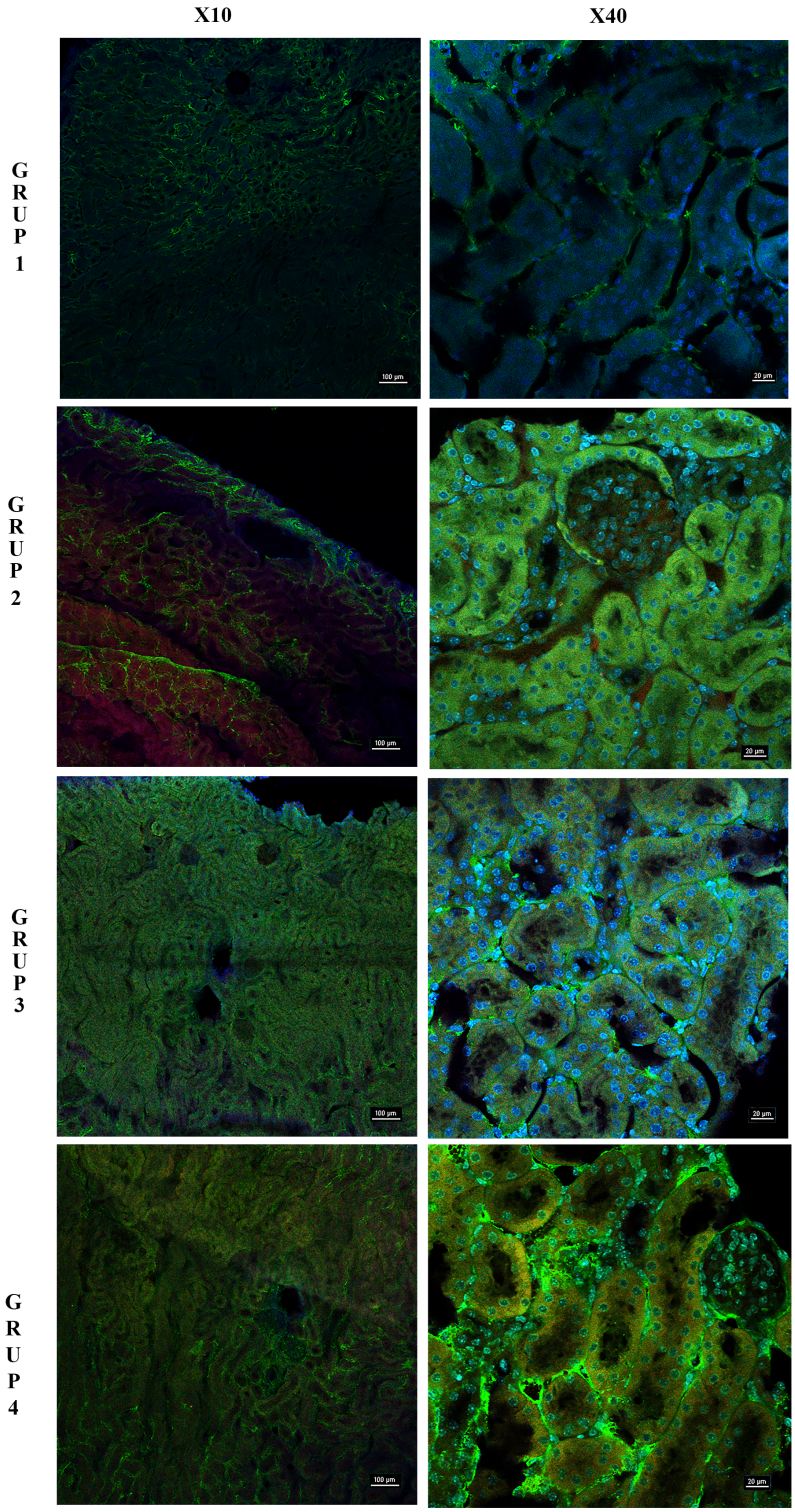
Şekil 3.11. Karaciğer MT-MMP2 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MT-MMP2 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.12. Karaciğer MT-MMP2 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MT-MMP2 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi. (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.13. Böbrek MT-MMP2 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MT-MMP2 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntüler iki filtre çakıştırılarak elde edilmiştir. Kesitler 4 µm kalınlığında alınmıştır. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edilmiştir (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.14. Böbrek MT-MMP2 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MT-MMP2 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).

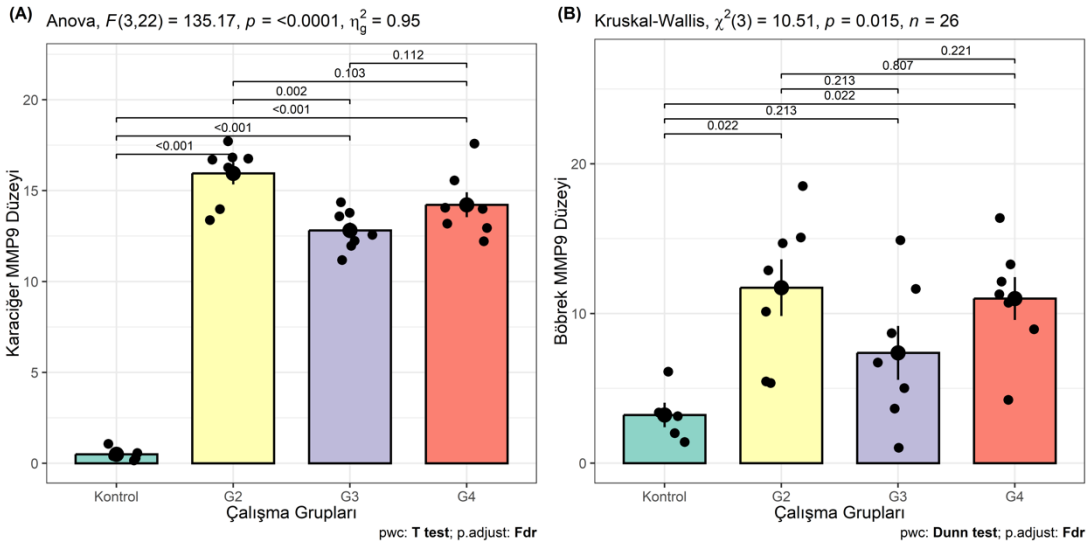
Karaciğer ve böbrekte anti MMP 9 antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.4'te ve Grafik 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Karaciğer ve böbrek anti- MMP 9 antikor işaretleme sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
MMP 9	0.50 ± 0.16^{a}	15.95 ± 0.61^{b}	12.81 ± 0.43^{c}	14.22 ± 0.69^{bc}	<.001p
BÖBREK					
MMP 9	3.22 ± 0.82^{a}	11.72 ± 1.89^{b}	7.37 ± 1.80^{a}	11.00 ± 1.43^{b}	.015np

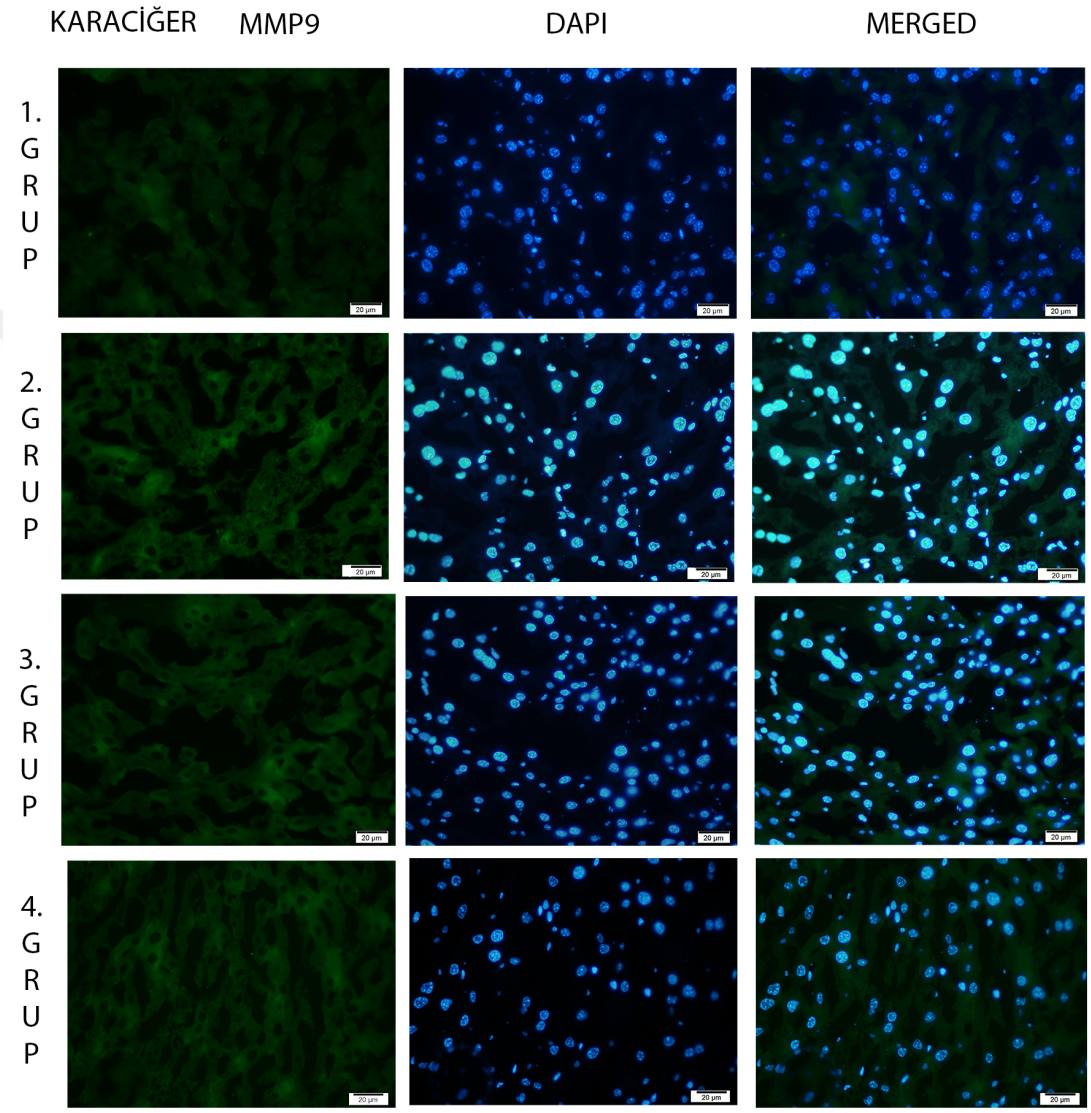
Karaciğer MMP 9 düzeyi G3 grubunda G2 ve G4'e göre anlamlı olarak düşük iken, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir.

Böbrekteki MMP 9 düzeyi G3 grubunda G2 ve G4'e göre anlamlı olarak düşük olup, kontrol grubu ile benzer seviyededir.

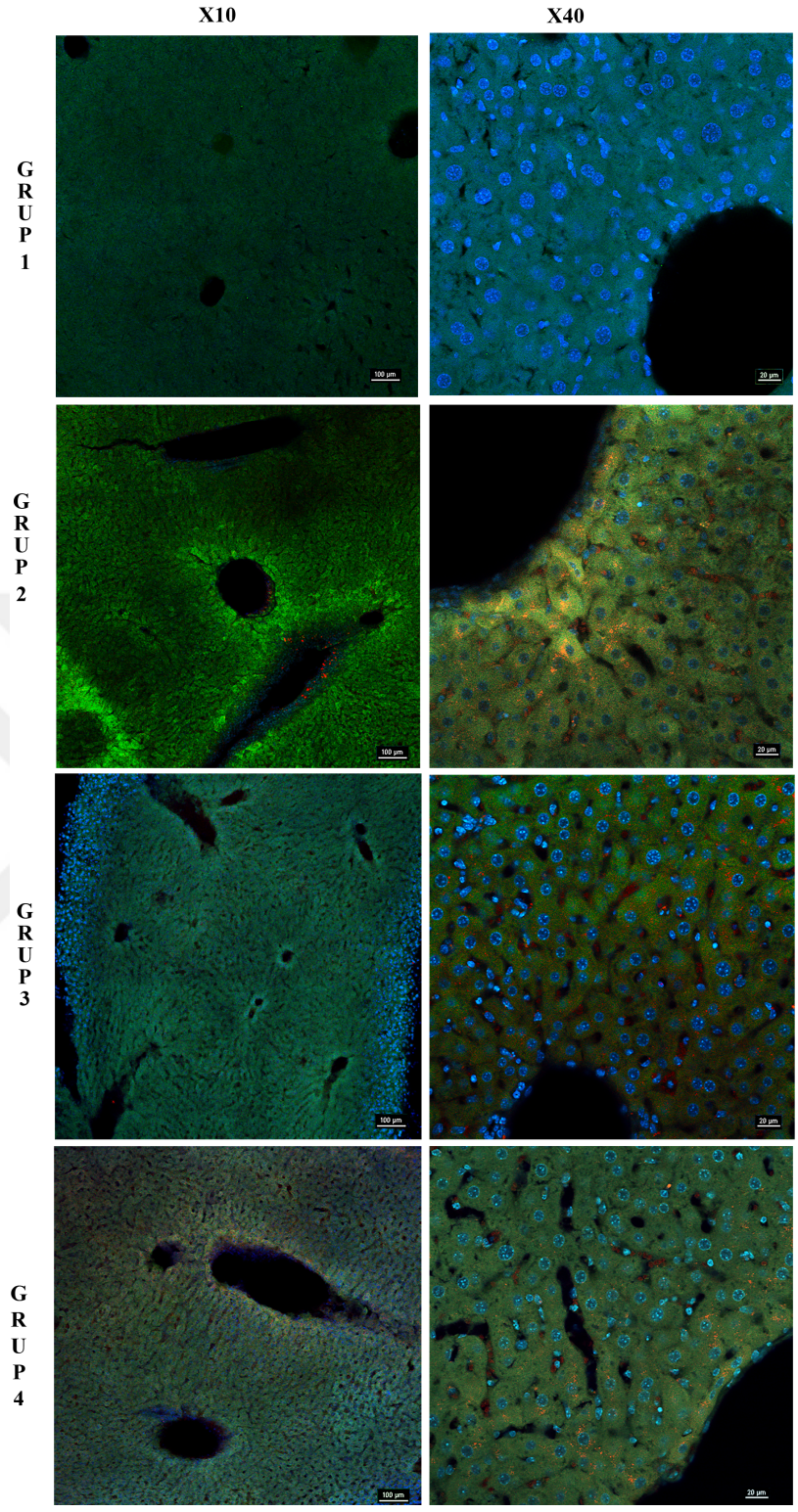


Grafik 3.3. Karaciğer ve böbrek anti- MMP 9 antikor işaretleme sonuçları dağılımları ve gruplar arası istatistiksel farkları

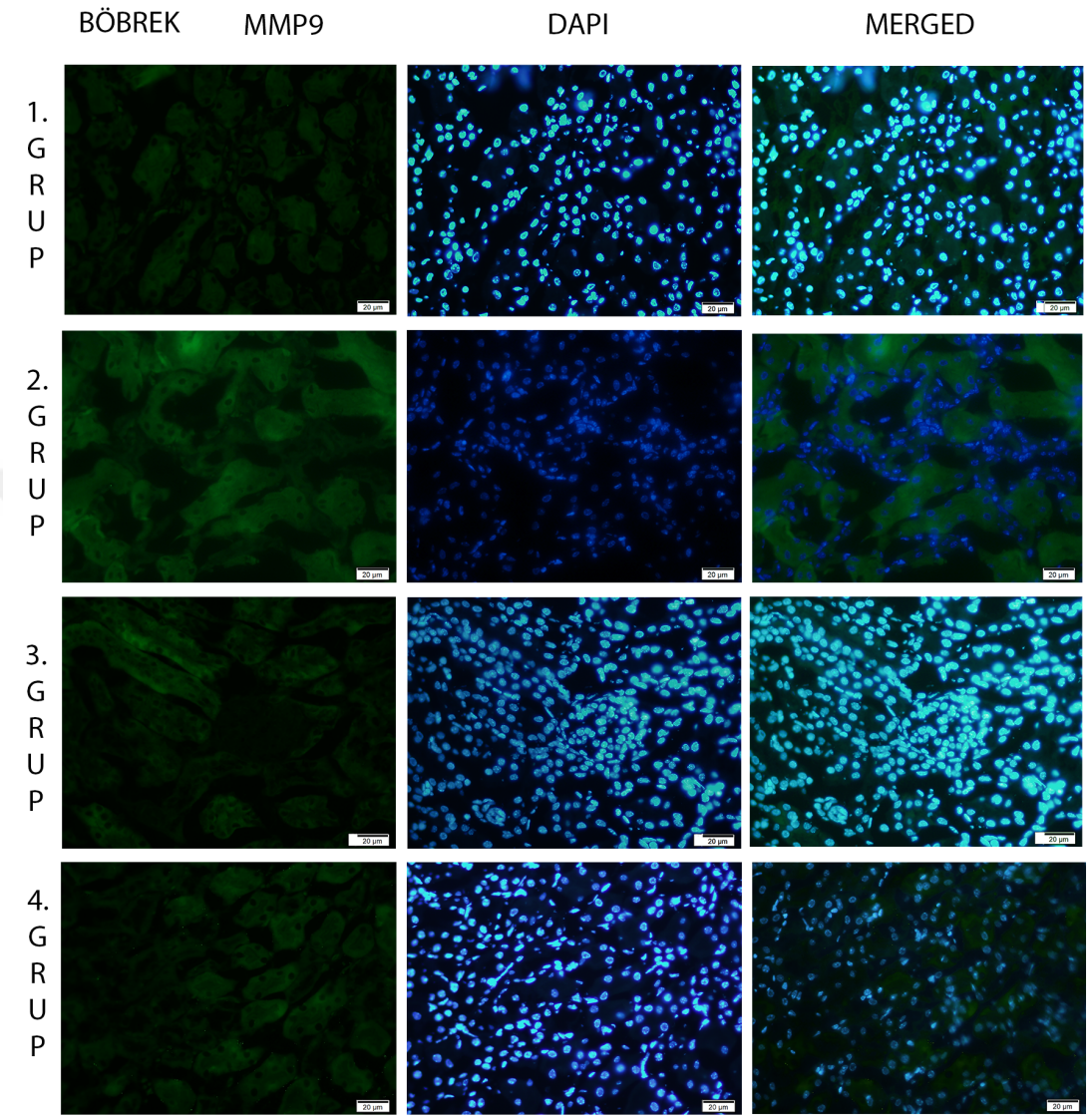
Anti-MMP 9 antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18'de verilmiştir.



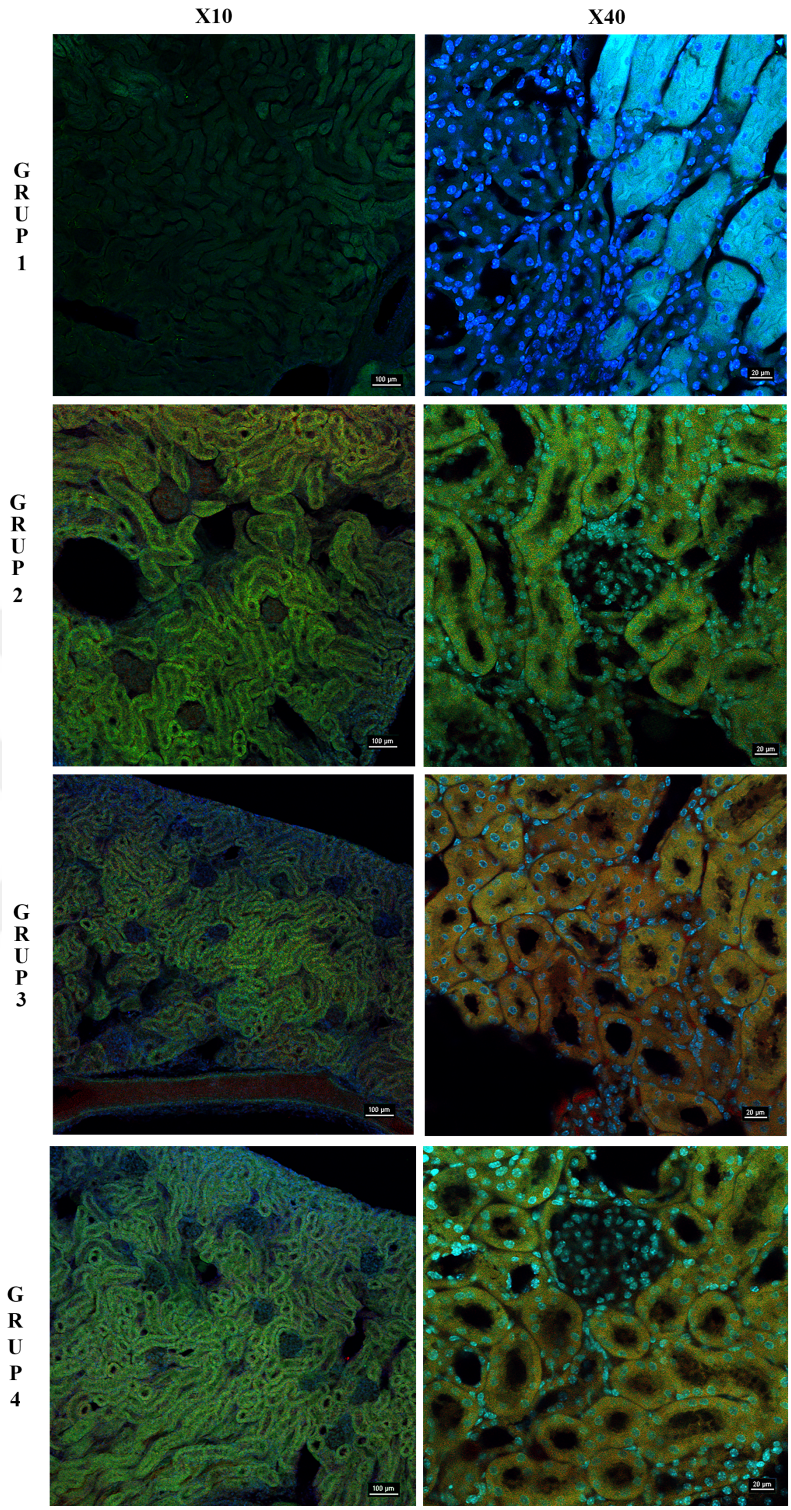
Şekil 3.15. Karaciğer MMP 9 flüoresan mikroskop görüntüleri FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MMP 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edilmiştir (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.16. Karaciğer MMP 9 konfokal Mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MMP 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.17. Böbrek MMP 9 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MMP 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.18. Böbrek MMP 9 Konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile MMP 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).

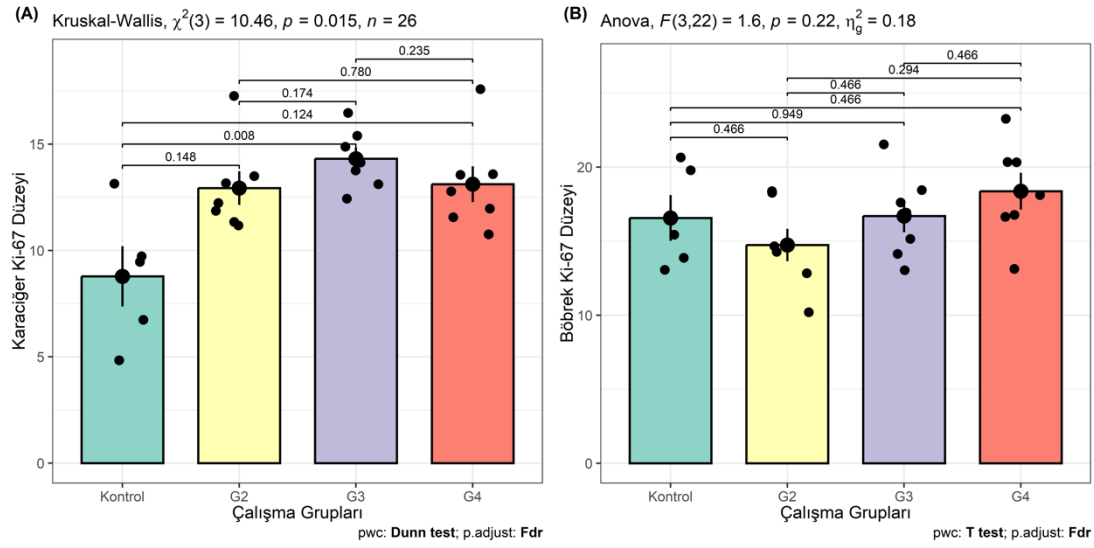
Karaciğer ve böbrekte anti Ki-67 antikor ile işaretleme sonuçları Tablo 3.5'te ve Grafik 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Karaciğer ve Böbrek Ki-67 antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
Ki-67	8.78 ±1.42[a]	12.93 ± 0.79[b]	14.32 ± 0.52	13.12 ± 0.84	.015np
BÖBREK					
Ki-67	16.56 ±1.55	14.74 ±1.09	16.69 ± 1.09	18.37 ± 1.24	.219p

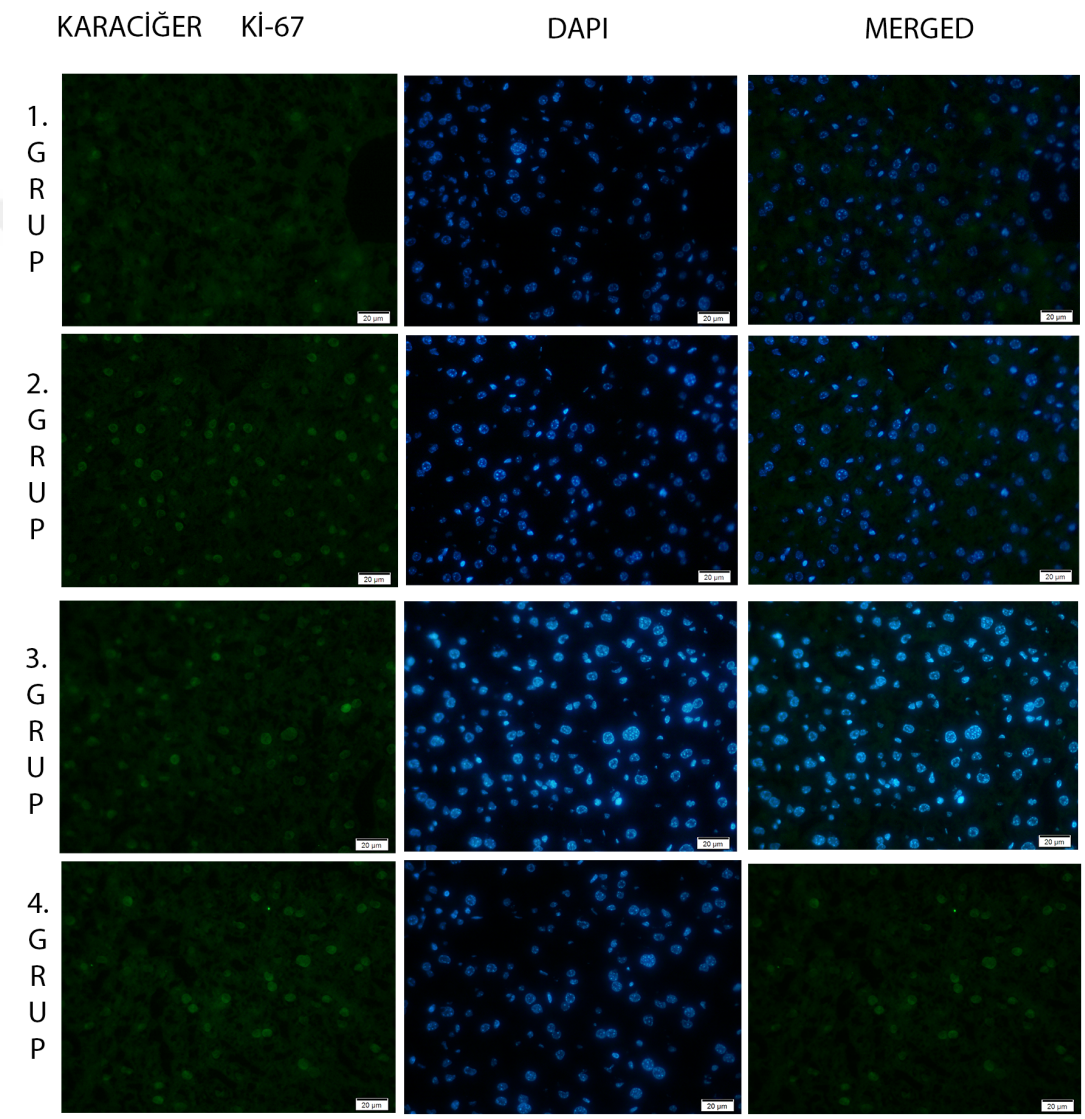
KaraciğerdeKi-67 işaretleme düzeyinde KN uygulanan G2 grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. Antioksidan grupları ise hem kendi aralarında hem de KN uygulanan grup ve kontrol grubu ile anlamlı düzeyde bir farklılık göstermemiştir.

Böbrekte ise Ki-67 antikoru ile işaretlenen tüm gruplarda anlamlı bir faklılık görülmemiştir.

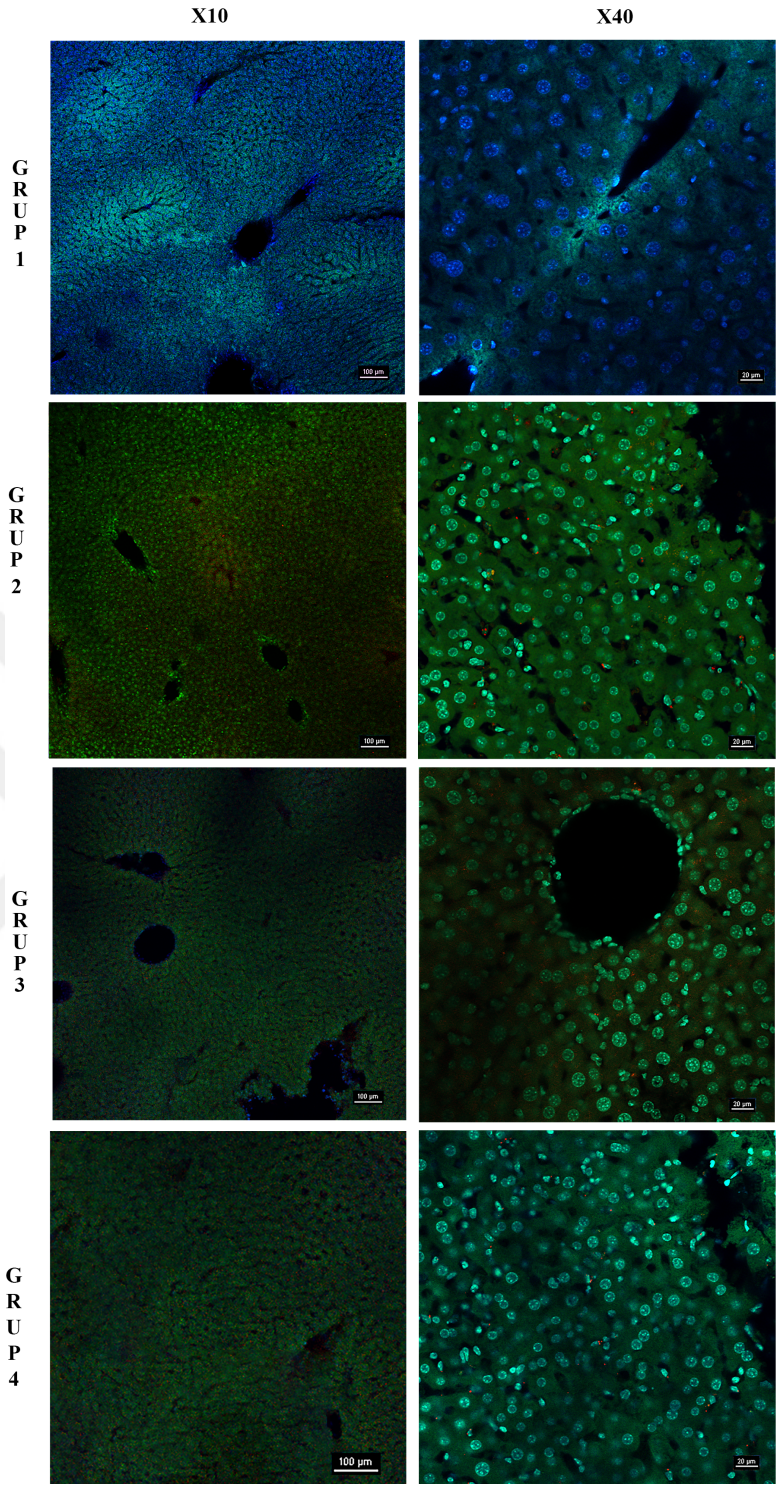


Grafik 3.4. Karaciğer ve böbrek anti Ki-67 antikor işaretleme sonuçları dağılımları ve gruplar arası istatistiksel farkları

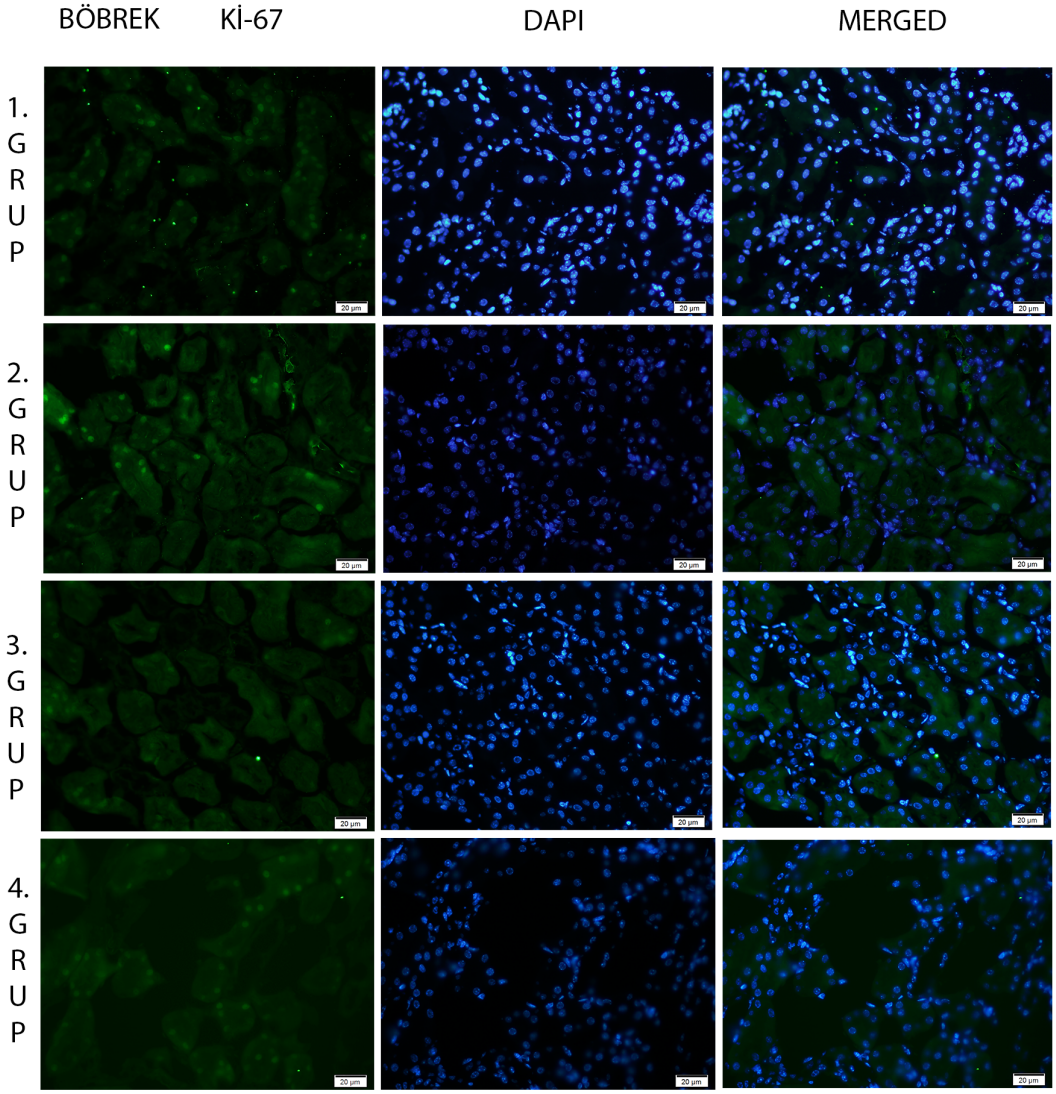
Ki-67 antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.19, 3.20, 3.21, 3.22'de verilmiştir.



