

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL OMURGA
İMLANTLARININ BİYOGÜVENİLİRLİĞİ**

Dr. Murat ZAIMOĞLU

**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayhan ATTAR**

ANKARA - 2018

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL OMURGA
İMLANTLARININ BİYOGÜVENİLİRLİĞİ**

Dr. Murat ZAIMOĞLU

**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayhan ATTAR**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından desteklenmiştir.**

ANKARA - 2018

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: MURAT ZAİMOĞLU	Sınav tarihi: 09 / 01 / 2018
Anabilim/Bilim Dalı	: BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI	
Tez Danışmanı	: AYHAN ATTAR	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL OMURGA İMPLANTLARININ BİYOGÜVENİRLİĞİ	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Y.SÜKRÜ ÇAĞLAR
Beyin ve Sinir Cerrahisi
Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.AYHAN ATTAR
Beyin ve Sinir Cerrahisi
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi
Doç.Dr.Gökmen KAHİLOĞULLARI
Beyin ve Sinir Cerrahisi
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Bu çalışmada bana yardımcı olan sayın hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayhan ATTAR'a saygılarımı ve teşekkürlerimi bildiririm.

Uzmanlık eğitimim süresince bizlere bilgi, beceri, deneyimleriyle yol gösteren sayın hocalarım, Prof. Dr. Atilla ERDEM'e, Prof. Dr. Yusuf Şükrü ÇAĞLAR' a, Prof. Dr. Ali SAVAŞ' a, Prof. Dr. Ağahan ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. Ayhan ATTAR'a, Prof. Dr. Hakan TUNA'ya, Prof. Dr. Hasan Çağlar UĞUR'a, Doç. Dr. Gökmen KAHİLOĞULLARI'na ve Doç.Dr. Melih BOZKURT'a,

Tez çalışma konusunu belirlediğim 2014 yılından bu güne kadar yoğun bir emek ve efor ile hazırladığım tezimin her adımında bana destek olan Ankara Üniversitesi Beyin Cerrahi kliniği uzman doktorları İhsan DOĞAN, Onur ÖZGÜRAL ve Ümit EROĞLU'na, klinik asistanlarından Özgür ÖZATEŞ ve Fatih YAKAR'a, klinik doktor ve personellerine teşekkürlerimi bildiririm.

5 yıl boyunca beraber çalıştığım ve bana beyin cerrahi eğitimi yanında, hayata dair dersler öğreten Dr. Bora TETİK, Dr. Haydar SEKMEN, Dr. Emrah KANTARCIOĞLU, Dr. Efe GÜNER, Dr. Altan DEMİREL abilerime teşekkür ederim.

5 yıl boyunca Ankara Üniversitesi Beyin Cerrahi kliniğinde iyi günde kötü günde beraber çalıştığımız Dr. Orkhan MAMMADKHANLI, Dr. Burak BAHADIR, Dr. Serdar SOLMAZ, Dr. Cemil KILINÇ, Dr. Eyüp BAYATLI, Dr. Koral ERDOĞAN, Dr. Yağız Emre SAYACI, Dr. Murat BÜYÜKTEPE, Dr. Bilal ŞÜKRİYEV kardeşlerime beyin cerrahisi kariyerleri boyunca başarılar dilerim.

İstatistik çalışmalarında bana yardımcı olan Batuhan Bakırarar'a teşekkür ederim.

Çalışmanın her aşamasında beni yönlendiren ve deney tasarımımda destek olan Kutsal Devrim SEÇİNTİ'ye

Antibakteriyel kaplamaları yapan Ortofiks Firmasına ve İmplant teminini sağlayan Artrofiks firmasına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yıllardır sevdiğim eşim Damla ve meleşim kızım Naz'a kısıtlı zamanımda gösterebildiğim az ilgiye rağmen beni sevip destekledikleri için onlara daha iyi bir eş ve baba olmaya ömür boyu söz veriyorum...

Dr. Murat ZAIMOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. NANOMATERYALLERE GENEL BAKIŞ	2
2.2. METAL NANO PARTİKÜLLERİN FARMAKOKİNETİĞİ	4
2.3. NANO GÜMÜŞÜN FARMAKOKİNETİĞİ.....	8
2.3.1. Nano Gümüşün Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım Profili	8
2.3.2. Emilim (Absorbsiyon)	9
2.3.3. Dağılım	10
2.3.4. Metabolizma	12
2.3.5. Atılım (Ekskresyon)	13
2.4. İNTRAVENÖZ (DAMAR İÇİ) UYGULAMADAN SONRA GÜMÜŞ NANO PARÇACIKLARIN VÜCUT DAĞILIMI	14
2.5. KAN VEYA PLAZMA FARMAKOKİNETİĞİ	16
2.6. HÜCRELER ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ.....	17
2.7. NANO GÜMÜŞÜN HÜCRE DÜZEYİNDEKİ ETKİLERİNDE ANAHTAR FAKTÖRLER.....	19
2.7.1. Boyut	19
2.7.2. Yüzey Kimyası	20
2.7.3. Şekil (geometri)	21
2.7.4. Hücre Tipi.....	21
2.7.5. Gümüşün Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Mekanizması	22
2.8. TOKSİKOKİNETİK	23
2.8.1. Toksik etkinin mekanizması	24
2.8.2. Akut Toksisite.....	25
2.8.2.1. Oral.....	25
2.8.2.2. İnhalasyon	26

2.8.2.3. Dermal	26
2.8.2.4. Periton içi uygulama.....	27
2.8.3. Tekrarlayan Doz Toksisitesi (Kronik Toksisite).....	27
2.8.3.1. Oral	27
2.8.3.2. İnhalasyon	28
2.8.3.3. Dermal	28
2.8.4. Hedef Organ Toksisitesinde Biyolojik Mekanizma	29
2.8.4.1. Akciğer toksisitesi	29
2.8.4.2. Karaciğer toksisitesi	29
2.8.5. Oksidatif, İnflamatuar ve genotoksik etki	29
2.8.5.1. Nano gümüş uygulamasının oksidatif, inflammatuar ve genotoksik sonuçları.....	30
2.9. İRİTASYON, KOROZİF ETKİ VE SENSİTİZASYON	32
2.10. MUTAJENİTE VE KARSİNOJENİTE.....	32
2.11. ÜREME SİSTEMİNE OLAN TOKSİSİTESİ	32
2.11.1. Fertilizasyona Etkisi	32
2.11.2. Gelişimsel toksisite.....	33
2.11.3. Oral alım sonrası risk.....	33
2.12. ARJİRİ (ARGYRIA).....	34
2.13. GÜMÜŞÜN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİ	34
2.14. NANO GÜMÜŞÜN ANTİFUNGAL AKTİVİTESİ	35
2.15. GÜMÜŞÜN MEMELİ DOKUSUNA ETKİLERİ	36
2.16. AKCİĞERLERE OLAN ETKİSİ	37
2.17. GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN CİLT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	39
2.18. GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN İNTRAPERİTONEAL (KARIN İÇİ) ENJEKSİYONU	43
2.19. GÜMÜŞ NANO PARÇACIKLARA ORAL MARUZİYET	44
2.20. İNSANLAR ÜZERİNDEKİ ÇALIŞMALAR	48
2.21. GEBELERDE GÜMÜŞ KULLANIMI	51
2.22. İN VİTRO ÇALIŞMALAR	52
2.23. DERMAL MODELLER	53
2.24. KARACİĞER MODELLERİ	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
4. BULGULAR.....	67
4.1. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ.....	69
4.2. Elektron Mikroskopisi.....	72
4.3. ICP-MS analiz sonuçları	81
4.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	89
5. TARTIŞMA	90

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
ÖZET	96
SUMMARY	97
7. KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	115
EK ETİK KURUL KARARI	123

SİMGE VE KISALTMALAR

nm	: nanometre
mg	: miligram
ug	: mikrogram
pg	: pikogram
kg	: kilogram
g	: gram
L	: litre
Dk	: dakika
Ppm	: parts per million (mg/L, mg/kg, ng/g)
Ppb	: parts per billion (ng/L, ng/kg, ug/mL ug/g)
Ppt	: parts per trillion (ug/L, pg/mL)
Vd	: dağılım hacmi
Cl	: klirens
T_½	: yarılanma ömrü
MRT	: ortalama etki süresi
C max	: maksimum veya pik konsantrasyonu
AUC	: zaman –konsantrasyon eğrisi altındaki alan
F	: biyoyararlanım
PBPK	: Fizyolojik temelli farmakokinetik model
AgNPs	: gümüş nano parçacık
BSA	: sığır serum albümini
PVP	: polyvinylpyrrolidone
ip	: intraperitoneal
IT	: intratracheal
iv	: intravenöz
SC	: subkutan
Bla	: mesane
Nc	: nazal kavite
Se	: serum
Bl	: kan

Fe	: dışkı
Ur	: idrar
Lu	: akciğer
Th	: Thymus
He	: kalp
Li	: karaciğer
te	: testis
sp	: dalak
RES	: retiküloendotelyal sistem

