

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOBİYOĞÜMÜŞ KULLANIMININ AKUT SUBAKUT VE
SUBKRONİK TOKSİK ETKİLERİNİN RODENT MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Yasemin YEŞİLÖREN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI

2018-KIRIKKALE

KABUL VE ONAY

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/ 10/2018

Doç. Dr. ~~Buğrahan Bekir YAĞCI~~
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU
Aksaray Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji	1
1.2. Gümüş	3
1.2.1. Tarihte gümüşün kullanımı	5
1.2.2. Gümüşün Hücre İçine Alınması ve Etkileri	6
1.3. Toksikite	15
1.3.1. Toksikite Oluşumunu Etkileyen Faktörler	16
1.3.1.1 Temas Yolu	16
1.3.1.2 Temas Süresi ve Sıklığı	17
1.3.1.2.1. Akut Zehirlenme	17
1.3.1.2.2. Subakut Zehirlenme	18
1.3.1.2.3. Subkronik Zehirlenme	18
1.3.1.2.4 Kronik Zehirlenme	18
1.3.1.3. Doz	19

1.3.2.	Toksikokinetik	21
1.3.3.	Zehirlenme Tipleri ve Zehirlerin İstenmeyen Yan Etkileri	23
1.3.3.1.	Yalın Zehirli Etkiler	24
1.3.3.1.1	Görevsel Zehirli Etkiler	24
1.3.3.1.2.	Yapısal Zehirli Etkiler	24
1.3.3.1.3.	Özel Zehirli Etkiler	25
1.3.3.2	Allerjik Tepkimeler	26
1.3.3.2.1.	Tip 1 tepkimeler (anaflaktik tepkimeler)	27
1.3.3.2.2	Tip 2 tepkimeler (sitolitik tepkimeler)	27
1.3.3.2.3	Tip 3 tepkimeler (arthus tepkimeleri)	27
1.3.3.2.4	Tip 4 tepkimeler	28
1.3.3.3.	İdiyosinkratik tepkimeler	28
1.3.4.	Toksikolojik Çalışmaların Gelişimi	28
1.3.5.	Toksisite testleri	29
1.3.5.1	Toksisite Testlerinin Sınıflandırılması	30
1.3.5.1.1.	Akut Toksisite Testleri	31
1.3.5.1.2.	Subakut Toksisite Testleri	31
1.3.5.1.3.	Subkronik Toksisite Testleri	31
1.3.5.2.	Sitotoksisite	33
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	34
2.1.	Hayvan Materyali	34
2.1.1.	Deney Grubu	34
2.1.2.	Kontrol Grubu	34
2.1.3	Barınma ve Beslenme Koşulları	34

2.2.	Yöntem	35
2.2.1.	Toksisite Deneyleri	35
2.2.1.1.	Biyogümüşün Uygulama Yolu ve Dozunun Belirlenmesi	35
2.2.1.2.	Biyogümüş Sentezi ve Ekstraksiyonu	36
2.2.1.3	Klinik Gözlem ve Değerlendirme	36
2.2.1.4.	Günlük Ağırlık Takibi	37
2.2.1.5.	Nekropsi ve Histopatolojik İncelemeler	37
2.2.2.	Sensitizasyon Testi (Guinea pig maksimizasyon deneyi)	37
2.2.2.1.	Deney Grubunun Hazırlanması	37
2.2.2.1.2	İntradermal indüksiyon fazı	38
2.2.2.1.3.	Lokal indüksiyon fazı	38
2.2.2.1.4.	Yarışma fazı	38
2.2.2.2.	Deri Reaksiyonlarının Gözlemlenmesi	38
3.	BULGULAR	40
3.1.	Toksisite Deneyleri Bulguları	40
3.2.	Canlı Ağırlık Bulguları	41
3.3.	Nekropsi ve Histopatolojik Bulgular	43
3.4	Sensitizasyon Testi (Guinea pig maksimizasyon deneyi)	43
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	45
	KAYNAKLAR	48
	ÖZGEÇMİŞ	53

ÖNSÖZ

Yüzyıllar öncesinden günümüze kadar geçen sürede insanların değerli madenler arasında gördüğü gümüş, birçok alanda kullanılmış ve insanlığa hayli fazla fayda sağlamıştır. Gümüşün en bilinen etkisinin antibakteriyel etkisi olduğu bilinmekle birlikte aslında altın, çinko, bakır gibi metallerin de antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu ancak bunların içinde insan sağlığına en az olumsuz etki oluşturanın gümüş olması nedeniyle diğer elementler bir kenara bırakılmış ve gümüş ile çalışmalar devam etmiştir.

Geçmiş zamanlarda insanların yiyecek ve içeceklerini bozulmadan saklamak için kullandıkları gümüşün medikal anlamdaki kullanımı da çok eskilere dayanmaktadır. Birinci dünya savaşı sırasında gümüş yaralarda enfeksiyon önlemek için kullanılmış basit bir antibiyotik işlevi görmekteydi. Ancak daha sonra penisilin gibi nispeten daha ucuz ve spesifik antibiyotiklerin ortaya çıkmasıyla daha az tercih edilmiştir. Bu gelişmelere rağmen günümüzde hala küçümsenmeyecek kadar medikal ürünün içerisinde farklı formlarda da olsa gümüş iyonları bulunmaktadır. Ayrıca sadece medikal değil kozmetik, kişisel bakım, çeşitli makineler, plastik paketleme ürünleri, dezenfektanlar, deterjanlar gibi birçok ürün yelpazesinde kullanılmaktadır.

Kullanım alanının bu kadar geniş olması, bu kadar fazla maruz kalmanın sonucunda direk gümüşün veya kullanılan diğer formlarının canlılar üzerindeki bilinen veya bilinmeyen toksik etkilerinin veya faydalarının tekrar araştırılması kaçınılmaz bir zorunluluk haline gelmiştir.

Bu çalışmamızda, ratlarda gümüşün akut, subakut ve subkronik toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının; konu seçiminde ve hazırlanmasında yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI' ya teorik ve pratik çalışmalardaki yardımları için İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üye ve yardımcıları ile yine aynı şekilde bu çalışmada emeği geçen hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Mert POLAT ve Doç. Hüsamettin EKİCİ' ye ve bu çalışma süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem, babama ve eşim Mehmet YEŞİLÖREN' e teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Å:	Amstrong
Ag:	Gümüş
A549:	İnsan akciğer karsinomu
BT:	Biyotransformasyon
DDT:	Dikloro Difenol Trikloroethan
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
NaCl:	Sodyum Klorür
NP:	Nanopartikül
HepG2:	Hepatoselüler Karaciğer Karsinomu
HT-29:	İnsan Kollateral Adenokarsinomu
Kg:	Kilogram
LD50:	Lethal doz 50
LC50:	Letal Konsantrasyon 50
IgE:	İmmunglobin E
IgG:	İmmunglobin G
IgM:	İmmunglobin M
LOAEL:	En düşük advers etki düzeyi
LOEL:	En düşük etki düzeyi
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
Mm:	Milimetre
Mg:	Miligram
mL	Mililitre
NOEL:	Hiçbir advers etkinin gözlenmediği en yüksek düzey
NP:	Nanopartikül
Nm:	Nanometre
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyon
Ppm:	Milyonda Bir
RBC:	Kırmızı Kan Hücresi
ROS:	Reaktif Oksijen Türü

μg : Mikrogram
vb: Ve benzeri



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Gümüş nanopartiküller için potansiyel insan ve çevresel maruziyet yolları	5
Şekil 1.2.	Biyolojik ve çevresel ortamlarda nanogümüşün akıbeti ve toksisitesi	7
Şekil 1.3.	Biyolojik ve çevresel ortamlarda nanosilverin akıbeti ve toksisitesi (McShan ve ark. 2014).	12
Şekil 3.1.	Toksisite Deneyi Canlı Ağırlık Değişimleri (Erkek)	41
Şekil 3.2.	Toksisite Deneyi Karaciğer Ağırlıkları (Erkek)	41
Şekil 3.3.	Toksisite Deneyi Canlı Ağırlık Değişimleri (Dişi)	42
Şekil 3.4.	Toksisite Deneyi Karaciğer Ağırlıkları (Dişi)	42

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1	Gümüşün formu, yaklaşık boyutları ve yükleri	3
Çizelge 1.2	Bazı Kimyasal Maddelerin İnsan ve Kemirgenlerdeki Letal Doz Değerleri	20
Çizelge 2.1.	Deney hayvanlarına uygulanacak biyogümüşün uygulama Yolu ve dozu	36
Çizelge 2.2.	Magnusson ve Kligman ölçeği	39
Çizelge 3.1.	Magnusson ve Kligman ölçeğine göre gözlenen değerler	44

ÖZET

Nanobiyogümüş Kullanımının Akut Subakut Ve Subkronik Toksik Etkilerinin Rodentlerde Araştırılması

Bu çalışmanın amacı biosilver parçacıklarının kemirgen modeli üzerindeki toksisitesini araştırmaktır. Sistemik toksisite çalışmalarında 8-12 haftalık fareler kullanılmıştır. Çalışma grupları akut toksisite testlerinde 5 dişi ve 5 erkek fareden oluşurken subkronik toksisite testleri için 10 dişi ve 10 erkek çalışma grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise 8-12 haftalık 5 dişi ve 5 erkek fareden oluşturulmuştur. Negatif kontrol için Phosphate Buffered Saline solüsyonu kullanıldı. Akut toksisite testleri için tek doz nanobiosilver enjekte edildi; subakut ve subkronik toksisite testleri için toplam 7 enjeksiyon yapıldı. Nanobiosilver, bir kilogram vücut ağırlığı başına 20 mL'lik bir dozda intraperitoneal olarak enjekte edildi. Çalışma gruplarında biogümüş uygulamalarının sonunda klinik bulgularda belirgin değişiklikler görülmedi. Vücut ağırlığı değişiklikleri çalışma gruplarındaki referans aralıklarında hesaplandı. Ayrıca, tüm dokular biyogüvenliğin sistemik toksisitesini değerlendirmek için histopatolojik olarak incelendi. Çalışma gruplarının vital dokularında önemli değişiklikler yoktu.

Sonuç olarak, biosilver partikülleri, kemirgen modeli üzerinde herhangi bir akut, subakut ve subkronik toksisite etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut, biyogümüş, subakut, subkronik, toksisite.

SUMMARY

Investigation Of Acute Subacute And Subchronic Toxic Effects Of Nanobiosilver In The Rodent Model

The aim of this study was to investigate the toxicity of biosilver particles on rodent model. 8-12 weeks aged mice were used for systemic toxicity experiments. Study groups was consist of 5 female and 5 male mice for acute toxicity tests while 10 female and 10 male mice for subchronical toxicity tests. Control group was consisting of 5 female and 5 male mice aged with 8-12 weeks. Phosphate Buffered Saline extraction solution was used for negative control. Single dose of nanobiosilver was injected for acute toxicity tests; while totally 7 injections was performed for subacute and subchronic toxicity tests. Nanobiosilver was injected intraperitonealy at a dosage of 20 mL per kilograms of body weight. No significant clinical signs changes was observed after the biosilver administrations in all study groups. Body weight alterations were calculatated in referance ranges in study groups . Furthermore, all the tissues were examined histopathogicaly for evaluate the systemic toxicity of biosilver. There were no significant changes on vital tissues of study groups.

In conclusion, biosilver particles have not any acute, subcute and subchronic toxicity effects on rodent model.

Keywords: Acute, biosilver, subacute, subchronic, toxicity.

1.GİRİŞ

1.1. NANOTEKNOLOJİ

İnsanlık tarihi kadar eski olan teknoloji kavramı, her geçen gün ortaya çıkan değişimler ile toplumları derinden etkilemeye devam etmektedir. Özellikle son zamanlarda teknoloji büyük bir hızla gelişmekte olup bireysel ve toplumsal bazda bu gelişimleri takip etmek oldukça zorlaşmaktadır. Bu gelişmeler çerçevesinde Nanobilim ve Nanoteknoloji (N&N), 21'nci yüzyıla damgasını vuracak olan önemli bir teknolojik alan olarak görülmektedir (Özer 2008).

Nanoteknoloji, maddeler üzerinde 100 nanometre ölçeğinden küçük boyutlarda gerçekleştirilen işleme, ölçüm, tasarım, modelleme ve düzenleme gibi çalışmalarla maddeye atom ve molekül seviyesinde gelişmiş veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmayı hedefleyen, hızla gelişen bir bilim ve teknoloji alanıdır. Nanoteknoloji malzeme, elektronik, bilgisayar, tıp, ilaç, tekstil, çevre, enerji, biyoteknoloji, tarım ve gıda gibi birçok alanda uygulama imkânı sunabilmektedir (Tarhan ve ark. 2010).

Nano bilimi, boyutları 1-100 nanometre (metrenin milyarda biri) arasında değişen materyallerin eşsiz davranışları ve özelliklerini inceleyen bir disiplindir (Sarsar ve ark. 2014).

Bir nanometre, bir mikrometrenin binde biri, milimetrenin (mm) milyonda biri ve metrenin milyarda biridir. Örneğin; bir DNA sarmalı 2.5 nm, bir protein molekülü 5 nm, bir kırmızı kan hücresi 7.000 nm ve insan saçı 80.000 nm genişliğindedir.

Nanomateryaller, nano ölçeklerin, eşsiz özelliklerinden faydalanma amacı güdülerek tasarlanmıştır. Nanopartiküller, aynı kimyasal yapıya ancak daha geniş yüzey alanına sahip partiküllere göre genellikle daha büyük kimyasal reaksiyon, biyolojik aktivasyon ve katalitik özelliğe sahiptir. Ancak bu yeni özelliklerden faydalanmak istenirse de, materyallerin boyutlarını bu ölçekte değiştirmek toksikolojik

risklerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Garnett ve Kallinteri 2006; Limbach ve ark. 2007; Nel ve ark. 2006).

Nanomateriyaller tatmin edici bir şekilde karakterize edildiğinde hücrelerle olan etkileşimlerinin değerlendirilmesi mikroskopik ve biyokimyasal analizlerle incelenebilir.

Nanoteknoloji, nanomateriyallerin biyolojik etkilerinin potansiyel olumsuz etkilerini belirlemede muazzam bir ilerleme kaydetmiştir. Bununla birlikte, henüz tatmin edici bir şekilde araştırılmayan bir yön; fizyolojik bir ortamın nanomateriyallerin fizikokimyasal özelliklerini nasıl değiştirdiğidir. Bu durum katı faz nanomateriyallerle ilgili yeni karışıklıklar ortaya çıkarmaktadır (Braydich-Stolle ve ark. 2014).

Nanopartiküller memeli hücrelerindeki proteinler ve enzimlerle etkileşirler ve antioksidan savunma mekanizmasına müdahale ederek, reaktif oksijen türlerinin üretilmesine, inflamatuvar yanıtın başlamasına ve mitokondrinin pertübasyonuna, tahrip edilmesine neden olarak apoptoza veya nekroza neden olabilirler (Schrand ve ark. 2010).

Nanomateriyaller küçük boyutlarına rağmen işlevleri ve uygulamadaki yeni özellikleriyle ilgi çekmektedir. Birincisi, daha büyük boyutlardaki aynı kütleli materyaller ile karşılaştırıldıklarında daha geniş yüzey alanına sahiptirler. Birim kütle başına daha büyük yüzey alanı, kimyasalların daha reaktif olmalarını sağlar. Altın gibi bazı materyallerin nanopartikülleri normal boyutlarına kıyasla daha reaktiftirler. İkincisi, kuantum etkileri, nano boyutta, özellikle daha küçük nanomateriyallerde, maddenin davranışına hâkim olmaya başlayabilir (Anonim 2004).

Canlılık testleri, morfolojik gözlem ve oksidatif stres oluşturma kapasitesi, nanomateriyallerin toksisite oluşturma mekanizmasıyla ilgili ipucu vermektedirler. Bu çalışmaların sonuçları, nanomateriyallerin boyutlarının kimyasal bileşimlerinin, şekillerinin toksisitelerini nasıl etkilediğini anlamada katkıda bulunabilirler (Schrand ve ark. 2012).