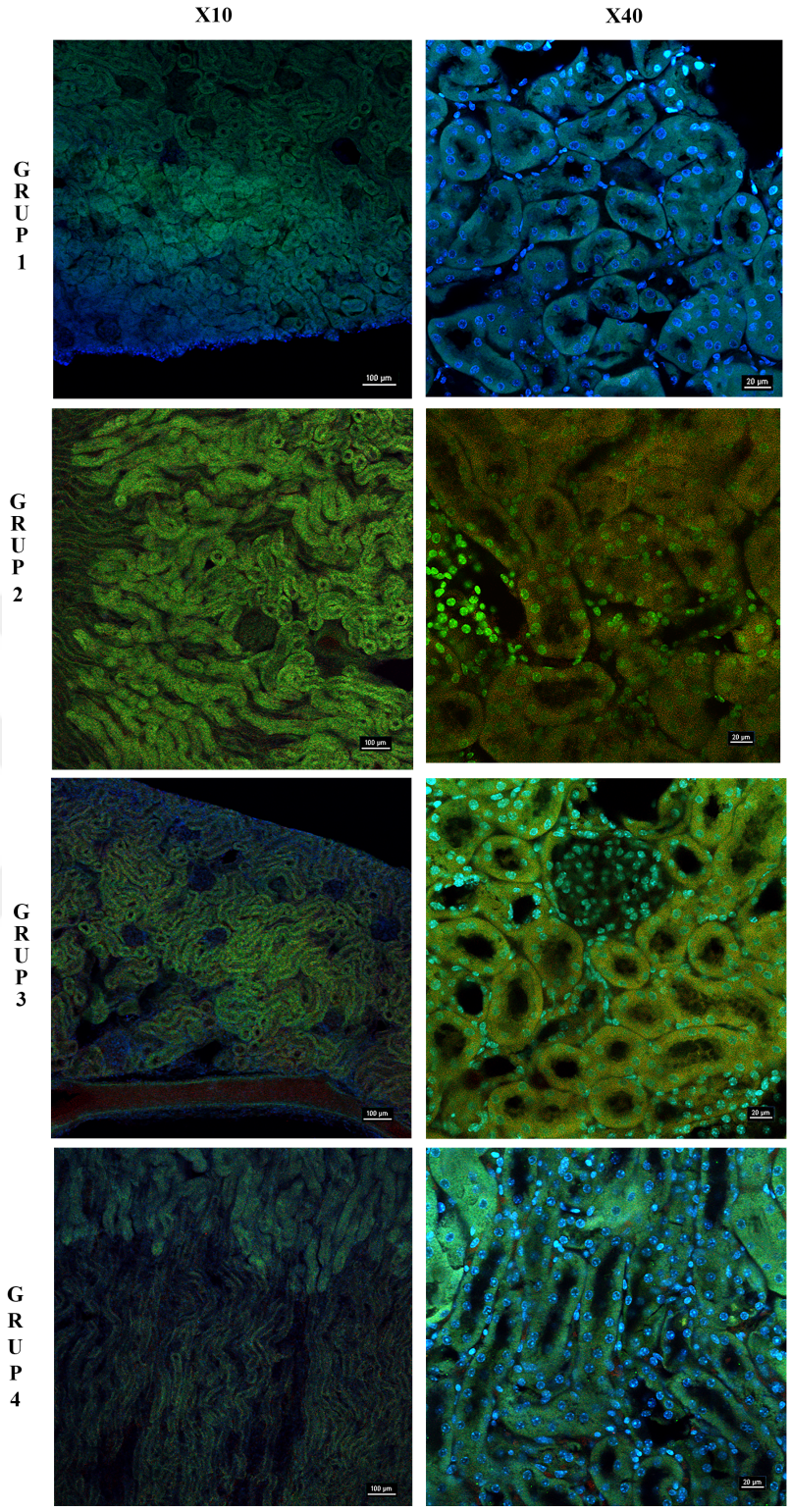
Şekil 3.19. Karaciğer Ki-67 flüoresan mikroskop görüntüleri FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Ki-67 işaretli çekirdekler yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.20. Karaciğer Ki-67 Konfokal mikroskop görüntüleri. Kesitler 50 µm kalınlığında alınmıştır. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Ki-67 işaretli çekirdekler yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.21. Böbrek Ki-67 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Ki-67 işaretli çekirdekler yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık objektif büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.22. Böbrek Ki-67 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Ki-67 işaretli çekirdekler yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) objektif büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).

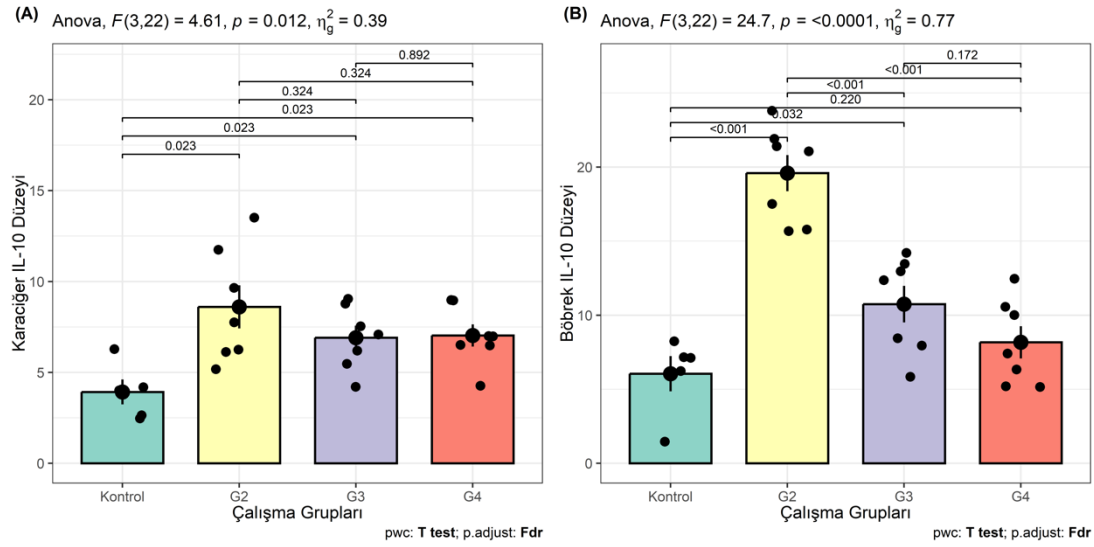
Karaciğer ve böbrekte anti IL-10 antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.6' da ve Grafik 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.6. Karaciğer ve Böbrek IL-10 antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
IL-10	3.92 ± 0.68^{a}	8.60 ± 1.19^{b}	6.91 ± 0.66^{b}	7.03 ± 0.61^{b}	.012p
BÖBREK					
IL-10	6.05 ± 1.19^{a}	19.59 ± 1.22^{b}	10.74 ± 1.24^{a}	8.17 ± 1.08^{a}	<.001p

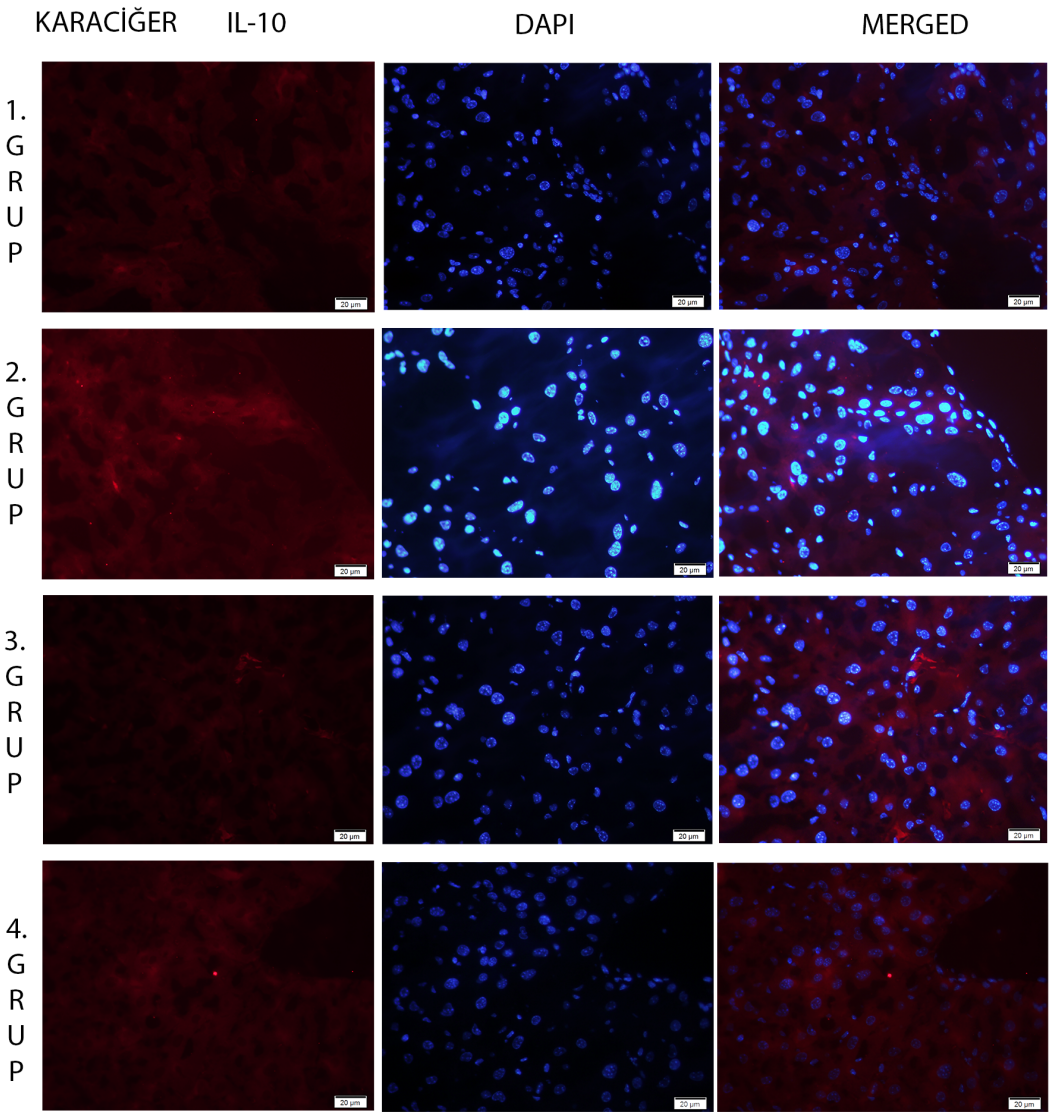
IL-10 düzeyi karaciğerde G2, G3 ve G4 grupları kendi aralarında benzer bulunmuştur. Bu gruplar, kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında tüm gruplar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir.

Böbrekte IL-10 düzeyi G2 grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Kontrol grubu ve antioksidan grupları kendi aralarında benzerdir.

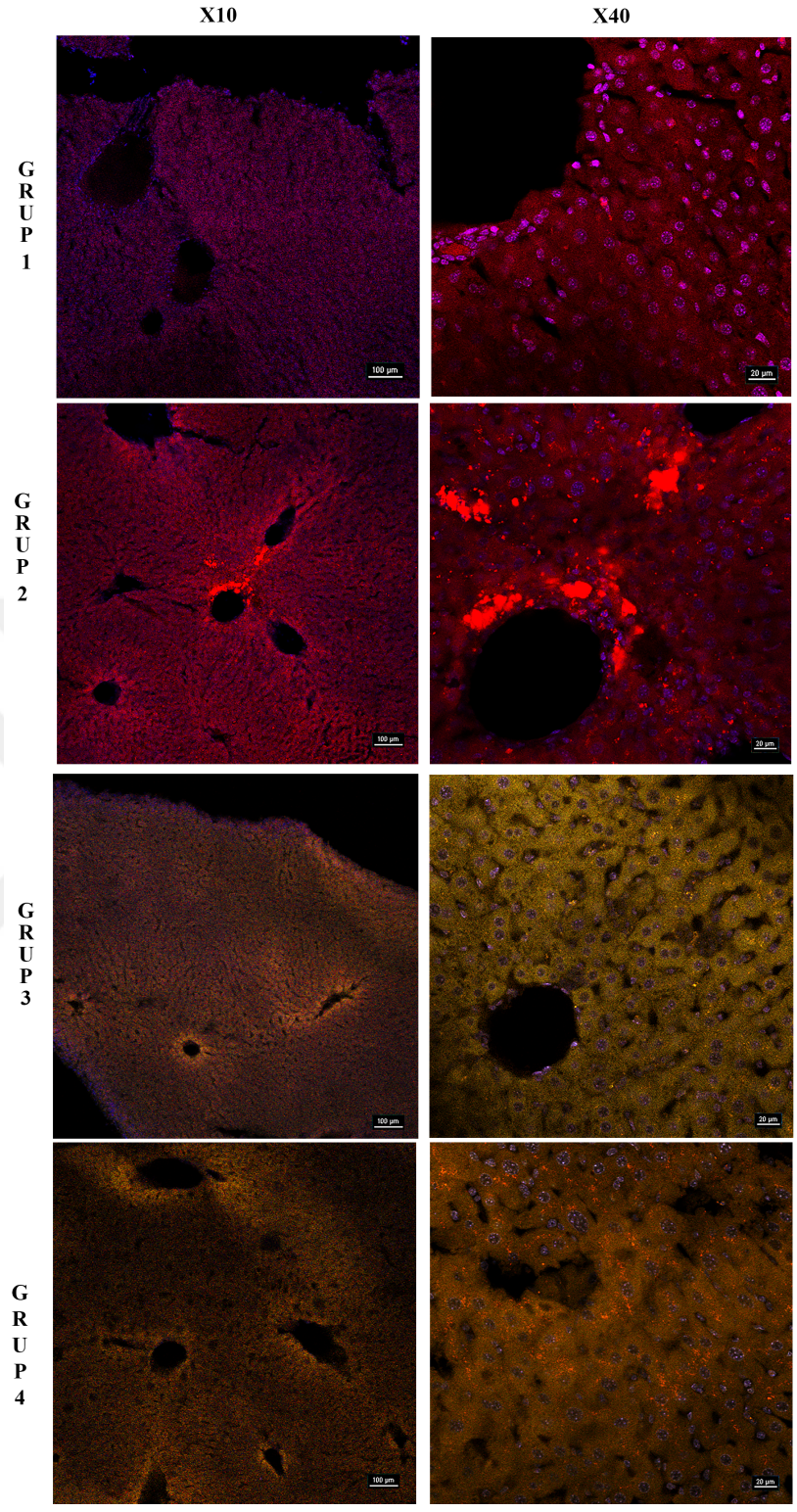


Grafik 3.5. Karaciğer ve böbrek anti IL-10 antikor işaretleme sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

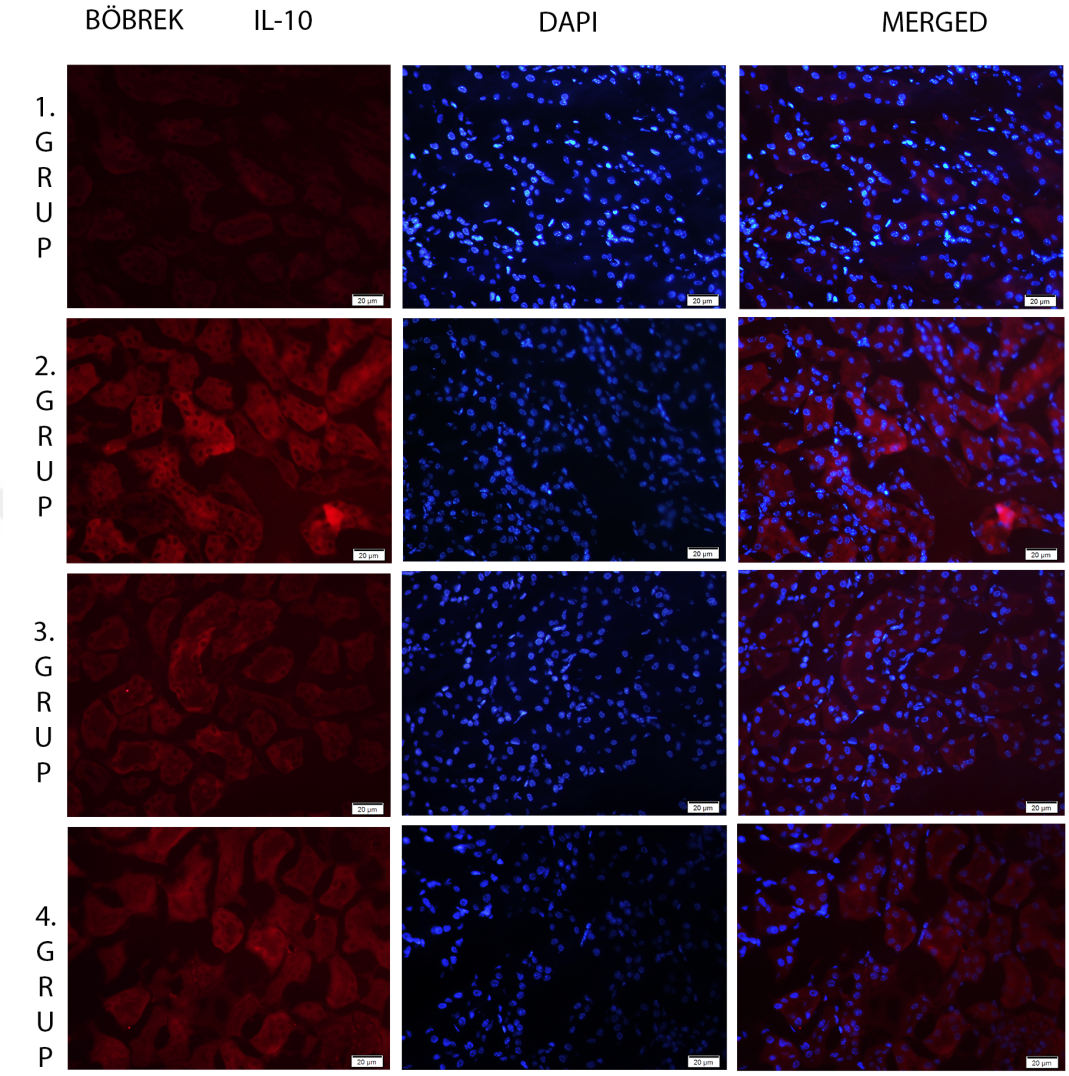
Anti IL-10 antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.23, 3.24, 3.25, 3.26'da verilmiştir.



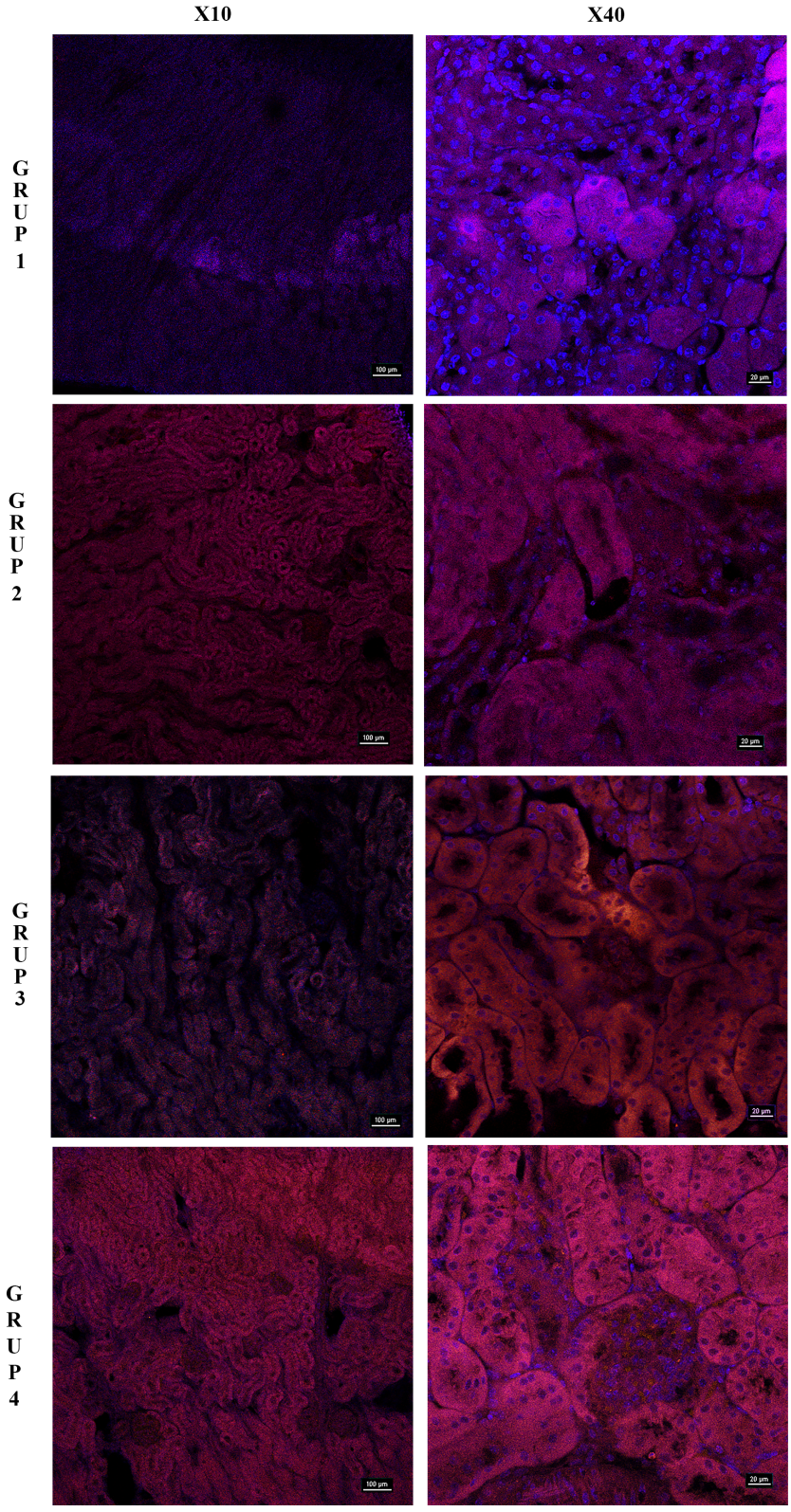
Şekil 3.23. Karaciğer IL-10 flüoresan mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm- 620nm) ile IL-10 kırmızı, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edilmiştir. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.24. Karaciğer IL-10 konfokal mikroskop görüntüleri. Grup 1'de TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm-620nm) kullanılan IL-10 Grup 1'de ve Grup 2 'de kırmızı ile Grup 3 ve Grup 4 'te sarı renk ile renklendirilmiştir. DAPI filtresi emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rhodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.25. Böbrek IL-10 flüoresan mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm-620nm) ile IL-10 kırmızı, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Kesitler 4 µm kalınlığında alınmıştır. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edilmiştir. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edilmiştir (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.26. Böbrek IL-10 konfokal mikroskop görüntüleri. Kesitler TRITC filtresi (emisyon aralığı 570 nm-620 nm) ile IL-10 Grup 1 ‘de, Grup 2’de ve Grup 4’te kırmızı, Grup 3’te sarı ile renklendirilmiştir, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm-475 nm) ile çekirdekler mavi, Rhodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN’ler kırmızı renkte görülmektedir (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).

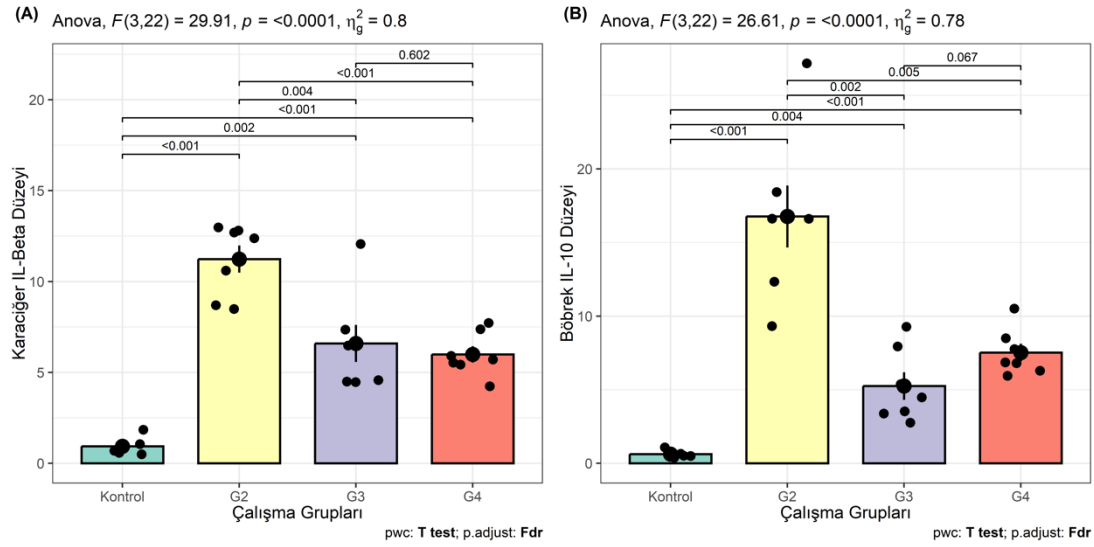
Karaciğer ve böbrekte IL-1β antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.7 ‘de ve Grafik 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.7. Karaciğer ve böbrek IL-1β antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
IL-1BETA	0.94 ±0.25[a]	11.23 ±0.75[b]	6.59 ±1.02[c]	5.99 ± 0.45[c]	<.001p
BÖBREK					
IL-1BETA	0.63 ± 0.12[a]	16.77 ± 0.75[b]	6.59 ± 1.02[c]	5.99 ± 0.45[c]	<.001p

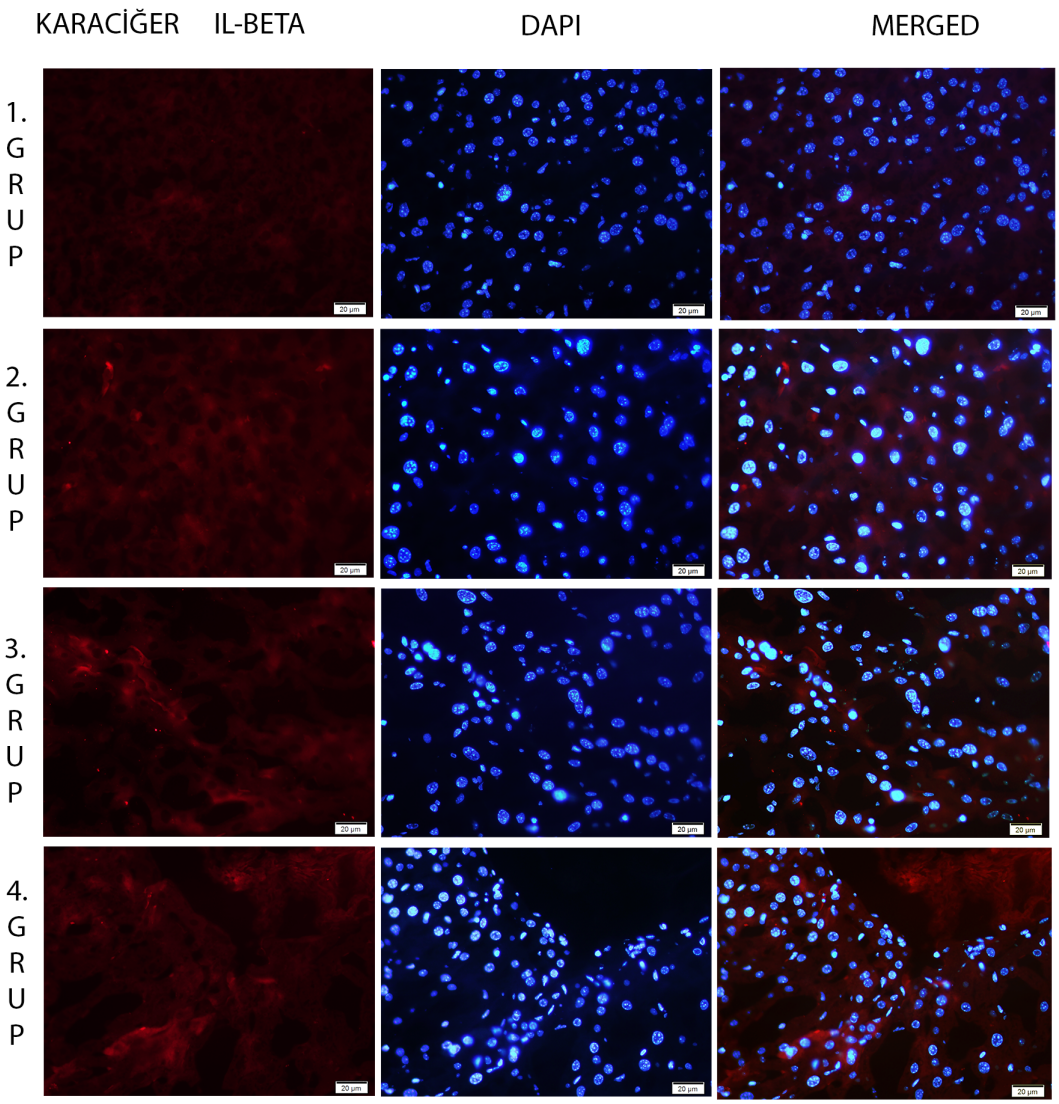
Karaciğer IL-1beta düzeyi KN uygulanan grup en fazla olup, G1 ve G3 ile G4 gruplarından anlamlı düzeyde fazla olup, G3 ile G4 grupları da G1 grubundan anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. G3 ve G4 grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Böbrek IL-1beta düzeyinin istatistiksel açıdan farklılıkları karaciğere benzerdir. KN uygulanan grup diğer tüm gruplardan en yüksek seviyededir. Antioksidan ön tedavisi uygulanan gruplar ise kendi aralarında benzer iken kontrol grubundan istatistiksel düzeyde yüksek bulunmuştur.

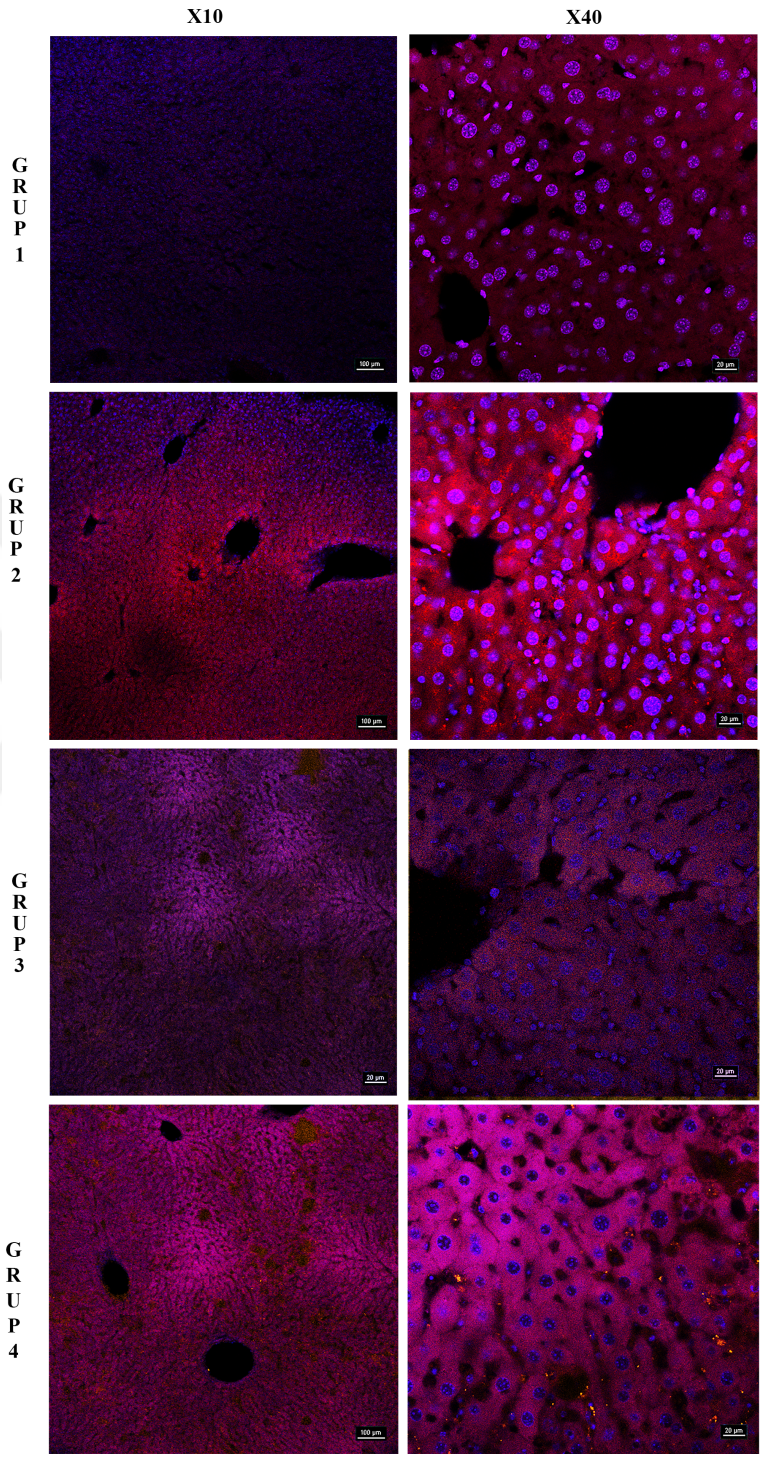


Grafik 3.6. Karaciğer ve böbrek IL- 1β antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

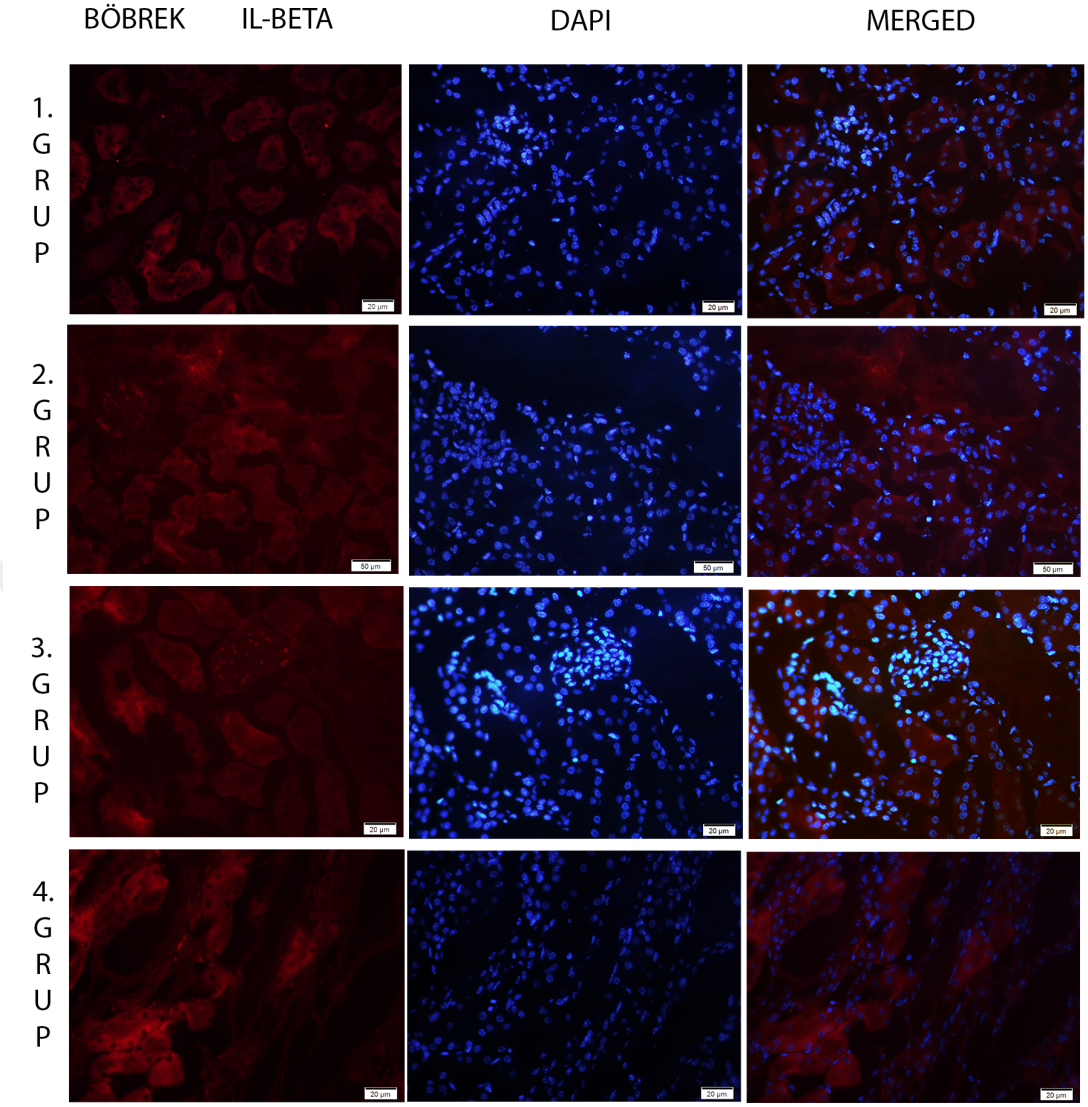
IL-1β antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.27, 3.28, 3.29, 3.30'da verilmiştir.