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1:	Genel farmakolojik parametreler	5
Tablo 2:	Nano gümüş üzerine yapılmış Farmakokinetik ve biyodağılım çalışmaları	8
Tablo 3:	Fungal patojenlerin %80'inin etkisiz hale gelmesi için gereken medikasyon miktarı	35
Tablo 4:	Antifungal medikasyonların doz bağımlı hemoliz etkisi	36
Tablo 5:	Çalışma kurgusu, grup bilgileri ve doz tablosu.....	64
Tablo 6:	Deney sırasında ölçülen rat ağırlıkları	67
Tablo 7:	Ratlardan alınan dokuların histopatolojik incelemesine ait tablo.	69
Tablo 8:	2. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları.....	81
Tablo 9:	30. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları.....	82
Tablo 10:	60. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Şekil 1:** Elektron mikroskopisinde Grup IV, 2. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D2) alınan beyin dokusunda çekirdek etrafında ödem ve axonal şişme görülmektedir (x5000). 73
- Şekil 2:** Elektron mikroskopisinde Grup V, 2. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G5D2) alınan böbrek dokusunda çekirdek çevresinde perinükleer ve mitokondriyal ödem görülmüştür (x5000). 74
- Şekil 3:** Elektron mikroskopisinde Grup IV, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D30) alınan beyin dokusunda doku hasarını gösteren perinükleer ve sitoplazmik ödem görülmektedir (x5000). 75
- Şekil 4:** Elektron mikroskopisinde Grup III, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G3D30) alınan böbrek dokusunda sitoplazma içerisinde vakuollerin geliştiği görülmektedir. Perimitokondriyal ödem az da olsa mevcuttur (x5000). 76
- Şekil 5:** Elektron mikroskopisinde Grup II, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G2D30) alınan böbrek dokusunda doku hasarının da düzelme başladığı görülmüştür. Perinükleer ödemin azaldığı ve sitoplazmadaki ödemin azaldığı görülmüştür (x5000). 77
- Şekil 6:** Elektron mikroskopisinde grup II, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G2D60) alınan beyin dokusunda dokunun tamamen normal beyin dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Yer yer görülen çekirdek etrafındaki vakuollerin geçirilmiş doku hasarı sonrası oluştuğu düşünülmüştür (x5000). 78
- Şekil 7:** Elektron mikroskopisinde Grup IV'te, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D60) alınan böbrek dokusunda, tamamen normal böbrek dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Mitokondriyal dizilimin eski düzenine kavuştuğunun saptanması, doku hasarının tamir edildiğini düşündürmüştür (x5000). 79
- Şekil 8:** Elektron mikroskopisinde grup VI, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G6D60) alınan karaciğer dokusunda dokunun tamamen normal karaciğer dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Mitokondriyal dizilimin eski düzenine kavuştuğunun saptanması, doku hasarının tamir edildiğini düşündürmüştür (x5000). 80

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Resim 1:** A-D. Karaciğer dokusunda sırasıyla periportal alan, perivenüler alan ve disse aralığında krem renkli pigment yüklü histiyosit birikimi (H&Ex94, x581, x697, x1003)..... 71
- Resim 2:** A, B. Karaciğer ve böbrek dokularında vasküler konjesyon (H&Ex836, x484)..... 72
- Resim 3:** A, B. Normal histopatolojik görünümdeki serebellum/beyin dokuları (H&Ex194, x581). 72

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 1. Grup I'in 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb).....	85
Grafik 2. Grup II'nin 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)	85
Grafik 3. Grup III'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)	86
Grafik 4. Grup IV'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb).....	86
Grafik 5. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)	87
Grafik 6. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki bakır miktarı (ppb).....	87
Grafik 7. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki çinko miktarı (ppb)	88
Grafik 8. Grup VI'nın 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki bakır miktarı (ppb)	88

1. GİRİŞ

Omurga cerrahisi sonrasında enfeksiyon gelişmesi, hala korkulan komplikasyonlardan birisidir. İmplant kullanılan olgularda ise enfeksiyon gelişimi daha kolay olmaktadır. Bugüne dek implant kullanılan omurga cerrahilerinde enfeksiyon gelişmesini önlemek adına pek çok girişim yapılmış, pek çok yöntem denenmiştir. İmplantların antibiyotikler ile kaplanması veya gümüş ile kaplanması bu girişimlere verilebilecek örneklerdendir. Antibiyotik kaplı implantlar bu çalışmanın kapsamı dışındadır. Bu çalışma, gümüş ile kaplanmış implantların güvenlik sınırlarını test etmeyi amaçlamıştır. Gümüş dışında pek çok başka metalin de antimikrobiyal özellikleri vardır. Bu metallere en iyi bilinenleri bakır ve çinkodur. Yine de bugüne dek bakır ve/veya çinko kaplanmış bir implant sistemi tanımlanmamıştır.

Bir implant üzerine antibakteriyel nitelikli bir metali kaplamak için farklı teknikler kullanılabilir. Electroplating, plazma buhar biriktirme, sol-gel teknikleri bunların en sık kullanılanlarıdır. Sol-gel tekniği, en kolay olanıdır ve kendi içerisinde dip coating, spin coating ve spray coating olarak 3 ayrı teknikle yapılabilmektedir. Karmaşık geometrik yapıdaki parçalar (spinal implantlar gibi) için en uygun yöntem, dip coating yöntemidir.

Sol-gel kaplamalar, nano parçacık içeren kaplama kimyasalları ile yapılmaktadır. Kaplama yapıldığında ise, son sinterleme aşamasında kaplanmış materyal polimerize olduğu için artık nano boyutta olmaktan çıkmakta, makro molekül haline gelmektedir. Bu nedenle, aslında bu tür kaplamalara nano kaplama denilmesi çok uygun değildir, aslında hala bu isimle anılıyor olmasının altındaki sebep, kaplamanın nano materyal içermesi değil nano metre inceliğinde (20-600 nm) yapılabiliyor olmasındandır. Yine de, gümüş, bakır ve çinko gibi metallerin nano formundan yola çıkılarak yapılan bu tür kaplamalar incelenirken ilgili metallerin nano formlarının da incelenmesi gerekmektedir. Literatürde nano bakır ve nano çinko ile yapılmış yeterli sayıda toksikoloji çalışması yoktur. Bu nedenle de, nerede ise tüm nano materyallerin vücuda alındıklarında benzer emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerine maruz kaldığı gerçeğinden yola çıkılarak, nano gümüş ile ilgili çalışmalara odaklanması çok yanlış olmayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NANOMATERYALLERE GENEL BAKIŞ

Nano maddeler, Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) ve Amerikan Ulusal Standartlar Enstitüsü (ANSI) tarafından tanımlanmıştır (6). Bu tanıma göre, 1, 2 veya 3 farklı çapının 100 nm ve altında olması bir materyalin “nano” olarak sınıflandırılmasına yeterlidir. Nano boyutlu materyallerin, nano boyutta olmayan benzerleri ile aralarında davranışsal olarak çok fazla fark vardır. Bu durum, bu tür nano materyallerin tüketim mamüllerinde aşırı kullanımına neden olmaktadır. Diğer taraftan, nano teknoloji çok hızlı gelişen bir bilim dalıdır. Bu durum da, nano materyaller içeren ürünlerin artışı hızlandırmaktadır. Bu nedenle, bu sahadaki ürünlerin olası kalıcı etkileri ile ilgili olarak son derece dikkatli olunmalıdır. Sonuç olarak, potansiyel risk seviyesini, maruziyet içeriğini (serbest parçacıkların mı yoksa bileşikten kopan parçaların mı etkide rol oynadığını) çok iyi tanımlamak ve nano maddelere bağlı hasarı saptamak ve özellikle de insan sağlığını tehdit eden nano materyal karakteristiğini ortaya koymak çok önemlidir (146). Bu bilgi, gelecekte risk belirlemede ve maruziyeti azaltacak ölçümler yapabilmede değerli olacaktır. Bu da ya koruyucu önlemler alarak ya da zararlı maddelerin alternatiflerini bularak olacaktır. Sonuç olarak, bir ürünün içine nano materyal koymak için güvenli nano materyaller yapmak ve eldeki nano materyallerin güvenlik sınırlarını iyi belirlemek gerekmektedir. Nano materyallerin gösterdiği özellikler, aynı maddenin nano boyutta olmayan türlerinin gösterdiği özelliklerden oldukça farklı olduğu için partikül maruziyetinin potansiyel olarak yapabilecekleri önceden çok iyi belirlenmelidir.