1.2. GÜMÜŞ

Gümüş iyonu, elektron sayısının proton sayısından bir az olması sebebiyle pozitif yüklü katyondur (dolayısıyla Ag^+ olarak yazılır). Gümüş iyonun iyonik yarıçapı ~ 0.1 nm' dir. İyonlar yüklerinden dolayı oldukça reaktiftirler. Bir iyon diğer iyonlarla birleşebilir, ancak iyonun kendisi doğal olarak kalıcıdır ve tahrip edilemez. Bu karmaşık etkileşimler, makromoleküller, nanoparçacıklar, kolloidler ve partiküller arasındaki hassas sınırları bulanıklaştırmaktadır (Lead ve Wilkinson 2006).

Çizelge 1.1. Gümüşün formu, yaklaşık boyutları ve yükleri (Kulinowski 2008)

GÜMÜŞÜN TİPİ	YAKLAŞIK BOYUTU	ÖZNETELLİKLER
Elemental / metalik (tek atom)	0.288 nm	Doğada tek olarak bulunmaz, Elemental gümüş oksidasyon tepkimelerine girmez
Gümüş iyonu (iyonik)	0.258 nm	Toksik, suda çözünebilir, pozitif veya negatif yüklü olabilir
Nanogümüş	1-100 nm	Serbest iyon salınımı yapabilir ve/veya kendi başına toksik olabilir.
Kolloidal	1-1000 nm	Sıvı içinde süspansiyon halinde tutulan farklı boyutlu parçacıkların bir karışımı, nano partiküllü gümüş, gümüş iyonları veya her ikisini de içerebilir.
İnorganik gümüş bileşikleri /gümüş tuzları. (Örn. gümüş klorür, gümüş oksit)	Değişir	Kolayca çözülemez, nano hale getirilebilir.
Organik gümüş bileşikleri (Örn. gümüş proteinler)	Değişir	Kovalent, çözülmesi neredeyse imkânsız.

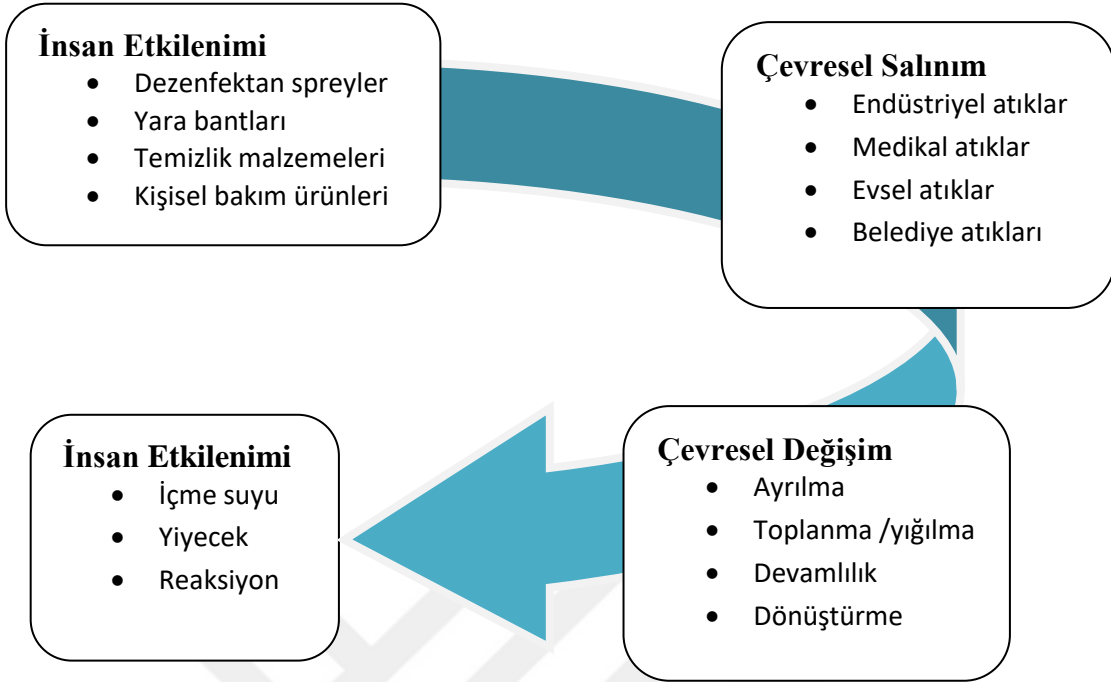
Nanogümüş molekülleri, bir iyonun aksine kararlı formda değildirler, çözünebilir ve parçalanabilirler. Bunun anlamı moleküler özelliklerini kaybederek yeni bir form kazanamazlar. Bu gümüş iyonları ile gümüş nanogümüş iyonları arasındaki temel farktır. Kolloid terimi gümüş için sıklıkla kullanılmaktadır (Çizelge 1.1.). Bir kolloid, 1 nm ile 1.000 nm arasında geniş bir aralıkta bir parçacık olarak tanımlanır. Yani bir kolloid, bir nanopartikül olabilir veya olmayabilir (Lead ve Wilkinson, 2006).

Biosidal gümüş ürünleri; iyonik, kolloidal veya nano partiküler formların, serbest ya da bağlı gümüş şekillerini ihtiva ediyor olabilir. Kullanılan gümüşün formu ne olursa olsun bakterisidal etkisini belirleyecek en önemli özellik, serbest kalan gümüş iyonlarının konsantrasyonudur (Navarro ve ark. 2008).

Mevcut literatürler, iyonların Ag-NP'lerden çözünmesinin toksisitede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir; Bununla birlikte, iyonları NP'lerden ayırmak için mevcut değerlendirme metodolojisi, kesin bir toksisite nedeni belirlenmeden önce hala iyileştirme gerektirir (Maurer 2014).

Gümüşün antibakteriyel aktivitesinde, gümüş iyonu salınımının büyük rolü vardır. Gümüş nitrat bileşikler, oldukça fazla serbest gümüş iyonu bırakmaları sebebiyle medikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilirler. Diğer gümüş bileşiklerinin antimikrobiyal etkileri, serbest gümüş iyonu salınımı amacıyla oksitlendiklerinde ortaya çıkar. Birim kütle başına daha yüksek bir yüzey alanı, daha fazla oksitlenmiş gümüş üretecektir (Schaller ve ark. 2004).

Gümüş nanopartiküller (Ag NP'ler), tekstil ve yara sargıları, tıbbi cihazlar ve buzdolapları ve çamaşır makineleri gibi cihazlarda ve antibiyotik ajanlar olarak giderek daha popüler hale gelmiştir. Stensberg ve arkadaşları 2011' de yaptıkları bir çalışmada; Ag NP içeren ürünlerin sayısı 2006' da 30' dan az iken 2011' in başlangıcında 300' ün üzerine çıktığını ve çoğu zaman enfeksiyonun önlenmesi veya deodorantlar olarak bakteriyostatik kaplamalar olarak kullanıldığını, ticari veya endüstriyel ürünlerde kullanılmak üzere yaklaşık 280 ton Ag NP' nin üretildiği ve bu sayının 2015 yılına kadar dört katına çıkacağı tahmin edildiğini bildirmişlerdir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Gümüş nanopartiküller için potansiyel insan ve çevresel maruziyet yolları (Stensberg ve ark 2011).

1.2.1. Tarihte Gümüşün Kullanımı

Gümüş yıllardan beri süt ve su gibi ticari ürünlerin içerisindeki zararlı bakteriler üzerindeki öldürücü etkisiyle bilinmekteydi. Antik Yunan da artırlmış su ve şarapları depolamada kullanılmıştı. 1900' lerin başında Birleşik Devletler' de halk sütlerini taze tutmak için gümüş paralarını sütlerin içerisine atarlardı. Ancak son yıllarda gümüşü çözelti, süspansiyon ve/veya nano partikül formunda bir biyosit olarak kullanılmasında dramatik bir canlanma yaşamıştır.

Gümüşün medikal anlamda da kullanımı da çok eskilere dayanmaktadır. 1884' lerde Alman doğum uzmanı C. S. F. Crede, gonorrhoea olan annelerden doğan bebeklerde, enfeksiyonları önlemek amacıyla göz solüsyonu olarak %1 gümüş nitrat

kullanmıştır (Eisler 1996). Bazı bölgelerde hala, yeni doğan bebekler için gümüş nitrat göz damlası yasal bir gerekliliktir (Chen ve ark. 2008). Birinci dünya savaşında gümüş bileşikleri yara enfeksiyonlarını engellemek amacıyla yaygın olarak kullanılmış, kostik, dezenfektan, antiseptik gibi ürünlerin içinde bulundurulmuştur.

Ancak penisilin ve sefalosporin gibi daha seçici antibiyotiklerin ortaya çıkışıyla gümüşün tıbbi kullanımında azalma olmakla birlikte, ciddi yanık yaralanmalarında gümüş ve sülfat içeren karışımlar (gümüş sulfadiazine krem) standart tedavilerde hala yerini korumaktadır.

Üstünkörü yapılmış tarihi araştırmalar, gümüşü başarılı bir dezenfektan maddesi gibi gösterse de tıptaki kullanım alanları büyüdükçe ve incelemeler arttıkça, karışımlar ortaya çıkmaktadır. Hollinger (1996), farmositik preparatlarda ve cihazlarda gümüşün kullanımı arttıkça, toksik etkilerinin tahmin edilebilir ve beklenebilir olduğunu öngörmüştür.

Gümüşün medikal alanlarda kullanımının temelinde antibakteriyel özellikleri yatmaktadır. Geçmişteki çalışmalar, gümüşün, bakterilere karşı geniş spektrumlu ve etkili bir toksin olduğunu doğrulamaktadır. Stafilokok gibi bakterilerin, antibiyotiklere dirençli hale gelmesiyle modern antibiyotik etkinliğinin kaybedilmesi, açık yara tedavilerinde gümüşün kullanımını arttırmıştır (Lubick 2008).

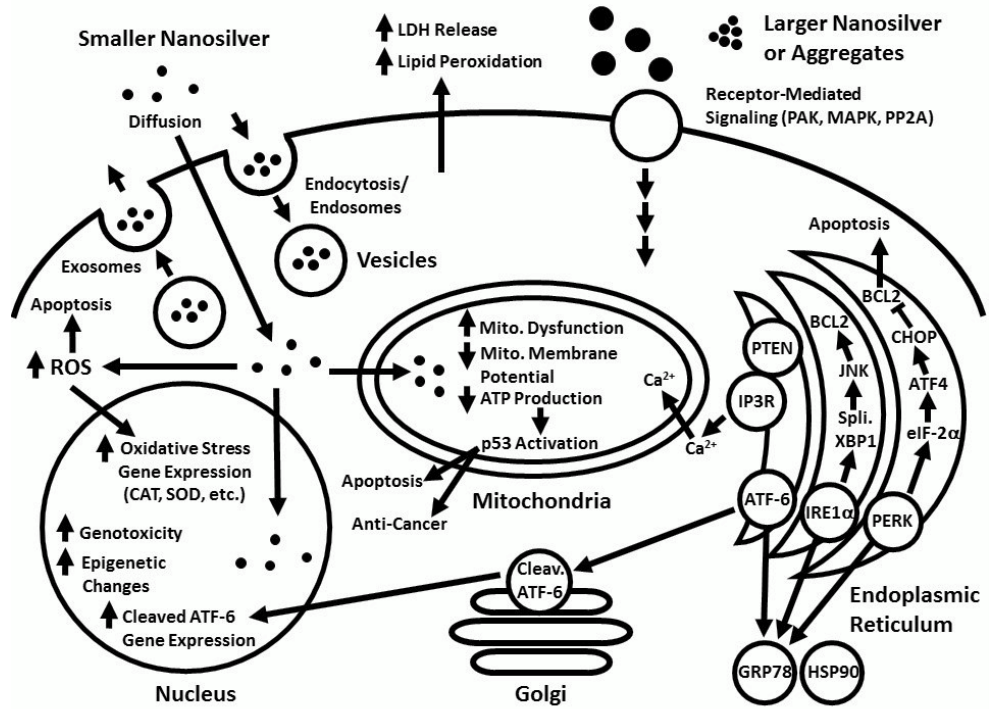
1.2.2. Gümüşün Hücre İçine Alınması ve Etkileri

Gümüş nanopartikülleri oluşturdukları Ag⁺ iyonları sayesinde oldukça reaktif olmasına rağmen, metalik gümüş nispeten reaksiyona girmez. Ayrıca nano partiküllerin mikrobiyal hücrelere etkili şekilde nüfuz ettiği görülmüştür bu da düşük konsantrasyonlarda nano boyuta indirgenmiş gümüş parçacıklarının mikrobiyal kontrol için yeterli olacağını düşündürmektedir. Bu yaklaşım özellikle hücre penetrasyonuna karşı dirençleri nedeniyle antibiyotiklere karşı daha az duyarlı olan organizmalar için, mevcut tedavilere kıyasla daha etkili olabilir. Gümüş nano parçacıklarının bakterilere müdahale ettiği gerçek mekanizma henüz belirsizdir ancak

bazı araştırmacılar, gümüş nano parçacıkların, hücre besin maddesinin taşınmasında rol oynayan enzimleri tahrip ederek, hücre zarı veya hücre duvarı geçirgenliğine zarar vererek, sonuçta hücre ölümüne neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (Sondi ve ark. 2004).

Metalik gümüş, insan dokularının mevcudiyetinde etkisizdir, ancak nem, vücut sıvıları ve salgılarının etkisiyle iyonize olur ve sülfidril grupları ve proteinlerin diğerk aniyonik ligandları, hücre zarları ve doku kalıntıları için güçlü bir afinite gösteren biyolojik olarak aktif olan Ag^+ 'yı serbest bırakır (Lansdown 2010a).

Hücrelerin yüzeyleri ve biyolojik dokuların hücre duvarları, istenmeyen maddelerin hücrenin içine girmesini engelleyen ve temel maddelerin girişini düzenleyen bir zar sistemi ile çevrilidir. İyon taşıyıcıları, metal yükleri ve büyüklükleri ile uyum ve bağ tercihlerine bağlı olarak esas iyonları almak üzere seçici olarak tasarlanan proteinlerdir (Veltman ve ark. 2008).



Şekil 1.2. Nanogümüşün hücre üzerinde stres yaratma yolları (Shana ve ark. 2018).

Endositozis, 100 nm' ye kadar olan materyallerin hücrelere girme sürecidir. Bu, nano parçacıkların hücre içine alındığı olası bir mekanizmadır. Endositoz sırasında, hücreler materyali hücre zarını kullanarak hücre içine alırlar. Üç çeşit endositoz vardır. Fagositozda, zar büyük bir nesne etrafında kıvrılır ve kapatır. Pinositozda, zar, çözülmüş maddeler ve proteinler gibi tek molekülleri sarar. Reseptör aracılı endositoz, spesifik reseptörlerle kaplanmış çukurların içe doğru oluşumunu içerir. Her durumda membran, materyalleri içine alır ve daha sonra hücrenin içine çekilerek vezikül veya endozom oluşturur. Endozomlar, oluşum sırasında seçici olarak bazı maddeleri konsantre edebilir, diğer materyalleri dışarıda bırakabilir veya lizozomlar ile birleşebilirler. Bu mekanizma, vezikülleri parçalamak veya diğer toksik olan materyallere karşı korumak için özel olarak tasarlanmıştır (Schirmer 2014). Toksik maddeler lizozomlar içinde çok yoğunlaşırsa, hücrelere bu toksinler sızmaya başlayabilirler. Endozomlar, hücre içinde belirli işlevleri bulunan, mitokondri, golgi cisimciği ve çekirdek gibi organellere, bazı materyalleri doğrudan sunmak üzere de kullanılırlar. Bir organik nanopartikül ile bu organellerin birleşmesi, bu sistemlerin işleyişini bozabilir (Şekil 1.2.).

Gümüş gibi hayati önemi olmayan metaller, taşıyıcılar tarafından, önemli bir iyonun özelliklerini taklit edecek derecede ele alınırlar. Gümüş iyonları muhtemelen, hücrenin sodyum ve / veya bakır konsantrasyonunu kontrol eden bir taşıyıcı sistem tarafından taşınır (Bury ve Wood 1999).