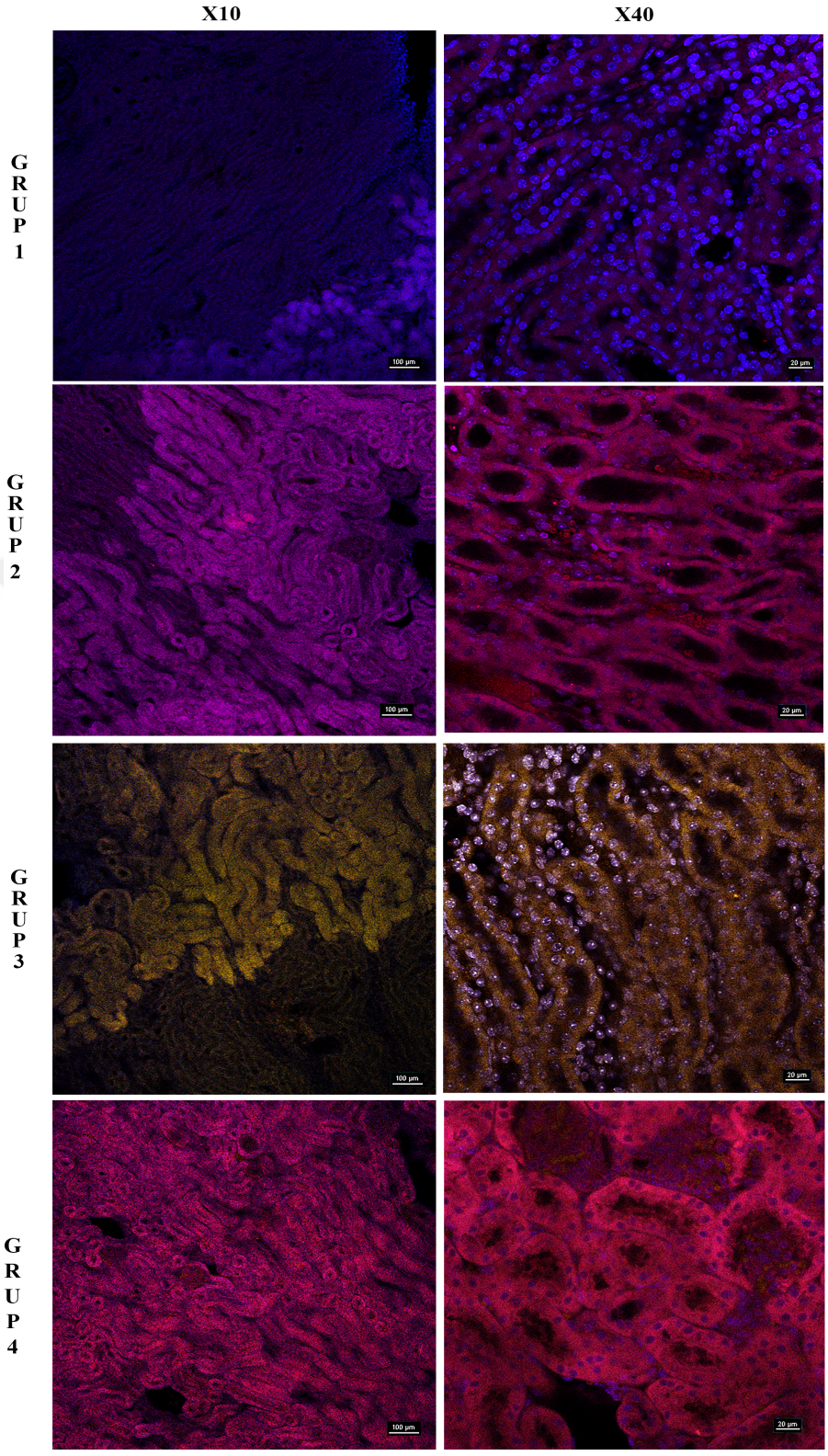
Şekil 3.27. Karaciğer IL- 1β flüoresan mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm-620nm) ile IL- 1β kırmızı, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.28. Karaciğer IL- 1β konfokal mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm-620nm) kullanılmış ve Grup 1, 2 ve 4'te IL- 1β kırmızı, KN sarı ve Grup 3'te IL-1β sarı ile renklendirilmiş, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rhodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir (Ölçek X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.29. Böbrek IL- 1β flüoresan mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm- 620nm) ile IL- 1β kırmızı, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.30. Böbrek IL- 1β Konfokal mikroskop görüntüleri. TRITC filtresi (emisyon aralığı 570nm-620nm) ile IL- 1β Grup 1, 2 ve Grup 4 'te kırmızı renkli ile Grup 3 'te sarı ile renklendirilmiştir. DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm 475 nm)ile çekirdekler mavi, Rhodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm -720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek; X10= 100µm, X40= 20µm).

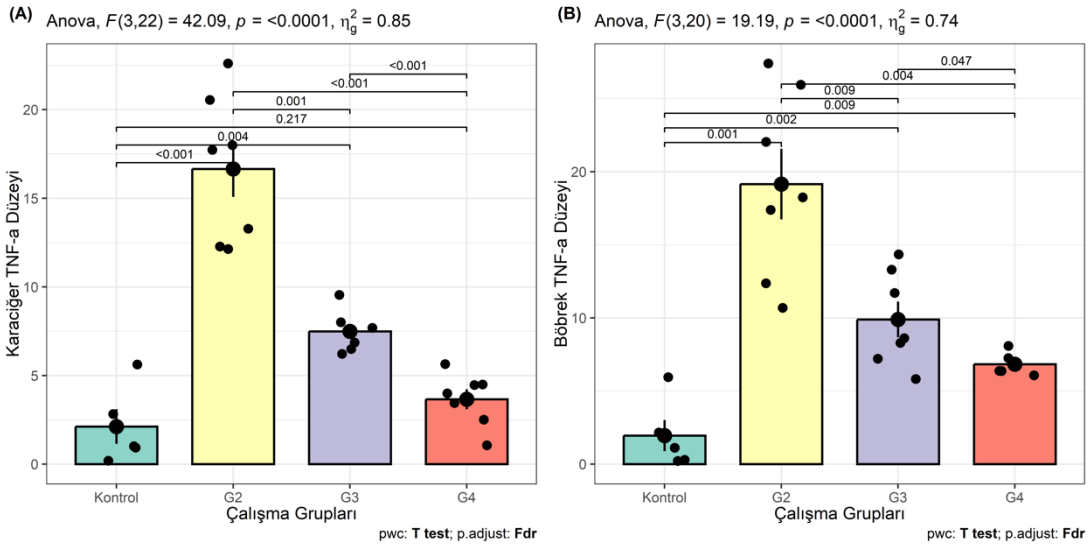
Karaciğer ve böbrekte TNF α antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.8'de ve Grafik 3.7'deverilmiştir.

Tablo 3.8. Karaciğer ve Böbrek TNF α antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
TNF α	2.12 ± 0.98^{a}	16.65 ± 1.58^{b}	7.49 ± 0.42^{c}	3.66 ± 0.57^{a}	<.001p
BÖBREK					
TNF α	1.96 ± 1.06^{a}	19.16 ± 2.41^{b}	9.90 ± 1.22^{c}	6.84 ± 0.37^{c}	<.001p

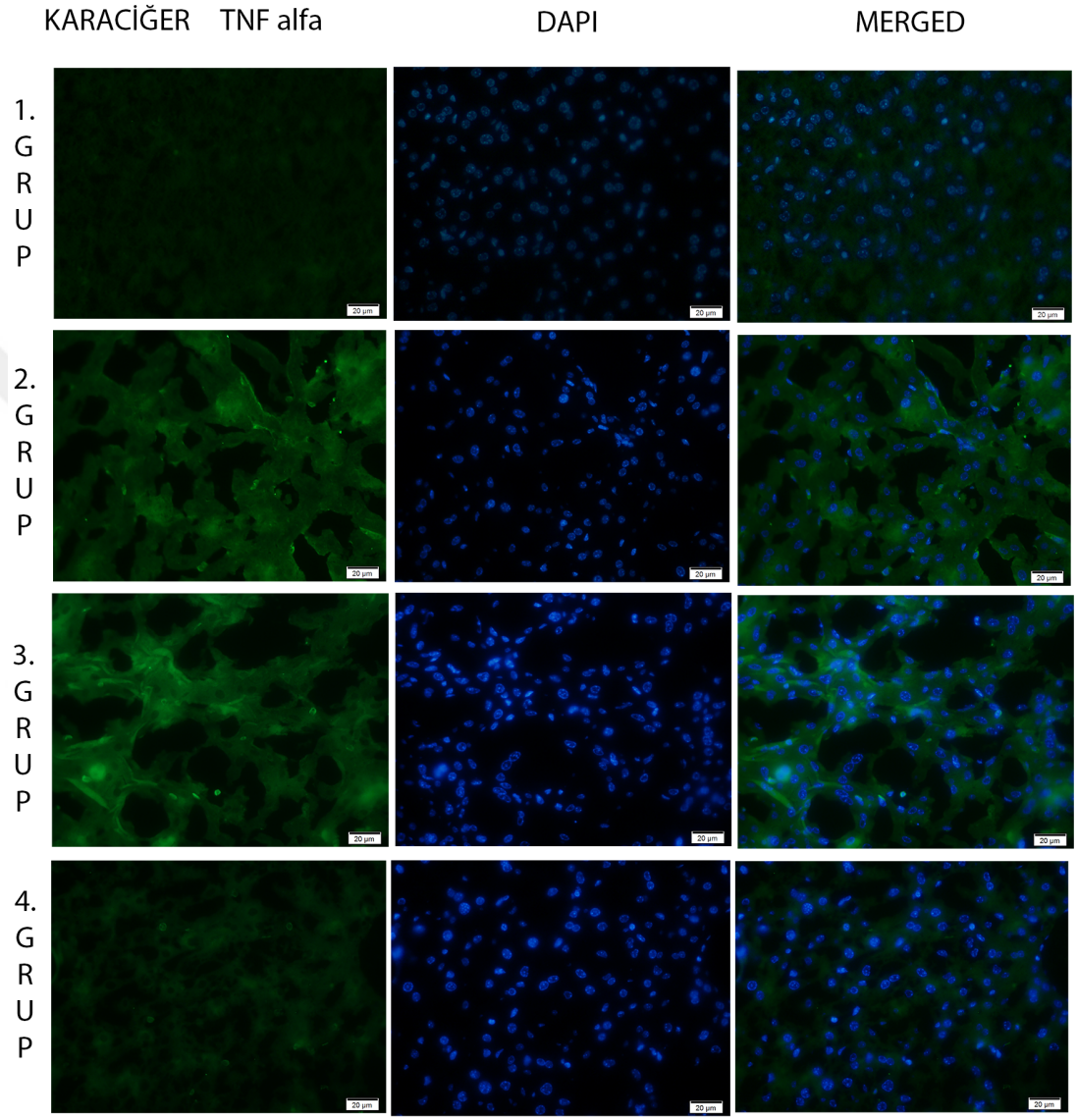
TNF alfa düzeyi G2 grubunda diğer tüm gruplardan anlamlı olarak yüksektir. MitoQ uygulanmış grup olan G4 grubunda TNF alfa düzeyi kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer olacak seviyeye inmiştir. G3 grubu ise G1 ile G4 ten anlamlı düzeyde fazladır.

Böbrekte de G2'deki TNF alfa düzeyi tüm gruplardan anlamlı olarak fazladır. Silimarin ve mito Q uygulanan gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir faklılık bulunmamaktadır. G1 grubu tüm gruplardan anlamlı şekilde düşüktür.

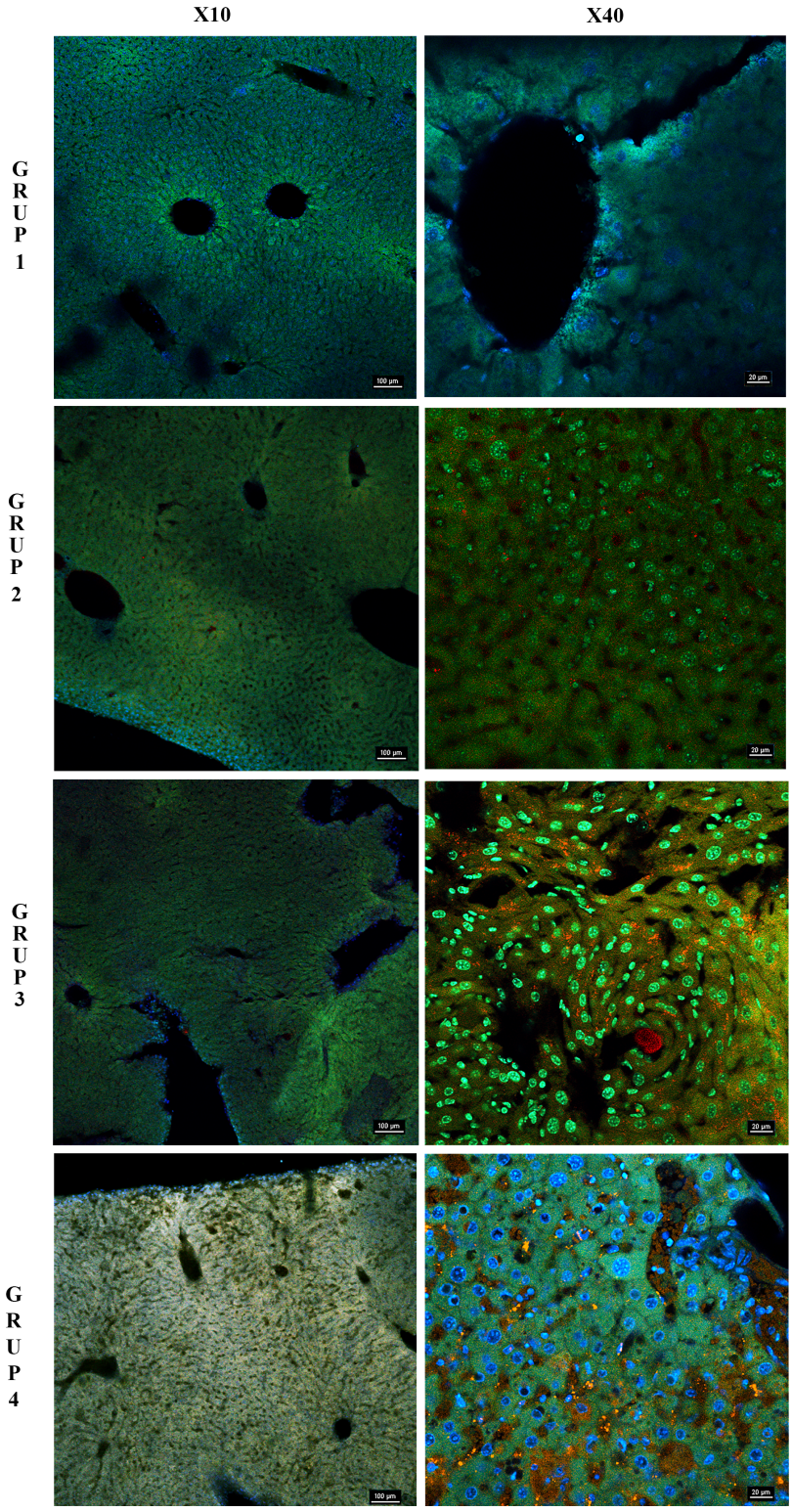


Grafik 3.7. Karaciğer ve böbrek TNF α antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

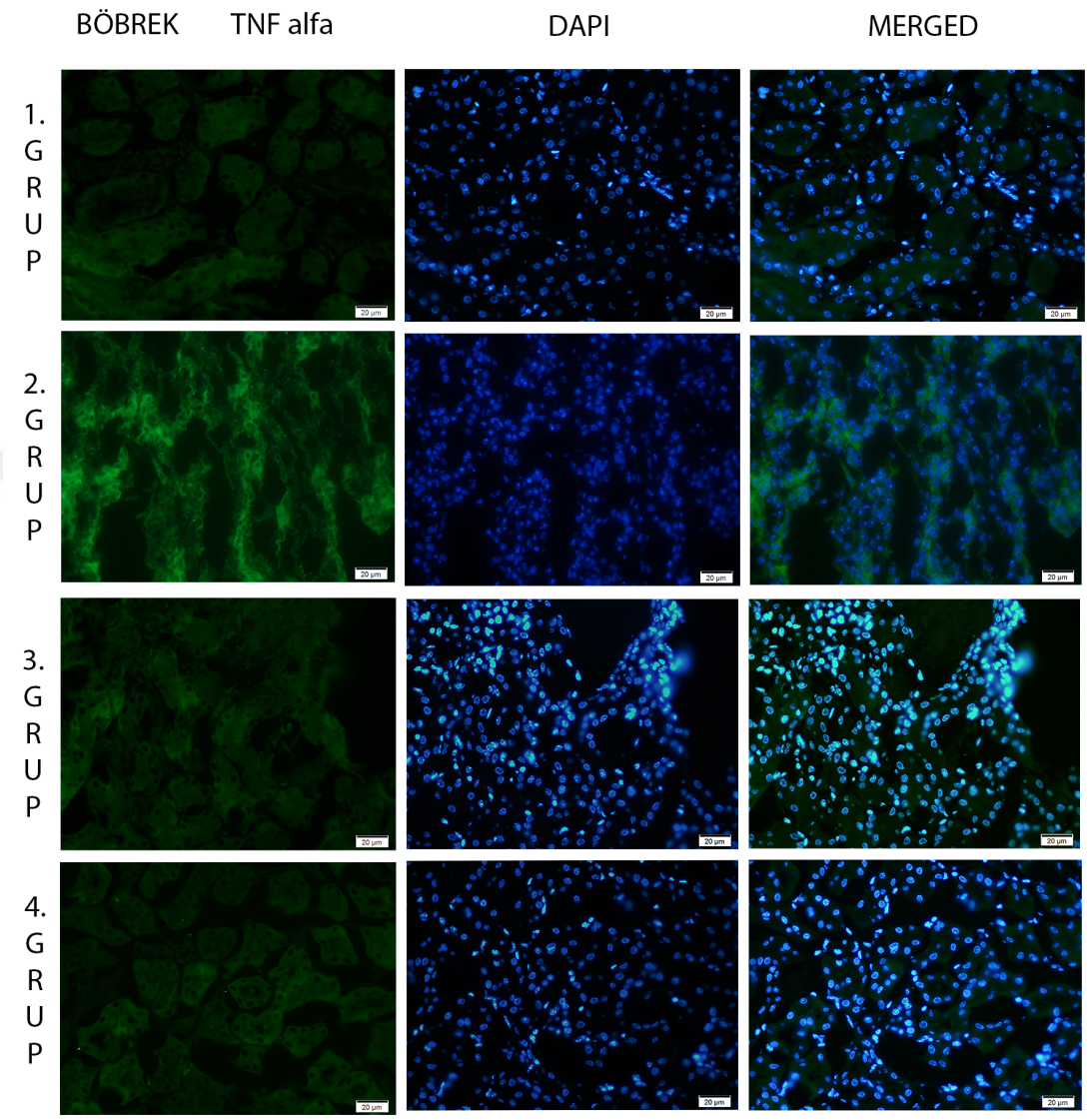
TNF α antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.31, 3.32, 3.33, 3.34'te verilmiştir.



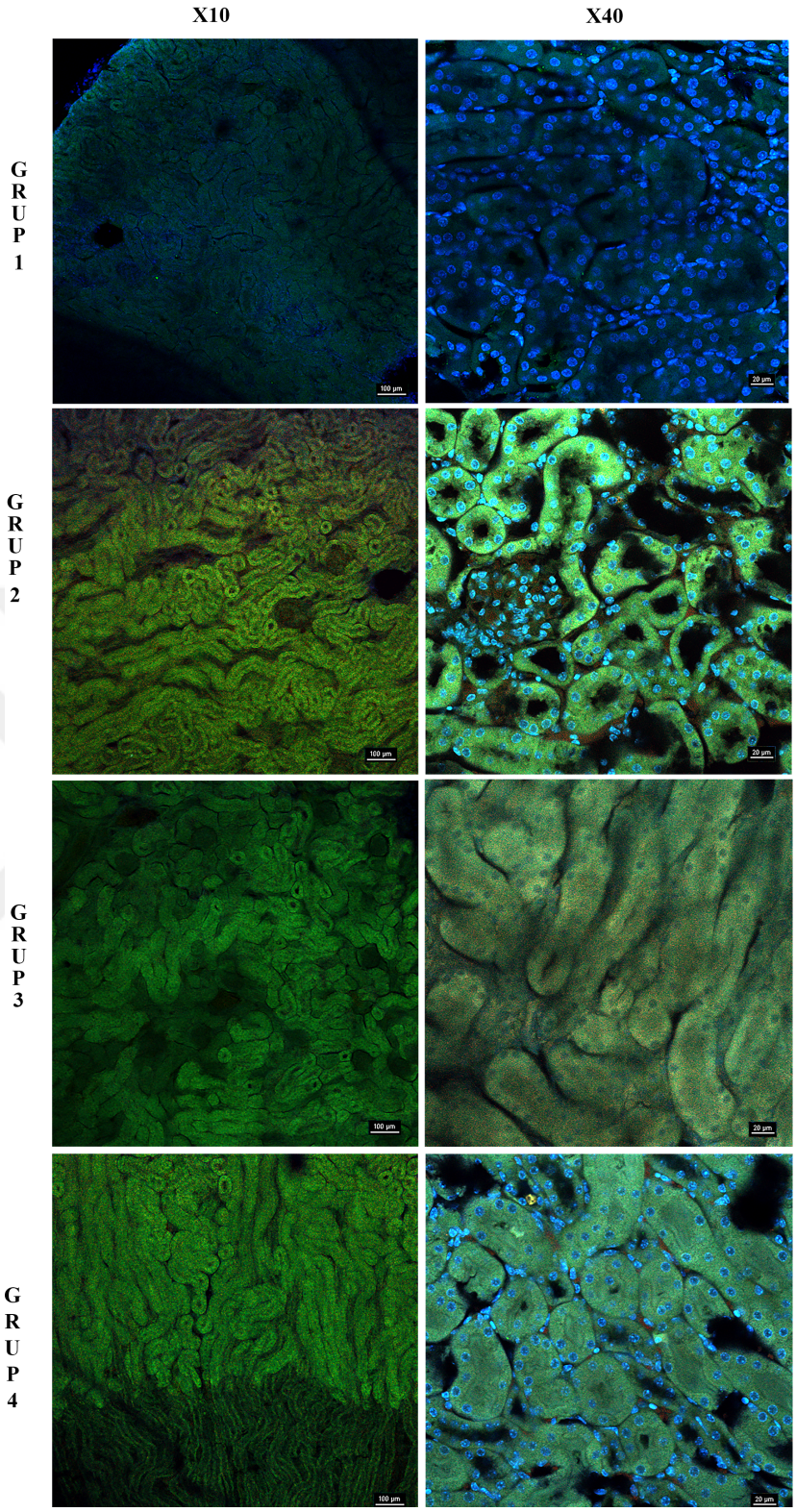
Şekil 3.31. Karaciğer TNF α flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile TNF α yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.32. Karaciğer TNF α Konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile TNF α yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100µm, X40= 20µm).



Şekil 3.33. Böbrek TNFα flüoresan mikroskop görüntüleri X40'lık büyütme. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile TNF α yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek X40= 20 µm).



Şekil 3.34. Böbrek TNF α konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile TNF α yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm -720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Görüntülerin tümü bu üç filtrenin üst üste çakıştırılması ile elde edildi ve X10'luk (sol sütun) ve X40'lık (sağ sütun) büyütmede gösterildi (Ölçek X10= 100µm, X40= 20 µm).

KASPAZLAR

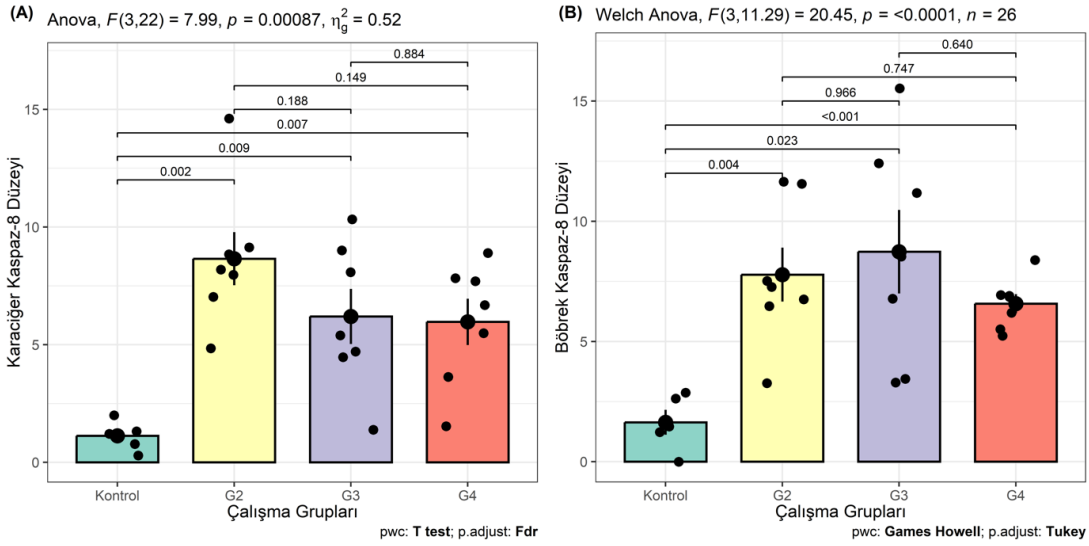
Karaciğer ve böbrekte Kaspaz 8 antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.9'da ve Grafik 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.9. Karaciğer ve Böbrek Kaspaz 8 antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
KASPAZ 8	1.13 ± 0.29^{a}	8.65 ± 1.13^{b}	6.20 ± 1.17^{b}	5.97 ± 0.99^{b}	<.001p
BÖBREK					
KASPAZ 8	1.64 ± 0.52^{a}	7.78 ± 1.12^{b}	8.74 ± 1.74^{b}	6.57 ± 0.40^{b}	<.001p

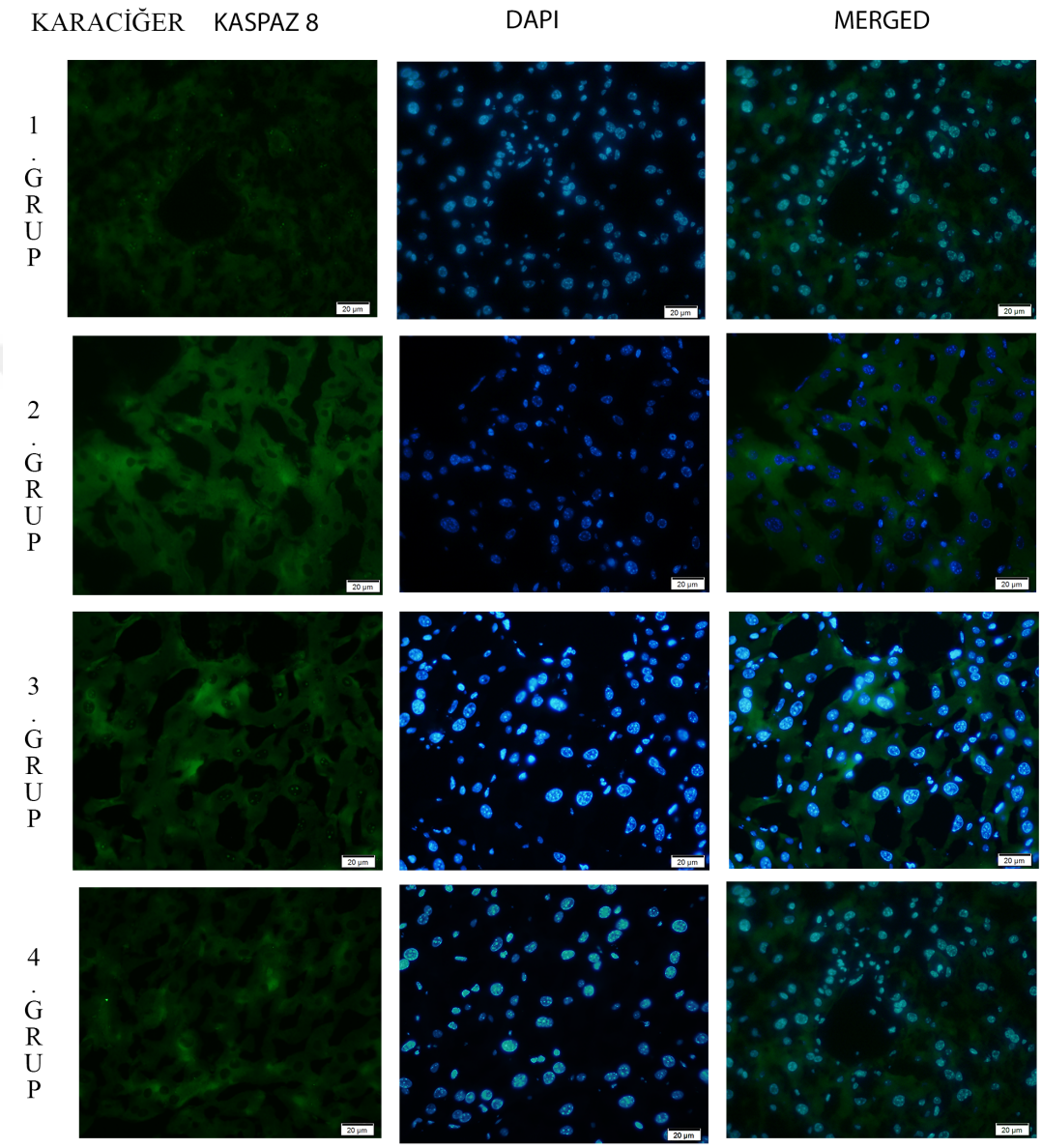
Karaciğer Kaspaz 8 düzeyi KN uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek düzeyde bulunmuştur. KN öncesi antioksidan ön tedavisi uygulanan gruplar ise yalnızca KN uygulanan grup ile benzer düzeydedir.

Kaspaz 8 düzeyi böbrekte karaciğerdeki gibi KN uygulanan grup kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksekken, diğer gruplar ile benzerdi.

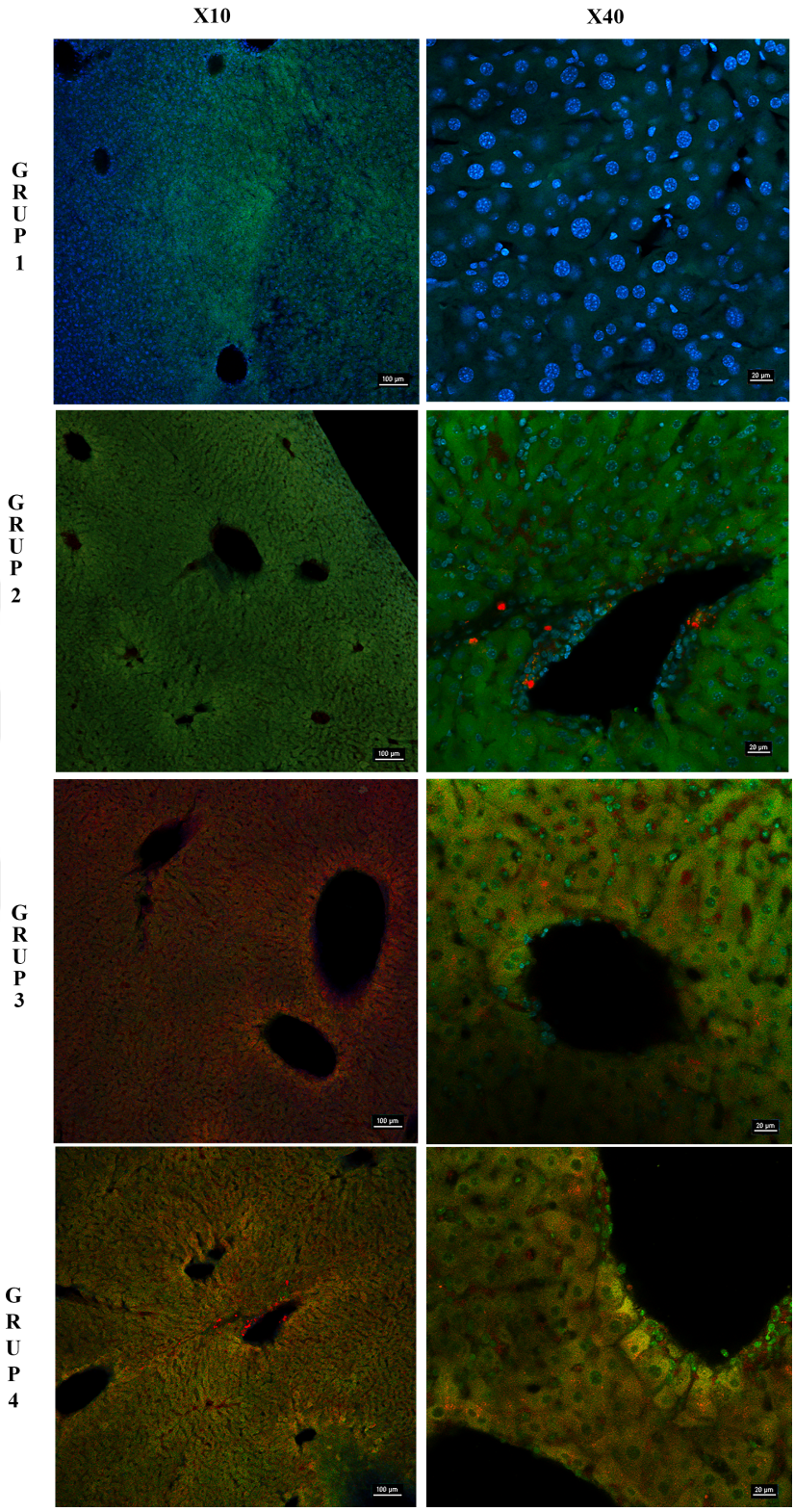


Grafik 3.8. Karaciğer ve böbrek Kaspaz 8 antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

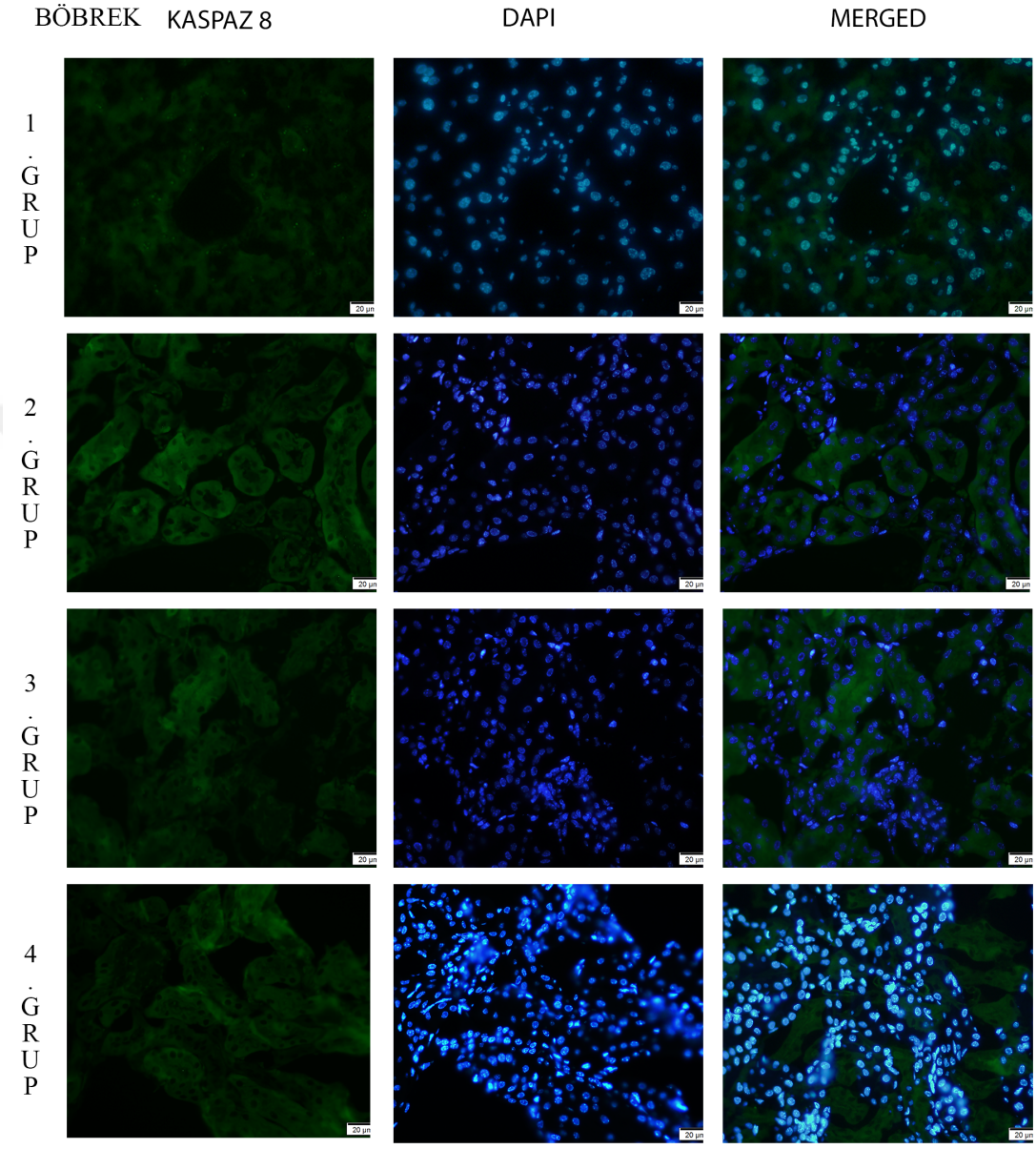
TNF α antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.35, 3.36, 3.37, 3.38 ‘de verilmiştir.