Nano gümüş içeren uygulamalar, çamaşır makinalarında yüzey kaplaması olarak, su arıtma cihazlarında, ambalaj materyallerinde ve daha pek çok üründe kullanılmaktadır. Dahası tekstil ve güneş kremi gibi bazı kozmetik ürünlerine de girmiş durumdadırlar. Ayrıca idrar sondaları, yara bakım örtüleri, cerrahi aletler ve kemik protezleri gibi medikal ürünlerin içine girmiş ya da yüzeyine kaplanmış durumdadırlar. Burada sayılmayan daha pek çok üründe nano gümüş kullanılmaktadır. Örneğin, **Woodrow Wilson Project on Emerging Nanotechnology** isimli projenin hazırladığı rapora göre en az 235 tüketim üründe nano gümüş kullanılmaktadır (<http://www.nanotechproject.org>). Bu ürünlerin büyük

çoğunluğu sağlık alanındandır. Yiyeceklerle temas halinde olan paketleme uygulamaları da vardır. Tüketicilerin nano gümüşü en çok kullanma sebebinin gümüş içeren kıyafetler örneğinde olduğu gibi anti bakteriyel özellik ya da koku önleyici özellik olduğu düşünülmektedir. Ayrıca diş macunlarında, plastiklerde ve sprey boyalarda da gümüşün kullanıldığını görmek mümkündür (150). Mesleki maruziyet üretim, paketleme ve taşıma sırasında olabilir. Ayrıca çeşitli preparatların hazırlanması aşamasında ya da bu preparatların tüketiminde benzer maruziyetler yaşanabilir. Mesleki maruziyet için asıl yolun inhalasyon ya da elle temas aşaması olduğu düşünülmektedir. Bu tür maruziyette oral alım da ihmal edilmemelidir. Ağız yoluyla alınan nefesteki nano gümüş, kolaylıkla yutulabilir ve oral alıma neden olabilir. Burun yolu ile inhale edilen gazın içerdiği nano gümüş de, mukosiliar aktivasyonla kolaylıkla yutulabilir. El-ağız teması da oral alım için bir yoldur.

Gümüş NP'lerin antimikrobiyal etkisinin nano gümüş yüzeyinden serbestleşerek biyolojik çevreye yayılan gümüş iyonlarına ve gümüş iyonlarının güçlü oksidatif aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu her iki özellik de hücrelerin yapısı ve fonksiyonu üzerinde bir seri olumsuz etkiyi tetiklemekte ve bu tetiklenen mekanizma ile sitotoksiste, genotoksiste, immün cevap ve hatta hücre ölümü gerçekleşmektedir. Son günlerde bilim adamları tarafından bu tür maruziyetlerin yaşandığı üretim hatları ve tüketiciler mercek altına alınmıştır ve belki de bu şekilde nano gümüş için gerekli olan risk analizi tamamlanabilecek ve gelecekte daha güvenli ve daha etkili antimikrobiyal ürünler geliştirilebilecektir.

Pek çok enfektif durumda 20 nm ve altında parçacık boyutuna sahip nano gümüşün güçlü antimikrobiyal etki yaptığı belirlenmiştir (132). Gümüş zararlı bakteri, maya ve sporların büyümesini önler/geciktirir. Son makaleler, gümüşün bir antimikrobiyal ajan olarak yanıklarda, açık yaralarda ve kronik ülserlerde tekrar gün yüzüne çıkışını müjdelemektedir (12). Nano Gümüş doğrudan içme suları, yiyecekler, kozmetikler, ilaçlar ve ilaç salınım cihazları ile alınabilir. Her ne kadar, akut oral ve transdermal yolla alınan (2000 mg/kg vücut ağırlığı) gümüşün gine domuzlarında ve sıçanlarda belirgin klinik bozulma, ölüm, akut iritasyon, göz ve ciltte korozif reaksiyon yapmadığı savunulsa da, bazı çalışmalar, oral yolla alınan ürünlerdeki gümüşün özellikle karaciğer ve böbrek başta olmak üzere pek çok dokuda biriktiği ve toksik etkilere neden olduğu yönündedir (154). Literatüre göre gümüş; alüminyum, demir

ve nikel gibi diğer pek çok metale göre daha toksiktir ancak bu durumun etki mekanizması henüz netlik kazanmamıştır (21).

Metalik nano partiküllerin hacimlerine göre çok fazla yüzey alanlarının olması ve bu sayede güçlü antimikrobiyal etki gösterebilmeleri umut vericidir. Zira antibiyotiklere hızla direnç gelişmektedir (106). Bakır, çinko, titanyum, magnezyum, altın ve alginat gibi pek çok madde antimikrobiyal özellik gösterse de (2,50,111), bunların içerisinde en etkili ve doğal olarak da en popüler olanı –arjiri riski taşısa da- bakteri, maya, virüs ve ökaryotik mikroorganizmalara karşı en etkili olan gümüş olmuştur. Son araştırmalar, metalik gümüşün ve gümüş nano partiküllerin yanık tedavisine, dental materyallerde, paslanmaz çelik malzemelerin kaplanması, tekstil ürünlerinde, su arıtmada, güneş kremi losyonlarında kullanılabilir olduğunu ve insan hücrelerine çok düşük toksik etkisi olduğunu beyan etmektedir (38).

2.2. METAL NANO PARTİKÜLLERİN FARMAKOKİNETİĞİ

Bu çalışma, yukarıda da belirtildiği gibi, gümüş nano parçacıkların in vivo toksisitesini ya da güvenilirliğini ortaya koymak üzere hazırlanmıştır. Bu nedenle de bu alandaki çalışmalar irdelenmiştir ve literatürde gümüş toksisitesine yönelik çokça çalışma bulmak mümkündür, çünkü gümüş başta yanık örtüleri olmak üzere pek çok üründe geniş bir kullanım alanı bulmuş durumdadır. Bununla ilişkili olarak, gümüş nano parçacıkların mikro organizmalar kadar insan dokusuna da toksik olup olmadığı incelenmelidir, öyle de yapılmaktadır. Ancak, literatür henüz yeterli ve sağlıklı veriden yoksundur. Farmakokinetik bilimi, ilaçların vücuttaki emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını inceleyen bilim dalıdır. Bunun için deneysel ve matematiksel yaklaşımlar kullanılır. Bu prosesleri açıklayan farmakokinetik parametreler, dağılım hacmi (Vd), klirens (Cl), yarılanma ömrü ($T_{1/2}$), ortalama etki süresi (MRT), maksimum veya pik konsantrasyonu (C max), zaman –konsantrasyon eğrisi altındaki alan (AUC) ve biyoyararlanım (F) dir (Tablo 1), (92, 168).

Bu parametreler, matematik modeller kullanılarak hesaplanmaya veya tahmin edilmeye çalışılırlar. Eğer ilacın kanda kalma süresini uzatmak amaçlanmış ise, azalmamış $T_{1/2}$, AUC, MRT ve azalmış Cl'ye gereksinim duyulur. Diğer taraftan,

düşük $T_{1/2}$, AUC ve MRT'nin yanı sıra yüksek Cl değerlerinin olması pek çok ilaç ve nano partikül için söz konusudur ve çabuk eliminasyonu ifade eder. Nano partiküller için bu durum tam bir eliminasyon değildir. Daha çok çabucak kandan temizlenme ama buna karşılık retiküloendotelial sistemde (kemik iliği, karaciğer, dalak ve lenf düğümleri) birikme söz konusudur. Bir nano parçacığın davranışını tam olarak ortaya koyabilmek için, o parçacığın kandaki miktarını mümkün olduğunca uzun süre monitörize etmek gerekir (genellikle yarılanma ömrünün 3 katı bir süre). Yani, farmakokinetik data, kanda istenilen dozda ilaç bulunmasını sağlamak için vardır. Ayrıca, hedef organ dozu, ilaçların ve nano parçacıkların etkinliğini ve potansiyel toksisitesini değerlendirmek için önemlidir. Örneğin, istenilen etkiye ulaşılabilmesi için, ilaçların ve nano parçacıkların hedef dokuda baskın olarak birikmesi gerekir. Aksine, hedef dışı organlarda fazla biriken ilaç ya da nano parçacıklar, istenmeyen yan etkileri neden olabilirler. Bu durumdan kaçınmanın yollarını bulmak da yine farmakokinetik biliminin işidir. Böylelikle, nano parçacıkların farmakokinetik ve doku dağılımı verileri, güvenli ve etkili biyomedikal uygulamaların olmazsa olmaz parçası haline gelmektedir (92,107,168).

Tablo 1. Genel farmakolojik parametreler

Genel Farmakokinetik Parametreler		
Sembol	Açıklama	Not
F	Biyoyararlanım	F, uygulanan dozun vücut tarafından emildikten sonra sistemik dolaşıma geçen kısmını ifade eder.
Vd	Dağılım hacmi	Vd, orantılılık sabitidir. Uygulanan doz / ölçülen kan değeridir. $Vd = \text{doz/konsantrasyon}$ Uygulanan ilacın vücut dokuları ve sıvılarına olan dağılımın önemli bir göstergesidir.
Cl	Klirens (temizlenme)	Cl, her hangi bir ilacın vücuttan temizlenmesinin göstergesidir.
$T_{1/2}$	Yarılanma ömrü	$T_{1/2}$, her hangi bir prosesin (emilim, atılım vs) tamamlanması için gereken sürenin yarısını ifade eder. $T_{1/2} = 0.693 \times Vd/Cl$ olarak hesaplanır.
MRT	Ortalama dolaşımda kalma süresi	MRT, molekülün vücutta ortalama kalış süresini ifade eder.