Partiküler nano gümüşün, deniz ve kara canlılarına, çeşitli memeli hücrelerine toksik olduğu ve hatta insan sağlığına zararlı olabileceği yönünde çeşitli kanıtlar olsa da kuşkusuz ki medikal sahada çok yararlı alanlarda da kullanılmaktadır. Ancak kullanımları tam olarak kontrol edilmelidir (Senje ve Illuminato 2009). Nanogümüşün toksisitesinin diğer bir şartı da biyoyararlılığıdır. Biyoyararlanım, genellikle nanoparçacığın organizmaya nüfuz edebilme kabiliyeti ile tanımlanır; Biyoyararlanılabilirliği olan nanopartiküller, hücrenin işleyiş mekanizmasını bozarak toksisite oluştururlar. Nanopartikülün kendisi de toksisiteye neden olabileceği gibi nanopartiküllerin açığa çıkardığı gümüş iyonları veya salınan gazlar da hücresel işlemleri kesintiye uğratabilirler.

İkinci nakil sistemi ise endositotik sistemdir ki nanoparçacıkların hücrelere girişi için oldukça uygun bir yoldur. Gümüş nanoparçacıklarının büyük bir iyonu, gümüş iyonunun sodyumu taklit ettiğine benzer şekilde taklit etmesi pek olası görünmemektedir (Senje ve Illuminato 2009).

Toksisite, canlı organizmanın aldığı doz veya maruz kalma durumu ile belirlenir. Gümüşün toksik olabilmesi için, bir organizmanın dokularına nüfuz etmesi gerekir. Bu nedenle biyolojik olarak biriken konsantrasyon, bir organizmanın maruz kaldığı gümüş dozunun göstergesidir (Veltman ve ark. 2008).

Gümüşün bakteriler için son derece toksik olduğu iyi bilinmekle birlikte, fitoplankton gibi bitkilerin yanı sıra omurgasızlar ve balıklar için metallerin en toksik maddeler arasındadır. Bununla birlikte, gümüş insanlara veya diğer memelilere karşı özellikle zehirli değildir. Aşağıda gümüşün toksisitesi üzerine etkiler sıralanmıştır:

- Hücre içine alınma kabiliyeti;
- Önemli işlevleri yerine getiren biyolojik bölgelere bağlanma eğilimi;
- Metalin atılma derecesi;
- Metalin hücreler içerisinde toksik olmayan formda sızdırılma derecesi.

Gümüş de dahil olmak üzere metallerin detoksifikasyonu, tüm organizmalarda evrimleşmiş normal bir süreçtir ve muhtemelen, yer kabuğunda doğal olarak bulunan metal iyonlarının varlığının bir sonucudur. Gümüşün insandaki detoksifikasyonu, dokularda gümüş tuzlarının; gümüş klorür, gümüş fosfat ya da gümüş sülfid ile çökelerek oluştuğu ortaya çıkmıştır. Argyria 'lı insanlarda, mavi veya gri renkte cilt renk değişikliği, ultraviyole ışığa maruz kalma sırasında metalik gümüşün foto redüksiyonundan kaynaklanır (Wadhera ve Fung1996).

Nörolojik olarak yapılan klinik ve deneysel çalışmaların iddiasının aksine yayınlanmış literatürlerin kritik analizlerinde, gümüşün beyin ve santral sinir sistemine emiliminin olmadığı ve ne kan-beyin bariyerini ne de kan-serebrospinal sıvı bariyerini herhangi bir türde geçtiğini kanıtlayan sağlam kanıtlar yoktur. Sigara kullanımını caydırmak amaçlı kullanılan acı bir tadı andıran gümüş asetatın kullanımı güvenli ve

efektiftir. Diğer yandan Westhofen ve Schafer bir vakada, generalize argyrosis ile birlikte ilerleyici tat ve koku duyularında düzensizlik, vertigo ve hypesthesia eşlik ettiğini ortaya koymuşlardır (Lansdown 2010a).

Gümüş sülfür ve gümüş klorür granülleri, bazal membran olarak adlandırılan ve hücrelerin dışında, birçok organın yüzey hücrelerinin altında bulunan bağ dokusunun ince katmanında yer alırlar. Bir beyaz kan hücresi olan makrofajlar da gümüşün hücrelere nüfuz etmesini önler (Baudin ve ark. 1994).

Gümüş stabil bir mineral olarak depolamadan önce, büyük oranda sülfhidril grupları içeren proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin en yaygın olanı, metal spesifik bağlanma proteinleri olarak adlandırılır. Bu proteinler daha sonra granüler halde depolanmış materyallerin etrafında toplanır ya da lizozomlar tarafından kaplanırlar; veziküller genellikle vücuda yabancı maddeleri zararsız formda tutmak veya indirgemek için kullanılır. Gümüş tortuları, periferik sinirlerin ve kan-beyin bariyerinin yakınında görülebilir, ancak bu tortuların, sinir dokusunun önemli membranları üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu düşünülmemektedir (Lansdown 2007). Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksinler, lizozomların parçalanmasına ve toksinlerin sızmasına sebep olur. Karaciğer metallothioneinler gibi detoksifiye proteinlerin sentezi için önemli bir organdır ve bu da gümüşün bu organa kuvvetli bir şekilde birikme eğiliminde olmasının nedeni olabilir. Sindirim sisteminin bazal mebranlarında da yüksek muhafaza gücü ve ortadan kaldırma kapasitesi sebebiyle yüksek gümüş konsantrasyonlarına rastlanabilir (Baudin ve ark. 1994).

Gauger ve ark. (2003), bir kolunda gümüş kaplı bir tekstil ile, diğerinde pamuklu tekstil ürünü olan 15 hastanın sonuçlarını 7 gün boyunca karşılaştırmış, çalışmanın sonunda, gümüş kaplı tekstil ile temasta olan kollarında çok düşük miktarda stafilokok bakterisine rastlamışlardır. Bunun gibi birçok çalışma yapılmış olsa da gümüş toksisitesinin doz bağımlı karakteristik bulguları henüz tam olarak ortaya konulamamıştır.

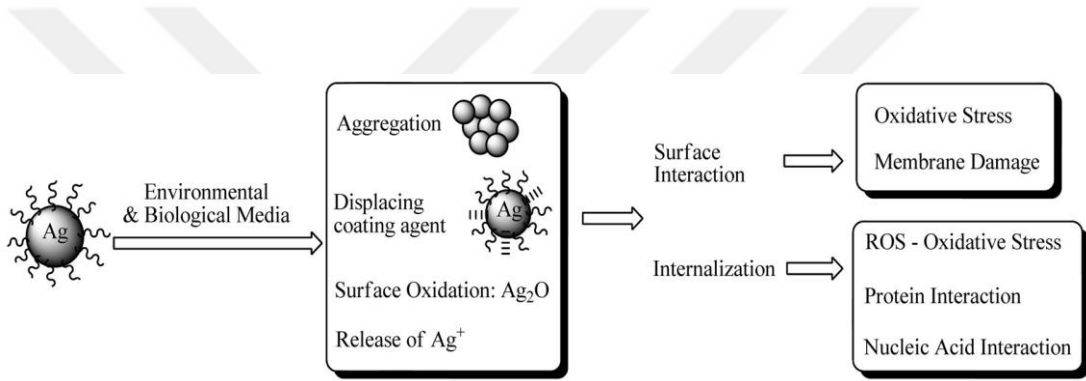
Gümüşün bakteriler için toksik hale geldiği konsantrasyonla ilgili dikkatle incelenmemiş olup mevcut deneysel veriler arasında değişkenlik görülmüştür. Örneğin, patojen bir bakteri olan *Staphylococcus aureus*' un verilen dozda gümüşe

tepkisine ilişkin, iki benzer çalışma yapılmış, 8 ila 80 ppm arasında değişen eşik değerinde toksik etkiler görülmüştür (Chopra 2007). Başka bir patojen bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan iki başka araştırmada, gümüş iyonu için 8 ila 70 ppm arasında benzer toksisite görülmüştür. Bakteri kolonisinin doğası da gümüşün etkinliğini değiştiren faktörlerdendir. Bjarnsholt ve ark. (2007), bakteri biyofilmini yok etmek için gerekli olan gümüşün bakterisid konsantrasyonunun, serbest yaşayan bakterileri yok etmek için kullanılan 10 ile 100 kat daha yüksek olduğunu ve mevcut kullanılan yara bandajlarındaki gümüş konsantrasyonunun bakteriyel biyofilm ile enfekte olmuş kronik yaraların tedavisi için çok düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Gümüşün farklı salınımları, farklı gümüş formülasyonları da gümüş toksisitesini etkiler (Brett 2006, Chopra 2007).

Chen ve arkadaşları (2008), 15 nm (AgNPs15), 50 nm (AgNPs50) ve 100 nm (AgNPs100) olmak üzere üç farklı karakteristik boyutta AgNP' leri kullanarak, balık kırmızı kan hücrelerinde nanogümüşün boyut bağımlı nano toksisitesini incelemişlerdir. Optik mikroskopi ve transmisyon elektron mikroskobu gözlemleri, AgNP' lerin RBC' ler tarafından adsorpsiyon ve alımında büyük bir etki gösterdiklerini göstermiştir. Hemoliz, membran hasarı, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim üretimine bağlı olarak belirlenen toksik etkilerin açıkça büyük ve doza bağımlı olduğunu, özellikle, en küçük boyutlu AgNPs15' ün AgNPs50 ve AgNPs100' den daha fazla hemoliz ve membran hasarı indüklemeye yeteneği sergilediğini saptamışlardır.

Gümüşün biyosidal etkisinin arkasındaki mekanizmalar, enzimler ve proteinlerdeki tiol (sülhidril, -SH) gruplarının etkileşimiyle ilgilidir. Gümüş, böyle bir ligan ile proteine bağlandığında, o proteinin normal işlevlerini etkiler. Hücrelerin solunumu ve membranlardan elektron taşınması, sülhidril grubu enzimlerinin desteklediği iki fonksiyona örnek olabilir. Gümüş, aynı zamanda, DNA sarmalına müdahale ederek DNA replikasyonunu da inhibe eder. Gümüş, bakterilerin solunum yeteneğini ve önemli iyonların hücre içindeki dengelerini muhafaza ederek yaşam için uygun bir iç ortamı koruyan hücre duvarı üzerinde oksidatif stres oluşturarak, büyümeyi inhibe eder, solunum ve metabolizmayı bastırır; hücre potasyumunu kaybeder ve önemli kimyasalların hücre zarı içine ve dışına taşınması baskılanır (Hwang ve ark. 2007).

Nanogümüşün toksisitesi, biyolojik ve çevresel değişimler, yüzey oksidasyonu, gümüş iyonu salınımı ve biyolojik makro moleküllerin etkileşimiyle yakından ilişkilidir. Nanogümüş partikülleri membran (zar) proteinleri ile etkileşime girebilir ve hücre çoğalmasının inhibisyonuna yol açan sinyal yollarını aktive edebilir. Nanogümüşün en önemli toksisite mekanizmalarından biri gerek iyonik gerekse nano gümüşün sülfür içeren protein grupları gibi büyük makro moleküllere affinitesinin olmasıdır. Nanogümüş partikülleri, hücre içindeki difüzyon veya endositoz yoluyla hücre içine girebilir, mitokondriyal disfonksiyona, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretilmesine, hücre içindeki proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir ve son olarak hücre çoğalmasının inhibisyonuna neden olur (şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Biyolojik ve çevresel ortamlarda nanosilverin akıbeti ve toksisitesi (McShan ve ark. 2014).

Nanogümüş partikülleri, difüzyon veya endositoz yoluyla hücre içine girerek mitokondriyal disfonksiyona ve Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretilmesine sebep olarak hücre içindeki proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir ve son olarak hücre çoğalmasının önlenmesine neden olur. ROS oluşumu hücrel anti-oksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında oksidatif stres oluşur. Glutasyon ve sülfidril bağlı protein gruplarındaki tükenme ve antioksidan enzimlerdeki değişiklikler ile lipid peroksidasyonunun görülmesi, oksidatif hasarın birer işaretidir. (McShan ve ark. 2014).

Khan ve arkadaşları (2011), yaptıkları bir çalışmada nanogümüşün beş tür bakteri ile etkileşimini incelemişler ve nanogümüşün bakteriyel yüzey üzerindeki emilimini veya ekstraselüler proteinlerle etkileşiminin pH, zeta potansiyeli ve NaCl konsantrasyonuna bağlı olduğunu bulmuşlardır.

Kruszewski ve arkadaşları (2013), son zamanlarda yaptıkları bir çalışmada hepatoselüler karaciğer karsinomu (HepG2), insan akciğer karsinomu (A549) ve insan kollateral adenokarsinomu (HT-29) üzerine incelemede bulunmuşlardır. Bütün hücrelere, sırasıyla 10, 50 ve 100 ug / mL' de 2 veya 24 saat boyunca 20 nm veya 200 nmnanogümüş verilmiş bunun sonucunda nanogümüş emiliminin Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkışıyla paralellik gösterdiği ortaya konmuştur. HT29' daki birikim, A540 ve HepG2 hücrelerinden daha düşüktür; bu da, daha yüksek nano madde alımına sahip hücrelerde artan ROS üretimini göstermiş ve çalışmacılar HT-29 hücrelerinin ürettikleri münin sayesinde daha az nanogümüş tutulumuna sahip olduğu sonucuna varmışlardır (Kruszewski ve ark. 2013).

Kliniksel ve deneysel çalışmalar gümüşün emilim ve atılımında karaciğeri birincil organ olarak gösterse de bunun tersi olarak argyriyalı veya kan gümüş seviyesi > 200 µg olan hastalarda bile metabolizma enzimlerindeki geçici değişiklikler dışında gümüşün karaciğerde kalıcı patolojik değişikliklere sebep olduğunun bir kanıtı yoktur. 30 sağlıklı hastaya 20 gün boyunca günlük uygulanan 50 mg gümüş, kandaki fosfolipit, trigliseritler, kolesterol, glisemi ve ilgili enzimlerdeki geçici artışlara yol açmış, ancak dokuda fonksiyonel değişiklikler oluşmamıştır (Lansdown 2010b).

İn vitro çalışmaların çoğu, yüksek dozda gümüşün daha yüksek hücresel toksisiteyi tetiklediği doz bağımlılığını göstermektedir. İn vivo araştırmaların aksine, nanopartiküllerin in vitro konsantrasyonları genellikle çok daha yüksektir ve partiküller, kültür ortamı yoluyla hücrelere verilir (Stebounova ve ark. 2011).

Gümüşün sistemik toksisite yaratmasının tek yolu gümüşe doğrudan maruz kalmak değildir. Hollinger (1996), tıbbî uygulamalarda gümüşün gittikçe yaygınlaşmasıyla gizli toksik etkilerin ortaya çıkmaya başlayacağını öngörmüş, gümüşün dolaşım sistemine alımının (örn., oral yolla veya deride yara yoluyla) etkilerinin daha kapsamlı araştırılmasını, ayrıca, gecikmiş yara iyileşmesi ve spesifik

organlarda olası lokal gümüş toksisite üzerindeki etkilerin de dikkate alınmasını önermiştir.

Gümüş nanopartiküllerinin yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, insan hücreleri ve ortamları üzerindeki biyolojik etkileri hakkında hala bilgi eksikliği vardır. Bazı yazarlar bakteri ve memeli hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre sistemlerinde AgNP' lerinin potansiyel toksisitesini araştırmışlardır. Bu tür çalışmalar, AgNP' lerin sitotoksitesini, nanoparçacıklardan Ag iyonlarının çözülmesi veya salınması, hücre membran bütünlüğünün bozulması, oksidatif stres, protein veya DNA bağlama ve hasarı, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve apoptotik hücre ölümü gibi farklı mekanizmalara bağlamışlardır. Toksik mekanizma, yüzey alanı, ebat ve şekil, kapak oluşturucu madde, yüzey yükü, parçacık saflığı, yapısal bozulma ve bireysel parçacıkların biyoyararlanımı gibi nanopartiküllerin özelliklerine de bağlıdır (Bressan ve ark 2013).