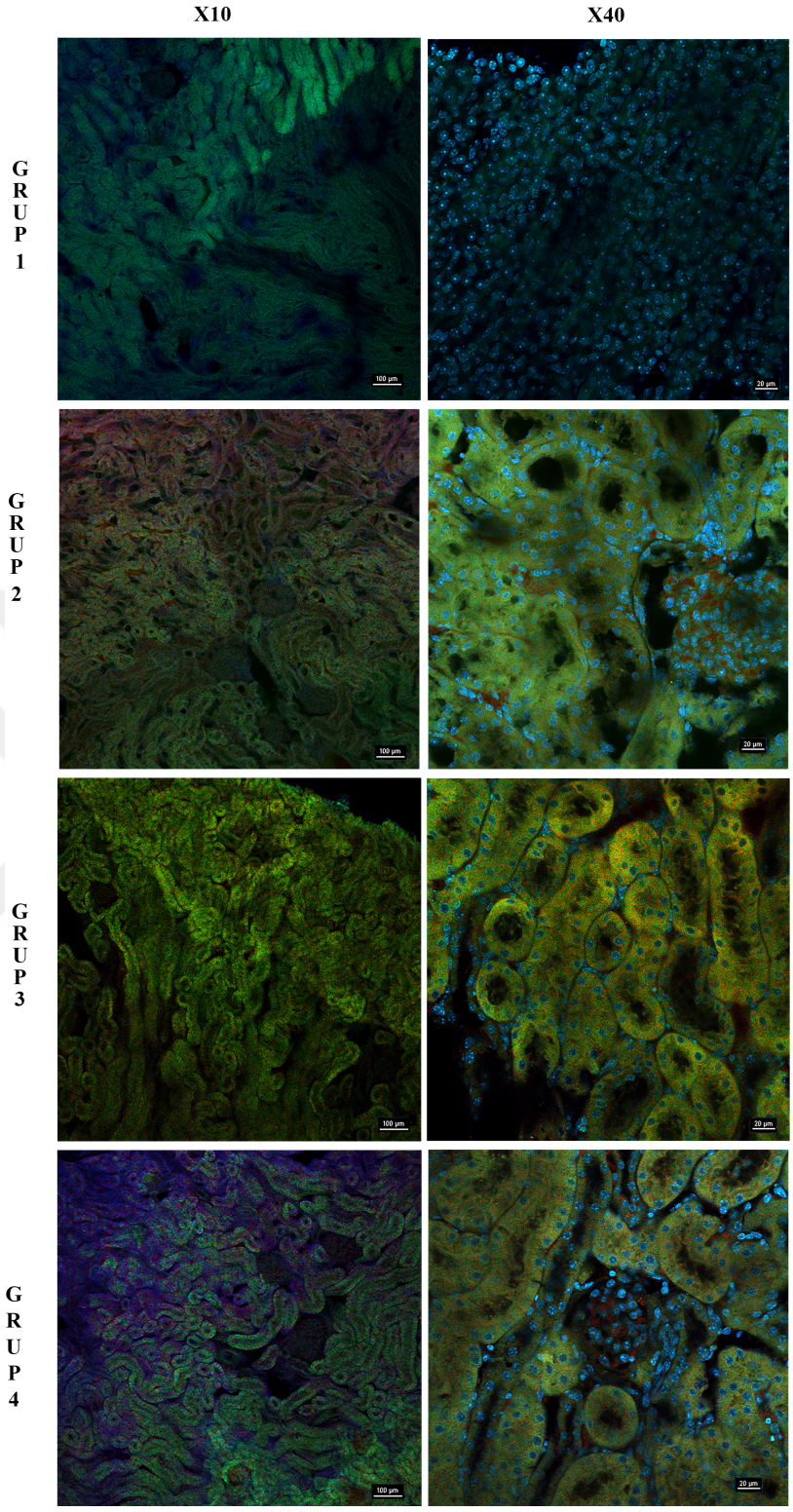
Şekil 3.35. Karaciğer Kaspaz 8 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 8 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40’lık büyütmede elde edildi (Ölçek; X40= 20µm).



Şekil 3.36. Karaciğer Kaspaz 8 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 8 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alınmıştır (Ölçek; X10= 100 µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.37. Böbrek Kaspaz 8 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 8 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm-475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek; X40= 20 µm).



Şekil 3.38. Böbrek Kaspaz 8 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 8 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm-475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm -720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı (Ölçek; X10= 100 µm, X40= 20 µm).

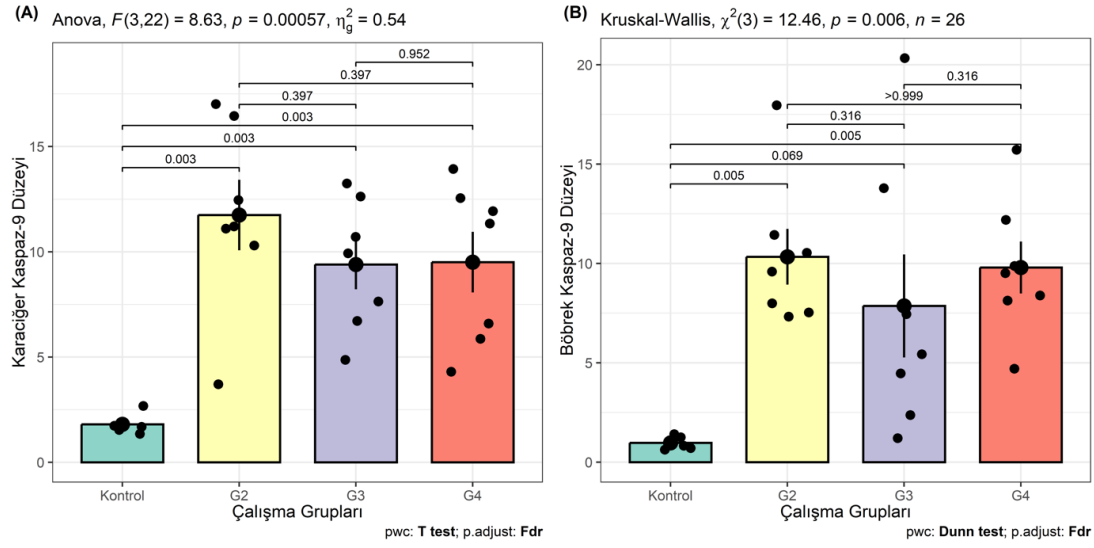
Karaciğer ve böbrekte Kaspaz 9 antikor işaretleme sonuçları Tablo 3.10'da ve Grafik 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.10. Karaciğer ve Böbrek Kaspaz 9 antikor sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
KASPAZ 9	1.81 ± 0.23^{a}	11.75 ± 1.67^{b}	9.39 ± 1.17^{b}	9.51 ± 1.44^{b}	<.001p
BÖBREK					
KASPAZ 9	0.97 ± 0.16^{a}	10.34 ± 1.40^{b}	7.86 ± 2.59^{a}	9.79 ± 1.31^{b}	.006np

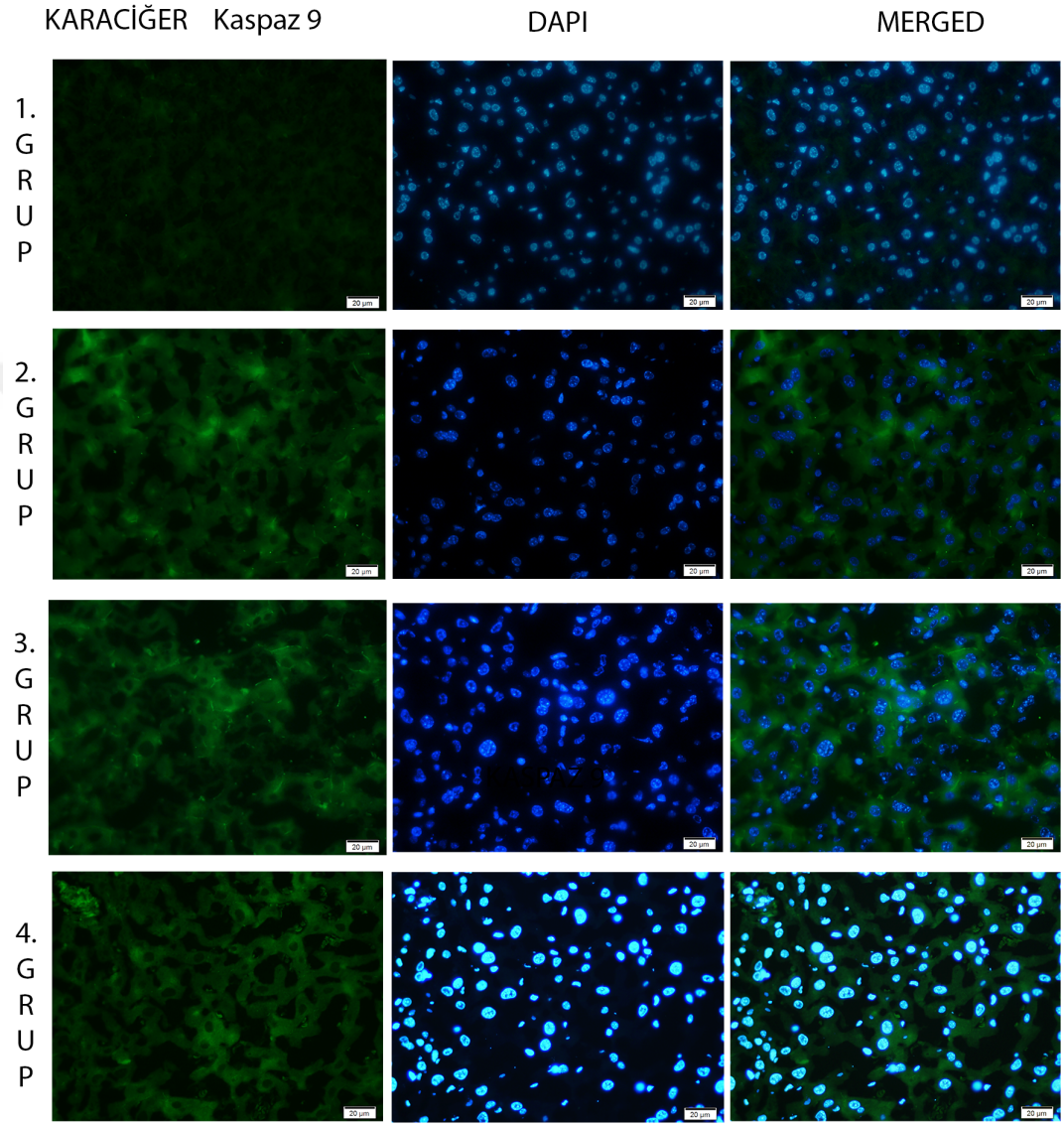
Karaciğer kaspaz 9 düzeyi CdTe kuantum nokta nanopartikül uygulanmış grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek ve diğer gruplar ile arasında anlamlı fark yoktur.

Kaspaz 9 düzeyi böbrekte KN uygulanan grup hem kontrol grubundan hem de G3 grubundan anlamlı olarak yüksektir. G4 ile G2 grupları birbirleri ile istatistiksel olarak benzerdir.

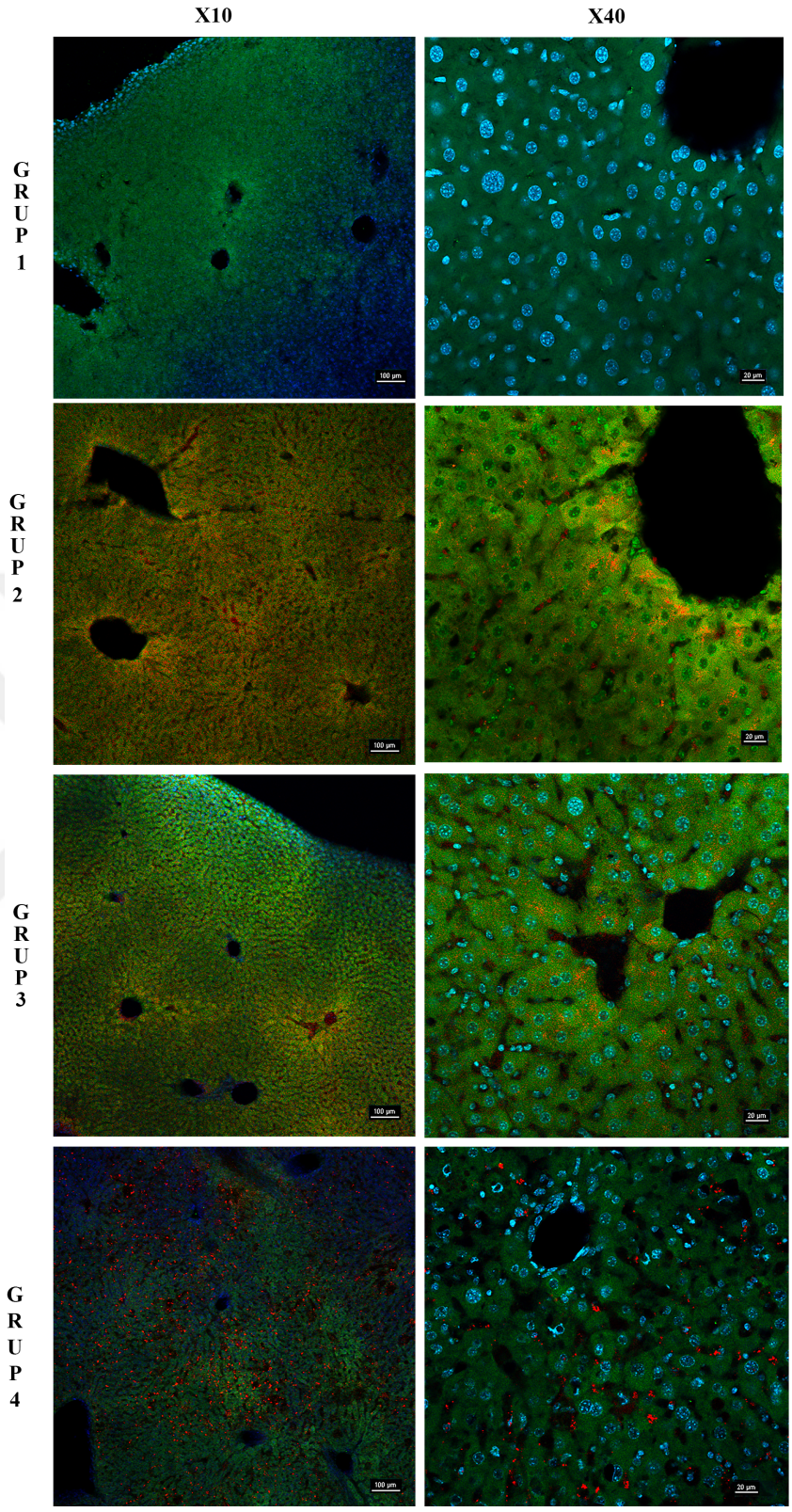


Grafik 3.9. Karaciğer ve böbrek Kaspaz 9 antikor sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

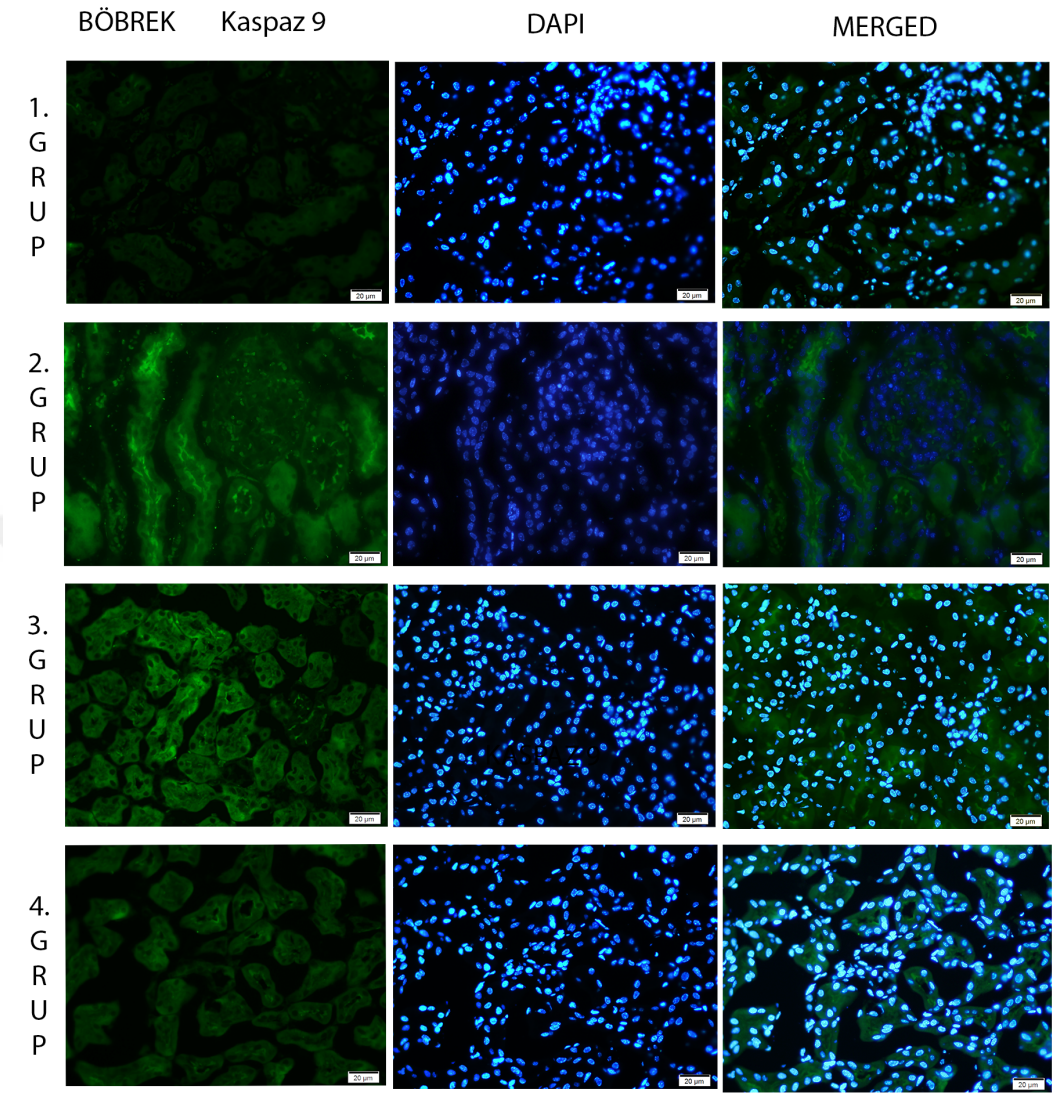
Kaspaz 9 antikor ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop ve konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 3.39, 3.40, 3.41, 3.42'da verilmiştir.



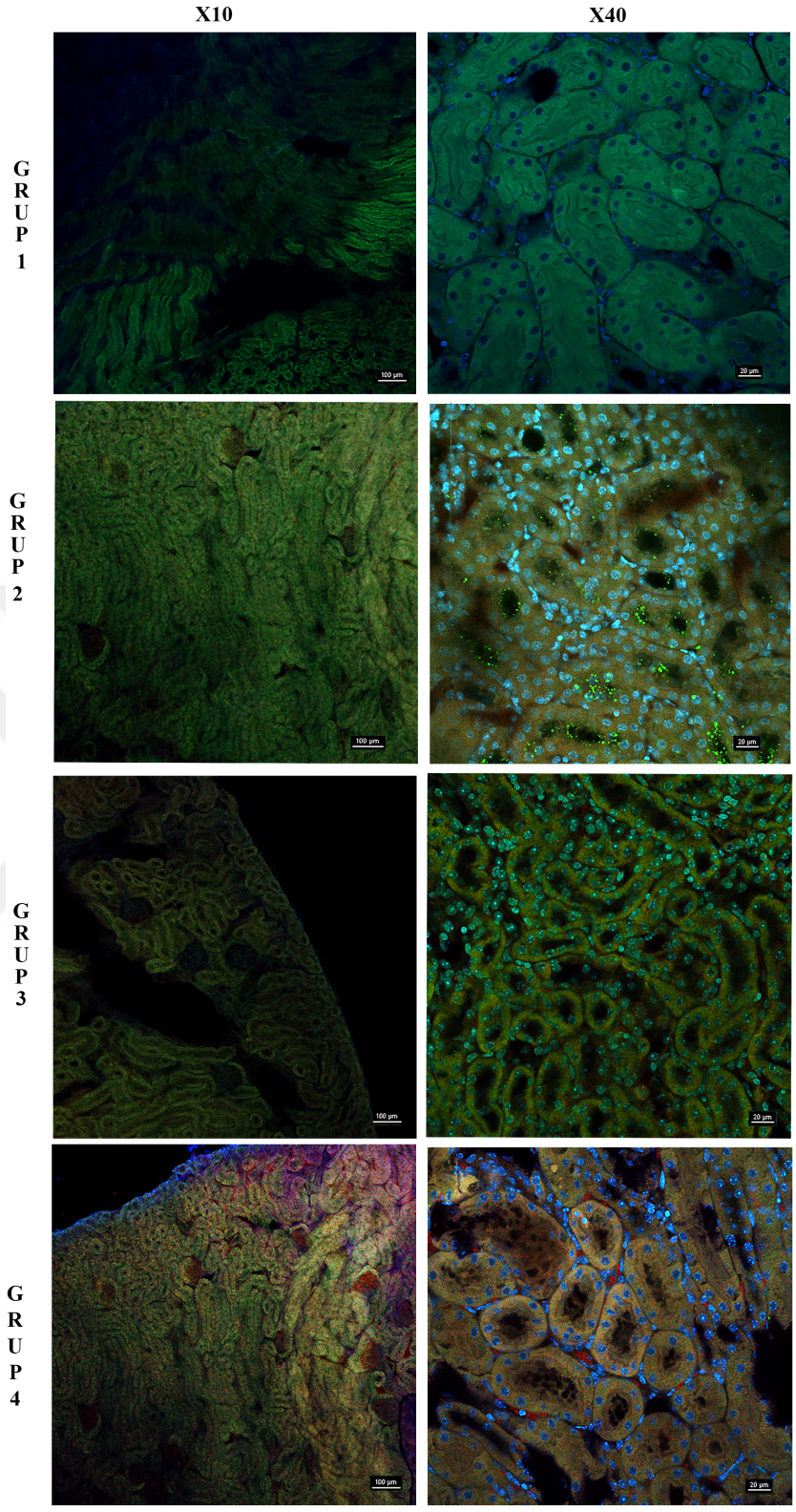
Şekil 3.39. Karaciğer Kaspaz 9 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek; X40= 20 µm).



Şekil 3.40. Karaciğer Kaspaz 9 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'ler kırmızı renkte görülmektedir. Kesitler 50 µm kalınlığında alındı (Ölçek; X10= 100µm, X40= 20 µm).



Şekil 3.41. Böbrek Kaspaz 9 flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm-475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek; X40= 20 µm).



Şekil 3.42. Böbrek Kaspaz 9 konfokal mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı 425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi, Rodamin filtresi (emisyon aralığı 650 nm- 720 nm) ile 710 nm eksitasyonlu CdTe KN'lar kırmızı renkte görülmektedir (Ölçek; X10= 100 µm, X40= 20 µm).

TUNEL

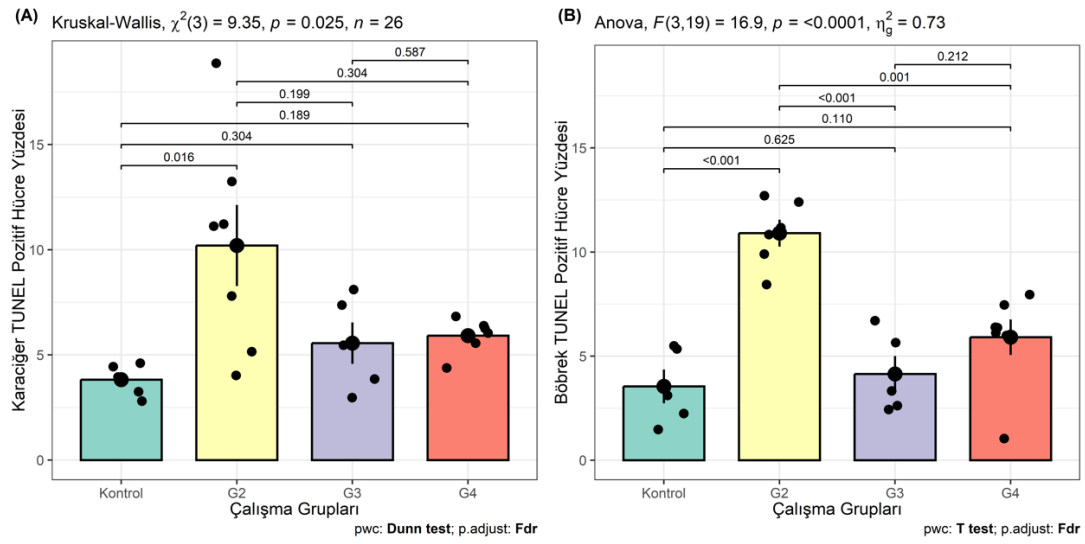
Karaciğer ve böbrekte TUNEL sonuçları Tablo 3.11'de ve Grafik 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.11. Karaciğer ve böbrek TUNEL sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
TUNEL	3.83 ± 0.35^{a}	10.20 ± 1.93^{b}	5.56 ± 0.99	5.91 ± 0.35	.025np
BÖBREK					
TUNEL	3.55 ± 0.81^{a}	10.91 ± 0.65^{b}	4.15 ± 0.86^{a}	5.91 ± 0.85^{a}	<.001p

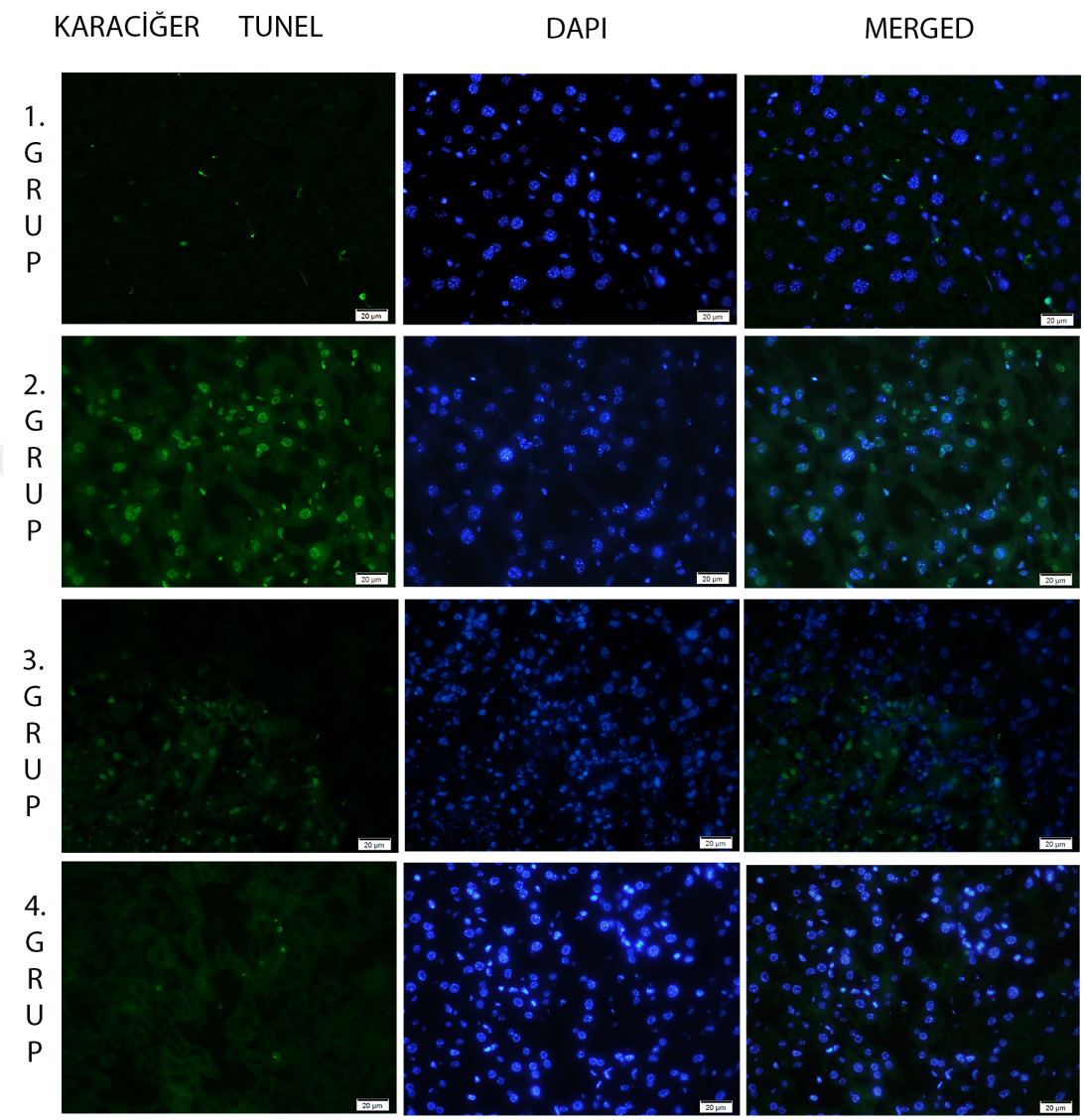
TUNEL sonuçlarına baktığımızda karaciğer için G2 grubu G1'e göre istatistiksel olarak anlamlı (p=0.016) düzeyde yüksektir. Antioksidan uygulanan G3 ve G4 gruplarında ise TUNEL sonuçlarında azalma görülse de G1 ve G2 grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir.

Böbrekte ise G2 grubunda TUNEL pozitif hücre yüzdesi diğer tüm gruplardan anlamlı (<.001p) düzeyde yüksektir. Antioksidan gruplarında ise hem kendi hem de kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir farklılık görülmemektedir.

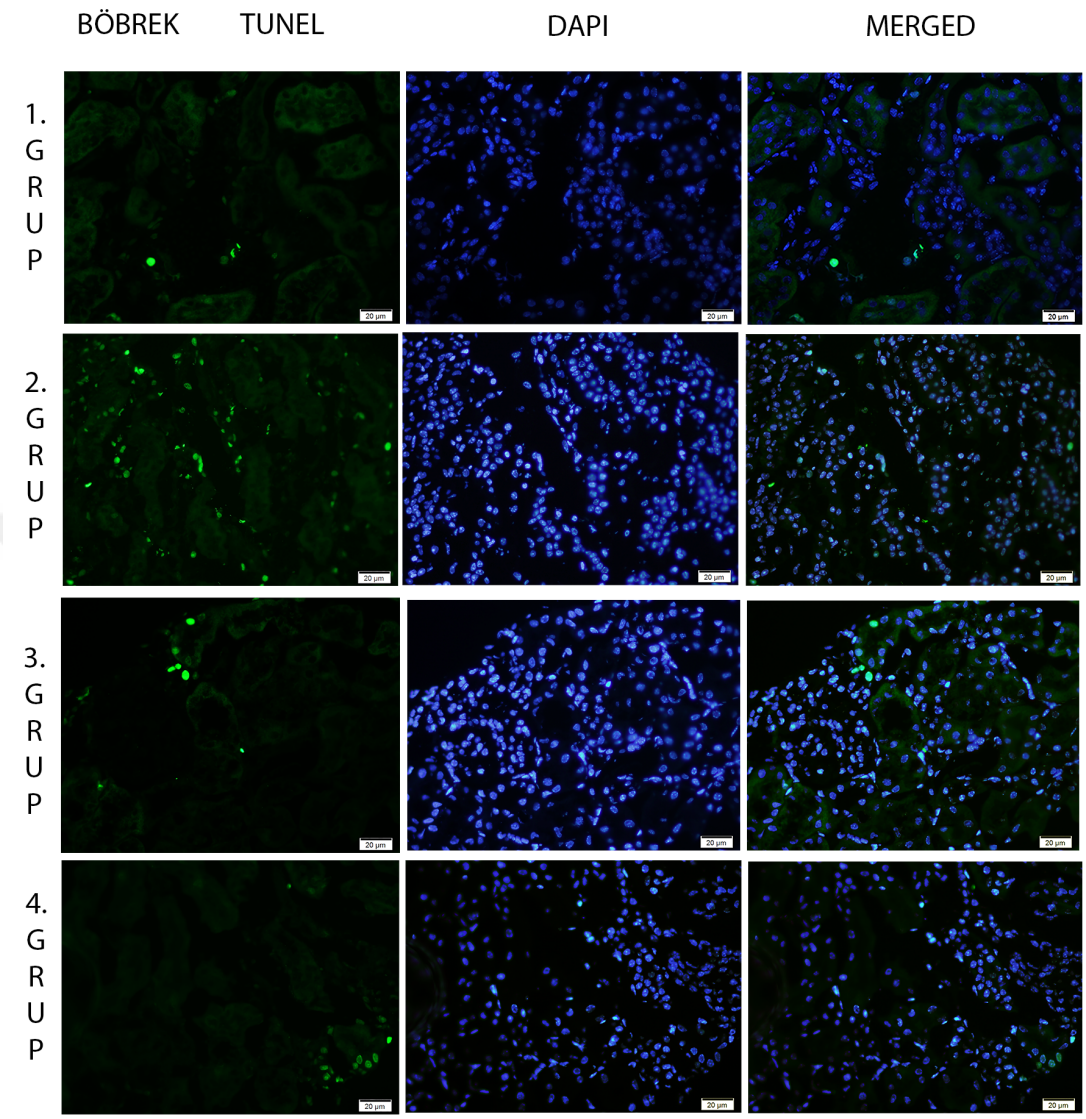


Grafik 3.10. Karaciğer ve böbrek TUNEL sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

TUNEL ile işaretlenen karaciğer ve böbrek dokularının flüoresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.43, 3.44, 3.45, 3.46 da verilmiştir.



Şekil 3.43. Karaciğer TUNEL flüoresan mikroskop görüntüleri. FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile TUNEL pozitif hücrelerin çekirdekleri yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm- 475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı (Ölçek; X40= 20 µm).



Şekil 3.44. Böbrek TUNEL flüoresan mikroskop görüntüleri FITC filtresi (emisyon aralığı 500 nm- 550 nm) ile Kaspaz 9 yeşil, DAPI filtresi (emisyon aralığı (425 nm-475 nm) ile çekirdekler mavi görülmektedir. Kesitler 4 µm kalınlığında alındı. Merged görüntü iki filtre çakıştırılarak elde edildi. Görüntülerin tümü X40'lık büyütmede elde edildi (Ölçek; X40= 20µm).

3.5. Biyokimyasal Bulgular

3.5.1. Biyokimyasal parametrelerin sonuçları

Serum Biyokimyasal testler

Serum biyokimyasal parametreler ALT'nin G2, G3 ve G4 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür.

AST en yüksek G2 grubunda bulunmuş olup, G3 ve G4 grupları kendi aralarında benzer iken kontrol grubundan daha fazladır.

Direk bilirubin, total bilirubin, üre, kreatinin ve albümin parametrelerinde istatiksel anlamlı bir fark görülmemiştir.

LDH G2 grubunda en yüksek iken G3 ve G4 grupları birbirleri ile benzer ve kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 3.12. Serum Biyokimyasal Parametre Sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
ALT, U/L	31.20 ± 4.97^{a}	121.67 ± 11.65^{b}	75.43 ± 4.32^{b}	79.00 ± 4.30^{b}	<.001p
AST, U/L	60.80 ± 5.08^{a}	205.67 ± 24.67^{b}	97.00 ± 2.62^{c}	93.60 ± 3.66^{c}	<.001p
DİREKT BİLİRUBİN, mg/dl	0.26 ± 0.05	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.01	.397np
TOTAL BİLİRUBİN, mg/dl	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.06	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.01	.556np
ÜRE, mg/dl	42.40 ± 1.29	44.17 ± 1.70	43.71 ± 1.87	40.20 ± 2.52	.465np
KREATİNİN, mg/dl	0.72 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.72 ± 0.06	0.58 ± 0.05	.092np
ALBUMİN, g/L	32.32 ± 0.33	32.45 ± 0.32	32.00 ± 1.53	31.64 ± 0.64	.809np
LDH, U/L	288.04 ± 10.34^{a}	1281.82 ± 26.10^{b}	699.57 ± 6.49^{c}	671.10 ± 7.33^{c}	<.001p

3.5.2. TAS, TOS ve OSI Sonuçları

TAS (p=.509), TOS (p=.588) ve OSİ (p=.491) açısından çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 3.12).

Tablo 3.13. Karaciğer ve böbrek TAS, TOS VE OSI Sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
TAS	1.27 ± 0.26	1.33 ± 0.24	1.49 ± 0.60	1.60 ± 0.43	.509
TOS	2.74 ± 1.25	4.29 ± 2.28	3.77 ± 2.30	4.06 ± 1.70	.588
OSİ	0.21 ± 0.07	0.32 ± 0.17	0.24 ± 0.10	0.26 ± 0.12	.491

3.5.3. Doku Katalaz (CAT), Superoksit Dismutaz 1 (SOD1)(Cu-Zn) ve Malondialdehid (MDA) Seviyeleri

Çalışma gruplarına göre hem karaciğer hem de böbrekteki MDA değerleri Tablo 3.14'te ve Grafik 3.11'de verildi.