Farmakokinetik analizler, rutin olarak ilaçların ve kimyasalların tıbbi amaçla kullanılmasından önce kullanılırlar. Metal nano partiküller söz konusu olduğunda, bu metallerin sentezi, biyo dağılımı ve tıbbi uygulamaları konusunda çok sayıda yayın olmasına rağmen, klasik farmakokinetik yaklaşım ve hesaplama sadece birkaç

çalışmada yapılmıştır. Bu çalışmalardan gümüş ile ilgili olanları tablo 6'de özetlenmiştir. Nano partiküllerin farmakokinetiklerinin az biliniyor olması bu metallerin güvenli şekilde kullanılmalarına kısmen engel olmakta, güvenlik sınırları karanlıkta kalmaktadır.

Klasik farmakokinetik analizlerin dışında, nano parçacıkların farmakokinetiği hakkında fikir edinmek için farklı bir teknik daha vardır. Fizyolojik temelli farmakokinetik model (PBPK) olarak ifade edilen bu teknik, kimyasalların, ilaçların ve dahası nano partiküllerin emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını matematiksel olarak açıklamakta kullanılır (148). Bu tekniğin avantajı, hedef organ dozunun belirlenebilmesine olanak sağlaması ve yüksek ekstra polasyon (hayvanda alınan sonuçların ve kullanılan dozların insana yansıtılabilecek şekilde genişletilebilmesi) kapasitesidir. Bu ise özellikle nano metallerin tıbbi kullanımında çok önemlidir.

Gümüş nano parçacıkların dokuya alınımı, metabolizması ve atılımı incelenmeden önce, genel olarak tüm nano parçacıkların vücuttaki davranışı hakkında genel bir bilgi sahibi olmak önemlidir.

Nano parçacıklar, bazı durumlarda serbest ilaçlara bağlanarak onların kandaki miktarlarını ve atılım yollarını değiştirmekte kullanılmaktadır. Örneğin hidrofilik (suda çözünen) bir ilaç kana enjekte edildiğinde, genel olarak böbreklerden süzülür ve idrar ile atılır. Çünkü bu moleküller serum proteinlerine bağlanmazlar. Ama hidrofobik (suda çözünmeyen) bir ilaç, serum proteinlerine bağlanacağı için, atılım şekli büyük oranda karaciğerden eliminasyon sonrası dışkı yolu ile olacaktır. Bir ilacı, hidrofilik veya hidrofobik olmasına bakmaksızın, nanoparçacıklarla kapladığımızda ise, hem karaciğerdeki enzimlerden kaçabilmekte, hem de moleköl boyutu arttığı için böbrekten süzülememektedir. Bu ise, ilacın kandaki var olma süresini ve miktarını artırmaktadır. Böbreklerden süzülme için sınır değeri 5.5 nm'dir ve pek çok nano parçacık bu boyuttan çok daha büyüktür (92). Bir nano parçacık damar içine enjekte edildiği zaman hızlıca serum proteinlerine bağlanır ki bu durum doku makrofajları için bir uyarı oluşturur. Bunun sonucu olarak da, nano parçacıklar hızlıca kandan uzaklaştırılarak makrofajlar içinde hapsedilmiş şekilde ilgili dokularda birikir. Nano parçacık bağlanmış serum proteinlerine opsonin bulmaya da opsonizasyon adı verilmektedir. Dalak, kemik iliği ve karaciğer bu

makrofajlarca zengin yapılar olduğu için nano parçacıkların özellikle buralarda birikmesine şaşırmamak gerekir.

Ayrıca, nano parçacıkların dağılımını etkileyen ana unsur, damar duvarındaki porların (deliklerin) çapıdır. Küçük moleküllerin aksine, nano parçacıklar ancak endotel hücreleri arasındaki açıklıklardan geçerek dokuya dağılabilmektedir. Bu nedenle de, endotel duvarı gevşek olan dokularda nano parçacık birikimi çok daha fazla olmaktadır. Karaciğer, dalak, kemik iliği ve tümör dokusu gibi yapılar bu şekildedir (92). Bu durum, altın nano parçacıklarının tümörlerde tedavi amacı ile kullanılmasının yolunu açmıştır. Opsonizasyon, mononükleer fagositik sistemin (MPS) nano parçacıkları tanımasını ve hücre içine alarak kandan uzaklaştırmasını sağlar. 100 nm'den daha büyük nano parçalar, kanda daha uzun kalır ve daha az fagosit edilirler. Nötral parçacıkların kanda kalma süresi de, negatif veya pozitif şarjlı parçacıklardan daha uzundur. Yani bir nano parçacığın yüzey kimyası, parçacık boyutu ve yüzey elektrokimyası onun kaderini belirler. Bu nedenle de, dış yüzeyi hidrofilik polimer uzantılı yapılarla (PEG-polieter glikol örneğinde olduğu gibi) kaplanmış nano parçacıklar kanda daha uzun süre kalmakta ve tümör dokusunda daha çok birirmektedir (92).

Bir molekülün kanda kalış süresi ($T_{1/2}$) ile dokularda birikme miktarı arasında bir ilişki olduğu bilinir. Ama bu durum nano parçacıklar için geçerli değil gibi durmaktadır. Muhtemelen, nano parçacıklar, vücuttan atılmak yerine, proteinlere bağlanarak ve makrofajlarda doğrudan hücre içine hapsedilerek kandan uzaklaştırılmaktadır. Yani aslında, büyük miktarları hala vücut içinde ama dokularda birikmiş haldedir. Bu durum, nano parçacıkların damar içi uygulamadan sonra kandan çok hızlı temizlenmesini ama buna tezat teşkil edecek şekilde dokularda fazlaca saptanmasını açıklamaktadır (107). Dahası, pek çok farmakokinetik çalışma, lenfatik sistemi göz ardı etmektedir. Lenfatik sistem, büyük moleküllerin ve bazen de mikroorganizmaların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan bir sistem olup retikuloendotelial sistemin bir parçasıdır. Pek çok ilaç, lenf düğümlerince tutulamayacak kadar küçük moleküler yapıdadır ama nano parçacıkların pek çoğu bu kadar küçük değildir. Muhtemelen nano parçacıklar kandan uzaklaşma sürecinde, proteinlere bağlanmak ve dokularda birikmek gibi özelliklerinin yanı sıra lenf düğümlerince de içeri alınmaktadır. Bu ise, ilerleyen

zaman diliminde buralardan tekrar kana geçebileceklerini göstermektedir. Belli ki, normal ilaçlara uygulanan farmakokinetik formüller, nano parçacıklar için her zaman geçerli olmayabilmektedir (107).

2.3. NANO GÜMÜŞÜN FARMAKOKİNETİĞİ

2.3.1. Nano Gümüşün Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım Profili

Çeşitli kimyasallar ve ilaçlar adına çok çeşitli PBPK modeli geliştirilmiş olmasına rağmen nano gümüş ile ilgili pek az çalışma vardır (Tablo 2).

Tablo 2. Nano gümüş üzerine yapılmış Farmakokinetik ve biyodağılım çalışmaları

Referanslar	Tip, yüzey kaplaması, parçacık boyutu	Model	Veriliş yolu ve dozu	Çalışma süresi	Organ/ doku	PK
Takenaka et al. (2001)	AgNPs: 14.6nm	Sıçan	6 saat inhalasyon 0.0072 mg/rat; IT:0.05mg/rat	0,1,4,7gün	Bl,He,Ln,Lu, Li,Ki,Nc,Br	H
Tang et al.(2008)	AgNPs: 50–100nm	Sıçan	SC:62.8mg/kg	2,4,8,12,18,24 hafta	Br	H
Lankveld et al. (2010)	AgNPs: 20,80,110nm	Sıçan	i.v.: 0.0238–0.0276 mg/rat	2,5,10,20,30 dak, 1, 24, 48, 96, 120, 168, 240, 384 saat	Bl,Li,Sp,Ki, Lu,He,Br,Te	H
Van der Zande et al.(2012) 40	Noncoated AgNPs: <20nm; PVP-coated AgNPs: <15nm; Ag+	Sıçan	Oral:9,90mg/kg	2 aya kadar	Li,Ki,Lu,He,Sp, Br,Bla,Te,St, Int,Bl,Fe	H
Dziendzikowska et al.(2012) 41	AgNPs: 20,200nm	Sıçan	i.v. :5mg/kg	1,7,28 gün	Li,Sp,Ki,Lu, Br,Ur,Fe	H
Xue et al. (2012) 42	Ag NPs:15nm	Fare	i.v.: 120mg/kg	10,20,30 dak, 1,3,6,12 saat, 1,7,14 gün	Bl,Lu,Li,Sp,Ki	E
Lee et al. (2013) 43	Citrate-coated AgNPs: 7.9nm	Tavşan	i.v.: 0.5,5mg/kg	5,10,30 dak, 1,2,6,12 saat, 1,2,3,4,5,6, 7,14,21,28 günler	Se,Li,Ki,Sp, Lu, Br,Te,Th,Ur,Fe	E

AgNPs, gümüş nano parçacık; **BSA**, sığır serum albumini; **PVP**, polyvinylpyrrolidone; **i.p.**,intraperitonea (karın içi enjeksiyon); **IT**, intratracheal instillation (nefes borusu içinden); **i.v.**,intravenöz (damar içi enjeksiyon); **SC**,subkutan (derialtı); **Bla**, mesane; **Nc**,nazal kavite (burun boşluğu); **Se**,serum; **Bl**, kan; **Fe**, dışkı; **Ur**, idrar; **Lu**, akciğer; **Th**, Thymus, **He**, kalp, **li**: karaciğer, **te**: testis, **sp**: dalak **PK**, farmakokinetik parametrelere ulaşılabilirlik; **E**,en azından bir farmakokinetik parametre (T1/2, Cmax,or AUC gibi) makalede yer alıyorsa. ; **H**, makalede farmakokinetik parametre yer almıyorsa.