Hücre toksisitesinin mekanizması, bakteriler üzerindeki toksisiteye benzerlik göstermekte, tipik hücre metabolizması için gereken enerji depolarını boşaltarak, DNA sentezini etkileyerek gerçekleştirmektedir. Atiyeh ve ark. (2007) gümüş bileşiklerinin yaranın iyileşme sürecini geciktirdiği ve konakçı hücreler üzerinde ciddi sitotoksik aktiviteye sahip olabileceği sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte aynı literatürü, gümüşün hem yara enfeksiyonu kontrolü hem de yara iyileşmesi açısından çelişkili olarak tanımlamışlardır. Brett (2006), bu tür etkilerin, gümüşün yanık vakalarında uzun süredir başarılı bir şekilde kullanılmasıyla tutarlı olmadığını vurgulamıştır. Atiyeh ve ark. (2007), "antimikrobiyal aktivite ile hücrel toksisite arasındaki pratik terapötik denge" nin yakalanmasının mevcut bilgi düzeyinde zor olduğunu ileri sürmüş, sonuç olarak enfeksiyon kontrolünün, konakçı hücre sitotoksitesini üzerinde üstün bir profile sahip bir ürün olarak devam ettiği" sonucuna varmıştır.

1.3. TOKSİSİTE

Canlı organizmalara zarar veren mineral, bitkisel, hayvansal ya da sentetik maddelere toksik madde ve bu maddelerle organizmanın geçici ya da sürekli olarak bozulmasına yani toksik etki oluşturmaya toksisite (zehirlenme, intoksikasyon) olarak tanımlanır (Kaya 1995).

Toksikoloji, profesyonel çalışma alanını, tanımlayıcı, mekanistik ve düzenleyici olarak üçe ayırmıştır. Bunlardan mekanistik toksikoloji, canlı organizmalar üzerinde kimyasalların toksik etkileri olduğu hücresel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları tanımlamak ve anlamakla ilgilidir. Risk değerlendirmesinde, mekanik veriler laboratuvar hayvanlarında gözlemlenen olumsuz bir sonucun insanlarla doğrudan ilişkili olduğunu göstermede çok yararlı olduğu gibi, mekanik veriler aynı zamanda daha güvenli alternatif kimyasalların tasarımı ve üretiminde ve kimyasal zehirlenme ve hastalığın tedavisi için rasyonel tedavide de yararlıdır. Tanımlayıcı toksikolojide, güvenlik değerlendirmesi ve düzenleyici gereklilikler için bilgi sağlayan toksisite testi ile doğrudan ilgilidir. Deney hayvanlarında uygun toksisite testleri, belirli kimyasallara maruz kalmak suretiyle insanlara ve çevreye verilen riskleri değerlendirmek için kullanılacak bilgileri vermek üzere tasarlanmıştır. Düzenleyici toksikoloji ise, tanımlayıcı ve mekanistik toksikologlar tarafından sağlanan verilere dayanarak, bir ilacın veya başka bir kimyasalın belirtilen bir amaç için pazarlanması için yeterince düşük bir risk oluşturup oluşturmadığına karar verme sorumluluğuna sahiptir (Eaton ve Gilbert 2008).

Organizmanın normal metabolizması için gerekli olmayan çeşitli yollarla dışarıdan alınan ilaçlar dahil tüm yabancı maddelere ksenobiyotik denir. Tüm ksenobiyotiklerin biyolojik sistemlerde oluşturdukları olumsuz etkilere toksik etki denir. Ksenobiyotiğin toksik etki oluşturmaya ise toksisite olarak ifade edilir. Toksikoloji bu ksenobiyotiklerin etkileri ile ilgilenir. Ancak canlı organizma için endojen olan maddeler (hormonlar, bazı aminoasitler gibi veya vücut için gerekli ekzojen kaynaklı maddeler de, vitaminler, yemek tuzu gibi) yüksek dozlarda toksik etki gösterirler ve bu nedenle toksikolojinin araştırma alanına girerler. Toksikoloji,

kimya, farmakoloji, fizyoloji, biyokimya, anatomi ve diğer birçok alanda geniş bir uzmanlık gerektiren çok geniş bir disiplindir (Kaya 1995).

Tüm ksenobiyotikler uygun yol ve uygun dozda canlı organizmaya verildiğinde toksik etki oluşturma potansiyeline sahiptir. Toksik etkinin meydana gelmesi için önce bir yoldan vücuda alınması ve oradan absorbe olması gerekmektedir. Meydana gelen toksik etkinin şiddeti, organizmada etki yerine ulaşan madde miktarına bağlıdır (Kaya 1995).

Bir zehrin veya toksik maddenin tanımı aynı zamanda kalitatif bir biyolojik yönü de içerir, çünkü bir tür veya bir genetik suş için toksik olan bir bileşik bir diğerine nispeten zararsız olabilir. Toksisitenin ölçümü de karmaşıktır. Toksikite akut veya kronik olabilir ve yaş, genetik, cinsiyet, diyet, fizyolojik durum veya organizmanın sağlık durumu ile birlikte bir organdan diğerine farklılık gösterebilir (Hodgson 2004).

1.3.1. Toksikite Oluşumunu Etkileyen Faktörler

1.3.1.1. Temas Yolu

Toksik maddelerin vücuda giriş yolları oral, inhalasyon, dermal ve paranteral yollardır. Toksik maddeler genel olarak en hızlı etkiyi ve en hızlı cevabı intravenöz yol ile vücuda alındıklarında meydana getirirler (Kaya 1995).

Diğer giriş yolları için sıralama şu şekildedir: inhalasyon > intraperitoneal > subkutan > intramuskuler > intradermal > oral > dermal.

Kimyasalların taşıyıcı maddeleri (kimyasalın çözüldüğü malzeme) ve diğer formülasyon faktörleri, yutulma, inhalasyon veya topikal maruziyet sonrası emilimi belirgin şekilde değiştirebilir. Ek olarak, uygulama yolu ajanların toksisitesini etkileyebilir. Örneğin, karaciğerde detoksifiye edilen bir maddenin inhalasyon yoluyla verildiği zamana kıyasla oral yolla verildiğinde daha az toksik olması beklenir (Eaton ve Gilbert 2008).

1.3.1.2. Temas Süresi ve Sıklığı

Toksik maddeye maruz kalma süresi ve sıklığına bağlı olarak;

- a) Akut zehirlenme
- b) Subakut zehirlenme
- c) Subkronik zehirlenme
- d) Kronik zehirlenme

Birçok ajan için, tek bir maruziyetin ardından oluşan toksik etkiler, tekrarlanan maruziyetle üretilenlerden oldukça farklıdır (Eaton ve Klaassen 2001).

1.3.1.2.1. Akut Zehirlenme

Akut zehirlenme, ksenobiyotiğin toksik dozuna bir kere veya 24 saatten az bir süre içinde birçok kere maruz kalma sonucu görülür. Akut maruz kalma sonucu maddeye ait akut zehirlenme belirtileri kısa bir süre içerisinde ortaya çıkar. Bu durum için bazı istisnai durumlardan da söz etmek mümkündür. Radyasyona akut maruz kalma sonucu karsinogenik etki maruziyetten yıllar sonra ortaya çıkabilir. Bu şekilde akut maruziyete rağmen toksik etkinin sonradan görülmesine gecikmiş akut toksik etki denir. Maddelere ait akut zehirlenme belirtileri 24 saatlik temas testleri ile belirlenir (Kaya 1995).

Akut sistemik toksisite, tek bir doz bileşiğin, tipik olarak sıçanlara ve farelere, oral, dermal veya inhalasyon yoluyla uygulanmasıyla değerlendirilir. Farmasötikler için, bu çalışmaların ana amacı, (gecikmiş toksisite dahil) doğanın ve herhangi bir akut toksik cevabın süresini belirlemektir. Ayrıca, öldürücü olmayan maksimum dozu da belirler ve insanlarda tek maruziyet veya aşırı dozaj ile ilgili ön bilgi sağlar (Anonim 2018).

1.3.1.2.2. Subakut Zehirlenme

1 ay veya daha az süre içerisinde toksik etki oluşturabilecek miktarda toksik maddenin organizmaya girmesi ile oluşan zehirlenmeye subakut zehirlenme denir. Pestisitlerin özellikle organik fosforlu inseksitlerin tarımda uygulanması sırasında bu tip zehirlenme olaylarına rastlanır. Subakut zehirlenme belirtileri akut zehirlenme belirtilerine çok benzerdir. Subakut zehirlenme belirtileri, 14 veya 28 günlük temas testleri ile saptanır (Kaya1995).

1.3.1.2.3. Subkronik Zehirlenme

Ksenobiyotiğe temas süresi subakut ile kronik süre (1-3 ay) arasındadır. Zehirlenme belirtileri ve toksik etki şekli kronik zehirlenmeye daha yakındır. Subkronik zehirlenme belirtileri 90 günlük temas testleri ile saptanır (Kaya1995).

Subkronik sistemik toksisite, bir test numunesinin 90 güne kadar tekrarlanmasından veya sürekli uygulamasından veya hayvan ömrünün %10' unu geçmemesinden sonra meydana gelen olumsuz etkiler olarak tanımlanır (Jong ve Geertsma 2012).

1.3.1.2.4. Kronik Zehirlenme

Organizmada birikme özelliğine sahip olan toksik maddelere 3 ay veya daha uzun sürede maruz kalma sonucu ortaya çıkan zehirlenmelerdir. Genel olarak bir maddenin organizmadan atılım hızı absorpsiyon hızına göre daha yavaş ise bu madde organizmada birikebilir yani kümülatif özellik gösterir. Kronik zehirlenme endüstride kimyasal maddelere maruz kalan işçiler için önemlidir. Kronik zehirlenme sonucu birçok meslek hastalıkları (benzolizm, silikozis, plumbizm) oluşmaktadır. Ayrıca çevre kirleticilerine (hava, su, besin maddelerindeki), DDT, klorobifeniller, kurşun, civa ve kadmiyum gibi kümülatif zehirlerle görülen kronik zehirlenmeler ise

epidemiyoloji ve halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Kronik zehirlenmelerde başlangıçta bazen akut zehirlenme benzeri ancak daha hafif şiddette belirtiler ve uzun dönem sonunda maddeye ait kronik zehirlenme belirtileri görülmektedir. Toksik maddelerin akut zehirlenme belirtileri ile kronik zehirlenme belirtileri birbirinden oldukça farklıdır. Örneğin akut benzen zehirlenmesinde başlıca toksik etki, santral sinir sisteminin depresyonu iken kronik benzen zehirlenmesinde ortaya çıkan başlıca toksik etki lösemidir (Eaton ve Gilbert 2008).

Uzun süreli veya kronik maruziyet çalışmaları, maruz kalma süresinin 3 aydan uzun olması dışında subkronik çalışmalara benzer şekilde gerçekleştirilir. Kemirgenlerde, genellikle kronik maruziyet çalışmaları genellikle 6 ay ile 2 yıldır. Kemirgenler dışında yapılan çalışmalarda genellikle 1 yıl veya daha uzun olabilir (Errill 1996).

1.3.1.3. Doz

Biyolojik bir sistemde zehir, canlıya zararlı bir tepki üretebilen, fonksiyon bozukluğuna yol açan ve canlıyı lme götürebilecek ajan olarak tanımlanabilir ancak bu tanım bilinen her kimyasalın, yeterli miktarda mevcutsa, yaralanma veya lme sebep olma potansiyeline sahip olmasının çok basit bir nedeni için yararlı bir çalışma tanımı değildir (Eaton ve Curtis 2008).

Doz toksisiteyi belirleyen temel faktördür. Uygun dozda kullanılmadığı takdirde her madde zararlı, olumsuz etkiler meydana getirebilir. Ksenobiyotiklerin geniş bir doz spektrumunu vardır. Bu nedenle toksik etki oluşturma potansiyelleri birbirinden farklıdır. Genel kural olmasa da büyük lde toksisiteyi doz belirler. Bir maddenin ne kadar toksik olduğunu ifade etmek için yani toksisite derecesini ifade etmek için *akut toksisite letalite* birimi olan ifadesi kullanılır. LD50 (Letal Doz 50) solunum yolu dışında diğer tüm yollarla organizmaya girerek etki gösteren katı veya sıvı haldeki kimyasal maddelerin belirli koşullarda bir kez verildiğinde bir gruptaki deney hayvanlarının %50' sini öldüren dozu ifade eder ve bu değer mg/kg olarak belirtilir. LD50 tayini için organizma maddeye hangi yol ile giriyorsa o yoldan deney

hayvanlarına uygulanması daha stabil sonuçların elde edilmesine olanak sağlar. Veriliş yoluna göre maddenin LD50 değeri farklılık gösterebilir (Çizelge 1.2.). LD50 değeri maddelerin toksik etki oluşturma potansiyellerini karşılaştırmayı sağlar ve bu ifade ile bir maddenin hangi dozlarda zararlı olduğunu da anlamak mümkündür. LC50 (Letal Konsantrasyon 50) solunum yolu ile vücuda girerek etkisini gösteren maddelerin akut toksisite ölçüsünü tanımlar. Belli koşullarda solunum yolu ile vücuda girdiğinde bir gruptaki deney hayvanlarının %50' sini öldüren konsantrasyondur ve birim olarak ppm veya mg/mm³ olarak ifade edilir.

Çizelge 1.2. Bazı Kimyasal Maddelerin İnsan ve Kemirgenlerdeki Letal Doz Değerleri (Saygı 2003)

Madde	İnsan için letal doz	Sıçan	Fare LD50	Tavşan LD50
Lindan	840 mg/kg	125 mg/kg	-	130 mg/kg
Kafein	192 mg/kg	192 mg/kg	620 mg/kg	-
Borik asit	640 mg/kg	2660 mg/kg	3450 mg/kg	-
Amital	43 mg/kg	560 mg/kg	-	575 mg/kg

Kimyasallar ve canlı sistemler arasındaki etkileşimler belirli safhalarda görülür. Birincisi, canlı organizmanın bir şekilde kimyasala maruz bırakıldığı ve bu kimyasalın organizmaya alınması veya emilmesinin takip edilebileceği maruz kalma aşamasıdır. Kimyasalın organizmada dağılmış olduğu bir sonraki evreden önce gelir. Bu iki evrenin de gerçekleşebilmesi için bir transport sistemine ihtiyaç vardır. Kimyasalın organizmanın çeşitli bölgelerine ulaşmasından sonra gelen evre enzimlerin aracılığıyla metabolizma olduğu evredir. Bu safhalar bazen toksikokinetik olarak adlandırılırken, sonraki safha kimyasalın ve metabolitlerinin organizmanın bileşenleri ile etkileşime girdiği toksikodinamik fazdır (Timbrell 2008).

1.3.2. Toksikokinetik

Hayvana veya çevreye özgü birçok faktör, toksik maddelerin tanımlanmış deney koşulları altında belirlenen toksisite değerini değiştirebilir. Bileşiklerin toksisitesi maruz kalma yoluna göre değişkenlik gösterebilir. Toksik maddelere en genel görülen maruz kalma yolları ağız, solunum, damar içi, periton içi olarak gözlenmekle birlikte bunlardan toksik etkinin en fazla görülenleri damar içi ve periton içi olanlarıdır. Klinik veteriner toksikolojide ise oral ve dermal yolla maruz kalınma çok sık görülür ve bunun sonucu olarak toksik maddenin emilimi ve yayılımı daha uzun sürmektedir. Günlük toksik dozun gıdayla birlikte alınması, tek seferde yoğun miktarda alınmasıyla kıyaslandığında daha düşük etki göstermektedir. Bununla birlikte enterohepatik dolaşımı da içeren gastrointestinal dolaşım ve derideki dolaşım toksik maddeye maruz kalma süresini anlamlı derecede uzatmaktadır. Bileşiklerin toksik etkileriyle ilgili vurgulanması gereken diğer konu ise organlarda yarattığı hasardır (Gregus 2008).

Maruz kalma derecesine göre (Doz), etkilenen hücrelerin sayısı, dokulardan, tüm organın bulunduğu noktaya kadar artar veya biyokimyasal veya morfolojik olarak değiştirilir. Önceden metabolize edilmeden hücrelerde doğrudan etkileri olan nispeten az madde vardır. Önceden metabolizma olmaksızın aktif olanlar genellikle doğal olarak reaktiftir veya hücre membranında veya hücrenin kendisinde spesifik reseptörlerde aktiviteye sahiptir. Aşındırıcı maddeler, hücrenin dışından hareket etme eğilimindedir ve birçok hücrenin ölümüyle sonuçlanan geniş etkilere sahip olsalar da toksik maddelere hücre içinde veya hücre zarında farklı şekilde etki eden yaygın etkilere sahiptir (Woolley 2008).