Tablo 3.14. Karaciğer ve böbrek MDA sonuçları

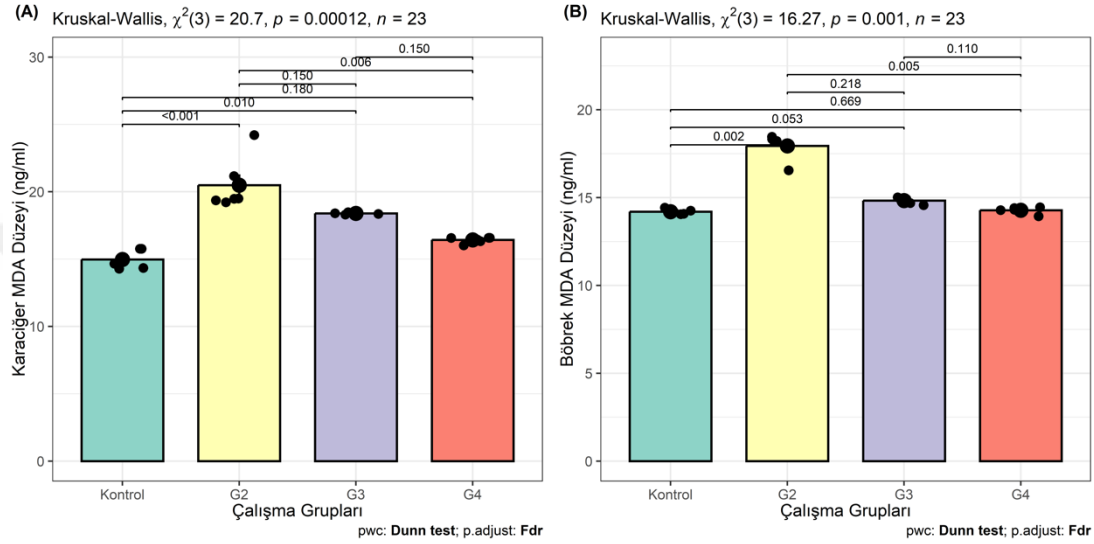
	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
MDA (ng/ml)	14.97 ± 0.75^{a}	20.49 ± 1.96^{b}	18.39 ± 0.06^{bc}	16.42 ± 0.22^{ac}	$.001^{1}$
BÖBREK					
MDA (ng/ml)	14.20 ± 0.07^{a}	17.95 ± 0.35^{b}	14.38 ± 0.09^{ab}	14.28 ± 0.09^{a}	$<.001^{1}$

Hem karaciğer hem de böbrekte çalışma gruplarına göre MDA değerleri (ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi (sırasıyla, p=.001 ve p<.001).

Karaciğer için FDR düzeltmeli Dunn post-hoc testi, mito-Q uygulanan gruptaki MDA düzeyinin (16.42 ± 0.22) kontrol grubundaki düzeye indiğini (14.97 ± 0.75^{a},

düzeltilmiş *p*=.18), ayrıca silimarin uygulanan grubun MDA düzeyinin mito-Q uygulanan grupla ve KN uygulanan grupla anlamlı düzeyde benzer olduğu bulundu.

Böbrek için Tukey HSD post-hoc testi sonuçlarına göre, silimarin uygulanan grupta MDA düzeyi kadmiyum uygulanan gruptan anlamlı şekilde düşükken mito-Q uygulanan grup ile benzerdi. Ayrıca Mito-Q uygulanan grup kontrol grubu ile benzer bulunmuştur.



Her bir satırdaki farklı harfler, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı gösterir (FDR düzeltmeli Dunn testi sonuçları).
[1] Kruskal-Wallis testi ile elde edildi.
Kısaltmalar: G2, kadmiyum uygulanan grup; G3, silimarin uygulanan grup; G4, mito-Q uygulanan grup.

Grafik 3.11. Karaciğer ve böbrek MDA sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

Çalışma gruplarına göre karaciğer ve böbrekteki CAT değerleri Tablo 3.15'te ve Grafik 3.12'de verildi.

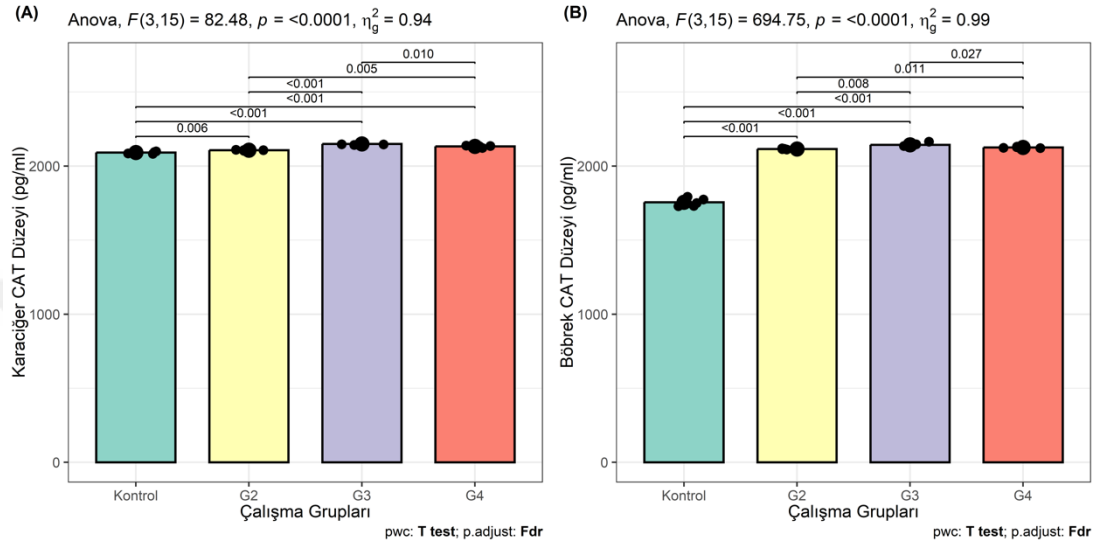
Tablo 3.15. Karaciğer ve Böbrek CAT sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
CAT (pg/ml)	2091.35 ± 3.17[a]	2106.85 ± 1.32[b]	2149.55 ± 3.25[c]	2132.32 ± 3.61[d]	<.001[2]
BÖBREK					
CAT (pg/ml)	1755.45 ± 12.28[a]	2115.25 ± 1.29[b]	2143.65 ± 5.47[c]	2125.70 ± 2.17[c]	<.001[2]

Hem karaciğer hem de böbrekte çalışma gruplarına göre Katalaz değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi (sırasıyla, *p*<.001ve *p*<.001).

Karaciğer katalaz seviyesi (pg/ml) en yüksek silimarin ön tedavili KN uygulanan grupta görülmüş olup, daha sonra sırasıyla; mito-Q uygulanan grup, KN uygulanan grup ve en az kontrol grubu olduğu gösterilmiştir.

Katalaz düzeyi böbrekte antioksidan ön tedavisi uygulanan gruplarda benzer ve diğer gruplardan yüksektir. En düşük katalaz değeri kontrol grubunda görülmüştür.



Her bir satırdaki farklı harfler, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı gösterir (FDR düzeltmeli Dunn testi sonuçları).
[1] Kruskal-Wallis testi ile elde edildi.
Kısaltmalar: G2, kadmiyum uygulanan grup; G3, silimarin uygulanan grup; G4, mito-Q uygulanan grup.

Grafik 3.12. Karaciğer ve böbrek CAT sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

Çalışma gruplarına göre karaciğer ve böbrekteki SOD1 değerleri Tablo 3.16'da ve Grafik 3.13'te verildi.

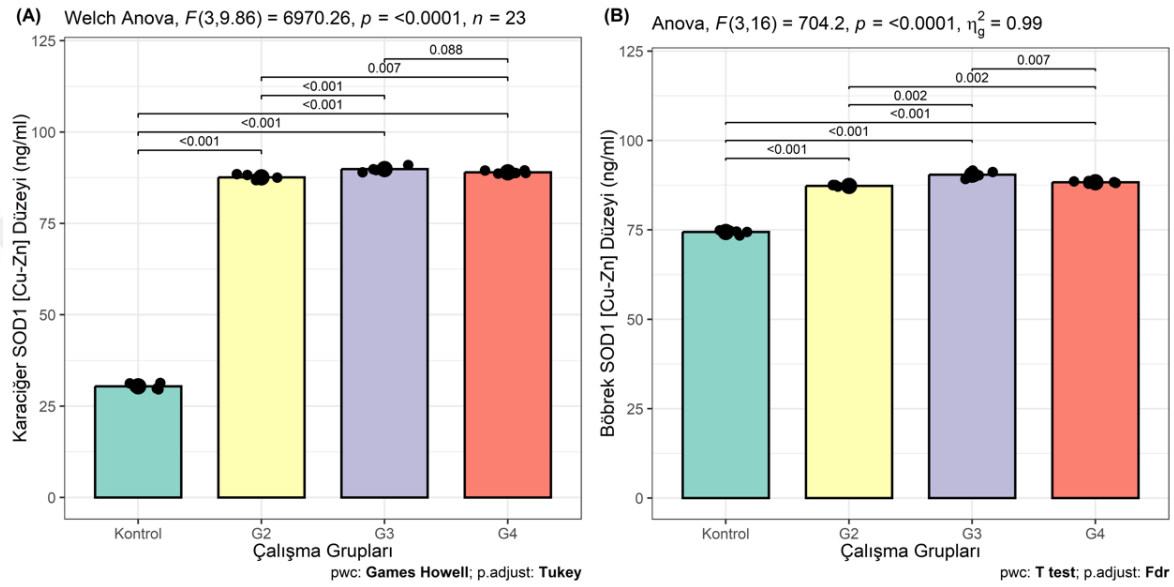
Tablo 3.16. Karaciğer ve Böbrek SOD1 sonuçları

	Kontrol	**G2**	**G3**	**G4**	***p*-değeri**
KARACİĞER					
SOD1 (ng/ml)	30.43 ± 0.36^{a}	87.63 ± 0.25^{b}	89.86 ± 0.26^{c}	89.00 ± 0.16^{c}	<.001[2]
BÖBREK					
SOD1 (ng/ml)	74.43 ± 0.26^{a}	87.31 ± 0.16^{b}	90.42 ± 0.43^{c}	88.34 ± 0.13^{d}	<.001[2]

Karaciğer SOD1 (Cu-Zn) Düzeyi (ng/ml) silimarin ve mito-Q ön tedavisi uygulanan gruplarda, yalnızca KN uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde yüksek

olduğu bulunmuştur (sırasıyla düzeltilmiş p <.001, düzeltilmiş p=.007). KN uygulanan grubun SOD1 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p<.001).

Böbrek SOD1 değeri en yüksek silimarin uygulanan grupta görülmüştür. KN uygulanan grup istatistiksel olarak mito-Q uygulanan gruptan düşük iken kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Tüm gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Her bir satırdaki farklı harfler, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı gösterir (FDR düzeltmeli Dunn testi sonuçları).
[1] Kruskal-Wallis testi ile elde edildi.
Kısaltmalar: G2, kadmiyum uygulanan grup; G3, silimarin uygulanan grup; G4, mito-Q uygulanan grup.

Grafik 3.13. Karaciğer ve böbrek SOD1 sonuçları ve gruplar arası istatistiksel farkları

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kullanım alanının giderek artması ile insan vücuduna maruziyeti artan ve özellikle benzersiz özelliklerinden dolayı da birçok ticari uygulamada ve biyomedikal amaçlarla kullanılmakta olan CdTe KN'lerin in vivo toksisitesini araştırmak ve bu toksisiteyi azaltmak adına silimarin ve mitokinon antioksidanları ile ön tedavilerinin etkilerinin histolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinden incelenmesini içermektedir.

Kadmiyum bazlı KN'lerin toksisitesi, çeşitli hücre ve hayvan modellerinde incelenmiştir. Ancak, bu NP'lerin toksisitesi ve biyogüvenliği ile ilgili büyük belirsizlikler devam etmektedir (Hardman 2006, Pelley ve ark 2009, Yong ve ark 2013). KN'lerin tipi, hayvan modelleri, maruz kalma dozu ve süresi ile yakından ilişkili olan in vivo toksisitesi açısından birçok tartışma vardır. Ayrıca, toksik etkilerinin altında yatan fizyopatolojik mekanizmalar hakkındaki bilgiler net değildir ve kapsamlı bir araştırmayı gerektirmektedir. Özellikle karmaşık biyolojik sistemi daha iyi anlamak adına bu alanda yapılan in vivo çalışmalar daha önemli bir yer tutmaktadır.

Çalışmamızda KN'lerin in vivo toksisitesinin incelemesi için seçtiğimiz organlar karaciğer ve böbrektir. İnhalasyon, cilt teması ve IV enjeksiyon, KN'ya maruz kalmanın en yaygın yolları olup kanla tüm vücuda dağılır ve kan akışı açısından zengin olan karaciğer, böbrek, dalak gibi ana organlarda birikebilir ve organlarda patolojik hasarlara yol açabilir.

Yang ve arkadaşları (Yang ve ark 2007) ve Lin ve arkadaşları (Lin ve ark 2011) QD-705'in 18.5 saatlik bir plazma yarı ömrüne sahip olduğunu, karaciğer, böbrek ve dalak, KN birikiminin ana hedef organları olarak bildirilmiştir. Bu bulgular, Fischer ve arkadaşlarının bulguları ile desteklenmiştir (Fischer ve ark 2006). 1 gün, 28 gün ve altı ay sonra gerçekleştirilen KN'lerin zamana bağlı dağılımı, karaciğer ve dalağın erken birikim organları olduğunu ve uzun süre maruziyetten sonra KN'lerin böbrekte biriktiğini göstermiştir. Karaciğer ve dalakta KN konsantrasyonu zamanla azaldığını sadece böbrekte KN birikiminin zamana bağlı olarak arttığını göstermişlerdir. Karaciğer ve böbrek, KN birikiminin ana organı olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda CdTe KN nanopartiküllerinin toksisitesi üretilen ROS ve bundan kaynaklı oluşabilecek oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir

Son yıllarda, KN'ler tarafından ROS üretimi ve oksidatif stres oluşumu, KN toksisitesinin önemli nedenlerinden biri olarak çok dikkat çekmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalara baktığımızda, Lovric ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu in vitro deneylerde CdTe KN'lere maruz kalan canlı hücrelerde ROS üretimini göstermiş ve bunun plazma zarı, mitokondri ve hücre çekirdeği hasarına yol açarak hücre apoptozunu indüklediği kanıtlamıştır (Lovrić ve ark 2005).

Yapılan çalışmalarda KN'lerin hücre içine alınmasının bir sonucu olarak hücre içindeki lokalize oksidatif stres alanları tanımlanmıştır (Maysinger ve Lovrić 2007). Hücrelerin KN'leri endozomal patojen olarak algıladıkları ve otofajik bir yola doğru hedef alarak yok ettikleri öne sürülmüştür. KN'lerin hücreye alınmasıyla indüklenen oksidatif stres, translasyon sonrası değişikliklerle otofajinin düzenlenmesine yol açmıştır. KN'ler ayrıca çekirdekle etkileşime girerek, otofajiyi indükleyenler de dahil olmak üzere gen düzenlemesine neden olmuştur (Scherz-Shouval ve ark 2007).

Çalışmalarda CdTe-ZnS'nin, plazma zarı hasarına, mitokondriyal değişikliklere ve nihayetinde apopitoza yol açan bir dizi olayı tetikleyecek olan ROS üretimi ve buna bağlı oksidasyon yoluyla hücrelerin bozunmaya uğrayabileceği gösterilmiştir (Lovrić ve ark 2005). KN'lerin yüzeyinde bulunan serbest Cd^{+2} iyonlarınında, hücre içinde sitotoksisiteye neden olan ROS üretimini de indüklediği bilinmektedir.

Cho ve diğerleri (Cho ve ark 2007) nöroblastoma hücrelerinde antioksidan (N-asetilsistein (NAC)) konjugasyonu olan veya olmayan CdTe KN toksisitesi ile ilgili iki mekanizma önermiştir. Bu mekanizmalar; FAS reseptörünün apopitoza yol açan up-regülasyonu ile hücre zarı hasarına ve mitokondriyal fonksiyonun tahribatına yol açan lipid peroksidasyonuyla ilgilidir. Bu olayların her ikisi de ROS tarafından tetiklendiği ve ROS'un, bir membran reseptörü FAS'ın up-regülasyonu yoluyla hücre dışı olarak da aktive edilmiş apopitotik kaskad ürettiğini bulmuşlardır.

Ayrıca in vivo olarak yürüttüğümüz çalışmamızda toksisite ile ilgili değerlendirdiğimiz bir diğer nokta KN'lerin inflamatuar hücreleri aktive etmesi ve

inflamatuar faktörleri serbest bırakabilmesidir. KN'ler canlı vücudunda eflamasyon sebebiyle dolaylı yoldan hasara yol açabilmektedir.

Memelilerde, redoks homeostazını sürdürmek için sofistike bir antioksidan sistem geliştirilmiştir. ROS aşırı olduğunda, homeostaz bozulur ve bu da kronik ve dejeneratif bozukluklarda kritik bir rol oynayan oksidatif stres ile sonuçlanır. KN kaynaklı ROS üretimini engellemenin, hücreyi oksidatif stres veya DNA hasarına karşı korumanın önemli bir yolu olabileceği düşündüren çalışmalar mevcuttur. Oksidatif stresin oluşturabileceği patolojik değişiklikleri önlemek veya en aza indirmek için çeşitli anti-oksidatif tedavi ve antioksidanlar önerilmiştir (Yaghini ve ark 2015).

Bu nedenle, bu araştırmanın hipotezi Cd^{+2} bazlı KN maruziyetinin karaciğer ve böbrek dokusunda oksidatif stres kaynaklı etkilerinin azaltılması yönünde antioksidanların etkili olabileceği yönündedir. Önerilen hipoteze göre bu araştırmanın genel amacı bir fare modelinde CdTe KN'lerin hepatotoksisite ve nefrotoksisitesi altında yatan mekanizmlardan oksitadif stres kaynaklı olanları azaltmaya yönelik silimarin ve mitokinon gibi iki güçlü antioksidanın koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

Hedeflere ulaşabilmek için yapılan antioksidan seçiminde dikkat ettiğimiz noktaların altında yatan en önemli nokta oksidatif stres mekanizmasını daha iyi anlamlandırabilmek için mitokinon gibi direk mitokondri hedefli bir antioksidan ile, silimarin gibi çok yönlü antioksidanın oksidatif stres, apoptoz ve enflamatuvar hasar ile ilişkili olmak üzere farklı parametreler ile karşılaştırılmasıdır.

Literatürde bu alanda yapılan çalışmalar bulunmaktadır ancak sayıca azdır. Örneğin; in vitro bir çalışmada CdTe KN nanopartikül uygulanmış HL-7702, HepG2, HEK-293 ve Raji hücreleri ile insan göbek kordonu endotel hücreleri'nin KN kaynaklı üretilen ROS'un down-regülasyonu için antioksidan olarak N-acetylsistein (NAC) kullanılmıştır (Yan ve ark 2011).

Yapılan bir başka çalışmada, CdSe/ZnS KN'lerin proinflamatuar sitokinlerin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Yine antioksidan görevinde NAC kullanılmış ve CdTe KN'ler ile birlikte uygulanan NAC'ın oksidatif hasarı ve inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (Li ve ark 2020). Antioksidan olarak NAC'nin oksidatif stres ve

inflamatuar yanıt üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiği iyi bilinmektedir (Pan ve ark 2018).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada CuO-NP (bakır oksit nanopartilülleri)'nin oluşturabileceği oksidatif stres kaynaklı apopitozisin, dehidro-epiandrosteron (DHEA) ve quercetin'in antioksidan tedavisi ile sıçanların karaciğerindeki bazı biyokimyasal göstergeleri iyileştirmedeki terapötik etkinliğini araştırmış ve uygulanan antioksidan tedavisinin oksidatif stresi, mRNA gen ekspresyonunu ve hepatik doku DNA hasarını azaltarak CuO-NP toksisitesinde terapötik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Abdelazeim ve ark 2020).

Liu ve arkadaşlarının (Liu ve ark 2022) yaptığı bir çalışmada CdTe KN uygulanan ICR fareler NAC ile ön tedavi edilmiş. H&E boyama analizi 10 uM/kg vücut ağırlığı dozuna CdTe KN'ler ile karşılaştırıldığında, NAC ön tedavi grubunda hepatositlerin merkezi damarı yakından çevrelediğini ve radyal olarak düzenlendiğini, hepatik sinüzoidlerin ise genişlemediğini veya konjesyon ve inflamatuar hücre infiltrasyonun olmadığı gözlenmiş. Sonuçlar, NAC'nin farelerde ROS'u ortadan kaldırabileceğini ve karaciğeri hasardan koruyabileceğini göstermiştir.

İn vivo çalışmamız, hayvan modeli olarak 26 adet 8 haftalık erkek Swiss albino fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KN toksisitesi ile yapılan çalışmalarda BALB/c fare, C57BL/6 fare, Sprague-Dawley rat, SD rat, Wistar rat gibi değişik deney hayvanı modelleri kullanılmıştır (Fan ve ark 2016) (Su ve ark 2011, Liang ve ark 2015, Yang ve ark 2015, Mu ve ark 2017). Başka hayvan modelleri olarak rhesus makak maymununda CdSe/CdS/ZnS KN ve gibel ve havuz yengeci modellerinde de Si/SiO_2 KN'lerinin toksisite çalışmaları yapılmıştır (Sadaf ve ark 2012, Serban ve ark 2015).

Fareler 4 farklı grubu oluşturmak üzere rastgele bölündü. Hayvan sayısı belirlenirken istatiksel açıdan en anlamlı ve hayvan etik hakları adına en düşük sayıda olmasına dikkat edildi. İlk grup (G1) (n=5) kontrol grubu olup sadece fizyolojik salin uygulanmış gruptur. İkinci grup (G2) (n=7) ise CdTe KN nanopartikül uygulanan grup olup uygulanan KN dozu, elde edilecek sonuçların karşılaştırma yapılabilmesi için daha önceki in vivo çalışmalarda kullanılan KN dozu aralığında bir doz seçilmiştir (Ballou ve ark 2004, Gao ve ark 2004, Geys ve ark 2008).

Üçüncü grup (G3) (n=7) ise silimarin uygulaması yapılmış grup olup silimarin uygulaması CdTe uygulamasından 2 saat önce yapılmıştır. Dördüncü grupta (G4) (n=7) mitokinon uygulaması yapılan grup olup, o da ikinci grup gibi CdTe KN uygulamasından 2 saat önce yapılmıştır. Kontrol grubu hariç diğer gruplara uygulanan KN'lerin etkisinin incelenmesi için 24 saat beklenilmiştir.

Antioksidan tedavisinin oksidatif stres oluşturucu KN uygulamasından 2 saat önce yapılmış olması, hali hazırda bulunan antioksidan mekanizmasının da tetiklenmesi sağlanarak öncelikli bir zemin oluşturulabilmesi amaçlanmıştır.

Silimarinin özellikle karaciğer başta olmak üzere birçok organda bilinen birçok faydalı etkilere sahiptir (Vargas-Mendoza ve ark 2014). Silibin oksidatif strese, karaciğerde yağ birikimine ve insülin direncine müdahale eder (Federico ve ark 2017, Marin ve ark 2017)). Silimarin karaciğer fonksiyonel testlerini iyileştirir ve farelerde oksidatif stresi azaltarak hepatotoksisiteyi önlediği bilinmektedir (Aller ve ark 2015) (Papackova ve ark 2018)

Süt devedikeni özü, bağışıklık sistemini düzenleyici etkiye sahiptir ve silimarinin antiinflamatuar etkileri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Hussain ve ark 2009, Balouchi ve ark 2014). İmmünomodülatör etkisi nedeniyle periton diyalizi hastalarında inflamasyonun tedavisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Nazemian ve ark 2010, Balouchi ve ark 2014, Karimi ve ark 2018). Bu etkilerinin yanı sıra antidiyabetik, antiviral, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, antikanser gibi birçok etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lani ve ark 2015, Voroneanu ve ark 2016, Won ve ark 2018).

Silimarin ile nanopartikül toksisitesine yönelik yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Magnezyum oksit nanopartikül uygulanmış ratlarda artan oksidatif stresin silimarin ile azaltılamasına yönelik yapılan çalışmada GPX, SOD ve CAT aktivitelerinde artış ve MDA düzeyinde azalma ($P<0.05$) gözlenmiştir. Bu çalışmada silimarinin antioksidan özelliği ile MgO NP'leri tarafından üretilen serbest radikallerin azaltılabileceği gösterilmiştir (Masoud Negahdary 2014).

Başka bir çalışmada Titanyum dioksit NP'lerin ratlardaki oral uygulaması kan serumu ALT, AST ve ALP düzeylerini önemli ölçüde yükseltirken, silimarinin

yükselmiş karaciğer enzim seviyelerini azalttığı görülmüştür (Hajizadeh Moghaddam ve ark 2017).

Bazı deneysel araştırmalar silimarinin laboratuvar hayvanlarında nefrotoksik ilaçlarda özellikle böbrek fonksiyonları üzerindeki olumlu etkilerini bildirmiştir (Shahbazi ve ark 2012, AKTAŞ ve BAYRAM 2020).

Kuantum noktaların toksisitesini azaltmaya yönelik yapılan bir çalışmada ise insan deri hücrelerinin oktilamin-poli (akrilik asit) (OPA) ile fonksiyonlaştırılmış CdSe/ZnS kuantum noktaları ile 24 saatlik maruz kalmasının ardından, A375 ve A375-S2 hücrelerinde KN kaynaklı hücre ölümünün önemli ölçüde azaldığı ve silibinin gibi antioksidanlarla ön tedavinin KN kaynaklı sitotoksisiteyi modüle edebileceğini düşündürmüştür (Zheng ve ark 2011). Literatürde silimarinin KN kaynaklı oksidatif hasarı azaltmaya yönelik in vivo bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız silimarinin dozu 100 mg/kg olup 3. Grupta bulunan hayvanlara IV olarak uygulanmıştır. Silimarin oldukça güvenli bir madde olarak kabul edilmektedir. ABD Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bakanlığı'nın Ulusal Toksikoloji Programı'nda yayınladığı bir makaleye göre, erkek ve dişi fare ve sıçanlar silimarin ile tedavi edilerek 3 ay ve 2 yıl takip edilmiştir. Erkek sıçanlar için silimarin 0, 3,125, 6,250, 12,500, 25,000 ve 50,000 ppm konsantrasyonlarında (260, 525, 1.050, 2.180 ve 4.500 mg silimarin/kg vücut ağırlığına eşdeğer) oral olarak uygulanmıştır. Her iki çalışmanın sonunda da ölüm görülmemiş, ortalama vücut ağırlıklarında önemli bir değişiklik olmamıştır (Soleimani ve ark 2019).

Bir çalışmada IV infüzyondan sonra LD50 değerleri farelerde 400 mg/kg iken sıçanlarda 385 mg/kg olarak verilmiştir. Nanopartikül toksisitesi çalışmalarında uygulanan silimarin dozlarına baktığımızda ratlara 4 hafta boyunca 200 mg/kg IV uygulaması ve başka bir çalışmada 3 hafta boyunca 100 mg/kg oral uygulamasının silimarinin in vivo koşullarda tedavi edici etkilerini gözlemlemek için uygun görülmüştür (Masoud Negahdary 2014, Hajizadeh Moghaddam ve ark 2017).

Bugüne kadarki en iyi karakterize edilmiş mitokondri hedefli antioksidan olan 10 karbonlu bir alkil zinciri ile bir trifenilfosfonyum (TPP) grubuna bağlı bir kinon parçasından oluşan MitoQ'dur (Murphy ve Smith 2007) (Kelso ve ark 2001) (Smith

ve ark 2003). Lipofilitesi ve pozitif yükü sayesinde hücre zarlarını geçmesine ve mtROS'u azaltmak için en uygun şekilde konumlandırıldığı mitokondriyal iç zarın yüzeyine bakan matriste birikir (Murphy ve Smith 2007, Smith ve Murphy 2010).

MitoQ'nun koruyucu etkilerine ilişkin ilk çalışma, kardiyak iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı yapılmıştır. Mito Q'nun kalp fonksiyon bozukluğuna, doku hasarına ve mitokondriyal fonksiyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Peoples ve ark 2019). Daha sonraki çalışmalara baktığımızda Mito Q'nun hepatoprotektif, nefroprotektif, kardiyoprotektif, antiseptik, antihipertansif, antikanser ve nöroprotektif etkileri çeşitli in vivo modellerde gösterilmiş olup bu etkileri daha az apoptoz indüksiyonu, azalmış protein oksidatif hasar belirteçleri ve ayrıca mitokondriyal fonksiyon hasarına karşı önemli koruma ile ilişkilendirilmiştir (Fridovich 1995, Winterbourn ve ark 2000, Zorov ve ark 2006, Cashman 2018).

Literatürde Mito Q'nun nanotoksisite çalışmaları için kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Benzer çalışma örneği olarak platinium kaplı altın nanotoksisite çalışmasında Mito Q'nun yapısal ve işlevsel örneği Mito-TEMPO kullanılmıştır. Nanopartikül kaynaklı toksisiteye karşı oksidatif stresin önemli ölçüde azalmasına sebep olmuştur (Raghunathan ve ark 2013).

Farelerde Mito Q'nun IV toksisitesi ile ilgili çalışmalara baktığımızda 750 nmol MitoQ (20 mg MitoQ/kg) uygulanan farelerde herhangi bir toksisite gözlenmezken, 1.000 nmol MitoQ/farede (27 mg/kg) MitoQ/fare) toksisite belirgindi. Oral toksisiteyi ölçmek için farelere içme sularında MitoQ uygulandı ve 500 µM'ye kadar iyi tolere edildiği gösterildi. Toksisite daha yüksek konsantrasyonlarda görüldü (Smith ve ark 2003). Çalışmamızda kullanılan 5mg/kg dozunda mitokinon IV olarak uygulandı ve farelerde herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmedi.

Çalışmamızın 24 saatin sonunda anestezi uygulamasından önce ortalama 30.40 ± 0,75 gram ağırlığındaki hayvaların KN uygulaması ve antioksidan ile tedavileri sürecinde ağırlıklarında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Organ ağırlıklarında ise karaciğere baktığımızda yalnızca KN uygulamasının, silimarin ile birlikte uygulanan KN grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. Böbrek ağırlıklarına baktığımızda yine KN uygulanan grup ve silimarin ile birlikte KN uygulanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı artış görülmüştür.

Du ve ark. yaptığı çalışmada TGA/TGH-CdTe KN'leri Kunming farelere 10mg/kg dozunda uygulanmış ve elde edilen sonuçlara göre, hayvanların sakrifikasyon öncesindeki canlı ağırlıkları gruplar arasında benzer iken karaciğer ağırlığında kontrol grubuna göre anlamlı artış görülmüştür.

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 16,5 mg/kg dozunda uygulanan CdTe KN'lerinin karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı katsayı oranında önemli artış gözlenmiştir (Zhang ve ark 2015).

Akut toksisite cevabı olarak karaciğer ve böbrek ağırlığındaki artış bizim için beklenen bir gözlem olmuştur. Silimarin ön tedavisinin karaciğer ağırlığındaki artışı engelleyebildiği görülmüştür. Daha önce bahsedildiği gibi karaciğere silimarin ile ağırlık artışı sebebi olan konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrayonu silimarin uygulaması ile azalmıştır. Silimarinin antioksidatif ve immünmodilatör etkisi sayesinde bu sonucu elde ettiğimizi düşünmekteyiz.

Böbrekte ise ağırlık artışına silimarinin anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Mitokinon uygulamasının organ ağırlıkları üzerine anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Mitokondrial denge ve bütünlüğünü koruyan mitokinonun ağırlık artışına pozitif etkisi gözlenememiştir.

2. Grupta uygulanan 10mg/kg CdTe KN'lerin IV uygulamasından sonra 24 saatlik etkinin ilk gözlemi hiperspektral mikroskop altında yapıldı.

Optik hiperspektral görüntüleme, doku bileşenleri tarafından yansıtılan ışığın spektral analizine dayanan, invaziv olmayan, bütün bir hayvan görüntüleme tekniğidir. Spektral "karışmama", izleyici sinyalinin cilt ve diğer dokuların otoflüoresansından ayrılmasını sağlar. Son zamanlarda lenfatik drenajın takibi, organ hedefleme ve görüntüleme gibi farklı çalışmalarda in vivo olarak hiperspektral görüntüleme ile görselleştirilen KN flüoresan nanoparçacıkları birleştiren invaziv olmayan teknikler kullanılmaktadır (Kobayashi ve ark 2007, Wen ve ark 2012, Mathieu ve ark 2013, Subileau ve Vittet 2021).

Bizim çalışmamızda kullandığımız 710 nm emisyon pikine sahip KN'lerin sakrifikasyon öncesi hiperspektral analizde kuyruk veninden verildiği nokta oldukça parlak görülmektedir.

Dokular, görünür ışığı, özellikle de spektrumun daha kısa dalga boylu mavi bölgesindeki ışığı güçlü bir şekilde emer ve dağıtır. Bu, birkaç milimetrenin ötesindeki önemli doku derinliklerinde flüoresanı uyarmayı ve tespit etmeyi zorlaştırır. Neyse ki doku, 700 ila 900 nm (NIR-I) ve 1.000 ila 1.400 nm (NIR-II) yakın kızılötesi (NIR) dalga boyu bölgelerinde iki göreceli şeffaflık penceresine sahiptir. Kullanılan flüoresan ışığın ve/veya uyarma ışığının dalga boyları bir saydamlık penceresi dahilinde olduğunda, daha yüksek kontrastlı görüntüler ve daha fazla doku penetrasyonu mümkündür (Chinnathambi ve Shirahata 2019).

Seçtiğimiz CdTe KN'ninde eksitasyon dalga boyu bu görüntüyü almamız için uygun aralığa dahil olmaktadır. Sistemik dolaşımdan dokulara dağılımı ve birikiminin flüoresan yoğunluk grafiğinde incelenmesi için sakrifikasyondan sonra organların hiperspektral mikroskobide görüntüleri alındı. Bu görüntülerde dokularda birikim daha net gözlendi.

Elde ettiğimiz hiperspektral görüntülerdeki CdTe KN'lerinin dokularda birikiminin kantitif tayini için kan ve dokulardan eser element tayininde kullanılan ICP-MS kullanıldı. Cd^{+2} miktarına göre elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu olarak verilmiş karaciğer, dalak ve böbrek en yüksek kadmiyum seviyelerini sergiledi, bu da bu dokuların CdTe-KN birikiminin tercihli bölgeleri olduğunu göstermiştir.

Bu bulgular, kuyruk damarına IV enjeksiyondan sonra karaciğer ve dalakta çeşitli tipte KN'lerin biriktiğini ve bunların böbrek yoluyla atıldığını gösteren önceki çalışmalarla uyumluydu (Lin ve ark 2011, Su ve ark 2011, Liu ve ark 2013, Nurunnabi ve ark 2013, Yaghini ve ark 2018).

NP'lerin karaciğer, dalak ve akciğerler gibi retiküloendotelyal (RE) dokulara alınmasının, mononükleer fagosit sistemi hücreleri tarafından kandan spesifik olmayan NP klirensinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Fischer ve ark 2006). Ancak Haque ve ark. (2012), bir çalışmada CdTe-KN'lerin akciğerlerdeki dağılımını karaciğer ve dalaktağınkinden çok daha az bulmuş ve akciğerlerdeki CdTe-KN düzeyinin zamanla azaldığını görmüşlerdir. Bu, CdTe-KN'lerin karaciğer ve dalağa spesifik dağılımının RE sistemi ile bağlı olmadığını ve diğer faktörlerin bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir (Haque ve ark 2012).

CdTe-KN nanopartiküllerinin flüoresan özelliğinden faydalanarak elde ettiğimiz hiperspektral mikroskobik görüntüye ek olarak, karaciğer ve böbrek dokusunun 50 mikronluk kesitlerindeki CdTe KN'lerinin konfokal mikroskop görüntüleri alınmıştır. X40'lık objektif büyütmelerde kırmızı renkli kuantum noktalarının doku içinde biriktiği yerler net olarak görülmektedir.

Çalışmamızdaki immunhistokimyasal analizlerde ilk olarak dokudaki kadmiyumun birikimini göstermek için metallotionin (MT) flüoresan işaretleme yöntemi kullanılarak yapıldı.

MT, düşük moleküler ağırlığa sahip, sistein açısından zengin ve ısıya dayanıklı olma özellikleriyle karakterize edilen, her yerde bulunan, enzimatik olmayan bir protein ailesidir.

MT'nin Cd^{2+} tarafından indüklenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Son yıllarda, dokularda Cd^{2+}'nin progresif birikimi ile MT konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. MT, canlı vücudu Cd^{2+} stresine maruz kaldığında çok hassas bir biyobelirteç görevi görebilir (Figueira ve ark 2012). Ayrıca Lin ve diğerleri, KN'lerin kendilerinin değil, yalnızca KN'lerden ayrışan serbest Cd^{2+}'nın dokularda MT üretimini indükleyebileceğini bildirdi (Lin ve ark 2009). Bu nedenle, MT'de bir yükselme ekspresyonu, invivo KN degradasyonunun iyi bir biyolojik indeksi olarak kullanılabilir.