Daha önce gümüş üzerine yapılmış çalışmalar, potansiyel olarak gümüş nano parçacıkların uygulama sahasından vücuda geçerek dokularda biriktiğini göstermiştir. Daha sonraki başlıklarda bu uygulama yolları ve ağırlıklı olarak gümüş biriken dokular anlatılmıştır.

Semler-Behnke ve ark (117), 1.4 nm ve 18 nm boyutundaki iki farklı nano altını işaretleyerek sıçanlara intratrakeal olarak vermişler ve 18 nm boyundaki altının) 99,8'inin akciğerde kaldığını ancak 1.4 nm altının akciğerde kalan kısmının %91.5 olduğunu ve kalan %8.5'luk kısmın kan ve karaciğer dahil pek çok ikincil hedef dokuda biriktiğini saptamışlardır. Böylelikle daha küçük parçacıkların akciğerdeki hava-kan bariyerini geçebildiğini göstermesi açısından bu çalışma önemlidir.

Diğer taraftan, damar içi uygulamada gümüşün gösterdiği dağılım hacmi intratrakeal olandan hayli farklıdır (81). Bu durum, gümüşün vücut dağılımında uygulama yolunun da önemli olduğu sonucunu çıkarmaktadır. Yazarlar ayrıca, intratrakeal uygulamada bir kısım gümüşün yutularak mide-barsak sistemine geçebileceğini ve hızlıca dışkı ile atılmış olabileceğini öne sürmüşlerdir. Zaten daha önceki çalışmalar da oral olarak verilen nano gümüşün çok büyük bir kısmının dışkı ile atıldığını kalanının ise biyolojik bariyerleri geçerek dokularda biriktiğini göstermiştir. Karaciğer, daha önce de belirtildiği gibi, bu tür bir birikimde ilk hedef organdır. Çünkü retiküloendotelyal sistemin (RES) görevi bu tür yabancı partikülleri makrofajlarca fagosite ederek zararsız hale getirmektir. Parçacık boyutu ve verilmiş yolu bunu değiştirmektedir. Daha küçük parçacıklar daha geniş bir dağılım hacmi yaratmaktadır. Altın nano parçacıkların idrar ve dışkı ile atıldığı bilinmektedir. Aynı durum gümüş nano parçacıklar için de geçerlidir.

2.3.2. Emilim (Absorbsiyon)

Pek çok çalışmacı, nano gümüşün oral, dermal ya da inhalasyon yoluyla maruziyet sonrasında vücut içine alınabildiğini göstermiştir (72,83,125,127,134,136). Bu alımın gümüş iyonları şeklinde mi yoksa daha büyük parçacıklar şeklinde mi olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Lubick (102) bulgularını yorumlarken, organizmanın gümüşü

sadece iyon formunda değil, nano formda da alabileceğini, bu şekilde sürekli bir gümüş iyon kaynağı oluşabileceğini ve belki de bu şekilde organizmanın gümüş iyon detoksifikasyonunu by-pass yapabileceğini savunmuştur. Bu durum Louma (103), Drake ve Hazelwood (37) tarafından da desteklenmiştir. Örneğin, emilen gümüş iyonları kolay çözünebilen gümüş sülfid ve gümüş klorid presipitatları oluşturmaya ve ayrıca proteinlere bağlanarak onların biyo yararlanımlarını azaltmaktadır. Muhtemelen nano gümüş, nano olmayan gümüşe göre çok daha toksiktir.

Park ve arkadaşlarının (54) bulduğu AUC_{oral} / AUC_{iv} değerleri baz alındığında, sitrat kaplı 7.9 nm boyutundaki gümüş nano parçacıkların oral biyoyararlanımı 1 mg/kg doz için %1.2, 10 mg /kg doz için ise %4.2 dir. Bu kısmen düşük bir biyoyararlanım olsa da altın nano partiküllere göre (111) hala yüksek değerlerdir. Gümüş nano partiküllerin 28 gün sıçanlarda oral uygulandığı çalışmada (135) ise (90 mg/kg, <20 nm kaplanmamış veya 20 nm PVP kaplanmış) kan gümüş seviyesi gümüş nitrat verilen gruba göre nano partikül grubunda tüm zaman noktalarında 7-10 kat daha düşük bulunmuştur. Bu, gümüş nitrat şeklinde verilen gümüşün çok daha fazla emildiğini göstermektedir. Verilen çözünebilir gümüş dozu ise nano gümüş grubunda %7, gümüş nitrat grubunda %100 olarak hesaplanmıştır. Kan gümüş seviyeleri normale geldiğinde ise nano gümüşün kan seviyesi gümüş nitrattan 2 kat fazla bulunmuştur. Bu çalışma, oral nano gümüş uygulamasında, plazmadaki gümüşün büyük kısmının nano partikül değil, bu nano partiküllerden serbestleşen gümüş iyonları olduğunu ve partikül biyoyararlanımının çok düşük olduğunu göstermektedir.

2.3.3. Dağılım

Absorbsiyonu (emilimi) takiben, gümüşün kana geçtiği ve dokularda biriktiği ve gümüş bağımlı toksisiteye neden olabildiği bilinmektedir. Gümüşün en çok tercih ettiği organlar sırası ile karaciğer ve cilt olarak öne çıkmaktadır. Ancak, böbrek, dalak, kalp, olfaktor sinir, beyin ve testislerde de biriktiği saptanmıştır (67,74,126,127,134).

Gümüş nano partiküller üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmaların büyük bir çoğunluğu, dağılım için ilk seçilen organın karaciğer olduğunu göstermektedir. Bunu dalak ve böbrek izlemektedir. Oral (74-76,100,154), intravenöz (81,142,152-154), subkutan (128,130), veya inhalasyon (127) yoluyla verilmesi durumu değiştirmemektedir. Karaciğerdeki gümüş birikimi Küpffer hücreleri, hepatositler ve sinuzoidal endotelyumda saptanmıştır (74) Böbrekte, korteks, medulla ve kortikal glomerüller dahil tüm böbrek bölgelerinde gümüş saptanabilmektedir (75,76). Ayrıca, oral alım sonrasında sıçanlarda cinsiyet bağımlı böbrek dağılımı gözlenmiştir. Erkekler göre dişilerde böbrekte 2 kat fazla gümüş saptanmaktadır (77). Böbrek ve karaciğer dışında, dalakta da yüksek oranda dağılım saptanmıştır. Bu dağılım yine nano gümüşün boyutuna bağımlıdır (81), 5 gün boyunca i.v. olarak verildiğinde 20 nm parçacıklar birincil olarak karaciğerde birikirken ve böbrek 2.sırada, dalak 3. sırada iken, 80 veya 110 nm boyutundaki parçalar birincil olarak dalakta, daha az olarak karaciğerde, daha sonra da akciğerde birirmektedir. Bu bulgular, i.v enjeksiyon sonrasında farelerde, 90.5 nm nano gümüş aglomeratların dalakta daha fazla olduğunu söyleyen önceki çalışma ile de uyumludur (142). Bu durumun açıklamasını Lİ ve Huang (92) yapmaya çalışmıştır. Onlara göre, karaciğerdeki hücre porlarından daha küçük parçacıklar (yaklaşık 100 nm) en iyi şekilde karaciğer tarafından tutulurken daha büyük parçacıklar dalak tarafından tutulmaktadır. 20 ve 200 nm i.v. gümüş ile yapılan başka bir çalışmaya göre, 20 nm parçacıkların karaciğer, dalak, böbrek beyin ve akciğerde 200 nm boyutundakilere göre tüm zaman dilimlerinde (1., 7. ve 28. günlerde) çok daha fazla biriktiğini göstermiştir (39). Tüm bunlar, gümüş dağılımının boyut bağımlı olduğunu ve ileriki çalışmaların bu konuya odaklanmaları gerektiğini gözler önüne sermektedir.