Zehirlerin, uygulandıkları yerden biyolojik zarları geçip sistemik dolaşıma geçmeleri emilme olarak tanımlanır. Normal olarak zehirler vücuda sindirim, solunum ve deri yoluyla girerler; ama bir sağaltım sırasında ya da deneysel olarak parenteral yollarla da girebilirler (Eaton ve Gilbert 2008).

Tüm hücrelerde bulunan plazma zarı benzer özellik gösterir; yaklaşık 70Å kalınlıktaki bu zar protein moleküllerini 2 yandan kuşatan lipid tabakasından yapılmıştır. Zardaki lipid kısım daha ziyade lesitin, sefalin ve kolesterolden ibarettir. Herhangi bir maddenin bu yapıdaki biyolojik zardan geçişi dağılım katsayısı (yağdaki çözünürlük/ sudaki çözünürlük) ve iyonlaşma oranıyla yakından ilişkilidir. İyonize maddeler zarlardan zor geçerken, suda kolay çözünen bileşenler fosfolipid yapıdaki zarları zar zor aşarlar. İlaçlarda olduğu gibi zehirlerin biyolojik zarlardan geçişinde de basit difüzyon, etkin taşıma, kolaylaştırılmış difüzyon ve endositoz (pinositoz) olayları rol oynar (Timbrell 2008).

Sindirim kanalı mukozası zehirli maddelerin emilip dolaşıma geçmelerinde en önemli yolu oluşturur. Sindirim kanalının tüm kısımlarında emilim olursa da bunun en çok gerçekleştiği yer ince bağırsaklardır. Gevişenlerde rumen ve retikulum, köpeklerde mide ve gevişenler dışındaki ot yiyicilerde kalın bağırsaklardan da emilim olur. Sindirim kanalındaki içeriğin tabiatı bir zehirin emilmesinin ve sonuçta etkisinin değişmesine yardımcı olur. Özellikle etçillerde mide asiti başlangıçta çözünmez durumdaki maddelerin çözünebilirliğini ve böyle emilirliğini artırır. Mide içeriği asidik ve bağırsaklarda bazik olduğundan, herhangi bir maddenin yağdaki çözünürlüğü bakımından bu iki kısım arasında farklılıklar vardır. Yani zayıf asidik bileşikler mideden ve bazik olanlar ise bağırsaklardan daha kolay emilirler.

Genel olarak, yeni bir kimyasal üzerinde gerçekleştirilen ilk toksisite testi, tek bir maruziyetin uygulanmasından belirlenen akut toksisitedir. Akut toksisite testlerinin yapılış amaçlarında; genellikle yaklaşık ölümcül doz olarak ifade edilen maddenin (örn. LD50), gerçek toksisitesinin tahmin edilmesini sağlamak, hedef organlar ve diğer klinik bulguları hakkında bilgi sağlaması, türler arasındaki farklılıkların ve duyarlı türlerin saptanması, toksik etkinin geri dönüşümünün saptanması, uzun süreli çalışmaların planlanması ve doz seçimini sağlamak.

LD50 ve diğerk akut toksik etkiler, bir veya daha fazla türdeki bir veya daha fazla uygulama yolundan (oral yoldan veya hedeflenen maruz kalma yolundan) sonra belirlenir. En çok kullanılan türler fare ve sıçan olmakla birlikte, çalışmalar yetişkin erkek ve dişi hayvanlarda yapılır. Tek bir dozdan sonra 14 günlük bir sürede ölen hayvanların sayısı tablo haline getirilir. Mortalite ve ağırlığa ek olarak, test hayvanlarının günlük muayenesi, zehirlenme, uyuşukluk, davranışsal değışiklikler, morbidite, gıda tüketimi ve benzeri belirtiler için yapılmalıdır.

LD50'nin belirlenmesi, laboratuvar hayvanlarının refahı ve korunmasına yönelik artan endişeler nedeniyle bir kamu konusu haline gelmiştir. LD50 biyolojik bir sabit değildir. Birçok faktör toksisiteyi uyarır ve bu nedenle herhangi bir çalışmada LD50'nin tahminini değıştirebilir. Hayvanların türü, yaşı ve ağırlığı, yem türü, ön deneme açılma süresi, uygulama yöntemi, süspansiyon ortamının hacmi ve türü ve gözlem süresi gibi faktörlerin, toksik maddelere karşı olumsuz tepkileri etkilediğı gösterilmiştir (Errill 1996)

1.3.3. Zehirlenme Tipleri ve Zehirlerin İstenmeyen Yan Etkileri

Kimyasalların istenmeyen yan etkilerinin spektrumu oldukça geniş olmakla birlikte bazı kimyasalların zararlıyken bazısı değildir. Örneğın, bir kimyasal ya da ilaç birçok etki oluştururken bunlardan sadece bir tanesi istenen etki olarak tanımlanırken diğerkleri kimyasalın yarattığı yan etki olarak adlandırılır (Eaton ve Gilbert 2008).

Zehirlenmeler alınan zehir miktarı ve süresine göre klinik olarak perakut, akut, subakut ve kronik olarak ayrılır. Bu süreler şüphesiz zehirli maddelerin yol açacağı yalın zehirli etkiler, alerjik tepkimeler (aşırı duyarlılık tepkimeleri) ve idiyosinkratik tepkimelerin klinik olarak ortaya çıkmaları için geçmesi gereken süreleri ifade eder. Zehirli maddelerin etkileri, ayrıca yerel ve sistemik etkiler; dönüşümlü ve dönüşümsüz etkiler diye de ayrılır (Kaya 1995).

1.3.3.1. Yalın Zehirli Etkiler

İlaç ve benzeri maddelerin yalın zehirli etkileri genellikle kullanılan miktarlarına bağlı olarak ortaya çıkan ve farmakolojik etkilerinin şiddetlenmiş şekliyle kendilerini gösterirler; oluş biçimi farmakolojik etki biçiminin hemen hemen aynıdır. Yalın zehirli etkiler; Görevsel, Yapısal ve Özel zehirli etkiler olarak 3 grupta incelenir (Kaya 1995).

1.3.3.1.1.Görevsel Zehirli Etkiler

Bu esasta, ilaçların doz fazlalığında olduğu gibi, beklenen veya öngörülen etkilerin şiddetlenmiş ya da abartılmış şekilde ortaya çıkması durumudur. Örn. sitrikinin gibi MSS uyarıcıları ile bu sistemin şiddetli derecede uyarılması, organik fosforlu bileşiklerle zehirlenmelerde ter, tükürük salgısı artışı, kas seyirmeleri ve depolarizasyonlu felç gibi (Kaya 1995).

1.3.3.1.2. Yapısal Zehirli Etkiler

Zehirli maddelerin doku veya hücre düzeyinde yol açtığı hasarla ortaya çıkan etkilerdir. Burada maddenin kendisi etken olabileceği gibi biyotransformasyonu (BT) sırasında veya sonucu ortaya çıkan etkin metabolitleri de etken olabilmektedir. Etkin ara ürünler (epoksitler, N-oksitler vb) hücrelerde çeşitli büyük moleküllere (enzimler, DNA, RNA gibi) sıkıca bağlanarak onlarda biyokimyasal değişikliklere ve sonuçta organik bozukluklara kadar gidebilen görevsel, biyokimyasal bozukluklara sebep olabilirler. Vücutta, zehir ve benzeri maddelerin BT' u ve atılmasında karaciğer ve böbrekler yapısal bozukluklara maruz kalan en önemli iki organdır. Bunları sindirim kanalı, kemik iliği, sinir sistemi, kollajen doku, damar endoteli, epitelyal doku, tiroid bezi gibi yapılar izler (Kaya 1995).

1.3.3.1.3. Özel Zehirli Etkiler

İlaç, zehir veya etkin metabolitlerin hücre çekirdeğinde DNA' ya etkileri sonucu gelişen Mutajenik, Karsinojenik ve Teratojenik etkiler özel zehirli etkiler başlığı altında incelenir. İlk iki etkide DNA molekülünde kalıcı hasar ve bozukluk bulurken, sonuncusu DNA'daki bozukluk veya DNA'nın çekirdek dışındaki bozukluğuyla ilgili olabilir (Kaya 1995).

A) Karsinojenik Etki:

Kanser, DNA yapısındaki bozukluk sonucu hücrelerin yeteri ölçüde farklılaşmadan kontrolsüz ve hızlı bir şekilde çoğalmasıyla kendini gösteren bir durumdur.

Karsinojenitenin değerlendirilmesi için, sıçanlar ve fareler iki yıla kadar (bu türlerin ortalama ömrü) toksik doza maruz bırakılır ve hastalığın insidansı ve tümörlerin tipi değerlendirilir (Anonim 2018).

B) Mutajenik Etki

Radyasyon dahil, çeşitli maddelerin hücre DNA' sında yaptıkları kalıcı değişikliklere mutasyon denir; etki genotoksik etki diye de bilinir. Etken (mutajen) madde kromozomlarda çok küçük ve önemsiz veya çok büyük ve önemli değişikliklere sebep olabilir. Her hücrede kendi yapısı, gelişmesi ve göreviyle ilgili genetik bilgiler DNA' da kayıtlı olduğundan, mutasyon sonucu DNA molekülünde oluşan değişiklik kısıtlı bir noktaya özellikle de tek bir zincire sınırlı kalırsa, genellikle önemli bir bozukluğa yol açılmaz ve hücreler normal görevini sürdürebilirler. Ama DNA' nın yapısında oluşan değişimin derecesi büyükse hücrelerin görevlerinde ve gelişmesinde bozulma yanında ölümü de söz konusu olabilir. (Kaya 1995).

Genotoksisitenin belirlenebilmesi için farklı test sistemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle in vitro testlerin yanı sıra in vivo testlerinde yapılması gerekmektedir. Genotoksik etkinin belirlenmesinde hızlı ve basit bir test olarak Alkaline Filter Elution testi örnek verilebilir. Bu testle genotoksik materyallere karşı hayvan DNA dizilerindeki kırılmalar hızlı bir şekilde belirlenebilir (Zorba ve Yıldız 2007).

C) Teratojenik Etki:

İlaç, zehirli ve çeşitli kimyasal maddelerin anne karnında plasenta yoluyla yavruya geçmesi sonucu yavruda şekil bozuklukları veya noksan gelişmesiyle kendini gösteren bozukluklara yol açması olayıdır. Teratojenik maddeler hücre çekirdeğini etkilemeksizin ya hücrelerin ölümüne ve böylece bir organ veya dokuyu oluşturacak hücre sayısının azalmasına sebep olarak ya da hücrelerin farklılaşmasını önleyerek; annede yaptıkları bozukluk sonucu (kalp-damar bozukluğu, plasentada dolaşım bozukluğu, vb) yavruda bozukluklara yol açarak; mutasyon ve hücrelerde kontrolsüz çoğalma ile farklılaşmanın bozulmasına yol açarak etkili olurlar (Kaya 1995).

1.3.3.2. Allerjik Tepkimeler

Kimyasal alerji olarak da bilinen ilaç alerjisi insan veya hayvanların kimyasal bir maddeye önceden maruz kalmaları sonucu gelişen bir tepkidir. Küçük molekül ağırlıklı bir maddenin alerjik tepkiye yol açabilmesi için kendisi veya metaboliti vücutta önce bir proteinle birleşerek antijenik bir bileşik oluşturması gerekir. Böyle bir antijene maruz kalınmasını takiben 2 hafta içerisinde antikorlar şekillenir; işte söz konusu maddeye belirtilen süreden sonra tekrar maruz kalınması sonucu alerjik belirtilerle seyreden antijen-antikor tepkimeleri ortaya çıkar.

1.3.3.2.1. Tip 1 tepkimeler (anaflaktik tepkimeler)

Bunlara IgE tipi antikorlar aracılık ederler; bu antikorlar mast hücreleri ve bazofil lökositlerin zarına sıkıca yapışmışlardır. Kimyasal madde-protein bileşiği (hapten) yan yana duran iki IgE molekülüne köprü oluşturacak şekilde bağlanır; bunun sonucunda anılan hücrelerden histamin, lökotrienler, prostoglandinler gibi birçok yerel hormon salıverilerek damarlarda genişleme veya daralma ödem, yangısal cevap vb. etkiler şekillenir (Kaya 1995).

1.3.3.2.2. Tip 2 tepkimeler (sitolitik tepkimeler)

Bu tepkimelere hem IgG hem de IgM antikorları aracılık eder; burada kimyasal madde veya metaboliti damar endoteli veya kan hücrelerinin zarındaki belirli bir protein grubu ile birleşerek onu antijen haline getirir. İşte bu sabit antijenlere karşı yukarıda belirtilen antikorlar şekillenir. Oluşan antikorların bir kısmı hücre yüzeyindeki antijenlere bağlanır; bu bağlanma komplementin etkinleşmesi sonucu doğrudan veya hücre yüzeyindeki antijen-antikor bileşiğini tanıyan fagositik ya da fagositik tipte olmayan öldürücü hücreler aracılığında dolaylı yoldan hücrelerde erimeye sebep olurlar.

1.3.3.2.3. Tip 3 tepkimeler (arthus tepkimeleri)

Bu tepkimelere öncelikle, IgG antikorları aracılık eder. Büyük antijen- antikor bileşikleri oluşur; şekillenen bu bileşikler damar endoteline kolayca çökerek serum hastalığı diye bilinen hücreler içi yıkımlayıcı nitelikte yangıya sebep olurlar (Kaya 1995).

1.3.3.2.4. Tip 4 tepkimeler

Gecikmiş aşırı duyarlılık tepkimeleri olarak da bilinen bu duruma T- lenfositler ve makrofajlar aracılık ederler. Duyarlı hücreler antijenle temasa girdiklerinde salıverdikleri lenfokinler vasıtasıyla yerel yangıya sebep olurlar; lenfokinlerin salıverilmesi dokuda makrofajların ve nötrofil lökositlerin toplanmasına yol açar. Bu tip tepkimelerin başlıca örneğini temas dermatiti oluşturur; krom bileşikleri, nikel, neomisin, organik civa bileşikleri, para-amino benzoik asit türevleri, antihistaminikler bu tip tepkimelere sebep olurlar (Kaya 1995).

1.3.3.3. İdiyosinkratik tepkimeler

Canlıda genetik noksanlık veya farklılık sonucu herhangi bir maddeye karşı gelişen istenmeyen bir tepki olarak tanımlanan idiyosinkrazinin çok sayıda örneği vardır. Kimi durumda kimyasal maddenin BT' una veya etkisizleştirilmesine giren herhangi bir enzimin noksanlığı, kimi durumda da zehrin etkisine aracılık eden reseptör sayısının azalması veya biçiminin değişmesi söz konusudur (Kaya 1995).

1.3.4. Toksikolojik Çalışmaların Gelişimi

Toksikoloji 1900' lü yıllarda hızlı bir gelişim göstermiştir. Bu hızlı gelişim ikinci dünya savaşı döneminde uyuşturucu, böcek öldürücü ilaç, mühimmat, sentetik elyaf ve endüstriyel kimyasalların üretimindeki belirgin artışla birlikte paralellik göstermiştir. Birçok bilim dalı gelişimini düzenli bir çalışmaya dayanan: teori, hipotez, sentez ve yeni fikir gelişimleri üzerine dayandırmaktadır (Gallo 2001).

Modern toksikoloji on dokuzuncu ve yirminci yüzyıllarda biyoloji ve fizik bilimlerinin gelişimin bir devamı olarak görülebilir. Yirminci yüzyıla kadar ilaç kullanımına yönelik düzenlemeler oldukça esnek olmakla birlikte 1937 yılında 'elixir of sülfonamid' adında bir ilacın kullanımıyla yüzden fazla kişinin ölmesinin ardından

ABD kongresi satışı yapılacak ilaçların öncesinde hayvanlar üzerinde test edilmesini zorunlu hale getirmiştir (Vural 2005).