Sonuçlarımız, MT'nin karaciğer ve böbrek dokularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığını gösterdi. CdTe uygulanan gruplardaki (G2, G3, G4) MT düzeyinde anlamlı bir farklılık içermemesi CdTe KN nanopartikülünün bozunmasında silimarin ya da mitokinonun herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürmüştür.

CdTe KN'lere maruz kaldıktan sonra, deney gruplarındaki fareler karaciğer ve böbrek doku morfolojisinde önemli değişiklikler sergiledi. Dokulardaki genel histopatolojik değişiklikler hematoksilen eosin ile boyanarak incelendi.

Hepatik sinüzoitlerinde genişleme ve inflamatuvar hücre filtrasyonu oldukça yoğunken aktif Kupffer hücrelerinde artış ve hepatik hücrelerde balonlaşma dejenerasyonu görüldü.

Silimarin ile birlikte uygulanan KN grubunda, hafif derecelerde sinüzoidal genişleme ve merkezi damarlar çevresinde daha az inflamatuar hücre infiltrasyonu sergiledi.

Mitokinon ile birlikte uygulanan KN grubunda ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu silimarin grubuna göre biraz daha fazla olsa da yalnızca KN uygulanan gruba kıyasla daha korunmuş bir yapı sergiledi.

Böbrek hücreleri, farklı derecelerde ödem ve hiperemi ile bazı renal tübüler bozukluklar, tübül epitel hücrelerinde bulutlu şişlik, hücresel parçalanmalar gözlemlendi.

Silimarin ve mitokinon gruplarında böbrek dokusu daha korunmuş ve interstisyel enflamatuar hücrelerin hafif bir infiltrasyonu ile daha hafif derecede zarar görmüş bir durum sergiledi. Antioksidan grupları arasında bariz bir farklılık gözlenmedi.

Histopatolojik değişikliklerle ilgili literatürde yapılan çalışmalara baktığımızda Cd^{+2} bazlı yapılan farklı çalışmalarda, farklı doz, farklı büyüklük, farklı yüzey kimyasına sahip ve farklı hayvan grupları ile yapılan çalışmaların bazılarında dokularda hiçbir histopatolojik değişiklik gözlenmezken bazılarında ise ciddi değişiklikler gözlemlenmiştir (Su ve ark 2011, Haque ve ark 2013, Yang ve ark 2015).

Örneğin; Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ICR farelerden 1,5 µmol/kg kuyruk veninden CdTe KN uygulanmış ve ilk 7 gün boyu balonlaşma dejenerasyonu gibi giderek artan ciddi histopatolojik değişiklikler gözlenirken 28. günde dokunun kendini yenilediği gözlenmiştir (Wang ve ark 2016).

Başka bir çalışmada ICR farelere CdTe KN'nin IV enjeksiyonundan 24 saat sonra karaciğer ve böbrek hücrelerinde hepataselüler dejenerasyon ve böbrekte hemosit ve nekroz gibi bazı histopatolojik değişiklikler tanımlandı (Fan ve ark 2016).

Dawley ratlar ile yapılan başka bir akut toksisite çalışmasında yüksek doz uygulanan CdSe/ ZnS KN 'lerin renal tübüler epitelyal hücre nekrozuna, vakuoler dejenerasyona sebep olduğu ve sıkışmış sitoplazma ve kondanse nukleus ile bozulmuş glomerüler yapı tanımlanmıştır (Yang ve ark 2018).

Du ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Kunmig farelerde TGA/TGH CdTe KN'nin IV enjeksiyonu sonrası karaciğer ve böbrekte histopatolojik değişiklikler gözlemlemişlerdir (Du ve ark 2019).

Nguyen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BALB/c farelere 10mg/kg CdTe KN enjeksiyonu uygulanmış ve 24 saat sonra yalnızca karaciğerde hepatik hemorarji gözlenirken böbrekte herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Nguyen ve ark 2019).

Çalışmamızda incelediğimiz immunhistokimyasal işaretlemelerin bir diğer amacı proinflamatuvar ve akut faz yanıtlarını gözlemlemektir. Bunun için yine kesitler uygun immün işaretli antikorlarla değerlendirilmiş olup, sonuçlar hem gruplar arasında hem de birbirleri ile korelasyonları açısından değerlendirilmiştir.

KN'lerin enjeksiyonu, akut bir bağışıklık tepkisini aktive edebilir ve akut enflamatuar tepkiye yol açabilir. Bu amaç doğrultusunda incelediğimiz yapılardan biri Matriks metaloproteinazlar (MMP)'lerdir. Çalışmamızda incelemiş olduğumuz membran tipi matriks metalloproteinaz MT-MMP2 ve jelatinaz grubu MMP9 seviyelerinde KN uygulanan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında literatürle uyumlu olarak hem karaciğerde hem de böbrekte anlamlı bir artış gözlenmiştir.

MMP'ler ECM'nin hemen hemen her bileşenini parçalayabilen 24'ün üzerinde çinko bağımlı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (Kessenbrock ve ark 2010). MMP'ler, ECM substrat özgüllüklerine göre beş ana gruba ayrılmıştır: kollajenazlar, jelatinazlar, membran tipi, stromelisinler ve matrilisinler (Bourboulia ve Stetler-Stevenson 2010).

MMP'ler iskemik, toksik veya aynı zamanda sitokinler ve kemokinler gibi ECM olmayan substratlar üzerinde de etki gösterirken inflamasyon ve bağışıklıkta da düzenleyici işlevlere sahiptirler (Parks ve ark 2004). Bununla birlikte, MMP'lerin biyolojisi oldukça karmaşıktır. Çünkü aynı MMP, ifade edildiği hücre tipine veya dokuya bağlı olarak zıt bir etkilere sahip olabilir (Martin ve Matrisian 2007).

MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-11 ve MMP-13, normal karaciğerlerde yapısal olarak ifade edilen MMP'ler arasındadır (Moore ve ark 2007) (Hamada ve ark 2008). ECM'yi yeniden modellemeye ek olarak, MMP'lerin başka biyolojik rolleri olabilir.

MMP-9'u da içeren jelatinaz ailesinin bir üyesi olan MMP-2, saf karaciğerlerin vasküler alanlarında saptanır (Hamada ve ark 2008). Yayınlanmamış çalışmalarda MMP-2'nin, TGF-β aktivasyon sürecine katılımı yoluyla karaciğer vasküler homeostazının korunmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. TGF-β aktivasyonuna aracılık etmenin yanı sıra, MMP-2, proteolitik bölünme yoluyla IL-1β, TNF-α ve MCP-3'ün aktivitesini modüle etme yeteneğine sahiptir (McQuibban ve ark 2002).

Son yıllarda, akut karaciğer hasarında MMP'lerin rollerinin ortaya çıkarılmasına büyük ilgi olmuştur. MMP-9, akut olarak hasar görmüş karaciğerlerde lökositler tarafından eksprese edilen indüklenebilir bir jelatinazdır (Hamada ve ark 2008).

Bizim çalışmamızda immunhistokimyasal olarak işaretlemelerimizden biri olan MMP-9, fibronektin ve tip IV kollajen dahil olmak üzere birçok ECM proteininin dönüşümünden ve parçalanmasından sorumludur (Ram ve ark 2006). Lökosit ekstravazasyonu sırasındaki fokal matriks bozulması, muhtemelen proteolitik basamakların karmaşık bir etkileşimi ile düzenlenir.

MT- MMP2 çalışmamızda kullandığımız diğer antikor işaretleyici olup bilinen diğer adı MMP15'tir. MT1-MMP gibi membran tipi bir MMP olup, diğer MMP'lerin aktivasyonunu sağlar. MMP aracılı proteoliz, yalnızca lökosit göçünü kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda parankim hücrelerinin ECM'den ayrılmasına yol açarak "anoikis" adı verilen bir fenomen olan apopitozla sonuçlanır (Frisch ve Screaton 2001).

KN toksisitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada Si KN uygulaması, matris metalloproteinazların (MMP 2 ve MMP-9) gen ekspresyon seviyelerinde iki ila üç kat artışa ve MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde %141'lik bir artışa yol açmıştır (Serban ve ark 2015).

Antioksidan verilen çalışmalara baktığımızda silimarinin MMP'lerin ekspresyonunu azalttığını gösteren bulgular vardır (Chen ve ark 2012) (Kara ve ark 2008, Kim ve ark 2009, Ramakrishnan ve ark 2009, Chen ve ark 2012, Kamaraj ve Anandakumar 2013, Tabandeh ve ark 2013, Kanawati ve ark 2021).

Çalışma sonuçlarımıza göre: MMP9'un seviyesi hem karaciğerde hem de böbrekte, KN grubuna göre (G2) silimarin uygulanan grupta (G3) anlamlı düzeyde azaltılabilmiştir. Bu kanıtlanmış olumlu etkisi göz önüne alındığında sonuçlarımız bunu destekler niteliktedir.

Mitokinonun MMP'lerin ekspresyonu üzerine etkisi ile ilgili farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin; insan deri hücrelerinde parçalanmış kollajendeki kültür ortamında hücre içi oksidan seviyeleri yükselmiş ve antioksidan olarak MitoQ10 ile tedavi, MMP-1 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır (Fisher ve ark 2009).

Başka bir çalışmada deneysel bir siroz modelinde oksidatif stresin etkisini azaltmaya yönelik mitokondri hedefli antioksidan olan mitokinon etkisi araştırılmış. TIMP-1, MMP-2 ve MMP-13 gen ifadelerinin mitokinon tedavisi ile azaltılabildiği görülmüştür (Turkseven ve ark 2020).

Literatürde KN kaynaklı oksidatif hasarı azaltmaya yönelik mitokinon ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda: karaciğer MMP9 seviyesi, Mito Q ile birlikte KN uygulanan grup (G4), KN grubuna (G2) ve silimarin ile birlikte KN uygulanan grupla anlamlı farklılık göstermemiştir. Böbrekte ise uygulanan Mito Q, MMP9 seviyesini indirmeye yeterli olamamıştır.

Çalışmamızda KN uygulanması literatürdeki gibi MT-MMP2 ekspresyonunu oldukça arttırmıştır. Ancak silimarin ve mitokinon ön tedavisi MT-MMP2 ekspresyonunu değiştirmemiştir.

MMP'lerin de modüle ettiği akut inflamasyon yanıtları olan IL10, IL-1Beta ve TNF alfa çalışmamızda incelediğimiz diğer sitokinlerdir.

KN'lerin intraperitoneal enjeksiyonu (IP), akut bir bağışıklık tepkisini aktive edebilir ve akut bir enflamatuar tepkiye yol açabilir. Yapılan bir çalışmada PEG-InP/ZnS KN'lerin farelere IP enjeksiyonunun, periferik lenfatik sıvıda ve kanda IL-6 salınımını artırabildiğini ve bu da akut faz iltihabını düşündürmüştür (Chen ve ark 2019).

Başka bir çalışmada 25 mg/kg CdSe/CdS-MPA KN dozu ile muamele edilen fareler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dalakta, karaciğerde ve plazmada proinflamatuar sitokinlerden IL-6 artış göstermiştir (Chen ve ark 2013).

Çalışmalar, ayrıca, KN'lerin yüzey modifikasyonunun KN'lerin toksisitesini azaltabildiğini göstermiştir. Örneğin; bir çalışmada suda çözünür adenosin 5-monofosfat (AMP) ve 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) kaplı CdSe/CdS/ZnS KN'lerin (AMP/MPA-KN'ler) IV uygulamasının BALB/c fareleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiş ve sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, AMP-KN'lerin TNF-α ve IL-6 seviyelerinde artış olmadığı belirgin bir inflamatuar yanıt oluşmadığı görülmüştür. Ancak MPA-KN'ler, karaciğer ve böbrekte AMP-KN'lerden daha güçlü proinflamatuar aktiviteye neden olmuştur (Dai ve ark 2015).

Kuyruk venine enjeksiyon yoluyla verilen CdSe/ZnS KN'lerin dalak, karaciğer, timus, lenf ve diğer önemli immün organlarda uzun süre biriktiği saptanmıştır. Farelere uygulanan CdSe/ZnS KN'ler farelerde toplam lenfosit canlılığının azalmasına neden olmuş ve makrofajların çoğalmasını engellemiştir ve enflamatuar faktörlerden TNF-a ve IL-6'da artış gözlenmiştir (Wang ve ark 2016).

Başka bir çalışmada $CuInS_2$/ZnS KN'leri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farelerde daha 1. günde IL-4 seviyelerini yükseltttiği ve 28. günde de IL-10 ve IL-13 seviyelerini arttırdığı gözlenmiştir (Chen ve ark 2020)

Örneğin, Nguyen ve ark. (Nguyen ve ark 2013) CdTe QD'lerin düşük ila orta dozlarda IL-6, KC, IL-12 ve TNF-α seviyelerinde önemli artışa yol açtığını, ancak doz 7 ve 10 mg/kg vücut ağırlığına artırıldığında serumda IL-6 ve TNF-α ekspresyonun önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır.

Literatürde CdSe/ZnS KN'lerin IL-1β, 2, 4, 6, 8 ve 18 ile INF-γ, TGF-β, CRP, MIF, TNF-α, NF-kB, ve CYP1A1 dahil olmak üzere proinflamatuar ve antiinflamatuar sitokinlerin üretimini arttırdığını ve NAC ön uygulamasının bu seviyeleri düşürebildiğini göstermişlerdir (Li ve ark 2020).

Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak karaciğer ve böbrek dokularında IL 1β seviyesi KN uygulanan grupta en yüksek seviyelere ulaşmıştır.

Hem karaciğer hem böbrekte antioksidan ön tedavisi ile KN'lerin sebep olduğu inflamatuvar yanıt oldukça azaltılabilmiş, IL-1β seviyesi oldukça azaltılabilmiştir.

Literatürte silimarinin oksidatif stres kaynaklı artan IL- 1β seviyesini çok iyi regüle edebildiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Kim ve ark 2016, Ou ve ark 2018, Zhang ve ark 2018, Bellavite 2023, Tang ve ark 2023).

Mitokinonunda da oksidatif stres kaynaklı artmış IL-1β seviyesini azalttığını kanıtlayan geçmiş çalışmalar mevcuttur (Chen ve ark 2021) (Dashdorj ve ark 2013).

Proinflamasyonu azaltmadaki rollerini karşılaştırdığımızda silimarin ve mitokinon ön uygulaması yapılan gruplar arasında anlamlı bir farkı görülmedi. Her ikisinin de antioksidatif stres etkisi ile dokuda inflamatuvar yanıtı oldukça iyi regüle ettiği görülmüştür.

TNf-α düzeyleri ise, karaciğerde KN grubunda en yüksek değerdedir. Parankimal hücreler, karaciğerde oksidatif stres kaynaklı hasara maruz kalan birincil hücrelerdir. Parankimal hücrelerdeki mitokondri, mikrozomlar ve peroksizomlar, esas olarak karaciğer yağ asidi oksidasyon geni ekspresyonu ile ilgili olan PPARa'yı düzenleyerek ROS üretebilir. Ayrıca, Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreler ve endotelyal hücreler potansiyel olarak oksidatif stresle ilişkili moleküllere daha fazla maruz kalır veya bunlara karşı hassastır (Sakaguchi ve ark 2011, **Cichoż-Lach ve Michalak 2014**).

TNF-α gibi çeşitli sitokinler, ROS tarafından indüklenen Kupffer hücrelerinde üretilebilir, bu da inflamasyon ve apopitozu arttırabilir. Hepatik stellat hücrelerin proliferasyonu ve kollajen sentezi, oksidatif bozuklukların neden olduğu lipid peroksidasyonu tarafından tetiklenir (Li ve ark 2014).

Literatürde silimarinin oksidatif stres kaynaklı artan TNF alfa düzeyinide çok etkili bir şekilde azaltabildiğini gösteren çalışmalar oldukça fazladır (Aghazadeh ve ark 2011, Abdel-Moneim ve ark 2015, Ou ve ark 2018, Zhu ve ark 2018, Heidarian ve Nouri 2021).

Mitokinon uygulamasının artmış TNF alfa düzeyini azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Dashdorj ve ark 2013, Chen ve ark 2021).

Çalışmamızda karaciğerde silimarin ve mitokinon uygulaması TNF alfa düzeyini oldukça düşürmüştür. Hatta mitokinon TNF alfa düzeyini kontrol grubu seviyelerine düşürmüştür. Böbrekte de KN grubu literatürle uyumlu olarak TNF alfa düzeyi tüm gruplardan yüksektir. Antioksidan ön uygulaması TNF alfa düzeyini indirmiş ancak mitokinon ile silimarin arasında bir farklılık gözlenmememiştir.

Çalışmamızda karaciğer ve böbrek dokusunda IL-10 seviyelerine baktığımızda daha önceden bahsedildiği gibi her iki dokuda da CdTe KN'lerinin IL-10 seviyesinde artışa sebep olduğu kanıtlanmıştır. KN kaynaklı anti-inflamatuvar yanıt oluşması için IL-10 seviyesinde artış beklenildiği gibidir.

Karaciğerde silimarin ile birlikte KN uygulanan grubun IL-10 düzeyi kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuş olması silimarinin KN kaynaklı artan inflamatuvar yanıta karşı artmış antiinflamatuar etki kaynaklı olabilir.

Böbrekte ise durum daha karmaşık olup, silimarin ile birlikte KN uygulanan grupta IL-10 seviyesi 24 saatlik süre içinde ya değişmeyerek kontrol ile aynı seviyede kalmış, ya da silimarin, KN kaynaklı artan IL-10 seviyesini tekrar kontrol seviyelerine indirmiştir.

Bu ikinci seçenek bizim için daha mantıklı görünmektedir. Çünkü silimarin ön tedavisinde ya da KN uygulamasından herhangi birinin IL-10 seviyelerini değiştirebileceğini bilmekteyiz. Burada silimarin bir dengeleme sağlayarak böbrekleri korumaya çalışmış olabilir. KN kaynaklı artan IL-10 seviyesini düşürmüş olması da immünomodülatör özelliği sayesinde gerçekleşmiş olabilir.

Literatürde silimarinin immünmodülasyon özelliği ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır (Katiyar 2002, Meeran ve ark 2006, Vaid ve Katiyar 2010). Çalışmalarda antiinflamatuar yanıt olarak artan IL-10 seviyesi silimarin uygulanması sonrası azalmıştır.

Mitokinon uygulanan grubumuzda karaciğerde IL-10 düzeyi silimarin ile birlikte KN uygulanan grup ve KN uygulanan grup ile benzer seviyelerde olup kontrol grubuna göre artmış bir antiinflamatuvar etki görülmüştür.

Mitokinon uygulamasının böbrekte IL-10 düzeyine etkisine baktığımızda ise, silimarinin vermiş olduğu cevap ile aynı bulunmuştur. Yani IL-10 düzeyi kontrol

seviyesi ile aynıdır. KN kaynaklı IL-10 düzeyinde beklediğimiz artışı mitokinonun kontrol seviyelerine indirerek dengeleme yapmaya çalıştığını düşündürmektedir.

KN kaynaklı artmış aşırı anti inflamatuvar yanıtı dengelemek adına antioksidanların işlev gördüğü düşünülmektedir. Proinflamatuvar ve antienflamutuvar yanıtların birbiriyle karşılıklı etkileşimi de oldukça karmaşık bir süreci içermektedir (Medina ve Moreno-Otero 2005, Li ve ark 2014).

Antijen Ki-67, hücre döngüsünün aktif fazlarında (G1, S, G2 ve M) bulunan ancak dinlenme durumunda (G0 fazı) bulunmayan bir nükleer proteindir. Ki-67 proteinindeki (pKi67) önemli bir artış, aktif hücre çoğalmasını gösterdiğinden, bir hücre çoğalması belirteci olarak kullanılabilir (Ju ve ark 2013) (Belev ve ark 2013)

Hücre proliferasyonu, çevreleyen hücrelerin nekroza veya apopitoza karşı telafi edici bir tepkisi olabilir ve örneğin tümör ilerlemesi gibi durumlarda kritik bir mekanizma olabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda ise apopitoz anında, proliferasyonun mükemmel bir belirteci olan Ki-67 ekspresyonunun arttığını gösterilmiştir (Scholzen ve Gerdes 2000). Bu sonuç, yayınlanan çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, birkaç nedenden kaynaklanmış olabilir. Hücre anti-apopitozu ve proliferasyonunu etkileyen bir uyaran NF-κB'yi aktive eder (Piva ve ark 2006). NF-κB, siklin D1 ve c-myc aktivasyonu yoluyla hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini doğrudan teşvik edebilir. İkincisi, zarar verici uyaranlara hücresel tepki, yaralanmanın tipi, ciddiyeti ve süresi ile ilişkilidir (La Rosa ve ark 1994). Ki-67'nin artan ekspresyonu ve apopitozun bir arada bulunması ortamda bulunan uyaranın geri dönüşümlü zarar verdiğini düşündürebilir.

Halihazırda hücre proliferasyonunu belirlemek için her biri kendi özgüllüğü ve sınırlamaları olan birkaç yerleşik yöntem vardır. Mevcut yöntemler histokimyasal, immünohistokimyasal ve akış sitometrik yaklaşımları içerir. Histokimyasal prosedürler, DNA içeriği için boyama, [^{3}H]timidin dahil etme ve DNA analoğu bromodeoksiüridin (BrdU) alımı yoluyla mitozun doğrudan gözlemlenmesini içerir. İmmünohistokimyada ilgili mevcut antikorlar, Ki-67 ve çoğalan hücre nükleer antijenlerini (PCNA'lar) tanıyan antikorlardır (Hall ve Levison 1990).

Çalışmamızda Ki-67 seviyelerini inceledik. Literatürde yer alan bulgularla uyumlu ancak yalnız karaciğerde KN nanopartiküllerden kaynaklı oksidatif stresin Ki-67 düzeyini arttırdığı görülmüştür. Karaciğerde KN uygulanan grubun kontrol grubuna göre anlamlı düzeydeki artışı, KN'lerin hücrelerde oluşturduğu inflamasyon, apoptotik ve nekrotik değişimlere karşı geri döndürülebilir bir mekanizma oluşturmaya çalıştığını düşündürebilir.

Çalışmalar KN'lerin fagositik hücrelerin artışını desteklediğini göstermiştir (Liu ve ark 2013, Manshian ve ark 2015). Literatürle uyumlu olarak karaciğerde KN kaynaklı Ki-67 seviyesinde görülen artışı bu farkı böbrekte gözlemlemedik. KN uygulaması böbrekte, proliferasyonda değişiklik yapmamıştır.

Çalışmamızda hem karaciğer hem de böbrekte antioksidanlar ile ön tedavi edilen gruplarda Ki-67 düzeyinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Literatürde Balb/c farelere uygulanan hepatotoksik maddenin zararlı etkilerinden korumak için uygulanan silimarinin Ki-67 seviyesini arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmalarda silimarinin hücre apopitozunu azaltırken hücre yenilenmesini desteklediği öne sürülmüştür (He ve ark 2004, Sozmen ve ark 2014).

Silimarin ve mitokinonun çalışmamız süresince hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde değiştirmediği gözlenmiştir. Bu durumun sebebi KN'ların sebep olduğu apoptik ve inflamatuvar yanıtı regüle edebilen antioksidanların, proliferasyona etki edemediği olabilir.

Cd^{+2} bazlı KN'lerin sitotoksisite çalışmalarında, hem Cd^{2+} salınımı hem de KN'lerin alımı apopitozu indükleyebilir. Çalışmamızda apopitotik belirteçler olarak Kaspaz 8 ve 9 immün işaretlemesi yapılmıştır.

Apopitoz, kaspaz-kaskad reaksiyonunun yürütülmesiyle kromozom parçalanması, zarda bozulma ve hücresel büzülme ile karakterize edilen, kompleks bir moleküler süreçtir (Amna ve ark 2013). Oksidatif hasar doğru bir şekilde onarılamadığında apoptoz ortaya çıkar.

Genel olarak apopitozun, kaspaz 9 ve 8'in ilgili aktivasyonu ile ölüm reseptör yolu veya mitokondriyal yol ile gerçekleştiği kabul edilmiştir.

KN'lerin uyarılmasıyla ekstrinsik yolun başlatılması, tümör nekroz faktörü-α'nın salınmasına veya Fas ligandının Fas reseptörü ile temasına bağlanmıştır (Nguyen ve ark 2013). Ölüm reseptörünün aktivasyonu, apopitotik faktör c-Jun'un fosforilasyonu ve pro-kaspaz 8'in bölünmesi yoluyla hücre ölümünü teşvik eder. CdTe KN'lerin Fas reseptörünün yukarı regülasyonunu indükleyebildiği ve bunun da fibroblastların apoptoza yol açtığı bulunmuştur (Choi ve ark 2007, Zhang ve ark 2015). Kadmiyum içeren KN'lere benzer şekilde, diğer KN türlerinin apoptoz üzerinde benzer etkileri vardır (Wang ve ark 2015).

Çalışmamızda Kaspaz 8 işaretleme yüzdesine baktığımızda literatürle uyumlu olarak karaciğer ve böbrekte KN uygulanan grup kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir. Uyguladığımız KN ekstrisink yoldan kaspaz 8 aktivasyonunu arttırmıştır.

Önceki çalışmalarda, CdTe KN'lerinin, HepG2 hücrelerinin apoptozunu indükleyebildiği ve BCL2 proteininin azalması, BAX proteininin artması ve Kaspaz-3'ün aktivasyonuyla apopitozisin indüklendiği gösterilmiştir (Nguyen ve ark 2013).

Başka bir çalışma ise, CdTe KN'lerinin AML-12 hücrelerinde P53 ve Bax gen ekspresyonunun arttırarak ve Bcl-2' yi azaltarak ROS üretimini arttırdığı ve apopitozisi indüklediği bildirilmiştir (Zhang ve ark 2015).

Bu veriler, CdTe KN'lerin apopitozu endoplazmik retikulum yolu ve mitokondriyal yol ile indüklenebileceğini göstermiştir. Son yıllarda, mitokondriyal yol aracılı apopitoz geniş ölçüde araştırılmıştır. Hücreler apoptotik uyaranlara (hücre hipoksisi ve sitokin tükenmesi) tabi tutulduğunda, iç mitokondriyal apoptotik yol aktive edilerek Cyt-C salınımına ve apopitoza neden olabilir. Bu yol esas olarak mitokondriyal membran geçirgenliğinde bir artışı ve intramitokondriyal proapoptotik faktörlerin (örn. Cyt-C) sitozole salınmasını içerir. Apaf-1'in Cyt-C ile etkileşimi, hücreden salındıktan sonra, Kaspaz-9 holoenzimini oluşturmak için Pro-Caspase-9'u toplayan ve aktive eden ATP ve dATP'nin yardımıyla apoptotik bir kompleks oluşturur. Caspase-9 holoenzimi, efektör kaspaz-3 ve 7'yi daha da aktive ederek, hücre içi substratları parçalayan ve sonuçta apopitoza yol açan bir kaspaz kaskadı başlatır (Yan ve ark 2011).

Çalışmamızda yine literatürle uyumlu olarak hem karaciğer hem böbrekte KN grubunun kaspaz 9 işaretlenme yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Her iki dokuda da KN uygulaması kaspaz 9 aktivasyonunu tetikleyerek apoptotik süreci desteklemiştir.

Antioksidan gruplara baktığımızda ise yalnızca böbrekte silimarin ön tedavisi uygulanan grubun kaspaz 9 seviyesi kontrol grubu ile aynı kalabilmiştir.

Silimarinin anti-apoptotik davranışı dokuların korunmasını önemli ölçüde kolaylaştırır. Yüksek oksidatif stres ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı uyarımı, c-Jun NH_2-terminal kinaz (JNK) sinyal yolunu uyararak apoptozu tetikleyebilir (Sinha ve ark 2013). Bu alanda yapılan çalışmalara baktığımızda stresli farelere silimarin uygulamasının, Bid, Bax, kaspaz-3 ve 8'in yanı sıra poli adenozin difosfat-riboz polimeraz (PARP) bölünmesinin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek JNK aktivasyonunu ve bununla ilişkili apoptotik sinyali zayıflattığını göstermiştir (Kim ve ark 2016).

Silimarin, anti-inflamatuar ve sitoprotektif etkilerisini, NF-κB ve kinazların TNF kaynaklı aktivasyonunu bloke ederek gösterir. Silimarin kaspazların aktivasyonunu baskılar ve apopitozu inhibe eder (Karimi ve ark 2011, Dabak ve Kocaman 2015).

Yapılan bir çalışmada kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitelerinin vankomisin (VA) indüksiyonuna karşı silimarinin koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada VA, VA + SLY50, VA + SLY100 ve SLY100 gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulunurken, VA + SLY200 grubunda VA grubuna göre daha düşük bulunmuştu ($p < 0,05$). Bu sonuçlar, yüksek doz (200 mg/(kg-gün)) silimarin ile ön tedavinin, VA kaynaklı nefrotoksisitede kaspaz aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiş. Bu nedenle, silimarinin konsantrasyonu, artan protein ve nükleik asit sentezi yoluyla hasarlı hücreleri onardığı böbrek hücrelerinde önemlidir (Guzel ve ark 2020).

Çalışmamızda seçtiğimiz antioksidanlardan Mito Q direk mitokondri hedefli olurken apoptoziste iç yolağı etkilemesi, silimarinin ise hem iç hem dış yolağı etkilemesi amaçlanarak kaspaz 8 ve 9 işaretleme seçimi yapılmıştır. MitoQ, Bax, sitokrom-C ve kaspaz aktivasyonunu azalttığı ve Bcl-2'nin azalması yoluyla içsel

apoptozu inhibe ettiği yapılan çalışmalarla bilinmektedir (Ibrahim ve ark 2019) (Young ve Franklin 2019).

Çalışmamızda hem karaciğer hem böbrekte ekstrinsink yolağın apoptotik belirteci olan Kaspaz 8 düzeyindeki artışa silimarin ve mitokinon antioksidanı etkili olamamıştır. Bu sonuç bize antioksidanların KN'lerin oksidatif stres indüksiyonunu intrinsink yollardan koruyabildiğini düşündürmüştür.

Kaspaz 9 düzeylerine baktığımızda silimarin börekte KN'nin indüklediği artışı azaltabilmiş ve kontrol seviyesine indirebilmiştir. Karaciğerde silimarin kaspaz 9 seviyesinde azalma sağlayamamıştır.

Mitokinon ise hem karaciğer hem de böbrekte kaspaz 9 seviyelerini indirememiştir. Antioksidanların etki mekanizmaları ve kazpaz seviyeleri ile ilişkili beklediğimiz sonuçları elde edemedik. Bunun sebebi flavonoidler, polifenolik yapıları nedeniyle hem prooksidan hem de antioksidan özellikler gösterirler, ancak bu etkiler dozlarına ve hücre tiplerine bağlıdır. Gruplar arası anlamlı bir farkın gözlenmemesi silimarin ve mitokinon dozlarının yetersizliği olarak düşünülebilir.

Bir diğer apoptotik belirteç olan TUNEL testi sonuçlarımıza göre karaciğer ve böbrekte KN uygulanan grubun kontrol grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısı anlamlı olarak fazla olduğu bulunmuştur.

Antioksidanlar ile ön tedavide ise hem silimarin hem mitokinon, özellikle böbrekte TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı düzeyde düşürerek kontrol seviyesine indirdiği gözlenmiştir.

Karaciğerde TUNEL tetkiki sonuçlarında antioksidan uygulanan grupların ne kontrol grubuna göre ne de KN uygulanan gruba anlamlı düzeyde değişiklik görülmemesi uygulanan KN'lerin hepatositlerde DNA kırığı bazlı apoptotik süreci tetiklediğini kanıtlarken, uygulanan silimarin ve mitokinonunun kontrol grubu ya da KN grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemesi, antioksidanların koruyucu etkisini kanıtlamaya yetecek sonuçlar olmamıştır.

TUNEL testi sonuçlarına göre böbrekte antioksidan uygulaması anlamlı sonuçlar vermiştir. Ayrıca diğer apopitotik belirteç olan kaspaz 9'un da daha önce

bahsetmiş olduğumuz gibi böbrekte silimarin uygulanan grupta koruyucu etkisi olduğu anlamlı sonuçlar ile gösterilmişti.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak CdTe KN'lerinin hem karaciğer hem böbrek hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısını arttırdığını göstermiştir.

Literatürde CdTe KN toksisitesini azaltmaya yönelik antioksidan kullanılan nadir çalışmayı yapan Liu ve arkadaşları NAC ve CdTe KN birlikte uygulandığı grupta, mavi çekirdekli negatif hücrelerin en belirgin olduğu gösterilmiş. Sonuçlar, NAC antioksidanının CdTe KN'lerin karaciğer dokusuna verdiği zararı ve apoptozu azaltabileceğini göstermiştir (Liu ve ark 2022).

Çalışmamızda kullandığımız antioksidanlarla ilgili çalışmalara baktığımızda; silimarin ve KN toksisitesinin TUNEL değerlendirmesi alanında literatürde örneği yoktur. Ancak oksidatif stres kaynaklı apopitotik süreçlerde silimarin kullanımının TUNEL testi sonuçlarına etkisi farklı birçok çalışma ile gözlenmiştir (Bektur ve ark 2016, Hussein ve ark 2021, Vangaveti ve ark 2021, Terzi ve Ciftci 2022). Sonuçlar hem karaciğer hem böbrek hücreleri için oldukça olumlu yorumlanmıştır. Ancak silimarinin bizim sonuçlarımızla karşılaştırma yapacak örnekleri literatürde bulunmamaktadır. Bu yüzden karaciğerde TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı şekilde değişiklik görülmemesi yorumunda kullanılabilecek bir karşılaştırma sunulamamıştır. Böbrekte ise silimarin, KN toksisitesinde artan TUNEL pozitif hücre sayısını azaltarak koruma sağladığı gösterilmiştir.

Aynı şekilde literatürde mitokinonunda nanopartikül toksisite çalışmasında TUNEL testi uygulaması örneği bulunmasa da farklı etken maddelerinin toksisitesi ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; MitoQ'nun BALB/c farelerinde lipopolisakarit/galaktozamin kaynaklı akut karaciğer hasarında hepatoprotektif etkisi araştırılmıştır (Hu ve ark 2021). Bu farelerde MitoQ, TUNEL pozitif hücrelerin sayısını azalttı, mtROS ve TNF-α'ı baskıladı ve LPS/Gal uygulamasıyla indüklenen proapoptotik proteinlerin aktivitelerini inhibe etti. MitoQ'nun birçok terapide kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Tüm bu immunflüoresan işaretleme yöntemleri ile yapılan analizlerden çıkan sonuca göre CdTe KN uygulamasının inflamasyon ve apoptozisi indükleyerek karaciğer ve böbrek toksisitesine sebep olabileceği literatürdeki bilgiler dahilinde

gösterilmiştir. Antioksidan ön tedavisinin ise inflamasyonu anlamlı olarak azaltırken, apoptotik belirteçlerde de daha iyi doz ayarlaması ile karaciğerde de böbrek gibi anlamlı sonuçlar elde edebileceğimizi gösterebileceğimizi düşünmekteyiz.

TAS ve TOS'un ölçümleri ve OSI değerleri çalışmalarda oksidatif stres belirteçleri olarak sıkça kullanılmaktadır. Nanopartikül toksisitesinin değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda da TAS, TOS ve OSİ değerlendirmeleri oksidan ve antioksidan sistemler hakkında yorum yapabilmek için kullanılmaktadır (CANLI ve Canli 2017, Kar ve ark 2021, Sawicka ve ark 2021, Temiz ve ark 2021, Varmazyari ve ark 2021).

Örnek çalışmalara baktığımızda Varmazyari ve arkadaşları in vitro olarak CdS kuantum noktalarının kortikal nöron hücrelerine etkisini incelemiş ve sonuçlara göre, artan CdS konsantrasyonu hücre canlılığının azalmasına neden olmuştur. En düşük CdS konsantrasyonlarına maruz kalmanın ardından nöronların toplam antioksidan kapasitesi (TAC) artmıştır. TAC bulgularının tersine, daha düşük CdS konsantrasyonlarına maruz kalmanın ardından toplam oksidan durum (TOS) azalmıştır (Varmazyari ve ark 2021).

Başka bir çalışmada Al_2O_3, CuO ve TiO_2 nanopartikülleri dişi sıçana 14 gün boyunca farklı dozlarda bireysel olarak uygulandı ve ardından ATPazların yanıtları serumda eritrosit, total oksidan durum (TOS), total antioksidan durum (TAS) düzeyleri belirlenmiş. Al_2O_3 ve CuO maruziyetlerinin ardından TOS seviyeleri önemli ölçüde artmış, ancak TAS seviyeleri maruz kalan grupların hiçbirinde önemli ölçüde değişmemiştir (CANLI ve Canli 2017).

Nanotoksisite çalışmalarında oksidatif stresi ölçmek için TAS, TOS ve OSI değerleri kullanılıyor olsa da silimarin ve/veya mitokinonun nanopartikül toksisitesine etkisi üzerine birkaç çalışma vardır ve bu çalışmalarda oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi için TAS, TOS, OSI değerleri kullanılmamıştır.