Pek çok çalışma, 110 nm boyutuna kadar olan gümüş nano parçacıkların uygulama yoluna bakılmaksızın beyinde biriktiğini söylemektedir (46,47,81,100,135,152-154). Yapılan son bir çalışma (135), 28 gün boyunca oral yolla verilen gümüşün %90'ının beyinde saptandığını ve bu durumun 2 ay boyunca devam ettiğini göstermektedir. Ancak diğer çalışmalarca desteklenen bir veri değildir. Kısacası, hala nano gümüşün kan beyin bariyerini geçme kapasitesi netlik kazanmamıştır. Garza-Ocanas ve arkadaşları (46), 2 nm boyutundaki ve sığır albumini ile kapladıkları gümüşleri intraperitoneal olarak 50 mg/kg dozunda enjekte etmişler ve enjeksiyonu takip eden

24., 96. ve 168. saatlerde sıçanların beyinlerinde dikkate değer ölçüde gümüş saptadıklarını yazmışlardır. Bu çalışmada ICP-MS ile ölçüm yapılmış ancak aynı dokularda sonraki TEM çalışmaları bunu desteklememiştir. Yazarlar, gümüş nano parçacıklardan serbestleşen gümüş iyonlarının kan beyin bariyerini geçebildiğini savunmuşlardır. Bir diğer çalışma, sıçanlarda 62.8 mg/kg (50-100 nm) gümüşün subkutan enjeksiyon sonrasında, sinir hücrelerinde saptanabildiğini belirtmiştir. Çalışmalarında TEM-EDS kullanmışlardır 36. Nano gümüş, kan beyin bariyerini 2 farklı mekanizma işle aşıyor görünmektedir: kan-beyin kapillerlerinin endotelinden transsitoz ile veya endotel hücrelerini eriterek (108), transsitozun primer mekanizma olabileceğini savunmuşlardır. Onlara göre hücre membranında hasar oluşmamaktadır. Van der Zende ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (39), sıçanlara 28 gün boyunca oral yolla 9 mg/kg gümüş nitrat ve 90 mg/kg nano gümüş verdikten 1 gün sonra, gümüş nitrat grubunda dokularda çok daha fazla gümüş saptadıklarını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar Loeschner ve arkadaşlarının (100) bulguları ile de uyumludur. Loeschner ve ark, 9 mg/kg gümüş içeren gümüş asetatı 28 gün boyunca oral yolla verdikleri deney hayvanlarında böbrek, akciğer, kas beyin ve plazmada 14 nm (12.6 mg/kg) gümüşe göre çok daha fazla gümüş saptamışlardır.

2.3.4. Metabolizma

Gümüş maruziyet sonrasında olabilecek olumsuz etkilerden en bilineni arjiridir. Arjiri, cildin gri-mavi renk alması durumuna verilen isimdir. Kalıcı olduğu söylenir ancak geçici olduğunu belirten veriler de yok değildir (37).

Yaygın veya bölgesel olabilir, maruziyet sonrası güneş gören cilt bölümlerinde daha belirgindir. Emilen gümüş iyonlarının transformasyonu veya metalik gümüş indirgenmesi olaydan sorumlu tutulsa da mekanizması henüz netlik kazanmamıştır (25, 103). Bu durum dolaşımdaki gümüşün en azından bir kısmının iyon formunda olduğunun ispatı olabilir. Bu iyonlar da muhtemelen diğer tür iyonlarla aynı detoksifikasyon metodları ile detoksifiye edilmektedir (sülfid ve klorit tuzları şeklinde çökelme). Yukarıda da belirtildiği gibi, dolaşımdaki nano gümüş

parçacıkları da bir tür iyon kaynağı olarak görev alıyor olabilir. Bu durumda da duyarlı organlara sürekli bir iyon sağlama durumu söz konusu olabilir (103).

Oral alımı takiben, midenin düşük pH'sında nano gümüşün oksidatif çözünmesi hızlanmakta ve gümüş iyonları mideye geçmektedir (yapay mide sıvısında, verile gümüşün %97'si 6 saat içinde gümüş iyonlarına ayrılmaktadır) (99). Ancak mideden geçiş hızı kısa olduğu için (10-240 dk), canlı dokuda bu durum tam olarak gerçekleşmemektedir. Çözünen gümüş daha sonra klor ile bileşik oluşturmakta ve çökelmektedir. Bu, serbest gümüş iyonu miktarını oldukça azaltmaktadır. Yapay mide sıvısında, toplam maksimum çözünmüş gümüş miktarı 0.51 mg/L olarak saptanmıştır. Bu konsantrasyonun üzerindeki değerlerde, gümüş klorür oluşmakta ve daha fazla artışı ve dolayısı ile biyoyararlanımı sınırlamaktadır. Eğer toplam gümüş miktarı bu değerin (0.5 ppm) altında ise, gümüş klorür oluşmamaktadır ancak yüksek oranda gümüş iyonu oluşmaktadır. Gümüş iyonları ve bileşikleri bir defa gastrointestinal sistemden dolaşıma geçtiğinde, sodyum ve bakır için olan aktif transport yolları gümüş iyonlarını proteinlerin (özellikle serum albumin) ve küçük moleküllerin tiol (-SH) gruplarına bağlamaktadır. Kanda, gümüş GSH ile etkileşime geçebilir, bu durumda hidrojen (H^+) açığa çıkarken GS-Ag oluşur. Bu oluşan kompleksler ise çeşitli dokulara dağılmaktadır. Dağılımı takiben Ag-thiol kompleksler görünür ışık altında ve yavaş bir şekilde sıfır-valanslı gümüş nano partiküllere indirgenirler. Thioller dışında, nano gümüş, Ag_2S nano partikülleri oluşturmak üzere sülfide de olabilirler. Ek olarak, Ag_2S nano partikülleri selenyumla etkileşerek Se/S değişimi ile Ag_2Se nano partikülleri ve Ag/S/Se arjiryal partikülleri oluştururlar.

2.3.5. Atılım (Ekskresyon)

Bazı veriler, gümüşün idrar ile atılabildiğini belirtmektedir (134). Ancak bunu iddia etmek için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Çünkü gümüşün asıl olarak idrarla değil dışkı ile atıldığını belirten geniş bir literatür mevcuttur (37,134). Bu durum absorbe edilen nano gümüşün en azından bir kısmının iyonik hale geçtiğinin bir başka göstergesidir. Emilimin nano gümüş şeklinde mi yoksa iyon şeklinde mi

olduğu netlik kazanmadan atılımı hakkında kesin kanılara varmak yanlış olacaktır. Oysa ki nano altın ile yapılan çalışmalar altının hem idrarla hem de dışkı ile atıldığını net olarak ortaya koymuş durumdadır (117). Aynı durumun gümüş nano parçacıklar için de geçerli olup olmadığı muhtemelen daha fazla çalışma ile mümkün olacaktır.

Gümüş asetatın ve aynı doza denk gümüş içeren nano gümüşün 28 gün boyunca oral verildiği deneklerde (100), gümüşün idrarla atılımı her iki grupta da çok düşük (günlük alımın $<0.1\%$) olduğu bulunmuştur. Nano gümüş grubunda günlük alımın dışkı ile atılma oranı %63, gümüş asetatın ise %49 bulunmuştur. Bu çalışma safra ile atılım konusunda bilgi vermekten uzaktır.

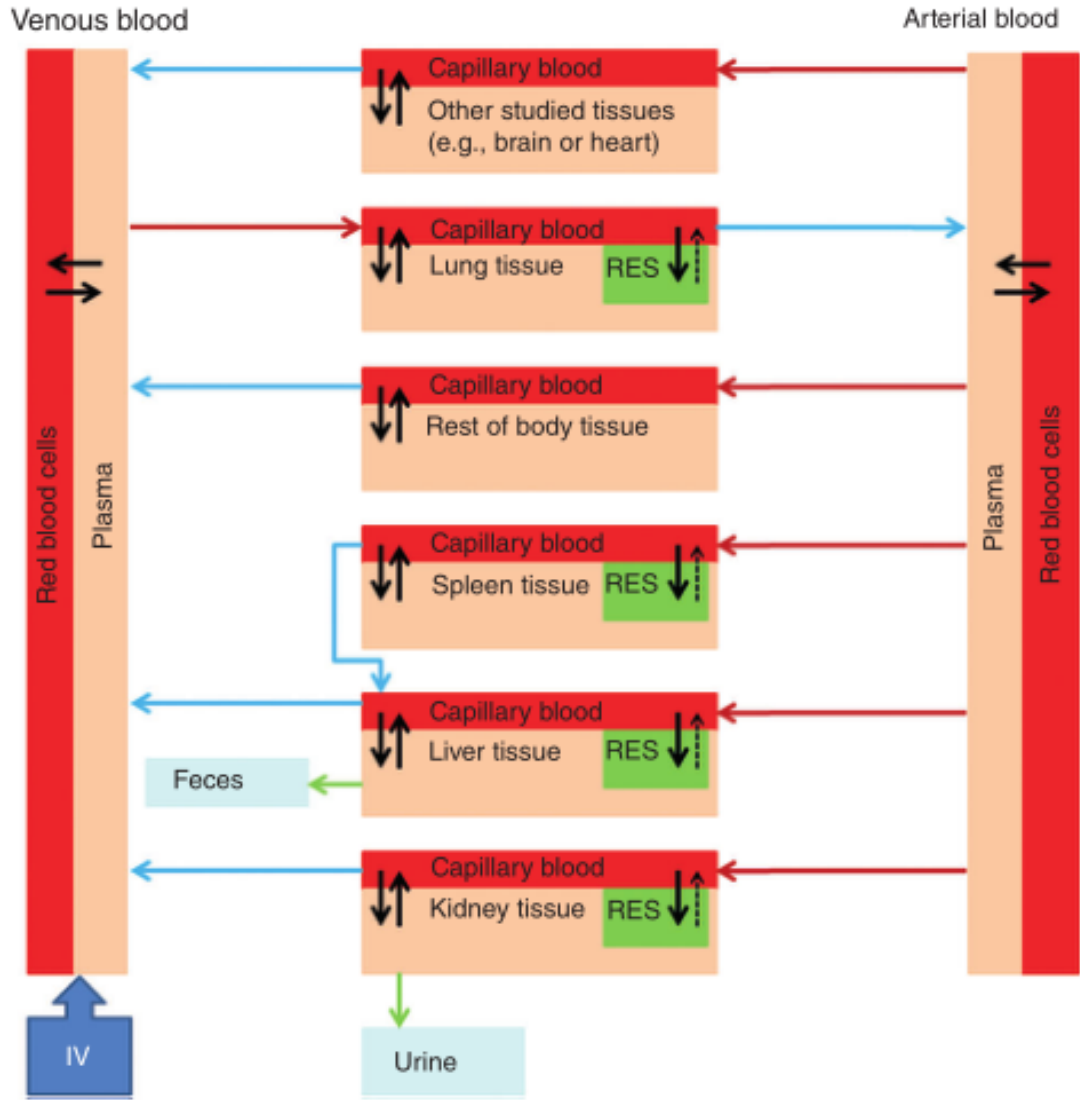
Tavşanlarda tek doz 0.5 ve 5 mg/kg sitrat kaplı gümüşün iv enjeksiyonunu takiben gümüşün idrarla atılımı çok düşük bulunmuştur. 7 günlük toplam idrar itrahi, toplam vücut ağırlığının %0.05'inden düşüktür. Aynı oran dışkı için hesaplandığında sırası ile %8.3 ve %16.7 bulunmuştur.