Tanımsal hayvan deneylerinin temelinde 2 ana ilke vardır. Birincisi laboratuvar hayvanlarında bileşiklerin oluşturduğu etkiler uygun nitelikte olduğunda insanlara uygulanabilirliğidir. Vücut yüzeyi birimine göre doz bazında, insanlarda toksik etkiler genellikle deney hayvanlarında olduğu gibidir. Vücut ağırlığı bazında, insanlar genellikle deney hayvanlarından daha savunmasızdır. Bu kantitatif farklılıklar göz önüne alındığında, insanlar için nispeten güvenli dozları hesaplamak için uygun güvenlik faktörleri uygulanabilir (Gallo 2001).

Belirlenen herhangi bir riski yönetmek ve azaltmak için gerekli kontrol önlemlerini tanımlamak adına doz ve toksikolojik cevap arasındaki ilişkiyi karakterize eden testlerden elde edilen veriler, bir risk değerlendirmesi yapmak için insan maruziyeti hakkındaki bilgilerle birleştirilir (Anonim 2018).

İkinci prensip, deney hayvanlarının yüksek dozlarda kimyasal maddelere maruz kalmasının insanlarda olası tehlikeleri keşfetmenin gerekli ve geçerli bir metodu olduğudur. Bu prensip, doz veya maruziyet arttıkça, bir popülasyondaki bir etkinin insidansının daha yüksek olduğu, kuantal doz-cevap kavramına dayanmaktadır. Deneysel model sistemlerinin tasarımında pratik olarak, toksikoloji deneylerinde kullanılan hayvan sayısının, risk altındaki insan popülasyonlarının büyüklüğüne kıyasla her zaman küçük olmasını gerektirmektedir. Bu tür küçük hayvan gruplarından istatistiksel olarak geçerli sonuçların elde edilmesi, göreceli olarak büyük dozların kullanılmasını gerektirir, böylece etkiler saptanabilirlik anlamında yeterince sık meydana gelecektir (Errill 1996).

1.3.5. Toksisite testleri

Toksisite testleri bir kimyasalın güvenilir olduğunu kanıtlamak için değil, o kimyasalın meydana getireceği toksik etkileri saptamak için yapılmaktadır. Kimyasalın nihai kullanımına bağlı olarak, kimyasalın yapısal bileşikler tarafından üretilen toksik

etkiler ve kimyasalın kendisi tarafından üretilen toksik etkiler, yapılması gereken toksikoloji testlerinin belirlenmesine katkıda bulunur. FDA, EPA ve Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), prosedürün tanımlanması ve sorumluluğun belgelendirilmesi gerektiğini şart koşan iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) standartları yazmıştır. Bir kimyasal madde piyasaya sunulurken yapılan toksisite testlerinde bu ilkelere uyulması beklenir (Eaton ve ark. 2008)

1.3.5.1. Toksikite Testlerinin Sınıflandırılması

Toksikolojik testler maddelerin; insanlar, hayvanlar veya çevre için zehirlilik derecesini ve etkileme mekanizmalarını incelemektedir. Bu amaçla bir maddenin belirli dozuna ilk maruz kalındığında ortaya çıkabilecek olumsuz etkilerin incelenmesi (akut toksisite çalışmaları), genetik materyalle etkileşime giren maddelerin potansiyelinin değerlendirilmesi (genotoksisite), bir maddeye sürekli maruz kaldıktan sonra şekillenen zehirlenmeler (tekrarlanan doz toksisite çalışmaları), bazı kimyasallara maruz kalma sonucunda kanserin gelişip gelişmediğinin tespit edilmesi ve ilaçların güvenli doz aralıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Anonim 2018).

Toksisiteyi, etkiye sebep olan neden ve etkinin gözlemlendiği maruziyet düzeyi (doz) olmak üzere iki temel öge oluşturmaktadır. Bazı testler özel bir etkiyi (deri ve göz tahrişi, deri hassasiyeti ve mutajenite gibi) tespit etmek için özel olarak tasarlanmıştır. Diğer testler (subkronik ve kronik çalışmalar gibi) organlar veya vücut sistemleri üzerinde daha az spesifik etkilerin veya etkinin geliştiği doz aralığının daha geniş bir yelpazesini tespit etmek için tasarlanmıştır (Anonim 2018).

Toksisite testleri, test süresinin uzunluğuna göre sınıflandırılabilirler. Bunlar;

1. Akut toksisite testleri,
2. Subakut toksisite testleri,
3. Subkronik toksisite testleri,

4. Kronik toksisite testleri,
5. Özel toksisite testleridir.

1.3.5.1.1. Akut Toksikite Testleri

Akut toksisite çalışmaları tek bir maddenin etkilerini değerlendirmek için yürütülmektedir. Genellikle her bir hayvan, bu çalışma tasarımında tek bir doz test maddesini alır. Nadir olarak, tekrarlanan dozlar uygulanabilir, ancak her durumda, tüm dozlar 24 saat veya daha kısa bir süre içerisinde uygulanır (Gad 2014).

Akut toksisite, bir maddenin tek bir dozuna ilk kez maruz kaldığında ortaya çıkan olumsuz etkilere karşılık gelir. Deri ve gözle temasın etkilerini (korozyon, tahriş edici ve hassaslaşma; topikal veya lokal toksisite) ve yutulan, teneffüs edilen, deri yoluyla emilen veya enjekte edilen bir maddenin iç organları üzerindeki etkilerini tespit etmek için ayrı testlere ihtiyaç vardır. Lokal toksisite durumunda, deri tahrişi normal olarak test maddesinin hayvanın sırtlarının tıraş edilmiş bölgelerine uygulanması ve 72 saatlik bir süre boyunca kızarıklık, şişme, erozyon ve ülserasyonun gelişmesi göz önüne alınarak değerlendirilir. Göz tahrişi testleri test maddesini doğrudan hayvanın gözüne uygulamak ve korneal opasite, şişme, kızarıklık ve diğer tahriş bulgularını gözlemlemeyi içerir (Anonim 2018).

1.3.5.1.2. Subakut Toksikite Testleri

Subakut toksisite testleri bir kimyasalın tekrarlanan dozlarda toksisitesi hakkında bilgi edinmek ve subkronik çalışmalara yardımcı olarak toksik dozların belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Kimyasal maddenin hayvanlara farklı dozlarda yemlerine katılarak verilmesi protokolüne dayanır. Genellikle ratlar için her cinsiyetten onar hayvana birer doz ve köpeklerde her cinsiyetten üç ya da dört hayvan için 3 doz şeklinde uygulanır. 14 gün sonra kimyasal ve histopatolojik incelemeler yapılır (Eaton ve Gilbert 2008).

1.3.5.1.3. Subkronik Toksikite Testleri

Sıçan ve köpek gibi deney hayvanlarının tercih edildiği bu testte, test süresi üç aydır. Kimyasal maddelerin verilme yolu genellikle oraldır. Madde özelliğine göre su içinde, besine karıştırılmış veya oral gavaj şeklinde verilebilir. Bu test ile kimyasal maddenin karaciğer, böbrekler, beyin ve idrar kesesi gibi pek çok organlar üzerindeki genel toksisitesi hakkında bilgi edinmek mümkün olur. Deney süresince hayvanların çok iyi gözlemlenmesi ve deney sonunda da detaylı histopatolojik incelemeler ile, günlük hayatta kullanılacak besin haricindeki maddelerin final toksisitesi subkronik testler ile tamamlanabilmektedir. Subakut ve subkronik toksisite testleri ile günlük hayatta maruz kalınabilecek maddelerin sağlık üzerindeki potansiyel toksisite risklerini de saptamak mümkündür. Risk tayini, kimyasal maddenin tanımlanması, doz cevap ilişkisi, maruziyet tayini ve risk karakterizasyonu olmak üzere 4 basamakta gerçekleştirilir (Vural 1996).

Subakut ve subkronik toksisite testlerinde doz cevap ilişkisinden yararlanılarak gözlemlenen en düşük etki düzeyi (LOEL) veya en düşük advers etki düzeyi (LOAEL), hiçbir advers etkinin gözlenmediği en yüksek düzey (NOEL veya NOAEL) hesaplanabilir (Tablo 2). Ancak, deney hayvanlarında elde edilen bu verileri insanlara uyarlamak oldukça zordur. Kronik toksisite testlerinden elde edilen veriler ile toplumun kimyasal maddeye maruziyeti sonucu hiçbir sağlık sorunu yaşamayacağı konsantrasyon değerini (BMC: Benchmark Concentration), günlük tolere edilebilir maruziyet derecesini (TDI: Tolerable Daily Intake = NOAEL x 0.5/UF) saptamak da mümkündür (UF: Belirsizlik faktörü: Uncertainty Factor) (11,14). Yine bu testlerden faydalanılarak, insan popülasyonunda hassas bireyler de dahil kişilerin ömür boyu maddeye maruziyetinde hiçbir zararlı etki riskinin görülmeyeceği doz değeri RfC veya RfD (Reference Concentration / Reference Dose) saptamak da mümkündür. Son yıllarda RfC saptamasında NOAEL yerine BMC' den yararlanılmaktadır. BMC değeri NOAEL ile LOAEL arasında bir değer olarak da kabul edilmektedir (Saygı 2003).

1.3.5.2. Sitotoksosite

Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksosite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir (Riss ve ark., 2006). Yapılan sitotoksosite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir. Sitotoksosite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Tokur Ve Aksoy 2017).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

2.1.1. Deney Grubu

Sistemik sitotoksisite deneylerinde, 8-12 haftalık fare/BALB-C kullanıldı. Akut toksisite testlerinde 5 dişi ve 5 erkek, subakut ve subkronik toksisite testlerinde ise 10 dişi 10 erkek fare çalışma guruplarını oluşturdu. Deneyde kullanılan fareler rastgele seçildi, tek tek işaretlendi ve uygulamadan 5 gün önce kafeslere ayrıldı.

Sensitizasyon deneylerinde ise deney hayvanı olarak 300 g- 500 g ağırlığında, dermatolojik olarak herhangi bir hastalığı bulunmayan, sağlıklı genç beş dişi beş erkek albino guinea pig kullanıldı.

2.1.2. Kontrol Grubu

Kontrol grubu; 8-12 haftalık 5 dişi ve 5 erkek fare/ BALB-C'den oluşturuldu. Negatif kontrol olarak ekstraksiyon amacıyla PBS (Phosphate Buffered Saline) kullanıldı. Aynı şekilde vücut ağırlığına göre deney hayvanlarına verilmesi gereken miktar hesaplandıktan sonra test protokolü taklit edildi.

Sensitizasyon deneylerinde kontrol grubu olarak üç erkek iki dişi olmak üzere sağlıklı genç hayvanlar kullanıldı.

2.1.3. Barınma ve Beslenme Koşulları

Barınma koşulları oda sıcaklığı 22°C (\pm 3°C), nem 30%-70% arasında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Beslenme için Ad-libutum ticari

rodent pellet yem ile normal laboratuvar diyeti ve sınırsız su sağlanmıştır. Aynı doza maruz kalan hayvanlar aynı kafeste muhafaza edilmiş, fakat kafesteki hayvan sayısı gözlemleri etkilemeyecek düzeyde tutulmuştur.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Toksikite Deneyleri

Akut, subakut ve subkronik sistemik toksisite testleri, “TS EN ISO 10993-11 2010 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 11: Sistemik toksisite deneyleri” “TS EN ISO 10993-2:2006 Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 2: Hayvansal sağlık özellikleri” ve "TS EN ISO 10993-12 2013 Tıbbî cihazların biyolojik değerlendirilmesi – Bölüm 12: Numune hazırlama ve referans malzemeler” protokollerine göre gerçekleştirildi.

2.2.1.1. Biyogümüşün Uygulama Yolu ve Dozunun Belirlenmesi

Deney hayvanlarına uygulanacak biyogümüşün uygulama yolu ve dozu TS EN ISO10993-11 standart test protokolüne göre belirlendi (Çizelge 2.1). Bu protokole göre gereken uygun doz (ml/kg vücut ağırlığı) hesaplanmasında hayvan türü, vücut ağırlığı/yüzey alanı, test örneği fiziksel- kimyasal ve biyolojik özellikleri göz önünde bulundurulur. Bu faktörleri dikkate alınarak, akut toksisite testlerinde tek sefer, subakut ve subkronik testlerde 7 gün süresince farelerde intraperitoneal yolla 50 ml/kg dozunda enjeksiyon şeklinde biyogümüş uygulandı.

Çizelge 2.1. Deneş hayvanlarına uygulanacak biyogümüşün uygulama yolu ve dozu

Tür	Subkutanöz ml/kg	Kas içi ml/kg	Intraperitoneal ml/kg	Sodayla besleme ml/kg	Damar içi ml/kg
Rat	20	1	20	50	40
Fare	50	2	50	50	50
Tavşan	10	1	20	20	10
Köpek	2	1	20	20	10
Maymun	5	1	20	15	10

2.2.1.2. Biyogümüş Sentezi ve Ekstraksiyonu

Gümüş nitrat (merk) 100 mg tartılarak saf suda çözüldü ve 100 ppm olacak şekilde seyreltildi. Askorbik asit 10 ppm olacak şekilde saf suda çözeltilisi hazırlandı. Cotinus coggygia bitkisinin kök ve gövde 6g/L olacak şekilde 15 dakika kaynatıldı. Sıvı kısım rotary evaratörde buharlaştırılarak ekstresi elde edildi. Daha sonrasında 100 ppm gümüş çözeltilisinden 100 ml, cotinus bitki ekstresinden 10mg, askorbik asitten 100 ml 0,1M çözeltilisinden, 13.4mg NaHPO₄, 0,15 molar NaCL çözeltilisinden 180 ml bir beherde karıştırıldı. Ardından NaOH ile çözeltilinin pH sı 7.8' e ayarlandı. Manyetik karıştırıcıda 38.6 °C 'de 28 saat süre ile manyetik balık kullanılarak karıştırıldı.

TS EN ISO 10993-11 ve 10993-12 standart test protokolünde belirtildiği üzere biyogümüşün direkt olarak deneş hayvanlarına uygulanamaması yöntemi seçildi. Bu amaçla biyogümüş, 37°C de 72 saat inkübasyonda tutularak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi. İlgili protokolün 10.3.1 kısmına göre kullanılan biyogümüşün yapısı itibariyle ekstraksiyon hazırlama oranı 3 cm² /ml olarak kabul edildi.

2.2.1.3. Klinik Gözlem ve Değerlendirme

Test süresince (Akut sistemik toksisite testi için 7 gün, subakut sistemik toksisite testi için 28 gün, subkronik sistemik toksisite testi için 90 gün) deneş grupları; solunum

(apne, takipne, siyanoz, burun akıntısı), gastrointestinal sistem (yumuşak gaita, emezis, diürez,diyare) kardiyovasküler (bradikardi, taşikardi, aritmi), motor aktivite (artan/azalan uyuklama, katalepsi, bitkinlik, seyirme, terleme, aneljezi, opistotonus), oküler belirtiler (lakrimasyon, myozis, midriazis, konjuktivitis, ekzoftalmus), dermatolojik belirtiler (ödem, eritem), gibi parametreler yönünden değerlendirildi.

2.2.1.4. Günlük Ağırlık Takibi

Hayvanların canlı ağırlıkları, çalışmanın başlangıç ve bitiş zamanında ölçüldü. Ayrıca, postmortem olarak karaciğer ağırlıkları ölçülerek; her bir olguya ait karaciğer ağırlık indeks oranları hesaplandı.

2.2.1.5. Nekropsi ve Histopatolojik İncelemeler

Biyogümüş toksisitesinin, sistemik toksisitesini belirlemek amacıyla akut, subakut ve subkronik sistemik toksisite için sırasıyla biyogümüş uygulama sonrası 7., 28. ve 90. günlerde postmortem incelemeler yapıldı ve histopatolojik incelemeler amacıyla organlardan örnekler alındı.

2.2.2. Sensitizasyon Testi (Guinea pig maksimizasyon deneyi)

2.2.2.1. Deney Grubunun Hazırlanması

Deney grubu için sadece sağlıklı ve sağlam deriye sahip guinea pig kullanıldı. Test öncesinde hayvanların uygulama bölgeleri tıraş edilerek intradermal enjeksiyon için, uygulama bölgesi başına 0,1 ml enjekte edildi.