Çalışmamızda KN uygulamasının kandaki oksidan-antioksidan sistem (TAS, TOS ve OSİ) üzerindeki etkisinin sonuçlarına baktığımızda; istatiksel anlamlılık düzeyi aralığında olmasa da, TOS seviyesi KN uygulamasından sonra artış göstermiş ve silimarin ile mitokinon uygulaması bu değerleri azaltmıştır. Aynı şekilde KN uygulaması TAS seviyesinde artış sağlamış ve silimarin ile mitokinon antioksidanları

bu değeri daha da arttırmıştır. Sonuçlarımızın istatiksel anlamlılık düzeyinde incelenemedi ancak bunun için literatürde de daha sıklıkla kullanılan dokulardaki MDA, SOD ve CAT değerleri ölçüldü. CdTe KN'lerin kandan ortalama 2 saat içerinde temizlenerek dokularda birikim göstermesi, oksidan-antioksidan sistem değerlerini dokularda incelememizin daha anlamlı sonuçlar alacağımızı düşündürmüştür.

Histolojik inceleme sonuçlarına göre KN uygulamasının karaciğer morfolojisinde bazı değişiklikler yaptığı görülmüştür. Bu değişikliklerin karaciğer ve böbrek fonksiyonu üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak kontrol grubuna göre KN uygulamasının ALT ve AST seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir.

Tiwari ve arkadaşları, sıçanlarda karaciğer hasarına işaret eden IV KN enjeksiyonunun serum AST ve ALT seviyelerini arttırdığını bildirmiştir (Tiwari ve ark 2011).

Benzer şekilde, Lin ve diğerleri tarafından yapılan bir başka çalışmada farelerde IV Cd/Se/Te bazlı QD 705 enjeksiyonunun, maruziyetten 12 ve 16 hafta sonra ALT ve AST aktivitelerinde önemli artışla sonuçlandığını bildirmiştir (Lin ve ark 2011).

Lu ve arkadaşları, CdSe/ZnS KN'lerini 10 mmol/kg dozunda IV uygulanmasından sonra karaciğerde nötrofil infiltrasyonunda ve ALT ve AST seviyelerinde artış gözlemiştir (Lu ve ark 2016). Nguyen ve arkadaşları da yine CdTe KN'lerinin 10 mg/kg IV uygulamasının ALT ve AST seviyelerinde önemli artış gözlemlemiştir (Lu ve ark 2016).

Nguyen ve arkadaşları CdTe KN'lerinin 10 mg/kg IV uygulamasının da ALT ve AST seviyelerinde önemli artış gözlemlemiştir (Nguyen ve ark 2019).

Başka bir çalışmada Du ve arkadaşları TGA/TGH-CdTe KN'lerinin 10mg/kg IV uygulamasının ALT seviyesini arttırdığını gözlemlemiştir (Du ve ark 2019).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, ICR farelere CdTe KN'lerinin 1.5 µmol/kg enjeksiyonundan sonra 1, 7, 17 ve 28. günlerde incelenmiş ve ALT ile

AST seviyelerinde zamanla artışla beraber CdTe KN'nin zamanla bozularak Cd^{+2} salınarak dokuda hasar verdiği gösterilmiştir (Wang ve ark 2016).

Çalışmamızda antioksidan uygulanmasının ALT seviyelerinde bir değişiklik yapmadığı görülürken, AST seviyesini KN uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde azaltmış olması ve antioksidan grupları arasında fark görülmemiş olması her iki antioksidanında uygun dozlarında karaciğere daha etkili koruma sağlayabileceği düşündürmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalardan silimarin ve mito Q'nun karaciğer değerlerini iyileştirdiği bilinmektedir (Smith ve Murphy 2010).

Çalışmamızda KN uygulaması albümin seviyesini düşürmemiştir. Direkt bilurubin ve total bilurubin seviyelerinde de bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Sadaf ve arkadaşları BALB/C farelerde IV enjeksiyonla verilen 5 nmol CdTe KN'larin ve CdTe/SiO2 KN'larin üzerindeki etkisini incelemiş ve maruziyetten 30 gün sonra sakrifeye etmişlerdir. Her iki KN'ninde karaciğer hasarına neden olmadığı görülmüştür (Sadaf ve ark 2012).

Örneğin, Liang ve arkadaşları KN'lerin hemen hemen tamamının hepatik sinüzoidlerdeki Kupffer hücreleri ve sinüzoidal endotelyal hücreler tarafından alındığını, ancak CdTe/CdS-MSA KN'lerin IV olarak Wistar sıçanlarına enjekte edilmesinden sonra KN'ların karaciğere dağılmasına rağmen, hepatositlerin KN'leri asimile edemediğini bulmuşlardır (Liang ve ark 2015). Bu yüzden de karaciğer fonksiyonunu etkilemediğini düşünmüşlerdir.

Ancak çalışmamızda, uyguladığımız MPA kaplı CdTe KN'leri daha önce bahsetmiş olduğumuz gibi, hem konfokal hem floresan görüntülerinde hepatositler içinde de birikim gösterdiği ve histopatolojik değişikliklerin hem bu hücre içi alım kaynaklı apopitotik süreçlerin tetiklenmesi hem de inflamasyon artışından kaynaklandığını, ancak bu durumun tüm karaciğer fonksiyonlarını etkileyecek düzeye erişmediğini gözlemledik.

Bu çalışmada böbrek, KN birikiminin olduğu yerlerden biridir ve histopatolojisinde glomerüllerde kanlanma gibi bazı histopatoloji değişiklik

gözlenmemiştir. Ayrıca biyokimyasal analizler, böbrek hasarının önemli bir göstergesi olan kreatinin ve üre seviyesinde herhangi bir değişiklik göstermedi.

Nguyen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da farelere CdTe uygulamasının kreatinin seviyelerinde bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir (Nguyen ve ark 2019).

Hastalık, yaralanma veya toksik madde dokulara zarar verdiğinde, plazma zarlarının bozulması üzerine LDH salınır. Toksikolojik seviye, piruvat ve laktat ile birlikte NADH ve NAD^+'nın karşılıklı dönüşümü ile birlikte dönüşümünü katalize eden oksido-redüktaz sitosolik enzim LDH'nin sızıntısının ölçülmesiyle belirlenebilir. LDH, enerji metabolizmasının anaerobik glikoliz sürecinde önemli bir enzimdir ve mitokondriyal fonksiyon kaybı sırasında aktivitesi artar. Bu nedenle, LDH aktivite seviyesi genellikle hücresel hasarın bir indeksi olarak hizmet eder (Choi ve Lee 2004, Nemmiche ve ark 2007).

Yaptığımız çalışmada KN uygulamasının serum LDH aktivitesinde önemli bir artışa sebep olmuş olup sonuç literatürle uyumludur. Örneğin bir çalışmada; BALB/c farelere 25 mg kg^{-1} dozunda CdSe/CdS-MPA KN'lerin uygulanmış ve 7.- 10. günlerde dalak, karaciğer ve akciğerlerde ve plazmada LDH aktivitesi önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda silimarinin oksidatif stres kaynaklı artan LDH aktivitesi düşürdüğü bilinmektedir (Clichici ve ark 2015, Ahmed ve ark 2016). Aynı kullanılan mitokondriyal koruyucu nitelikteki MitoQ'nun, mitokondriyon fonksiyon kaybında dolayı artış gösteren LDH aktivitesini etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (Li ve ark 2022).

Çalışmamızda silimarin ve mitokinon ön tedavilerinin KN kaynaklı artan LDH aktivetisinide anlamlı derecede düşürerek hücre hasarını engelleyebileceği kanıtlanmıştır.

LDH'ı düşürme etkileri açısından silimarin ve mitokinon arasında anlamlı bir farklılık görülememiştir. Hücresel hasarın korunmasında ikisi de oldukça etkili görülmektedir.

Çalışmamızda karaciğer ve böbreklerdeki dokusundaki oksidatif stres belirteçlerini analiz ettik. Bunun için MDA, SOD ve CAT seviyelerinin ölçümünü değerlendirdik.

Oksidatif stresin şu anda nanoparçacıklara maruz kalmanın olumsuz etkilerinin ana düzenleyicisi olduğuna inanılmaktadır (Xia ve ark 2006, Liu ve ark 2011, Pujalté ve ark 2011, Shukla ve ark 2014). Önceki çalışmalar, nanoparçacıklara maruz kalmanın, oksidan ve antioksidan süreçler arasındaki dengeyi bozarak hücre içi oksidatif stresi indükleyebileceğini göstermiştir (Wang ve ark 2016).

Oksidatif stres belirteçleri olarak SOD, CAT, GPx, GSH ve MDA, dokuların oksidatif stres durumunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılmıştır. SOD genellikle ROS'un neden olduğu doku ve hücresel hasara karşı birincil savunma hattı olarak kabul edilir ve $\cdot O^{2-}$'yi H_2O_2'ye katalize eder. CAT, H_2O_2'nin H_2O'ya ve O_2'ye ayrışmasını katalize eder (Sumner ve Dounce 1937). GPx, peroksidaz aktivitesine sahip bir enzim ailesidir ve başlıca biyolojik rolü, organizmayı oksidatif hasardan korumak ve lipid hidroperoksitleri karşılık gelen alkollere ve H_2O_2'yi H_2O'ya indirgemektir. Lipit peroksidasyonu canlı organizmalarda iyi bilinen bir hücresel yaralanma mekanizmasıdır ve hücrelerde ve dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Bu lipit peroksitler kararsızdır ve reaktif karbonil bileşikleri gibi karmaşık bir dizi bileşik oluşturmak üzere ayrışırlar. MDA ölçümü, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmıştır (Rikans ve Yamano 2000).

Literatürde yapılan çalışmalara baktığımızda; Du ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda TGA/TGH-CdTe KN uygulanan grupta karaciğerde MDA seviyeleri artmış ve SOD ve CAT aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. Buna karşılık, bu değerlerin miktarı, PEG–TGA/TGH CdTe KN'lere maruz kaldıktan sonra belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubuna göre yüksek doz TGA/TGH-CdTe KN uygulanan grupta karaciğerde olduğu gibi böbrekte de MDA düzeyinde artış ve SOD aktivitesinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Ancak, CAT aktivitesi önemli bir fark olmaksızın düşmüştür (Du ve ark 2019).

Başka bir çalışmada yüksek doz (16.5 mg/kg) dozunda CdTe KN uygulaması MDA'da önemli bir artışa neden olmuş ve 4.125 mg/kg KN uygulamasından sonra

karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir artışa neden olmuştur. Bulgular CdTe KN'lere IV maruz kalmanın karaciğerdeki antioksidanları tüketebileceğini ve bunun da oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir dengesizliğe neden olarak karaciğerde oksidatif strese neden olabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuç, İV uygulama yoluyla CdTe QD'lere maruz kalmanın, karaciğerde lipit peroksit belirteci malondialdehit (MDA) seviyesini önemli ölçüde artırdığını ve karaciğer antioksidan sistemini aktive ettiğini göstermiştir (Rikans ve Yamano 2000).

CdTe KN'ler ile yapılan başka çalışmada ise karaciğer ve böbreklerdeki SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin 1. günde arttığını ve ardından azaldığını ve 28. günde de kademeli olarak normale döndüğünü göstermiştir. Bu sonuçlar, dokuların antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak peroksit stresini azaltabileceğini göstermiştir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki artışın aksine, CdTe KN'ler hepatik ve renal GSH içeriklerini azaltmış, bu da karaciğer ve böbreklerde CdTe KN'nin neden olduğu antioksidan kapasite azalmasının GSH tükenmesi ile ilişkili olduğunu gösterdiğini düşündürmüştür.

Çalışmada hem karaciğer hem de böbreklerdeki MDA seviyesi, doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde artmıştır. Zaman akışı çalışması, MDA düzeylerinin, karaciğer ve böbreklerin serbest radikal temizleme oranının en düşük değerleri ile uyumlu olarak, 7. günde zirve değerlerine ulaştığını göstermiştir. Bu sonuç, CdTe KN'ların serbest radikalleri temizleme yeteneğini azaltarak doku oksidatif hasarını indüklediğini açıkça göstermiştir (Wang ve ark 2017).

Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda da hem karaciğer hem böbrekteki MDA, SOD ve CAT değerlerine baktığımızda KN uygulanan grupta 24 saat sonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda silimarin ön tedavisi böbrekte MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürmüş ve kontrol seviyesine indirmiştir. Aynı şekilde Mito Q'da MDA düzeyini oldukça azaltarak kontrol seviyelerine indirmiştir. Özellikle Mito Q'nun karaciğer ve böbrek MDA düzeyini en düşük seviyeye indirebilmiş olması lipid peroksidasyonunun başlangıcı olan mitokondriyal oksidadif hasarının Mito Q ile daha fazla korunabildiğini gösterilmiştir. Bu sonuç literatürle uyumlu olup mekanizma açısından değerlendirdiğimizde beklediğimiz bir sonuç olmuştur.

SOD ve CAT değerlerinin yükselişi uyguladığımız doz ve 24 saatlik süre sonunda yaptığımız değerlendirme ile oksidan-antioksidan sisteminin öncelikli olarak aktifleşmesi daha sonraki süreçlerde azalması literatürle uyumlu beklenen bir süreçtir. Vücudun antioksidan mekanizması toplu işleyen bir süreç olduğu ve daha ayrıntılı yorum için GSH gibi diğer antioksidanlarında değerlendirilmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamıza hem karaciğer hem böbrekteki SOD değerleri KN grubuna göre silimarin ön tedavisi uygulanan grupta anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Silimarinin karaciğer ve böbrek CAT değerlerine etkisine baktığımızda KN uygulanan gruba göre oldukça artmış olduğu bulunmuştur.

Silimarinin literatürde SOD ve CAT değerlerine etkisi ile ilgili yapılan araştırmalara baktığımızda; Negahdary ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 4 hafta boyunca magnezyum oksit nanopartikül uygulanmış ratlarda doku MDA seviyesini ve SOD ve CAT aktivitelerini ölçmüşlerdir. MgO NP'leri ile tedavi edilen hayvanlarda MDA seviyesi oldukça artmış, ancak GPX, SOD ve CAT aktivitelerinde düşüş gözlenmiş. Bu çalışmada gözlenen CAT ve SOD'taki azalış durumu, bizim çalışmamızla ve 4.125 mg/kg CdTe KN'lerinin karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir artış gösteren Rikans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla farklı ancak Du ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyumlu sonuçlar göstermiştir (Rikans ve Yamano 2000). Buradaki farklılıklarda uygulanan nanopartiküle, doza ve süreye dikkat edilmelidir.

Negahdary ve arkadaşları yaptıkları çalışmada silimarin kullanmış ve silimarin ile MgO NP uygulanan grupta bunların etkisinin önemli ölçüde engellemiş olduğunu ve GPX, SOD ve CAT aktivitelerinde artış ve MDA düzeyinde azalma gözlemlemişlerdir. Nanopartiküller, reaktif oksijen türlerinin oluşumundan ortaya çıkan vücut üzerinde zararlı etkilere sahip olduğundan, bu çalışma silimarinin antioksidan özelliği ile MgO NP'leri tarafından üretilen serbest radikalleri azaltabileceğini göstermiştir (Masoud Negahdary 2014).

MitoQ uygulanan grubun karaciğer ve böbrek dokusundaki SOD değerlerine baktığımızda oldukça arttırdığını görmekteyiz. Aynı şekilde uygulanan mito Q

karaciğer ve böbrekteki CAT değerlerini KN uygulanan gruba göre daha fazla arttırmıştır.

MitoQ' nun antioksidan etkilerini, SOD ve CAT dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin ekspresyonunu yukarı regüle eden transkripsiyon faktörü Nrf2'nin aktivasyonu yoluyla uyguladığı bildirilmiştir (Zhou ve ark 2018). Mitokinonun nanopartikül toksisitesi ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmadığı için, oksidatif hasar kaynaklı SOD ve CAT değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalara baktığımızda; tramvatik beyin hasarı uygulanmış ratlarda mitokinon ile tedavinin SOD ve CAT mRNA düzeylerinde oldukça artış gözlenmiştir (Tabet ve ark 2022).

Başka bir çalışmada Spraque Dawley sıçanlarında ortak safra kanalı ligasyonu (CBDL) ile indüklenmiş karaciğer sirozu modelinde bozulmuş SOD ve CAT ekspresyon değerleri uygulanan mitokinon tedavisi ile normale döndürülmüştür (Turkseven ve ark 2020).

Uyguladığımız silimarin ve mitokinon antioksidanları MDA, SOD ve CAT düzeyinde anlamlı artış göstermesi KN'lerin oksidatif hasar sonucu antioksidan sistemini devreye sokulduğu, iç antioksidan sisteminin azalması durumunda oksidatif hasara artışa geçeceğinden dolayı uygulanan antioksidanların MDA değerini daha fazla düşürürken SOD ve CAT değerlerini arttırdığı ve hücresel korumayı bu şekilde sağladığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; farelere İV olarak enjekte edilen CdTe Kuantum Nokta Nanopartiküllerinin 24 saatin sonunda en çok karaciğer ve böbrek dokularında biriktiği, hiperspektral ve konfokal mikroskop ile gösterildi. Ayrıca metallotionin immün işaretleme yöntemi ile flüoresan mikroskop sayımı yapıldı ve kantitatif değerlendirmesi de ICP-MS yöntemiyle doğrulandı.

CdTe KN'lerinin, sakrifikasyon öncesi hayvan ağırlıklarını değiştirmediği, karaciğer ve böbrek organ ağırlıklarını arttırdığı hem karaciğerde hem de böbrekte bazı histopatolojik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. İmmünflüoresan işaretleme yöntemiyle flüoresan mikroskopta görüntüleri alınıp Image J programında sayımı yapılan MT-MMP 2, MMP 9, IL-1β, TNF-α ve IL-10 antikorlarının değerlendirilmesi sonucu inflamasyonu arttırdığı, karaciğerde proliferasyon belirteci olan Ki-67'yi arttırdığı, ekstrinsink apopitoz yolağı ile ilişkili kaspaz 8'i, intrinsink apoptoz yolağı ile ilişkili Kaspaz 9 'u, apopitotik hücre ölümünü (TUNEL) arttırdığı gösterilmiştir. Karaciğer ve böbrek biyokimyasına ait tetkik sonuçlarına göre ALT, AST ve LDH seviyelerini arttırdığı, albümin, direkt bilirubin, total bilirubin, kreatinin ve üre seviyelerini ise değiştirmediği gösterilmiştir. Oksidatif stres markırı olarak serumda analizi yapılan TAS, TOS değerleri ve buna bağlı hesaplaması yapılan OSI değerlerini anlamlı düzeyde değiştirmediği, karaciğer ve böbrek dokularında analizi yapılan MDA, SOD ve CAT seviyelerini ise oldukça arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız antioksidan silimarinin KN ile birlikte uygulamasının ise, CdTe KN toksisitesinin oluşturduğu oksidatif stresi azaltarak koruma sağlayabildiğini gösterdik. Metallotionin ölçümlerine göre silimarinin CdTe KN'larının bozunmasına koruyucu bir etki sağlamadığı görüldü. Silimarinin IL-1β ve TNF-α seviyelerini baskılayarak inflamasyonu ve bununla ilişkili MMP 9 düzeyini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Silimarin ile kaspaz 8 aktivasyonunda bir azalma olmadığı, Kaspaz 9 düzeyinin ise yanlızca böbrekte azaldığı ayrıca apopitotik hücre ölümünü (TUNEL) azalttığı gösterilmiştir. Serum AST ve LDH seviyelerinde düşme gözlenirken, dokuda SOD ve CAT değerleri artmış buna rağmen MDA düzeyleri azalmıştır.

Çalışmada kullanılan mitokinonunda CdTe KN'larının bozunmasını engelleyemediği, inflamatuvar yanıtlardan TNF-α'yı karaciğerde normal seviyesine kadar indirebildiği, IL-1β ve IL-10 seviyelerini de azalttığı görülmüştür. Kaspaz seviyelerinde önemli bir değişiklik yapmadığı ancak TUNEL pozitif hücre sayısını azalttığı gözlenmiştir. AST ve LDH seviyelerini düşürdüğü gözlenirken, SOD ve CAT değerlerini arttırdığı, mitokondriyal oksidatif hasar sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu engelleyerek MDA düzeyini de kontrol seviyelerine kadar indirebildiği görülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre; uygulanan CdTe KN'nin karaciğer ve böbrek dokusunda birikerek dokuda olumsuz etkiler oluşturduğu, oksidatif stres kaynaklı bu hasarları azaltmaya yönelik olarak kullandığımız antioksidan silimarin ve mitokinon dokudaki oksidatif hasarı azalttığı ve özellikle inflamatuvar yanıtı regüle edebiliği gösterilmiştir. Her iki antioksidanın farklı yolaklardan etki sağladığı düşünüldüğünde farklı parametreler üzerinde farklı düzeyde etkileri görülmesi normal karşılanabilir. Ancak ikisi arasında yararlılık bakımından net bir farklılık tespit edilememiştir.

Özellikle apoptotik süreçler için değerlendirilen kaspaz 8 ve 9 için bir etki gözlenememiştir. Ancak apopitotik sürecin karmaşıklığı göz önüne alındığında sadece iki parametre yorum yapabilmek için yeterli olmayabilir.

Ayrıca deneyimiz CdTe KN, silimarin ve mitokinon için tek gün tek doz şeklinde 24 saatlik akut değişimlerin gözlenmesi için tasarlanmıştır. Bazı parametreler için literatürdeki gibi beklenilen sonuçların gözlenmemesi uygulanan doz ve bekleme süresi ile alakalı olabilir.

Kuantum nokta toksisitesine ilişkin çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesi kullanılan hayvan türü, yaşı, cinsiyeti, uygulanan KN'ların içeriği, yüzey kaplaması, büyüklüğü, yükü, KN'lere maruz kalma ve uygulama şekli gibi farklı paramatrelere bağlı olabilir.

Ancak literatürde sayıca az olan KN toksisitesi alanında yapılan in vivo çalışmaların oldukça değerli olduğu, özellikle de antioksidanlarla yapılan çalışmaların hem toksisite hem de antioksidanların etki mekanizmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın bu alanda yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı, halihazır uygulanan antioksidan tedavilerin alanını genişletebileceği, giderek artan KN kullanımınında daha güvenli bir hale antioksidan tedavileri ile getirebileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, El-Kersh MA, Al-Omair MA, 2015. Free Radical-Scavenging, Anti-Inflammatory/Anti-Fibrotic and Hepatoprotective Actions of Taurine and Silymarin against CCl4 Induced Rat Liver Damage. PLoS One, 10, 12, e0144509.

Abdelazeim SA, Shehata NI, Aly HF, Shams SGE, 2020. Amelioration of oxidative stress-mediated apoptosis in copper oxide nanoparticles-induced liver injury in rats by potent antioxidants. Sci Rep, 10, 1, 10812.

Aghazadeh S, Amini R, Yazdanparast R, Ghaffari SH, 2011. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of Silybum marianum in treatment of experimental steatohepatitis. Experimental and Toxicologic Pathology, 63, 6, 569-74.

Ahmed AF, Mahmoud MF, Ouf MA, Abd El-Fathaah E, 2016. Aminoguanidine potentiates the hepatoprotective effect of silymarin in CCL4 treated rats. Annals of hepatology, 10, 2, 207-15.

Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E, (2002). Nanocrystal targeting in vivo, BURNHAM INST LA JOLLA CA.

AKTAŞ İ, BAYRAM D, 2020. Investigation of the effects of silymarin on valproic acid-induced kidney damage in rats. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9, 1, 42-8.

Alivisatos AP, 1996. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. Science, 271, 5251, 933-7.

Aller R, Izaola O, Gómez S, Tafur C, González G, Berroa E, Mora N, González JM, de Luis DA, 2015. Effect of silymarin plus vitamin E in patients with non-alcoholic fatty liver disease. A randomized clinical pilot study. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 19, 16, 3118-24.

Amna T, Van Ba H, Vaseem M, Hassan MS, Khil M-S, Hahn Y, Lee H-K, Hwang I, 2013. Apoptosis induced by copper oxide quantum dots in cultured C2C12 cells via caspase 3 and caspase 7: a study on cytotoxicity assessment. Applied microbiology and biotechnology, 97, 5545-53.

Analysis NCoF, (2007). Trace elements-As, Cd, Hg, Pb and other elements: determination by ICP-MS after pressure digestion, NMKL Oslo.

Ballou BT, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS, 2004. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. Bioconjugate chemistry, 15 1, 79-86.

Balouchi S, Gharagozloo M, Esmaeil N, Mirmoghtadaei M, Moayedi B, 2014. Serum levels of TGFβ, IL-10, IL-17, and IL-23 cytokines in β-thalassemia major patients: the impact of silymarin therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol, 36, 4, 271-4.

Bektur NE, Sahin E, Baycu C, Unver G, 2016. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. Toxicology and Industrial Health, 32, 4, 589-600.

Belev B, Brčić I, Prejac J, Golubić ZA, Vrbanec D, Božikov J, Alerić I, Boban M, Razumović JJ, 2013. Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors. World J Gastroenterol, 19, 4, 523-7.

Bellavite P, 2023. Neuroprotective Potentials of Flavonoids: Experimental Studies and Mechanisms of Action. Antioxidants, 12, 2, 280.

Bertrand N, Leroux J-C, 2012. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. Journal of controlled release, 161, 2, 152-63.

Boczkowski J, Hoet P, 2010. What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. Nanotoxicology, 4, 1, 1-14.

Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG, 2010. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Semin Cancer Biol, 20, 3, 161-8.

Brodin P, Davis MM, 2017. Human immune system variation. Nature reviews immunology, 17, 1, 21-9.

Bruchez Jr M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP, 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science, 281, 5385, 2013-6.

Brun NR, Christen V, Furrer G, Fent K, 2014. Indium and indium tin oxide induce endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in zebrafish (Danio rerio). Environmental science & technology, 48, 19, 11679-87.

Brus L, 1986. Zero-dimensional" excitons" in semiconductor clusters. IEEE Journal of Quantum Electronics, 22, 9, 1909-14.

CANLI EG, Canli M, 2017. Effects of aluminum, copper, and titanium nanoparticles onsome blood parameters in Wistar rats. Turkish Journal of Zoology, 41, 2, 259-66.

Cao Y, Long J, Liu L, He T, Jiang L, Zhao C, Li Z, 2017. A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure. Life Sciences, 186, 33-42.

Cashman JR, 2018. Monoamine oxidases and flavin-containing monooxygenases.

Castillo-Briceño P, Arizcun-Arizcun M, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A, 2010. Correlated expression profile of extracellular matrix-related molecules during the inflammatory response of the teleost fish gilthead seabream. Developmental & Comparative Immunology, 34, 10, 1051-8.

Cayuela A, Soriano M, Carrillo-Carrión C, Valcárcel M, 2016. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. Chemical Communications, 52, 7, 1311-26.

Chan WC, Nie S, 1998. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science, 281, 5385, 2016-8.

Chen IS, Chen YC, Chou CH, Chuang RF, Sheen LY, Chiu CH, 2012. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. J Sci Food Agric, 92, 7, 1441-7.

Chen IS, Chen YC, Chou CH, Chuang RF, Sheen LY, Chiu CH, 2012. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92, 7, 1441-7.

Chen L, Lan C, Xiao H, Zhang X, Qi X, Ouyang L, Yang Y, Wang F, Jin Q, Sun Y, 2021. Mechanism of Yifei Decoction Combined with MitoQ on Inhibition of TGF β 1/NOX4 and PDGF/ROCK Signal Pathway in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2021.

Chen L, Miao Y, Chen L, Jin P, Zha Y, Chai Y, Zheng F, Zhang Y, Zhou W, Zhang J, Wen L, Wang M, 2013. The role of elevated autophagy on the synaptic plasticity impairment caused by CdSe/ZnS quantum dots. Biomaterials, 34, 38, 10172-81.

Chen S, Chen Y, Chen Y, Yao Z, 2019. InP/ZnS quantum dots cause inflammatory response in macrophages through endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. International Journal of Nanomedicine, 14, 9577.

Chen T, Li L, Lin X, Yang Z, Zou W, Chen Y, Xu J, Liu D, Wang X, Lin G, 2020. In vitro and in vivo immunotoxicity of PEGylated Cd-free CuInS(2)/ZnS quantum dots. Nanotoxicology, 14, 3, 372-87.

Chen Z, Li G, Zhang L, Jiang J, Li Z, Peng Z, Deng L, 2008. A new method for the detection of ATP using a quantum-dot-tagged aptamer. Analytical and bioanalytical chemistry, 392, 6, 1185-8.
Chinnathambi S, Shirahata N, 2019. Recent advances on fluorescent biomarkers of near-infrared quantum dots for in vitro and in vivo imaging. Science and Technology of Advanced Materials, 20, 1, 337-55.
Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Röder B, Hackbarth S, Winnik FM, 2007. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. Langmuir, 23, 4, 1974-80.
Choi AO, Cho SJ, Desbarats J, Lovrić J, Maysinger D, 2007. Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. J Nanobiotechnology, 5, 1.
Choi EJ, Lee BH, 2004. Evidence for genistein mediated cytotoxicity and apoptosis in rat brain. Life sciences, 75, 4, 499-509.
Chuang C-HM, Brown PR, Bulović V, Bawendi MG, 2014. Improved performance and stability in quantum dot solar cells through band alignment engineering. Nature Materials, 13, 8, 796-801.
Cichoż-Lach H, Michalak A, 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World J Gastroenterol, 20, 25, 8082-91.
Clichici S, Olteanu D, Nagy A-L, Oros A, Filip A, Mircea PA, 2015. Silymarin inhibits the progression of fibrosis in the early stages of liver injury in CCl4-treated rats. Journal of medicinal food, 18, 3, 290-8.
Dabak DO, Kocaman N, 2015. Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. Ren Fail, 37, 4, 734-9.
Dai T, Li N, Liu L, Liu Q, Zhang Y, 2015. AMP-Conjugated Quantum Dots: Low Immunotoxicity Both In Vitro and In Vivo. Nanoscale Research Letters, 10, 1, 434.
Dai X, Zhang Z, Jin Y, Niu Y, Cao H, Liang X, Chen L, Wang J, Peng X, 2014. Solution-processed, high-performance light-emitting diodes based on quantum dots. Nature, 515, 7525, 96-9.
Dashdorj A, Kr J, Lim S, Jo A, Nguyen MN, Ha J, Yoon K-S, Kim HJ, Park J-H, Murphy MP, Kim SS, 2013. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. BMC Medicine, 11, 1, 178.
De Wild M, Berner S, Suzuki H, Ramoino L, Baratoff A, JUNGA TA, 2003. Molecular Assembly and Self-Assembly a: Molecular Nanoscience for Future Technologies. Annals of the New York Academy of Sciences, 1006, 1, 291-305.
Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD, 2001. Structural determinants of glomerular permeability. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 281, 4, F579-F96.
Del Campo JA, Gallego P, Grande L, 2018. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. World journal of hepatology, 10, 1, 1.
Derfus AM, Chan WC, Bhatia SN, 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. Nano letters, 4, 1, 11-8.
Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J, 2007. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. Indian Journal of Pharmacology, 39, 4, 172-9.
Donaldson K, Stone V, Tran C, Kreyling W, Borm PJ, (2004). Nanotoxicology, BMJ Publishing Group Ltd. **61:** 727-8.

Dreher KL, 2004. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. Toxicological sciences, 77, 1, 3-5.
Du Y, Zhong Y, Dong J, Qian C, Sun S, Gao L, Yang D, 2019. The effect of PEG functionalization on the in vivo behavior and toxicity of CdTe quantum dots. RSC advances, 9, 22, 12218-25.
Fan J, Sun Y, Wang S, Li Y, Zeng X, Cao Z, Yang P, Song P, Wang Z, Xian Z, 2016. Inhibition of autophagy overcomes the nanotoxicity elicited by cadmium-based quantum dots. Biomaterials, 78, 102-14.
Farré M, Sanchís J, Barceló D, 2011. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30, 3, 517-27.
Federico A, Dallio M, Loguercio C, 2017. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. Molecules, 22, 2.
Figueira E, Branco D, Antunes SC, Gonçalves F, Freitas R, 2012. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? Ecotoxicol Environ Saf, 84, 185-90.
Fischer HC, Liu L, Pang KS, Chan WCW, 2006. Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots: In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. Advanced Functional Materials, 16, 10, 1299-305.
Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho MK, He T, Varani J, Kang S, Voorhees JJ, 2009. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin. The American Journal of Pathology, 174, 1, 101-14.
Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K, 1998. Milk Thistle (Silybum marianum) for the Therapy of Liver Disease. Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG, 93, 2.
Forti V, Balde CP, Kuehr R, Bel G, 2020. The Global E-waste Monitor 2020: Quantities, flows and the circular economy potential.
Fridovich I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual review of biochemistry, 64, 1, 97-112.
Frisch SM, Screaton RA, 2001. Anoikis mechanisms. Curr Opin Cell Biol, 13, 5, 555-62.
Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S, 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. Nat Biotechnol, 22, 8, 969-76.
Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoi M, Hoylaerts MF, Nemery B, Hoet PH, 2008. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. Environ Health Perspect, 116, 12, 1607-13.
Goldman ER, Balighian ED, Mattoussi H, Kuno MK, Mauro JM, Tran PT, Anderson GP, 2002. Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. J. Am. Chem. Soc., 124, 22, 6378-82.
Guzel S, Sahinogullari ZU, Canacankatan N, Antmen SE, Kibar D, Coskun Yilmaz B, 2020. Potential renoprotective effects of silymarin against vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. Drug and Chemical Toxicology, 43, 6, 630-6.
Hahn MA, Singh AK, Sharma P, Brown SC, Moudgil BM, 2011. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. Analytical and bioanalytical chemistry, 399, 1, 3-27.
Hajizadeh Moghaddam A, Ahmadi Avendi E, Sayraf R, Zare M, 2017. Comparison of the Therapeutic Effects of Silymarin and Nanosilymarin on Hepatotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. Avicenna Journal of Clinical Medicine, 23, 4, 345-51.