2.4. İNTRAVENÖZ (DAMAR İÇİ) UYGULAMADAN SONRA GÜMÜŞ NANO PARÇACIKLARIN VÜCUT DAĞILIMI

Çeşitli yollarla verilen nano gümüş bir şekilde kana geçebiliyor ve etki gösteriyorsa, intravenöz verilen gümüşün de aynı yolla aynı etkileri göstermesi beklenebilir. Yalnız, diğer yollarla verilen gümüşün az bir kısmı kana geçerken intravenöz uygulanan gümüşün tamamının kanda olacağı ve doz ayarlamasının çok iyi hesaplanması gerektiği de unutulmamalıdır.

Diğer uygulama yollarında olduğu gibi, intravenöz uygulamada da gümüşün seçtiği ana hedef organ karaciğer ve dalaktır. RES'in bir parçası olan bu organların ilk hedef olması da zaten beklenilmesi gereken bir durumdur. Hücre içersine alınan bu partiküller dışkı yoluyla atılmakta ancak geride kalanlar bazı istenmeyen hücresel olaylara neden olabilmektedirler. Yapılan bir çalışma, pro-inflamatuar etkinin/reaksiyonun partikül fagosite etmiş makrofajlarca başlatıldığı yönündedir. Muhtemelen daha zor yayılan büyük partiküller makrofajlarca daha kolay tanınmaktadır. Bu ise onların vücut dağılımını azaltmaktadır. Makrofajların 0.5

um'den büyük partikülleri fagosite ettiği hatırlanacak olursa bu durum daha da netlik kazanır. Kısacası, büyük moleküller kolay tanınıp fagosite edilirken, küçük parçalar tanınmadığı için fagositozdan kurtulmakta ve vücuda dağılabilmektedir.



Resim 1. Metalik nano partiküller için öne sürülen fizyolojik temelli farmakokinetik model (PBPK) yapısı.

2.5. KAN VEYA PLAZMA FARMAKOKİNETİĞİ

Park ve ark (152-154), sıçanlarda oral ve intravenöz 7.9 nm boyunda ve sitrat kaplı gümüş vererek bir çalışma yapmıştır. Düşük doz olarak 1 mg/kg ve yüksek doz olarak da 10 mg/kg dozunu seçtikleri bu çalışmada, gümüşün farmakokinetiğinin doz ve veriliş yoluna göre değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. İntravenöz uygulamada, 1 mg/kg gümüş verilen grupta $T_{1/2} = 99$ saat, 10 mg /kg gümüş verilen grupta ise 30 saat olarak saptanmıştır. Lee ve ark (2012), aynı tür gümüşün farmakokinetiğini tavşanlarda incelemişlerdir. Tek doz intravenöz uygulamadan sonra, (0.5 ve 5 mg/kg) serum C_{max} seviyesine her iki grupta da 5.dakikada ulaşılmıştır. $T_{1/2}$ ise, 11.7 ve 16.3 gün olarak saptanmıştır. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde gümüşün farmakokinetiğinin türler arasında farklılık gösterebildiği sonucuna ulaşılmaktadır. Örneğin $T_{1/2}$ süresi sıçanlarda tavşanlara oranla 3-4 kat daha kısadır (95-98,152-154). Bu, muhtemelen daha uzun bir geçiş süresi gereksinimi ile ilişkilidir ve biokorona formasyonuna izin verecek kadar uzundur (bio korona formasyonu: nano partiküllerin doku proteinleri tarafından sarılarak daha az biyoyararlanımlı hale gelmesi durumuna verilen isimdir) (107) oluşan bio korona formasyonu ise tahmin edilebileceği gibi nano partikül farmakokinetiğini etkilemektedir. İntravenöz ve oral uygulamalarda, birbirinden farklı bio korona formasyonu gelişmektedir. Bu ise saptanan $T_{1/2}$ zamanını değiştirmektedir Xue ve ark (142), 90.5 nm boyundaki gümüş nano parçacıkların farmakokinetiğini dişi ve erkek farelerde ve 120 mg/kg dozunda intravenöz olarak çalışmışlardır. Her iki cinsiyette de kan gümüş seviyesi tepe noktasına 10. dakikada ulaşmıştır. $T_{1/2}$ seviyesi erkeklerde 15.6 saat, dişilerde 29.9 saat olarak saptanmıştır. AUC, MRT ve Vd ise cinsiyet bağımlı bir değişim göstermiştir. Bu değerler dişilerde daha yüksek bulunmuştur. Ancak klirens dişilerde biraz daha düşük saptanmıştır. Dişi farelerde Vd değeri, 31.9 ml/g, erkeklerde 21.7 ml/g olarak saptanmış. Bu dağılım farenin toplam vücut sıvısından daha fazladır (25 gr ağırlığındaki bir farenin toplam vücut sıvısı 15 ml dir) bu ise dokularda çok fazla biriktiğini göstermektedir.

2.6. HÜCRELER ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Hayvan modelleri ile kıyaslandığında hücre kültürleri ile çalışarak gümüşün toksik etkilerini ortaya koymak çok daha kolaydır. Bu başlıkta, gümüş toksisitesinin hücresel düzeyde incelendiği çalışmalardan yapılan derlemeler bulacaksınız.

Nano gümüşün hücre içerisine alınması, hücre membranının gümüşü tanınması, içe alması ve taşınması ile başlar, kümelenmesi, birikmesi veya atılması ile sonuçlanır. Pek çok hücre için, nano gümüşün endositozu (hücreye alınması), enerji gerektiren bir süreçtir. Zaman ve doz bağımlıdır. Majör hedef organeller endozomlar ve lizozomlardır (9,10,104). Primer astrositler, akciğer fibroblastları, glioblastoma hücreleri, makropinositoz ve klatrin içeren yolaklar içe alımda rol oynar (9,10,104). Oluşan aglomeratlar, çöpçü reseptörlerce tanınır ve makrofajlar tarafından aktin bağımlı endositozla içeriye alınır (119). Monositler ise, aglomere olmamış gümüş parçacıklarını klatrin bağımlı ve aktin bağımlı yolakları kullanarak içlerine alırlar (138). Hücre içerisine alınmış gümüş nano parçacıklara, boyutlarına ve yüzey özelliklerine bağlı olarak, mitokondride ve nükleusta rastlanılabilir (9,10). Gümüş nano parçacıklar bir defa hücre içine alındıklarında oksidatif stres, hücre membran hasarı, hücre siklusunda gecikme/durma, inflamatuvar yanıt, DNA hasarı, genotoksisite, kromozom anormallikleri ve apoptoza neden olurlar (5,9,10,65,143). Nano gümüş parçacıkları, hücre şeklinde değişiklik, yaşamsal fonksiyonlarda azalma, laktat dehidrogenaz seviyesinde artış ve sonuçta da apoptozla ve nekrozla sonuçlanan süreçte neden olurlar (5,43). Sitotoksisite, gümüş nano parçacıkların ve bu parçacıklardan serbestleşen gümüş iyonlarının neden olduğu oksidatif stresin doğrudan bir sonucudur. Elektron spin rezonans çalışmaları, gümüş nano parçacıkların aktif yüzeylerinin doğrudan orijinal serbest radikaller üretebildiğini göstermiştir. Diğer taraftan, nano parçacıkların iyonlaşması da asidik endozomlarda ve lizozomlarda hidroksil radikalleri oluşmasını tetiklemektedir (52). Yüksek doz nano gümüş ile epitelyal hücrelerin polihedral yapılarını kaybederek fuziform şekil aldıkları saptanmıştır. Bunun sebebi, glutation (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve artmış lipid peroksidasyonu sebebi ile artan oksidatif strestir. Bu durum en nihayetinde kaspaz-3 aktivitesini artırarak ve DNA hasarı yaparak apoptoza sebep olur (7). Dahası, hücre içine alınan gümüş parçacıkları hücre membranına hasar verir, lizozomal şişmeye ve hatta lizozomal

membranda yırtılmaya neden olur (143). Gümüş nano parçacıklar ve bunlardan serbestleşen gümüş iyonları, indirgenmiş GSH ve thioredoxin, SOD ve thioredoxin dismutaz gibi proteinlerin thiol grupları ile etkileşirler. Sitoplazmada, hücre membranında ve mitokondri iç membranında hedef olarak seçilebilecek thiol grubu içeren çok sayıda molekül vardır. Nano gümüşün membran proteinleri ile olan ilişkisi sonrasında, lipid peroksidasyonuna ve artmış hücre zarı geçirgenliğine neden olur. Hasarlanmış hücre membranı LDH ve benzeri sitoplazmik içeriğini dışarı kaçırarak hücrenin ölümüne neden olur. Ayrıca, lizozomal membranların yırtılması da sitoplazma içerisine katepsin serbestleşmesine neden olur. Bu da lizozom aracılı apoptoza neden olur. Dahası, mitokondri hasarı, elektron transferinde hatalara neden olur, adenosin trifosfat (ATP) sentezi bozulur, oksidatif stres tetiklenir, sonuçta bu sefer de mitokondri aracılı apoptozis yaşanır (8,143).