2.2.2.1.2. İntradermal indüksiyon fazı

Kılları kırılmış iki skapula arası bölge A, B ve C bölgelerine ayrıldı ve enjeksiyon bölgelerinde (A, B ve C), her bir hayvana sırasıyla, Freundun tam adjuvantı (sc-24018, Santa Cruz) ile fizyolojik tuzlu su, biyogümüş (seyreltilmemiş ekstresi) ve biyogümüş ile 50:50 (hacim oranında), Freundun tam adjuvantı ile fizyolojik tuzlu su (50 %) emülsiyonu; her biri 0,1 ml olmak üzere, intradermal olarak enjekte edildi.

2.2.2.1.3. Lokal indüksiyon fazı

İntradermal indüksiyon fazının tamamlanmasından 7 gün sonra, her bir hayvana yaklaşık 8 cm² lik gazlı beze emdirilmiş test örnekleri ile lokal uygulama yapıldı. Lokal uygulamanın 48 saat öncesinde deri %10' luk sodyum dodesil sülfat (merck, 151-21-3) ile iritasyon oluşmaması için ön işleme tabi tutuldu. Lokal uygulamaya 48 saat sonra son verildi.

2.2.2.1.4. Yarışma fazı

Yarışmalı tüm test ve test örneklili kontrol hayvanları, lokal indüksiyon fazının tamamlanmasından 14 gün sonra, C bölgesindeki konsantrasyonda test numunesine batırılmış uygun yamalar kullanılarak, indüksiyon aşamasında tedavi edilemeyen alanlarına doğrudan yerel olarak kontrol ve test örnekleri uygulandı. 24 saat sonra pansuman ve yamalar çıkarıldı.

2.2.2.2. Deri Reaksiyonlarının Gözlemlenmesi

Pansuman çıkarıldıktan 24-48 saat arasında kontrol hayvanları ve testin yarışmalı deri bölgelerinin görünümü ve iyi bir aydınlatma altında deri reaksiyonları Magnusson ve Kligman ölçeğine göre değerlendirildi (Shchlede ve Eppler 1995). (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Magnusson ve Kligman ölçęđi

Yama testi reaksiyonu	Not skalası
Görünür bir değişiklik yok	0
Ayrık veya yamalı eritem	1
Orta derecede ve bitişik eritem	2
Yoğun eritem ve şişlik	3



3.BULGULAR

3.1. Toksikite Deneyleri Bulguları

Biyogümüşün sistemik akut, subakut ve subkronik toksisite deneyleri sonucunda her üç aşama için gerekli test sürelerinde aşağıda verilmiş tablodaki klinik gözlem kriterlerine göre takip edildi. Buna göre test süreleri boyunca biyogümüş uygulanan deney hayvanlarında sistematik olarak bulgular değerlendirildi.

Solunum sistemine ait olarak; abdominal solunum, nefes alma güçlüğü, solunum ritminde bozulma, solunumun durması veya siyanoz gibi bulgulara rastlanmadı.

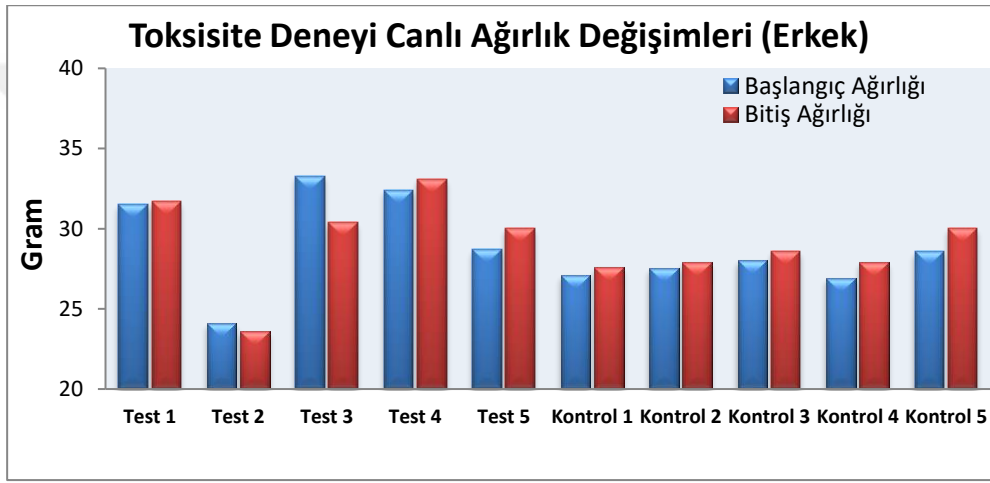
Deney süresi boyunca hayvanların motor aktivitelerinde; doğrulma kaybı, duyu yeteneğinin, kısmen ya da tamamen ortadan kalkması, istemli motor hareketlerin ve duyarlık kaybı ile hareket etmeyi olanaksız kılan bir hipertoni ile karakterize patolojik bir durum, dengesizlik, bitkinlik, seyirme, terleme gibi bulgulara rastlanmadı.

Oküler belirtileri takip edilen deney hayvanlarında, konjunktivitis, ekzoftalmus, artan veya azalan lakrimasyon, iris iltihabı, gözde opaklık, myazis veya midriyazis bulgularına rastlanmadı. Belirtilen test süresinde ve dozlarında biyogümüş uygulanan deney hayvanlarında uygulamalardan sonra yapılan kardiyovasküler takipleri sonucunda; kalp ritimlerinde bozulma (aritmi veya bradikardi) kalp ritminde artış (taşikardi), damar çeperlerinde ise vazodilatasyon ya da vazokontrüksiyon meydana gelmedi.

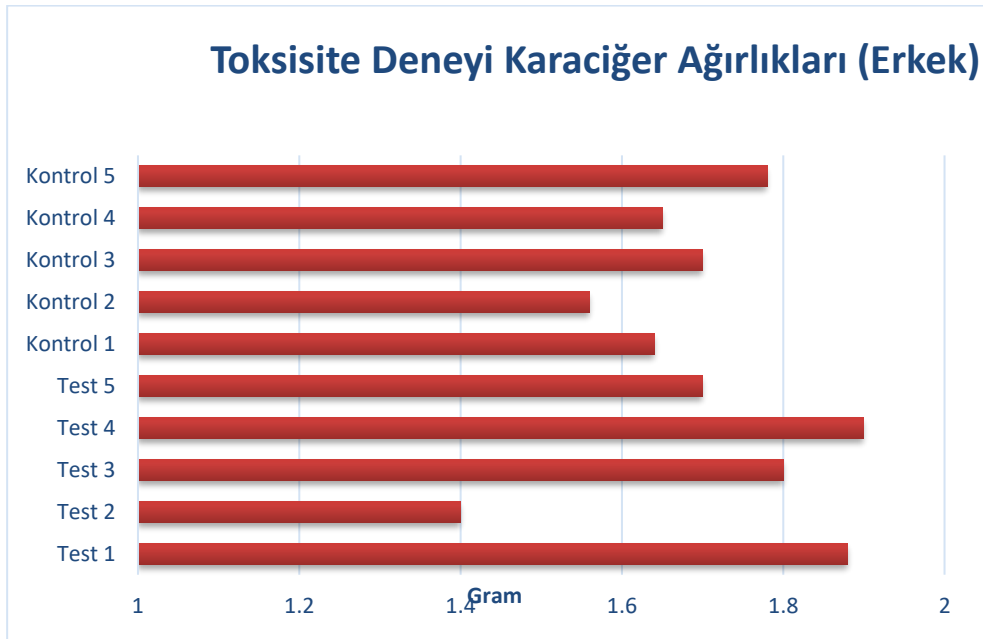
Biyogümüşün intraperitoneal boşluğa uygulandığından, sindirim sisteminde; artan ya da azalan salivasyona, yumuşak gaita, diyare, kusma ya da diürez gibi bulgulara rastlanmadı.

3.2. Canlı Ağırlık Bulguları

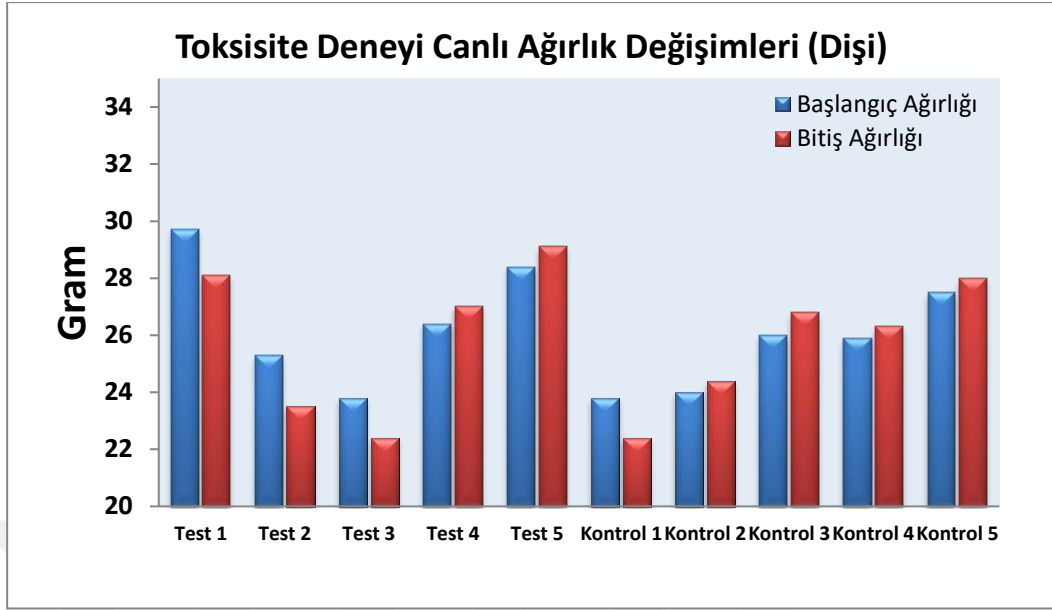
Deney süresince ağırlık takibi yapılmış olup ağırlık değişim oranı karaciğer ağırlığı ve karaciğer indeks değerleri aşağıdaki Tabloda verilmiştir. Tüm grupların gıda ve su tüketimi normaldir. Deney başlangıç ve bitiş süresi dahilinde hiçbir farede limit dışı ağırlık değişimi kaydedilmemiştir. Deney hayvanlarının karaciğer ağırlıkları ise normal sınırların (%4-6) içinde bulunmuştur.



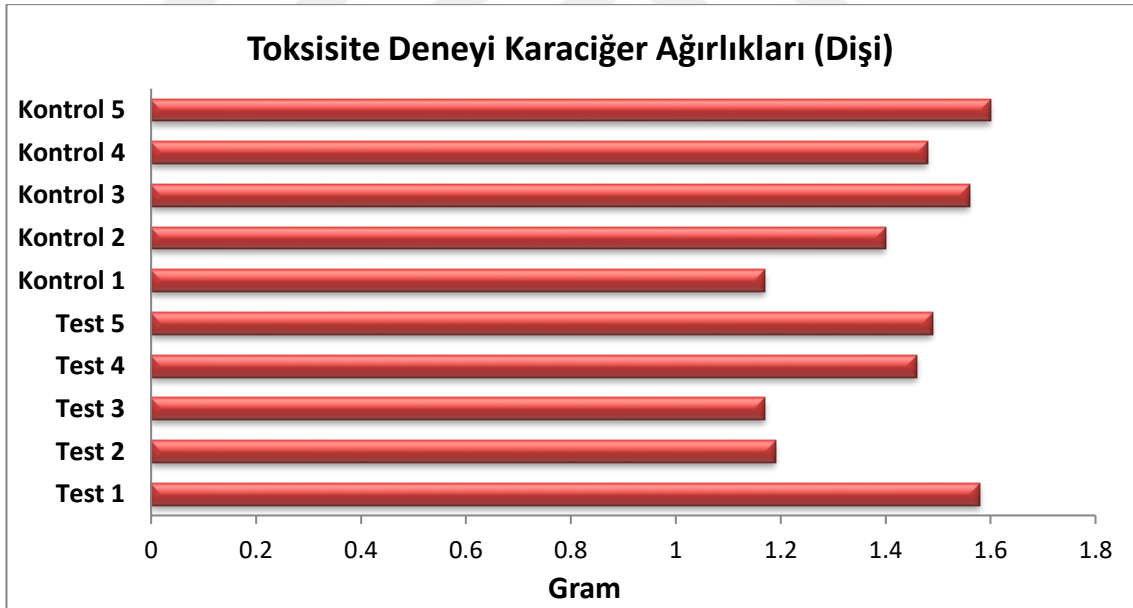
Şekil 3.1. Toksisite Deneyi Canlı Ağırlık Değişimleri (Erkek)



Şekil 3.2. Toksisite Deneyi Karaciğer Ağırlıkları (Erkek)



Şekil 3.3. Toksikite Deneyi Canlı Ağırlık Değişimleri (Dişi)



Şekil 3.4. Toksikite Deneyi Karaciğer Ağırlıkları (Dişi)

3.3. Nekropsi ve Histopatolojik Bulgular

Biyogümüşün sistemik toksisitesini belirlemek için yapılan akut (7 gün), subakut (28 gün) ve subkronik (90 gün) toksisite testleri sonucunda deney hayvanlarının tamamı postmortem histopatolojik yönden incelendi.

Dış bakıda herhangi patolojik duruma rastlanmayan deney hayvanlarında; böbrek üstü bezleri, lenfler, tüm brüt lezyonlar, aort, kalp, kemik iliği (femur, kaburga veya sternum), beyin (serebrum, serebellum ve pons dahil olmak üzere temsilci bölümler), sekum, kolon, duodenum, ileum, jejunum özofagus, gözler, safra kesesi, böbrekler, karaciğer, akciğerler ve bronşlar, dişilerde meme bezleri ve erkeklerde epididimisler nekropsi ve histopatolojik yönden incelendi, herhangi bir bulguya rastlanmadı.

3.4 Sensitizasyon Testi (Guinea pig maksimizasyon deneyi) Bulguları

Test edilen nanogümüş ile Sensitizasyon Testi (Guinea pig maksimizasyon deneyi) uygulandı ve 27 günlük gözlem süreci sonunda test sonlandırıldı. 27 günlük gözlem süresi sonunda test edilen nanogümüş TS EN ISO 10993-10 Tablo 4 Magnusson ve Kligman Ölçeği' nde verilen not skalasına göre "0,35 (Görünür bir değişim yok)" olarak değerlendirildi. Çalışma süresince erkek ve dişi hayvanlarda Magnusson ve Kligman ölçeğine göre gözlenen değerler çizelge 3.1'de sunuldu.

Çizelge 3.1. Magnusson ve Kligman ölçeğine göre gözlenen değerler

Deney Hayvanları		Pansuman çıkarıldıktan 24.gün	Pansuman çıkarıldıktan 48.gün	Bireysel Ortalama	Ortalama	Sonuç
Test Erkek	1	1	0	0,5	0,4	0,35
	2	1	0	0,5		
	3	0	0	0		
	4	1	0	0,5		
	5	0	1	0,5		
Test Dişi	1	0	0	0	0,3	
	2	0	0	0		
	3	1	0	0,5		
	4	0	1	0,5		
	5	0	1	0,5		
Kontrol	1	1	0	0,5	0,3	
	2	0	0	0		
	3	1	0	0,5		
	4	0	0	0		
	5	1	0	0,5		

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gümüş uzun yıllar boyunca güçlü antibakteriyel ajan olarak ve antifungal etkileri ile bilinse de son yıllarda solüsyon, süspansiyon ve nanopartiküller şeklinde biosidal etkileriyle yeniden hayat bulmaktadır (Navarro ve ark. 2008).

Drake ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada insanlarda toksisitenin, genellikle biyolojik olarak temin edilebilen bir gümüş formuna çok yüksek dozlarda maruz kalındığında meydana geldiğini, metalik gümüş ürünleri çok az çözünen veya çözünabilir gümüş iyonu ürettikleri için bunlara maruz kalmanın, insan sağlığı için herhangi bir risk oluşturmayacağını ancak aşırı yüksek dozlarda gümüş nitrata maruz kalındığında, kan basıncında azalma, ishal, midede irritasyon ve solunum sayısında düşme görülebileceğini, düşük dozlarda ise ancak uzun süreli maruz kalınması durumundaki bazı kronik semptomları ise, karaciğer ve böbrekte dejenerasyon ile midede ülserasyon şeklinde tanımlamışlardır. Bu çalışmada ise fareler intraperitoneal yolla 50 ml/kg dozunda, akut, subakut ve subkronik test çalışmalarında nano gümüşe maruz bırakıldıklarında herhangi bir toksik etki görülmediği ortaya konmuştur.