Hall PA, Levison DA, 1990. Review: assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol, 43, 3, 184-92.
Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ, 2008. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepatology, 47, 1, 186-98.
Haque MM, Im H-Y, Seo J-E, Hasan M, Sarma SN, Woo K, Kwon O-S, 2012. Evaluation of CdSe/CdS-PEG-FA quantum dots: distribution and observable-adverse-effect-level in mice after intravenous injection. Journal of Pharmaceutical Investigation, 42, 203-12.
Haque MM, Im H-Y, Seo J-E, Hasan M, Woo K, Kwon O-S, 2013. Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice. Journal of Applied Toxicology, 33, 9, 940-50.
Hardman R, 2006. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environ Health Perspect, 114, 2, 165-72.
Hardman R, 2006. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environmental health perspectives, 114, 2, 165-72.
He Q, Kim J, Sharma RP, 2004. Silymarin Protects Against Liver Damage in BALB/c Mice Exposed to Fumonisin B1 Despite Increasing Accumulation of Free Sphingoid Bases. Toxicological Sciences, 80, 2, 335-42.
Heidarian E, Nouri A, 2021. Hepatoprotective effects of silymarin against diclofenac-induced liver toxicity in male rats based on biochemical parameters and histological study. Arch Physiol Biochem, 127, 2, 112-8.
Hillyer JF, Albrecht RM, 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. Journal of pharmaceutical sciences, 90, 12, 1927-36.
Ho Y-P, Leong KW, 2010. Quantum dot-based theranostics. Nanoscale, 2, 1, 60-8.
Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K, 2004. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. Microbiology and immunology, 48, 12, 985-94.
Hu K, Xiao L, Li L, Shen Y, Yang Y, Huang J, Wang Y, Zhang L, Wen S, Tang L, 2021. The mitochondria-targeting antioxidant MitoQ alleviated lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice. Immunology Letters, 240, 24-30.
Hu L, Zhang C, Zeng G, Chen G, Wan J, Guo Z, Wu H, Yu Z, Zhou Y, Liu J, 2016. Metal-based quantum dots: synthesis, surface modification, transport and fate in aquatic environments and toxicity to microorganisms. RSC advances, 6, 82, 78595-610.
Hussain SA, Jassim NA, Numan IT, Al K, II, Abdullah TA, 2009. Anti-inflammatory activity of silymarin in patients with knee osteoarthritis. A comparative study with piroxicam and meloxicam. Saudi Med J, 30, 1, 98-103.
Hussein RM, Sawy DM, Kandeil MA, Farghaly HS, 2021. Chlorogenic acid, quercetin, coenzyme Q10 and silymarin modulate Keap1-Nrf2/heme oxygenase-1 signaling in thioacetamide-induced acute liver toxicity. Life Sciences, 277, 119460.
Ibrahim AA, Karam HM, Shaaban EA, Safar MM, El-Yamany MF, 2019. MitoQ ameliorates testicular damage induced by gamma irradiation in rats:

Modulation of mitochondrial apoptosis and steroidogenesis. Life Sci, 232, 116655.
ISO, (2010). Nanotechnologies -. Vocabulary - Part 1: Core Terns. (TS 80004-1). Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization.
Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C, 2016. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. The FEBS journal, 283, 14, 2640-52.
James AM, Cochemé HM, Smith RAJ, Murphy MP, 2005. Interactions of Mitochondria-targeted and Untargeted Ubiquinones with the Mitochondrial Respiratory Chain and Reactive Oxygen Species: IMPLICATIONS FOR THE USE OF EXOGENOUS UBIQUINONES AS THERAPIES AND EXPERIMENTAL TOOLS *&#x2666. Journal of Biological Chemistry, 280, 22, 21295-312.
Jauslin ML, Meier T, Smith RA, Murphy PM, 2003. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. The FASEB journal, 17, 13, 1-10.
Javed S, Ahsan W, Kohli K, 2018. Pharmacological influences of natural products as bioenhancers of silymarin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Clinical Phytoscience, 4, 1, 18.
Ju S, Mu J, Dokland T, Zhuang X, Wang Q, Jiang H, Xiang X, Deng ZB, Wang B, Zhang L, Roth M, Welti R, Mobley J, Jun Y, Miller D, Zhang HG, 2013. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. Mol Ther, 21, 7, 1345-57.
Kamaraj GRSJS, Anandakumar P, 2013. Erratum to: Silymarin attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis. Invest New Drugs, 31, 488-9.
Kanawati GM, Al-Khateeb IH, Kandil YI, 2021. Arctigenin attenuates CCl4-induced hepatotoxicity through suppressing matrix metalloproteinase-2 and oxidative stress. Egyptian Liver Journal, 11, 1, 1-7.
Kaplowitz N, 2004. Drug-induced liver injury. Clinical infectious diseases, 38, Supplement_2, S44-S8.
Kar F, Hacıoğlu C, Göncü Y, Söğüt İ, Şenturk H, Burukoğlu Dönmez D, Kanbak G, Ay N, 2021. In Vivo Assessment of the Effect of Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles on Biochemical, Histopathological, Oxidant and Antioxidant Status. Journal of Cluster Science, 32, 2, 517-29.
Kara E, Coşkun T, Kaya Y, Yumuş O, Vatansever S, Var A, 2008. Effects of silymarin and pentoxifylline on matrix metalloproteinase-1 and-2 expression and apoptosis in experimental hepatic fibrosis. Current Therapeutic Research, 69, 6, 488-502.
Karimi G, Hassanzadeh-Josan S, Memar B, Esmaeili SA, Riahi-Zanjani B, 2018. Immunomodulatory effects of silymarin after subacute exposure to mice: A tiered approach immunotoxicity screening. J Pharmacopuncture, 21, 2, 90-7.
Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M, 2011. "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. Iran J Basic Med Sci, 14, 4, 308-17.
Katiyar SK, 2002. Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light-induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. Int J Oncol, 21, 6, 1213-22.
Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA, Murphy MP, 2001. Selective targeting of a redox-active ubiquinone

to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. J Biol Chem, 276, 7, 4588-96.
Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell, 141, 1, 52-67.
Kim S, Fisher B, Eisler H-J, Bawendi M, 2003. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe (core/shell) and CdSe/ZnTe (core/shell) heterostructures. J. Am. Chem. Soc., 125, 38, 11466-7.
Kim S-H, Cheon HJ, Yun N, Oh S-T, Shin E, Shim KS, Lee S-M, 2009. Protective effect of a mixture of Aloe vera and Silybum marianum against carbon tetrachloride–induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis. Journal of pharmacological sciences, 109, 1, 119-27.
Kim SH, Oh DS, Oh JY, Son TG, Yuk DY, Jung YS, 2016. Silymarin Prevents Restraint Stress-Induced Acute Liver Injury by Ameliorating Oxidative Stress and Reducing Inflammatory Response. Molecules, 21, 4, 443.
Kim T-H, Jun S, Cho K-S, Choi BL, Jang E, 2013. Bright and stable quantum dots and their applications in full-color displays. MRS Bulletin, 38, 9, 712-20.
Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S, 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annual review of pharmacology and toxicology, 39, 1, 267-94.
Klaassen CD, Liu J, Diwan BA, 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, 238, 3, 215-20.
Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Regino CA, Urano Y, Choyke PL, 2007. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. Nano Lett, 7, 6, 1711-6.
Konstantatos G, Sargent EH, 2010. Nanostructured materials for photon detection. Nature Nanotechnology, 5, 6, 391-400.
La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE, 1994. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. Mol Cell Biol, 14, 2, 1039-44.
Lacerda SHDP, Park JJ, Meuse C, Pristinski D, Becker ML, Karim A, Douglas JF, 2010. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. ACS nano, 4, 1, 365-79.
Lai DY, 2012. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 4, 1, 1-15.
Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW, Moghaddam E, Chu JJ, Rausalu K, Merits A, Higgs S, Vanlandingham D, Abu Bakar S, Zandi K, 2015. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. Sci Rep, 5, 11421.
Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB, 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. Nutrients, 6, 12, 6020-47.
Li J, Zhang Y, Xiao Q, Tian F, Liu X, Li R, Zhao G, Jiang F, Liu Y, 2011. Mitochondria as target of quantum dots toxicity. Journal of hazardous materials, 194, 440-4.
Li X, Zhang H, Sun F, 2020. CdSe/ZnS quantum dots exhibited nephrotoxicity through mediating oxidative damage and inflammatory response. Aging (Albany NY), 13, 8, 12194-206.
Li X, Zhao Y, Peng H, Gu D, Liu C, Ren S, Miao L, 2022. Robust intervention for oxidative stress-induced injury in periodontitis via controllably released nanoparticles that regulate the ROS-PINK1-Parkin pathway. Front Bioeng Biotechnol, 10, 1081977.

Liang X, Grice JE, Zhu Y, Liu D, Sanchez WY, Li Z, Crawford DHG, Le Couteur DG, Cogger VC, Liu X, Xu ZP, Roberts MS, 2015. Intravital Multiphoton Imaging of the Selective Uptake of Water-Dispersible Quantum Dots into Sinusoidal Liver Cells. Small, 11, 14, 1711-20.

Liang XW, Xu ZP, Grice J, Zvyagin AV, Roberts MS, Liu X, 2013. Penetration of nanoparticles into human skin. Current pharmaceutical design, 19, 35, 6353-66.

Liang Y, Zhang T, Tang M, 2022. Toxicity of quantum dots on target organs and immune system. Journal of Applied Toxicology, 42, 1, 17-40.

Lin C-H, Yang M-H, Chang LW, Yang C-S, Chang H, Chang W-H, Tsai M-H, Wang C-J, Lin P, 2011. Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hepatotoxicity in mice. Nanotoxicology, 5, 4, 650-63.

Lin CH, Chang LW, Chang H, Yang MH, Yang CS, Lai WH, Chang WH, Lin P, 2009. The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: toxicity implications. Nanotechnology, 20, 21, 215101.

Lin CH, Yang MH, Chang LW, Yang CS, Chang H, Chang WH, Tsai MH, Wang CJ, Lin P, 2011. Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hepatotoxicity in mice. Nanotoxicology, 5, 4, 650-63.

Liu J, Erogbogbo F, Yong KT, Ye L, Liu J, Hu R, Chen H, Hu Y, Yang Y, Yang J, Roy I, Karker NA, Swihart MT, Prasad PN, 2013. Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: studies in mice and monkeys. ACS Nano, 7, 8, 7303-10.

Liu N, Mu Y, Chen Y, Sun H, Han S, Wang M, Wang H, Li Y, Xu Q, Huang P, Sun Z, 2013. Degradation of aqueous synthesized CdTe/ZnS quantum dots in mice: differential blood kinetics and biodistribution of cadmium and tellurium. Part Fibre Toxicol, 10, 37.

Liu Q, Wu D, Ma Y, Cao Y, Pang Y, Tang M, Pu Y, Zhang T, 2022. Intracellular reactive oxygen species trigger mitochondrial dysfunction and apoptosis in cadmium telluride quantum dots-induced liver damage. NanoImpact, 25, 100392.

Liu W, Zhang S, Wang L, Qu C, Zhang C, Hong L, Yuan L, Huang Z, Wang Z, Liu S, 2011. CdSe quantum dot (QD)-induced morphological and functional impairments to liver in mice. PLoS One, 6, 9, e24406.

Lovrić J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger D, 2005. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. Journal of Molecular Medicine, 83, 5, 377-85.

Lu Y, Xu S, Chen H, He M, Deng Y, Cao Z, Pi H, Chen C, Li M, Ma Q, 2016. CdSe/ZnS quantum dots induce hepatocyte pyroptosis and liver inflammation via NLRP3 inflammasome activation. Biomaterials, 90, 27-39.

MacSween R, 1987. Developmental anatomy and normal structure. Pathology of the liver, 2md edn., 1-45.

Manshian BB, Soenen SJ, Al-Ali A, Brown A, Hondow N, Wills J, Jenkins GJ, Doak SH, 2015. Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints. Toxicol Sci, 144, 2, 246-58.

Mansoori B, Shotorbani SS, Baradaran B, 2014. RNA interference and its role in cancer therapy. Advanced pharmaceutical bulletin, 4, 4, 313.

Marin V, Gazzin S, Gambaro SE, Dal Ben M, Calligaris S, Anese M, Raseni A, Avellini C, Giraudi PJ, Tiribelli C, Rosso N, 2017. Effects of Oral Administration of Silymarin in a Juvenile Murine Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. Nutrients, 9, 9.

Martin MD, Matrisian LM, 2007. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. Cancer Metastasis Rev, 26, 3-4, 717-24.
Masoud Negahdary MB, Marziyeh Ajdary, 2014. Effects of Silymarin on Oxidative Stress Markers in Rats Treated with Magnesium Oxide Nanoparticles. Annual Research & Review in Biology, 5, 3, 254-61.
Mathieu E, Gupta N, Macdonald RL, Ai J, Yücel YH, 2013. In vivo imaging of lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in mouse. Fluids and Barriers of the CNS, 10, 1, 1-5.
Maysinger D, Lovrić J, 2007. Quantum dots and other fluorescent nanoparticles: quo vadis in the cell? Bio-applications of nanoparticles, 156-67.
McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM, 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. Blood, 100, 4, 1160-7.
Medina J, Moreno-Otero R, 2005. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. Drugs, 65, 17, 2445-61.
Meeran SM, Katiyar S, Elmets CA, Katiyar SK, 2006. Silymarin inhibits UV radiation-induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. Molecular Cancer Therapeutics, 5, 7, 1660-8.
Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu A, Gambhir S, Weiss S, 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. Science, 307, 5709, 538-44.
Mo D, Hu L, Zeng G, Chen G, Wan J, Yu Z, Huang Z, He K, Zhang C, Cheng M, 2017. Cadmium-containing quantum dots: properties, applications, and toxicity. Applied Microbiology and Biotechnology, 101, 7, 2713-33.
Moore C, Shen XD, Gao F, Busuttil RW, Coito AJ, 2007. Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury. Am J Pathol, 170, 2, 567-77.
Mu X, Wang J-Y, Bai X, Xu F, Liu H, Yang J, Jing Y, Liu L, Xue X, Dai H, Liu Q, Sun Y-M, Liu C, Zhang X-D, 2017. Black Phosphorus Quantum Dot Induced Oxidative Stress and Toxicity in Living Cells and Mice. ACS Applied Materials & Interfaces, 9, 24, 20399-409.
Mukundan H, Xie H, Price D, Kubicek-Sutherland JZ, Grace WK, Anderson AS, Martinez JS, Hartman N, Swanson BI, 2010. Quantitative multiplex detection of pathogen biomarkers on multichannel waveguides. Analytical chemistry, 82, 1, 136-44.
Murphy MP, Smith RA, 2007. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 47, 629-56.
Murphy MP, Smith RAJ, 2007. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47, 1, 629-56.
Nazemian F, Karimi G, Moatamedi M, Charkazi S, Shamsara J, Mohammadpour AH, 2010. Effect of silymarin administration on TNF-α serum concentration in peritoneal dialysis patients. Phytother Res, 24, 11, 1654-7.
Nel A, Xia T, Madler L, Li N, 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311, 5761, 622-7.
Nemmiche S, Chabane-Sari D, Guiraud P, 2007. Role of α-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. Chemico-biological interactions, 170, 3, 221-30.

Nguyen KC, Rippstein P, Tayabali AF, Willmore WG, 2015. Mitochondrial toxicity of cadmium telluride quantum dot nanoparticles in mammalian hepatocytes. Toxicological sciences, 146, 1, 31-42.
Nguyen KC, Seligy VL, Tayabali AF, 2013. Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to Pseudomonas aeruginosa. Nanotoxicology, 7, 2, 202-11.
Nguyen KC, Willmore WG, Tayabali AF, 2013. Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Toxicology, 306, 114-23.
Nguyen KC, Willmore WG, Tayabali AF, 2013. Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Toxicology, 306, 114-23.
Nguyen KC, Zhang Y, Todd J, Kittle K, Lalande M, Smith S, Parks D, Navarro M, Tayabali AF, Willmore WG, 2020. Hepatotoxicity of cadmium telluride quantum dots induced by mitochondrial dysfunction. Chemical Research in Toxicology, 33, 9, 2286-97.
Nguyen KC, Zhang Y, Todd J, Kittle K, Patry D, Caldwell D, Lalande M, Smith S, Parks D, Navarro M, Massarsky A, Moon TW, Willmore WG, Tayabali AF, 2019. Biodistribution and Systemic Effects in Mice Following Intravenous Administration of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles. Chemical Research in Toxicology, 32, 8, 1491-503.
Nowack B, Bucheli TD, 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental pollution, 150, 1, 5-22.
Nurunnabi M, Khatun Z, Huh KM, Park SY, Lee DY, Cho KJ, Lee YK, 2013. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. ACS Nano, 7, 8, 6858-67.
O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, Gao B, Kaludercic N, Angeline A, Bernardi P, 2006. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. Archives of toxicology, 80, 9, 580-604.
Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and fibre toxicology, 2, 1, 1-35.
Ou Q, Weng Y, Wang S, Zhao Y, Zhang F, Zhou J, Wu X, 2018. Silybin Alleviates Hepatic Steatosis and Fibrosis in NASH Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Involvement with the Nf-κB Pathway. Digestive Diseases and Sciences, 63, 12, 3398-408.
Ou Q, Weng Y, Wang S, Zhao Y, Zhang F, Zhou J, Wu X, 2018. Silybin Alleviates Hepatic Steatosis and Fibrosis in NASH Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Involvement with the Nf-κB Pathway. Dig Dis Sci, 63, 12, 3398-408.
Paesano L, Perotti A, Buschini A, Carubbi C, Marmiroli M, Maestri E, Iannotta S, Marmiroli N, 2016. Markers for toxicity to HepG2 exposed to cadmium sulphide quantum dots; damage to mitochondria. Toxicology, 374, 18-28.
Pan X, Wu X, Yan D, Peng C, Rao C, Yan H, 2018. Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF-κB pathways regulated by MAPKs. Toxicology Letters, 288, 55-64.

Pandit A, Sachdeva T, Bafna P, 2012. Drug-induced hepatotoxicity: a review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, Issue, 233-43.
Papackova Z, Heczkova M, Dankova H, Sticova E, Lodererova A, Bartonova L, Poruba M, Cahova M, 2018. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. PLoS One, 13, 1, e0191353.
Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS, 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol, 4, 8, 617-29.
Pelley JL, Daar AS, Saner MA, 2009. State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots. Toxicological sciences, 112, 2, 276-96.
Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ, 2019. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. Exp Mol Med, 51, 12, 1-13.
Piva R, Belardo G, Santoro MG, 2006. NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. Antioxid Redox Signal, 8, 3-4, 478-86.
Porteous CM, Logan A, Evans C, Ledgerwood EC, Menon DK, Aigbirhio F, Smith RA, Murphy MP, 2010. Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800, 9, 1009-17.
Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, l'Azou B, 2011. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Particle and fibre toxicology, 8, 1-16.
Raghunathan VK, Devey M, Hawkins S, Hails L, Davis SA, Mann S, Chang IT, Ingham E, Malhas A, Vaux DJ, Lane JD, Case CP, 2013. Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity. Biomaterials, 34, 14, 3559-70.
Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y, 2006. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. J Clin Immunol, 26, 4, 299-307.
Ramakrishnan G, Jagan S, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T, 2009. Silymarin attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis. Investigational New Drugs, 27, 233-40.
Ribeiro CA, de Castro CE, Albuquerque LJ, Batista C, Giacomelli FC, 2017. Biodegradable nanoparticles as nanomedicines: are drug-loading content and release mechanism dictated by particle density? Colloid and Polymer Science, 295, 8, 1271-80.
Richter M, Vidovic N, Honrath B, Mahavadi P, Dodel R, Dolga A, Culmsee C, 2016. Activation of SK2 channels preserves ER Ca2+ homeostasis and protects against ER stress-induced cell death. Cell Death & Differentiation, 23, 5, 814-27.
Rikans LE, Yamano T, 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. Journal of biochemical and molecular toxicology, 14, 2, 110-7.
Sadaf A, Zeshan B, Wang Z, Zhang R, Xu S, Wang C, Cui Y, 2012. Toxicity evaluation of hydrophilic CdTe quantum dots and CdTe@SiO2 nanoparticles in mice. J Nanosci Nanotechnol, 12, 11, 8287-92.
Sajid M, Ilyas M, Basheer C, Tariq M, Daud M, Baig N, Shehzad F, 2015. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. Environmental Science and Pollution Research, 22, 6, 4122-43.

Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K, 2011. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. Drug Metab Pharmacokinet, 26, 1, 30-46.

Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R, 2007. An Updated Systematic Review of the Pharmacology of Silymarin. Complementary Medicine Research, 14, 2, 70-80.

Samia AC, Dayal S, Burda C, 2006. Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. Photochemistry and photobiology, 82, 3, 617-25.

Sawicka D, Zapor L, Chojnacka-Puchta L, Miranowicz-Dzierzawska K, 2021. The in vitro toxicity evaluation of halloysite nanotubes (HNTs) in human lung cells. Toxicological Research, 37, 3, 301-10.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Elazar Z, 2007. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. Autophagy, 3, 4, 371-3.

Scholzen T, Gerdes J, 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol, 182, 3, 311-22.

Serban AI, Stanca L, Sima C, Staicu AC, Zarnescu O, Dinischiotu A, 2015. Complex responses to Si quantum dots accumulation in carp liver tissue: Beyond oxidative stress. Chemico-Biological Interactions, 239, 56-66.

Shahbazi F, Dashti-Khavidaki S, Khalili H, Lessan-Pezeshki M, 2012. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: a review of literature. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 15, 1, 112-23.

Sharma V, Anderson D, Dhawan A, 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). Apoptosis, 17, 8, 852-70.

Shukla RK, Kumar A, Vallabani NVS, Pandey AK, Dhawan A, 2014. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. Nanomedicine, 9, 9, 1423-34.

Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F, 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis, 5, 5, 415-8.

Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC, 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. Archives of Toxicology, 87, 7, 1157-80.

Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S, 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. Advanced drug delivery reviews, 60, 11, 1226-40.

Smith RA, Hartley RC, Murphy MP, 2011. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. Antioxidants & redox signaling, 15, 12, 3021-38.

Smith RA, Murphy MP, 2010. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. Ann N Y Acad Sci, 1201, 96-103.

Smith RA, Murphy MP, 2010. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. Annals of the new York Academy of Sciences, 1201, 1, 96-103.

Smith RA, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP, 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100, 9, 5407-12.

Smith RA, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP, 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 9, 5407-12.

Smith RAJ, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP, 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 9, 5407-12.
Snow BJ, Rolfe FL, Lockhart MM, Frampton CM, O'Sullivan JD, Fung V, Smith RA, Murphy MP, Taylor KM, Group PS, 2010. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. Movement Disorders, 25, 11, 1670-4.
Soleimani V, Delghandi PS, Moallem SA, Karimi G, 2019. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. Phytotherapy research, 33, 6, 1627-38.
Sozmen M, Devrim AK, Tunca R, Bayezit M, Dag S, Essiz D, 2014. Protective effects of silymarin on fumonisin B1-induced hepatotoxicity in mice. jvs, 15, 1, 51-60.
Stanca L, Petrache SN, Serban AI, Staicu AC, Sima C, Munteanu MC, Zărnescu O, Dinu D, Dinischiotu A, 2013. Interaction of silicon-based quantum dots with gibel carp liver: oxidative and structural modifications. Nanoscale Research Letters, 8, 1, 1-11.
Stern ST, McNeil SE, 2008. Nanotechnology safety concerns revisited. Toxicological sciences, 101, 1, 4-21.
Su Y, Peng F, Jiang Z, Zhong Y, Lu Y, Jiang X, Huang Q, Fan C, Lee S-T, He Y, 2011. In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. Biomaterials, 32, 25, 5855-62.
Su Y, Peng F, Jiang Z, Zhong Y, Lu Y, Jiang X, Huang Q, Fan C, Lee ST, He Y, 2011. In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. Biomaterials, 32, 25, 5855-62.
Subileau M, Vittet D, 2021. Lymphatics in Eye Fluid Homeostasis: Minor Contributors or Significant Actors? Biology, 10, 7, 582.
Sumner JB, Dounce AL, 1937. Crystalline catalase. Science, 85, 2206, 366-7.
Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, Guo C, Huang P, Sun Z, 2011. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. Toxicology in vitro, 25, 8, 1619-29.
Tabandeh MR, Oryan A, Mohhammad-Alipour A, Tabatabaei-Naieni A, 2013. Silibinin regulates matrix metalloproteinase 3 (stromelysine1) gene expression, hexoseamines and collagen production during rat skin wound healing. Phytotherapy Research, 27, 8, 1149-53.
Tabet M, El-Kurdi M, Haidar MA, Nasrallah L, Reslan MA, Shear D, Pandya JD, El-Yazbi AF, Sabra M, Mondello S, Mechref Y, Shaito A, Wang KK, El-Khoury R, Kobeissy F, 2022. Mitoquinone supplementation alleviates oxidative stress and pathologic outcomes following repetitive mild traumatic brain injury at a chronic time point. Experimental Neurology, 351, 113987.
Tang S, Allagadda V, Chibli H, Nadeau JL, Mayer GD, 2013. Comparison of cytotoxicity and expression of metal regulatory genes in zebrafish (Danio rerio) liver cells exposed to cadmium sulfate, zinc sulfate and quantum dots. Metallomics, 5, 10, 1411-22.
Tang S, Zhang X, Duan Z, Xu M, Kong M, Zheng S, Bai L, Chen Y, 2023. The novel hepatoprotective mechanisms of silibinin-phospholipid complex against d-GalN/LPS-induced acute liver injury. International Immunopharmacology, 116, 109808.

Tang Y, Han S, Liu H, Chen X, Huang L, Li X, Zhang J, 2013. The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core–shell quantum dots. Biomaterials, 34, 34, 8741-55.

Tanida I, 2011. Autophagy basics. Microbiology and immunology, 55, 1, 1-11.

Temiz MA, Temur A, Akgeyik Y, Uyar A, 2021. Protective effect of Celtis tournefortii against copper-induced toxicity in rat liver. Acta Veterinaria Brno, 90, 1, 91-8.

Terzi F, Ciftci MK, 2022. Protective effect of silymarin on tacrolimus-induced kidney and liver toxicity. BMC Complementary Medicine and Therapies, 22, 1, 1-10.

Tiwari DK, Jin T, Behari J, 2011. Bio-distribution and toxicity assessment of intravenously injected anti-HER2 antibody conjugated CdSe/ZnS quantum dots in Wistar rats. International journal of nanomedicine, 463-75.

Treinen-Moslen M, (2001). Toxic responses of the liver in Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (CD Klaassen, Ed.), McGraw-Hill, New York.

Tully E, Hearty S, Leonard P, O'Kennedy R, 2006. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of Listeria monocytogenes cell surface proteins. International journal of biological macromolecules, 39, 1-3, 127-34.

Turkseven S, Bolognesi M, Brocca A, Pesce P, Angeli P, Di Pascoli M, 2020. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 318, 2, G298-G304.

Turkseven S, Bolognesi M, Brocca A, Pesce P, Angeli P, Pascoli MD, 2020. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 318, 2, G298-G304.

Vaid M, Katiyar SK, 2010. Molecular mechanisms of inhibition of photocarcinogenesis by silymarin, a phytochemical from milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn.). International journal of oncology, 36, 5, 1053-60.

Vallières L, Rivest S, 1999. Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. Endocrinology, 140, 9, 3890-903.

Vangaveti S, Das P, Kumar VL, 2021. Metformin and silymarin afford protection in cyclosporine A induced hepatorenal toxicity in rat by modulating redox status and inflammation. Journal of biochemical and molecular toxicology, 35, 1, e22614.

Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna YG-RM, Gayosso-de-Lucio JA, Morales-González JA, 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol, 6, 3, 144-9.

Varmazyari A, Taghizadehghalehjoughi A, Baris O, Yilmaz A, Hacimuftuoglu A, 2021. The evaluation of the cortex neurons viability in CdS nanoparticles induced toxicity. Nanomedicine Journal, 8, 3.

Voroneanu L, Nistor I, Dumea R, Apetrii M, Covic A, 2016. Silymarin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. J Diabetes Res, 2016, 5147468.

Wang H, Liu Z, Gou Y, Qin Y, Xu Y, Liu J, Wu J-Z, 2015. Apoptosis and necrosis induced by novel realgar quantum dots in human endometrial cancer cells via endoplasmic reticulum stress signaling pathway. International Journal of Nanomedicine, 10, 5505.

Wang J, Sun H, Meng P, Wang M, Tian M, Xiong Y, Zhang X, Huang P, 2017. Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice. International Journal of Nanomedicine, 12, 6425.
Wang J, Sun H, Meng P, Wang M, Tian M, Xiong Y, Zhang X, Huang P, 2017. Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice. Int J Nanomedicine, 12, 6425-35.
Wang M, Wang J, Sun H, Han S, Feng S, Shi L, Meng P, Li J, Huang P, Sun Z, 2016. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals. Int J Nanomedicine, 11, 2319-28.
Wang S, Chen L, Xia S, 2007. Cadmium is acutely toxic for murine hepatocytes: effects on intracellular free Ca^ 2^+ homeostasis. Physiological research, 56, 2, 193.
Wang S, Liu F, Zeng Z, Yang H, Jiang H, 2016. The protective effect of bafilomycin A1 against cobalt nanoparticle-induced cytotoxicity and aseptic inflammation in macrophages in vitro. Biological trace element research, 169, 94-105.
Wang X, Ren X, Kahen K, Hahn MA, Rajeswaran M, Maccagnano-Zacher S, Silcox J, Cragg GE, Efros AL, Krauss TD, 2009. Non-blinking semiconductor nanocrystals. Nature, 459, 7247, 686-9.
Wang X, Tian J, Yong K-T, Zhu X, Lin MC-M, Jiang W, Li J, Huang Q, Lin G, 2016. Immunotoxicity assessment of CdSe/ZnS quantum dots in macrophages, lymphocytes and BALB/c mice. Journal of Nanobiotechnology, 14, 1, 10.
Wen C-J, Zhang L-W, Al-Suwayeh SA, Yen T-C, Fang J-Y, 2012. Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. International Journal of Nanomedicine, 7, 1599-611.
Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ, 2000. Myeloperoxidase. Current opinion in hematology, 7, 1, 53-8.
Won DH, Kim LH, Jang B, Yang IH, Kwon HJ, Jin B, Oh SH, Kang JH, Hong SD, Shin JA, Cho SD, 2018. In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. Tumour Biol, 40, 5, 1010428318776170.
Wu T, Tang M, 2018. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. Journal of Applied Toxicology, 38, 1, 25-40.
Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE, 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. Nano letters, 6, 8, 1794-807.
Yaghini E, Seifalian AM, MacRobert AJ. 2 In Vivo Applications of Quantum Dot Nanoparticles for Optical Diagnostics and Therapy.
Yaghini E, Tacconi E, Pilling A, Rahman P, Broughton J, Naasani I, Keshtgar MR, MacRobert AJ, Della Pasqua O, 2021. Population pharmacokinetic modelling of indium-based quantum dot nanoparticles: preclinical in vivo studies. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 157, 105639.
Yaghini E, Turner H, Pilling A, Naasani I, MacRobert AJ, 2018. In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 14, 8, 2644-55.
Yan M, Zhang Y, Xu K, Fu T, Qin H, Zheng X, 2011. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. Toxicology, 282, 3, 94-103.

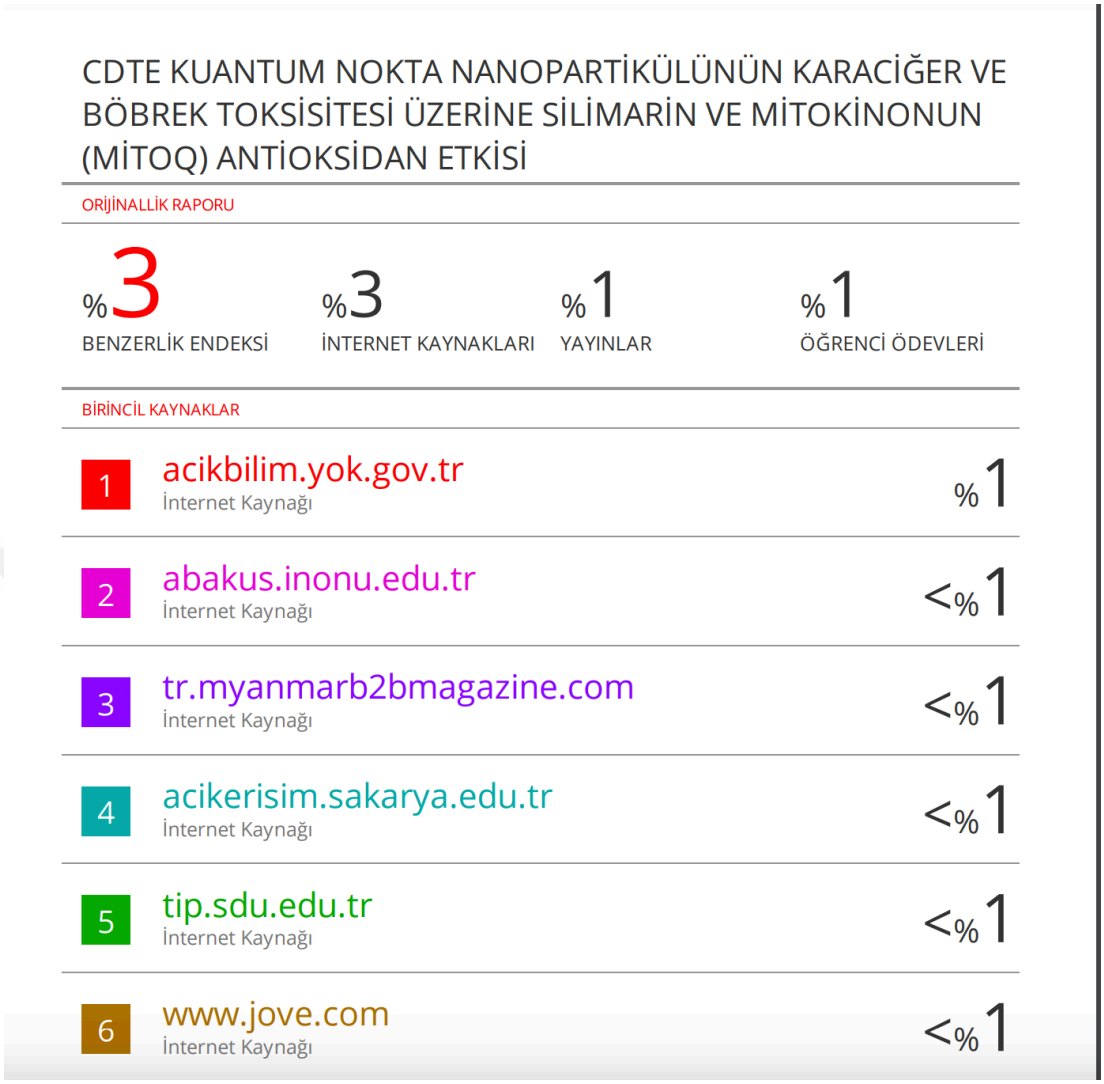
Yang L, Kuang H, Zhang W, Wei H, Xu H, 2018. Quantum dots cause acute systemic toxicity in lactating rats and growth restriction of offspring. Nanoscale, 10, 24, 11564-77.
Yang L, Li Y, 2006. Simultaneous detection of Escherichia coli O157：H7 and Salmonella Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. Analyst, 131, 3, 394-401.
Yang RS, Chang LW, Wu J-P, Tsai M-H, Wang H-J, Kuo Y-C, Yeh T-K, Yang CS, Lin P, 2007. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment. Environmental health perspectives, 115, 9, 1339-43.
Yang X, Shao H, Liu W, Gu W, Shu X, Mo Y, Chen X, Zhang Q, Jiang M, 2015. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity. Toxicology Letters, 234, 1, 40-9.
Yang Y, Ren X, Sun Z, Fu C, Liu T, Meng X, Wang Z, 2018. Toxicity and bio-distribution of carbon dots after single inhalation exposure in vivo. Chinese Chemical Letters, 29, 6, 895-8.
Yong K-T, Law W-C, Hu R, Ye L, Liu L, Swihart MT, Prasad PN, 2013. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. Chemical Society Reviews, 42, 3, 1236-50.
Young ML, Franklin JL, 2019. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ inhibits memory loss, neuropathology, and extends lifespan in aged 3xTg-AD mice. Mol Cell Neurosci, 101, 103409.
Zhang B, Xu D, She L, Wang Z, Yang N, Sun R, Zhang Y, Yan C, Wei Q, Aa J, Liu B, Wang G, Xie Y, 2018. Silybin inhibits NLRP3 inflammasome assembly through the NAD(+)/SIRT2 pathway in mice with nonalcoholic fatty liver disease. Faseb j, 32, 2, 757-67.
Zhang JQ, Zhou W, Zhu SS, Lin J, Wei PF, Li FF, Jin PP, Yao H, Zhang YJ, Hu Y, 2017. Persistency of enlarged autolysosomes underscores nanoparticle-induced autophagy in hepatocytes. Small, 13, 7, 1602876.
Zhang T, Hu Y, Tang M, Kong L, Ying J, Wu T, Xue Y, Pu Y, 2015. Liver Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe QDs) Due to Oxidative Stress in Vitro and in Vivo. Int J Mol Sci, 16, 10, 23279-99.
Zhang T, Hu Y, Tang M, Kong L, Ying J, Wu T, Xue Y, Pu Y, 2015. Liver toxicity of cadmium telluride quantum dots (CdTe QDs) due to oxidative stress in vitro and in vivo. International Journal of Molecular Sciences, 16, 10, 23279-99.
Zhang T, Wang Y, Kong L, Xue Y, Tang M, 2015. Threshold dose of three types of quantum dots (QDs) induces oxidative stress triggers DNA damage and apoptosis in mouse fibroblast L929 cells. International journal of environmental research and public health, 12, 10, 13435-54.
Zhao L, Zong W, Zhang H, Liu R, 2019. Kidney toxicity and response of selenium containing protein-glutathione peroxidase (Gpx3) to CdTe QDs on different levels. Toxicological Sciences, 168, 1, 201-8.
Zheng H, Chen G, Song F, DeLouise LA, Lou Z, 2011. The cytotoxicity of OPA-modified CdSe/ZnS core/shell quantum dots and its modulation by silibinin in human skin cells. Journal of biomedical nanotechnology, 7, 5, 648-58.
Zheng Y, Gao S, Ying JY, 2007. Synthesis and cell-imaging applications of glutathione-capped CdTe quantum dots. Advanced Materials, 19, 3, 376-80.
Zhou J, Wang H, Shen R, Fang J, Yang Y, Dai W, Zhu Y, Zhou M, 2018. Mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ provides neuroprotection and reduces neuronal apoptosis in experimental traumatic brain injury possibly via

the Nrf2-ARE pathway. American Journal of Translational Research, 10, 6, 1887.
Zhu M, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y, 2013. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. Accounts of Chemical Research, 46, 3, 622-31.
Zhu SY, Jiang N, Yang J, Tu J, Zhou Y, Xiao X, Dong Y, 2018. Silybum marianum oil attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in high fat diet-fed mice. Biomedicine & Pharmacotherapy, 100, 191-7.
Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, Cheng G, Lopez M, Kalyanaraman B, 2017. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. Chemical reviews, 117, 15, 10043-120.
Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1757, 5-6, 509-17.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

EK-B: Turnitin Raporu



CDTE KUANTUM NOKTA NANOPARTİKÜLÜNÜN KARACİĞER VE BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE SİLİMARİN VE MİTOKİNONUN (MİTOQ) ANTİOKSİDAN ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	tr.myanmarb2bmagazine.com İnternet Kaynağı	<%1
4	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	tip.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1

7	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	journals.plos.org İnternet Kaynağı	<%1
	innovareacademics.in	
9	İnternet Kaynağı	<%1
10	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
11	deupediatrigunleri.com İnternet Kaynağı	<%1
12	Submitted to Bozok Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
13	www.vvc.gov.lv İnternet Kaynağı	<%1
14	Submitted to Mersin Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

15	Submitted to ACISCHOOLS Öğrenci Ödevi	<%1
16	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<%1
17	sbk2019.org İnternet Kaynağı	<%1
18	aging-us.com İnternet Kaynağı	<%1
19	Submitted to Ondokuz Mayıs Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
20	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
21	supplementansiklopedisi.com İnternet Kaynağı	<%1
22	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
23	www.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

24	ataman-kimya.com İnternet Kaynağı	<%1
25	dspace.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
26	EKİZCELİ, Gülçin, İNAN, Sevinç, ÖKTEM, Gülperi, ONUR, Ece and ÖZBİLGİN, Kemal. "Sıçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusla rın Histolojik Değerlendirmesi", Uludağ Üniversitesi, 2015. Yayın	<%1
27	acikerisim.karatay.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
28	webftp.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart Kapat
Bibliyografyayı Çıkart Kapat
Eşleşmeleri çıkar Kapat

8. ÖZGEÇMİŞ