Berry ve ark. (1995), gümüş nitratın kemirgenlere intravenöz veya içme suyu ile verdikleri deneysel çalışmalarında; idrar yolunda gümüşün düşük nefrotoksitesisi doğrulanmış, bariz yapısal hasar olmaksızın glomerüler bazal membranlar, arteriolar endoteli ve elastik laminalarda gümüş çökeltileri gözlemlemişlerdir. Bunun aksine çalışma sonunda yapılan patolojik incelemelerde böbreklerde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır.

Jiang ve ark. (2017), nanoyapılı yüzeyler, nanopartiküller ve nanokompozitler gibi nanomalzemelerin, kardiyovasküler hastalıklar için gelecekteki terapötikler için yeni uygun kaynakları temsil ettiklerini, nanomateryallerin kendine özgü fizyokimyasal özelliklerini, yüzey enerjisi ve yüzey topografileri gibi özel özelliklerini, kardiyovasküler sistem içindeki arzu edilen hücresel tepkileri etkin bir şekilde artırarak, klinik kullanım için artan bir potansiyele yol açtıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Jiang ve ark. (2017) bulgularına benzer şekilde, farelere intraperitoneal

verdiğimiz gümüş ürünü de hayvanlarda kardiyovasküler herhangi bir patolojik bozukluğa sebep olmamıştır.

Deri yaralarının iyileşme süreci, proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesini içerir. Yaralanma inflamasyonu ve pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasını uyarır. Proliferasyonda granülasyon dokusu oluşumu ve anjiyogenez oluşur ve makrofajlar tarafından desteklenir. Doku yeniden şekillenmesi sırasında hasarlı doku çıkarılır ve hücre dışı matriks yeniden düzenlenir, bu son süreç çeşitli matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve doku inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Nanogümüş tedavisinin yara iyileşmesinde yararlı olduğu bulunmuştur, çünkü kısa süreli inflamasyon iyileşme sürecini hızlandırır. Erkek BALB/C fareleri kullanan bir termal hasar hayvan modelinde, nanogümüş (14 nm) ile kaplanmış bandajlar iltihabı azaltmış, bakteriyel büyümeyi ortadan kaldırmış ve kontrol farelerine kıyasla azaltılmış skar ile daha hızlı iyileşmeye neden olmuştur (Cameron ve ark. 2018). Bu çalışmada yapılan sensitizasyon testlerinde elde ettiğimiz bulgular bu bilgilerle paralellik göstermekte ve nanogümüş ürününün deride sensitizasyona yol açmadığını kanıtlamaktadır.

Rodentlerde nanogümüşün solunum sisteminde yarattığı toksik etkilerle ilgili bilgiler henüz çok sınırlıdır. AgNP'lerin subkronik inhalasyonu, pulmoner fonksiyonda doza bağlı, hafif pulmoner inflamasyon ve değişikliklere neden olduğu ve inhale edilen AgNP'lerin de karaciğer ve beyin gibi ekstra pulmoner organlara dağıtılmak üzere sistemik dolaşıma girebileceğine dair kanıtlar vardır. Öte yandan, düşük inhalasyon dozlarını kullanan çalışmalarda minimal toksisite veya hiç toksisite bildirilmemiştir (Seiffert ve ark 2016). Bu çalışmamızda ise akut, subakut ve subkronik intraperitoneal yapılan testler sonucunda deney hayvanlarında klinik olarak solunum fonksiyonlarında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Sindirim sisteminde, NP kararlılığı, çözünmesi ve potansiyel olarak toksik iyonların salınması, kısmen, sıvı pH, bileşim ve maruz kalma süresine bağlıdır. İntestinal mukus tabakası, oldukça dallanmış glikoproteinler, lipidler, hücresel ve serum makromolekülleri içeren karmaşık bir ağdır ve yutulan NP'lerin geçmesi gereken ilk bariyerdir. Yüzeyin elektriksel yükü çok önemli bir rol oynamaktadır; nötr veya pozitif yüzey yükü, mukozanın yapışmasını önler, penetrasyonu desteklerken, negatif yüklü hidrofilik ve lipofilik bileşiklerin geçişini engeller. Walczake ve

arkadaşları (2012), insan sindirim sisteminde in vitro olarak yaptıkları bir çalışmada gümüş iyonlarının sindirimi sonrasında 60 nm' lik gümüş nanopartiküllerinin klor iyonlarının etkileşimini ve toplanmalarını azalttığını gösteren bir çalışma yapmışlardır.

In vivo çalışmalarda memeli sindirim sistemlerinde nanogümüş iyonlarının alınımıyla ilgili doğru dozların tespit edilmesi açısından in vivo ve in vitro testlerin daha sık yapılması gerekmektedir.

AgNP' nin kemirgenlerde oral yoldan maruziyetini kullanarak yapılan on çalışmadan dokuzunda sağlıklı hayvanlarda doku dağılımı ve/veya toksisitesini değerlendirilmiş ve bir kolit modelinde iltihaplanma üzerine modüle edici etkilere odaklanılmıştır.

Çalışmalar sonucunda genel olarak kanıtlar, AGNP' nin akut veya subkronik oral uygulamasının neden olduğu konakçı dokular üzerinde olumsuz etkilerin olasılığının oldukça düşük olduğunu ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, kanıtların ağırlığı, oral yolla alınan AgNP' nin hem doku dağılımının hem de biyoyararlılığının düşük olduğunu göstermektedir (Bergin ve Witzmann 2013).

KAYNAKLAR

- ANONİM (2004) Nanoscience and nanotechnologies:opportunitites and uncertainties. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK.
- ANONİM (2018) <http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Animals-Chapter-9-Animal-Use-in-Toxicity-Studies.pdf>
- ATİYEH BS, COSTAGLIOLA M, HAYEK SN DİBO SA (2007) Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, *BURNS*, 33(2):139-148.
- BAUDİN JP, GARNİER-LAPLACE J, LAMBRECHTS A (1994) Uptake from water, depuration and tissue distribution of 110m Ag in a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 76(1-4), 129–141.
- BERGİN İL VE WİTZMANN FA (2013) Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps, *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 3(1-2).
- BERRY JP, ZHANG L ve GALLE P (1995) Interaction of selenium with copper, silver, and gold salts. Electron microprobe study, *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 27(1), 21–28.
- BJARNSHOLT T, KIRKETERP-MØLLER K, KRISTIANSEN S, PHIPPS R, NIELSEN AK, JENSEN PØ, HØIBY N ve GIVSKOV M (2007) Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *APMIS*, 115(8), 921–928.
- BRAYDICH-STOLLE LK, BREİTNER EK, COMFORT KK, SCHLAGER JJ, HUSSAIN SM (2014) Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications, *Langmuir* (50)23;30.
- BRESSANE, FERRONIL, GARDIN C, RIGO C, STOCCHERO M, VINDIGNI V, CAIRNS W ve ZAVAN B (2013) Silver Nanoparticles and Mitochondrial Interaction, *International Journal of Dentistry*, (13): 8.
- BRETT DW (2006) A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion, *Ostomy/Wound Management*, 52(1): 34–41.
- BURY NR, WOOD CM (1999) Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comperative Physiology*, 277, 1385–1391.
- CAMERON SJ, HOSSEİNİAN F ve WİLLMORE WG (2018) A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver, *International Journal of Molecular Science*, 1-40

- CHEN X, SCHLEUSNER HJ (2008) Nanosilver: a medical product in nanoapplication, *Toxicology Letters* 176(1):1-12
- CHOPRA I (2007) The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 587–590.
- DRAKE PL ve HAZELWOOD KJ (2005) Exposure related health effects of silver and silver compounds: A review, *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 575–589.
- EATON DL, GILBERT SG (2008) Principles of Toxicology, Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, Ed. Klaassen D, 7th edition, New York: McGraw-Hill chapter 3.
- EISLER R (1996) Silver hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *National Biological Service Biological Report* 32, 44.
- ERRILL MRA (1996) Regulatory toxicology, Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, Ed. Klaassen CD, 5th edition, New York: McGraw-Hill, chapter 34.
- GAD SC (2014) Rodents model for toxicity testing and biomarkers, *Biomarkers in Toxicology*, RC GUPTA, chapter 2, s:7-69.
- GALLO MA (2001) History and scope of toxicology. In: Klaassen CD (ed.) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th edition, p 3-12.
- GARNETT M ve KALLINTERI P (2006) Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles, *Occupational Medicine* 56:307-311.
- GAUGER A, MEMPEL M, SCHEKATZ A, SCHÄFER T, RING J ve ABECK D (2003) Silver-coated textiles reduce *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic eczema, *Dermatology*, 207(1), 15–21.
- GREGUS Z (1996) Mechanisms of Toxicity, Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, Ed. Klaassen D, 5th edition, New York: McGraw-Hill, chapter 2.
- HOLLINGER MA (1996) Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals, *Critical Reviews in Toxicology* 26, 255–260.
- HUSSAIN SM, HESS KL, GEARHART JM, GEISS KT, SCHLAGER JJ (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro.*; 19:975–983.
- HWANG MG, KATAYAMA H, ve OHGAKI S (2007) Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the bactericidal ability of silver cations *Water Research*, 41(18), 4097–4104.

- JIANG W, RUTHERFORD D, VUONG T, LIU H (2017) Nanomaterials for treating cardiovascular diseases: A review, *Bioaktive Materials*, 2(4), 185-198.
- JONG WHD, GEERTSMA RE. (2012) in Biocompatibility and Performance of Medical Devices, In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices Pages 120-158.
- KHAN SS, MUKHERJEE A, CHANDRASEKARAN N (2011) Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 87(1):129–138.
- SCHIRMER K (2014) Mechanisms of Nanotoxicity, In: *Nanoscience and the Environment*, Ed. Richard E. Palmer, vol 7, chapter 6.
- KRUSZEWSKI M, GRĄDZKA I, BARTŁOMIEJCZYK T, CHWASTOWSKA J, SOMMER S, GRZELAK A, ZUBEREK M, LANKOFF A, DUSIŃSKA M, WOJEWÓDZKA M (2013) Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles, *Toxicology Letters*, 219(2):151-9.
- LANSDOWN ABG (2007) Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 237–250.
- LANSDOWN ABG ve WILLIAMS A (2007) Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. *Journal of Wound Care*, 16(1):15–19.
- LANSDOWN ABG (2010a) Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use, *Issues In Toxicology*, Chapter 2, p:227.
- LANSDOWN ABG (2010b) Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices, *Advances in Pharmacological Sciences*, 16.
- LEAD JR, ve WILKINSON KJ (2006) Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends, *Environmental Chemistry*, 3, 159–171.
- LIMBACH L, WICK P, MANSER P, GRASS R, BRUININK A, STARK WJ (2007) Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress, *Environmental Science & Technology* 41:4158-4163.
- LUBICK N (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticless or both?, *Environmental Science & Technology* 42 (23), 8617–8617.
- MAURER EI, SHARMA M, SCHLAGE JJ, HUSSAIN SM (2014) Systematic analysis of silver nanoparticle ionic dissolution by tangential flow filtration: toxicological implications, *Nanotoxicology*, 8 (7), 718-727
- MCSHAN D, RAY PC ve YU H (2014) Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1): 116–127

- NAVARRO E, PICCAPIETRA F, WAGNER B, MARCONI F, KAEGI R, ODZAK N, SIGG L, ve BEHRA R (2008) Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environmental Science & Technology* 42(23): 8959-8964
- NEL A, XIA T, LI N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel *Science* 311:622-627.
- ÖZER Y (2008), Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği / Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Kara Harp Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü Teknoloji Yönetimi Ana Bilim Dalı.
- TOKUR O VE AKSOY A (2017) In Vitro Sitotoksosite Testleri, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1): 112-118.
- SAYGI Ş (2003) Derlemeler, *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (3): 291-298
- SCHALLER M, LAUDE J, BODEWALDT H, HAMM G, and KORTING HC (2004) Toxicity and antimicrobial activity of a hydrocolloid dressing containing silver particles in an ex vivo model of cutaneous infection, *Skin Pharmacology and Physiology*, 17:31–36.
- SCHRAND AM, RAHMAN MF, HUSSAIN SM, SCHLAGER JJ, SMITH DA, SYED AF (2010), Metal-Based Nanoparticles and, Their Toxicity Assessment, *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2, 544-568.
- SCHRAND AM, DAL L, SCHLAGER JJ, HUSSAIN SM (2012), Toxicity Testing of Nanomaterials, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 745:58-75.
- SEIFFERT J, BUCKLEY A, LEO B, MARTIN NG, ZHU J, DAI R, HUSSAIN F, GUO C, WARREN J, HODGSON A, GONG J, RYAN MP, ZHANG J, PORTER A, TETLEY TD, GOW A, SMITH R VE CHUNG KF (2016) Pulmonary Effects Of Inhalation Of Spark-Generated Silver Nanoparticles In Brown-Norway And Sprague-Dawley Rats, *Respiratory Research*, 17: 85.
- SCHLEDE E, EPPLER R (1995), Testing for skin sensitization according to the notification procedure for new chemicals: the Magnusson and Kligman test, *Contact Dermatitis*, 32(1):1-4.
- STEBOUNOVA LV, ADAMCAKOVA-DODD A, KIM JS, Park H, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, Thorne PS (2011) Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model, *Particle and Fibre Toxicology*, 8: 5.
- STENSBERG MC, WEI Q, ES McLAMORE, PORTERFIELD DM, WEI A and SEPÚLVEDA MS (2011), Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging, *Nanomedicine*, 6(5): 879–898.
- SONDİ I, and SALOPEK-SONDİ B (2004), Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid Interface Science*, (275): 177–182.

- SARSAR V, SELWAL KK and SELWAL MK (2014), Nanosilver: Potent antimicrobial agent and its biosynthesis, *Academic Journal*, 13(4), p:546-554.
- SENJEN R. ve ILLUMİNATO I. (2009), *Nano & Biocidal Silver*. Friends of the Earth Australia and Friends of the Earth United States, p 1-41.
- TARHAN Ö, GÖKMEN V, HARSA Ş (2010), Nanoteknolojinin Gıda Bilim ve Teknolojisi Alanındaki Uygulamaları, *GIDA*, 35 (3) 219-225.
- Timbrell, J.A (2008) Biochemical Mechanism of Toxicity: Spesific Examples ed. Timbrell JA, Principles of Biochemical Toxicology, 4nd ed. New York, Informahealthcare. p: 293-391.
- VELTMAN K, HUIJBREGTS MA, VANKOLKC M, WANG WX, HENDRIKS AJ, (2008), Metal bioaccumulation in aquaticspecies: Quantification of up take and elimination rate constant susing physicochemical properties of metal sand physiological characteristics of species. *Environmental Science and Technology*, 42(3), 852–858.
- ZORBA YO, YILDIZ M (2007), ADEZİV RESORATİF MATERYALLERDE BİYOUYUMLULUK TESTLERİ VE KRİTERLERİ, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, (2), 15-21.
- WADHERA A ve FUNG M (2005). Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver, *Dermatology Online Journal*, 11(1): 12.
- WOOLLWY A (2008), A GUIDE TO PRACTICAL TOXICOLOGY EVALUATION, PREDICTION, AND RISK, ed. WOOLLEY A., Linlithgow, UK. Chapter 4.
- Vural, N (1996), Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73,Ankara, A.Ü. Basımevi, s. 1-20.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler:

Ad-Soyad: Yasemin Yeşilören
Doğum yeri ve tarihi: Ankara- 17.12.1990
Medeni durumu: Evli- Bir kız annesi
e-mail adresi: yaseminyesiloren@yahoo.com

Eğitim Bilgileri:

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi 2008-2013.

Mesleki Deneyim:

2013-2018 yılları arasında özel sektörde (veteriner kliniğinde) veteriner hekim.