Gümüş nano parçacıklar oluşturdıkları oksidatif strese bağlı olarak kromozom ve DNA hasarı yaparak genotoksisiteye neden olurlar. Gümüş ayrıca mutajeniteye de sebep olur (76,77). TEM görüntüleri ve tek hücre elemental haritalama yöntemleri, gümüşün nükleusa geçtiğini ve kromozomları bozarak DNA hasarı yaptığını göstermiştir. Çünkü çekirdek zarındaki porların çapı 9-10 nm dir ve bu boyuttaki nano parçacıkların içeri giriş çıkışına izin verirler. Comet ve mikronükleus çalışmaları göstermiştir ki, gümüş nano parçacıkların hücre içine girişlerini takiben bu parçacıklar nükleusta birikmekte ve kromozomal hasar ve DNA hasarının doğrudan sorumlusu olan oksidatif stresi tetiklemektedir. Sonuç olarak hücre siklusu G2/M interfazında durmakta, proliferasyon inhibe olmaktadır. Sonraki aşamada hücreler ölümü ya da sağ kalmayı seçmek zorunda kalırlar. Bu ise, DNA hasarını onarabilme kapasitelerine bağlıdır (7,9,10). Yapılan bir başka çalışma, düşük doz nano gümüşün kronik uygulamada insan hepatoma hücrelerinde DNA hasarı ve buna bağlı karsinojenite ilişkili genleri artırdığını savunmaktadır. Ne var ki bu çalışmada da kullanılan dozlar mantıklı klinik kullanımın çok üzerindedir (3 mg/kg). Ayrıca, aynı dozda Ag_2CO_3 'ün benzer etkilerinin olmadığı da belirtilmiş, bu duruma “nano boyut etkisi” denilmiş, serbestleşen gümüş iyonları sorumlu tutulmuştur (69).

Bazı nano materyallerin immün cevabı aktive ettiği bilinmektedir (62). Gümüş nano parçacıklar da yaptıkları oksidatif stres sebebi ile doğal ve adaptif inflamatuvar cevabı

tetiklemektedir. Hem aktive olan sitotoksosite hem de gümüş nano parçacıkların kendisi monositlerde lizozomal membranları yırtmakta, sitokinlerden IL-1B'nın maturasyon ve sekresyonunu artırmaktadır. Bu sitokin ise immünolojik aktivasyondan sorumludur. Parçalanmış lizozomlardan sızan katepsin ve K⁺ iyon kaçıışı mitokondrial süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini artırmakta, inflamazomların oluşmasına neden olmaktadır (62). Gümüş nano parçacıklar ayrıca, kan beyin bariyerini oluşturan kılcal damar endotel hücrelerinde inflamasyonu artırmaktadır. Bu etki doz, zaman ve boyut bağımlıdır. Sitotoksik cevabı tetikleyebilirler ve IL-1B, IL-2, TNF alfa ve PGE2 gibi immün ilişkili sitokinlerin ekspresyonunu artırır. Gümüş nano parçacıklara olan cevap, biyolojik bariyerlerin bozulması ve endotel hücre katmanlarında bozulma şeklinde ortaya çıkmaktadır (133).

Lee ve ark (87) nano gümüş ve Amfoterisin B ile muamele ettikleri maya hücrelerinde her iki grubun da intrasellüler glukoz ve trehaloz biriktirdiklerini, kontrol grupta ise bu durumun olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, hücre içi komponentin bozulmuş membran geçirgenliği nedeni ile hücre dışına kaçıyor olduğunu desteklemektedir. Aynı çalışmada, TEM analizi ile maya duvarında ve plazma membranlarında gümüş nano parçacıklarca oluşturulmuş çukurlaşmalar ve delinmeler saptanmıştır. Maya hücre siklusunu nano gümüş sebebi ile G2/M ve G1 fazlarında durmaktadır. Bu durum, gümüşün mayalarda da etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

2.7. NANO GÜMÜŞÜN HÜCRE DÜZEYİNDEKİ ETKİLERİNDE ANAHTAR FAKTÖRLER

Daha önce de belirtildiği gibi, nano gümüşün sitotoksitesi zaman, doz, boyut, yüzey kimyası ve ısı bağımlıdır (104).

2.7.1. Boyut

Boyut, nano gümüşün hücre içine alınmasından, sitotoksitesinden, biyolojik bariyerleri geçebilmesinden ve yarattığı immün cevaptan sorumludur (98,133,153)

Hem oksijen radikallerinin (ROS) üretimi hem de gümüşün iyon haline geçebilmesi kendi parçacık boyutu ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalara göre PVP kaplanmış nano parçacıkların boyutları, ROS seviyesi, apoptoz, nekroz ve azalmış hücre sağ kalımı ile ters orantılıdır (91-94). Nano gümüş ne kadar küçük olursa o kadar geniş yüzey alanına sahip olacağı için o ölçüde de potent etki gösterecektir (78,79). Ayrıca, daha küçük parçacıkların hücre içine alınması da doğal olarak daha kolay olmaktadır (65,66). Gümüşün biyolojik bariyerleri geçebilme özelliği de yine parçacık boyutuna bağlıdır. Akciğer, mide, meme, karaciğer hücresi üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar, gümüşün hücrel aktivitesinde boyutun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Boyutun küçülmesi, ROS seviyesini, membran bütünlüğünü, hücre döngüsünü ve EC₅₀ değerini olumsuz etkilemektedir (97,98). Gümüşün boyutunun küçülmesi vasküler endotele geçişini ve burada hasar oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. Bu küçük parçacıkların hücreler içinde birikmesi endotel hücre katmanını oluşturan hücrelerde morfolojik değişikliklere ve sitotoksositeye neden olmakta, sitokin salınımını artırmaktadır (133). 5-28 nm boyutundaki gümüş nano parçacıkları daha fazla hidrojen peroksit üretmekte ve daha fazla inflamazom formasyonuna sebep olmaktadır çünkü lizozomlardan fazlaca katepsin salınımına, K⁺ kaçışına ve mitokondride daha fazla süperoksit üretimine yol açmaktadır (65,66,143). 40-50 nm boyutundaki nano parçacıkların daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiklerini belirtmektedirler.

2.7.2. Yüzey Kimyası

Yüzey kimyası, nano gümüşün hücrelerle olan ilişkisini etkilemektedir. Koloidal stabiliteyi sağlamak adına gümüşün yüzey kimyası çeşitli maddelerle birleştirilerek değiştirilebilmektedir. Yüzey kaplaması gümüşün şeklini kümelenmesini ve çözünme oranını değiştirmektedir. Yüzey kaplamasının stabilitesi, gümüşün sitotoksitesini de etkilemektedir. PVP ve sitrat kaplamalar sırası ile en dayanıklı ve en dayanıksız kaplamalar olarak belirlenmiştir. Sitrat kaplamalar, sitotoksositeyi azaltmaktadır. Sitrat kaplı nano gümüş kurutulup toz haline getirildiğinde yapısı bozulmakta ve tekrar sulandırıldığında çok ciddi sitotoksosite yapmaktadır. Oysa ki PVP kaplı nano gümüş parçacıkları, çok daha stabildir ve ihmal edilebilir düzeyde

toksik etkiye sahiptir (101). Yapılan çalışmalar kaplanmamış nano gümüşün çok fazla sitotoksik potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu ise doz ve zaman bağımlıdır. Ancak BSA (bovine serum albumin) kaplı nano gümüş sitotoksitesini azaltabilmektedir (78,79). Polisakkarid kaplı nano gümüş, kaplı olmayana göre çok daha fazla DNA hasarı yapmaktadır. Kaplı olmayan nano gümüş kümelenmeye meyillidir ve hücre içine alımı zorlaşmaktadır. Ancak protein ya da polisakkarit gibi makromoleküllerle birleştirilen gümüş daha çok hücre içine alınmakta ve daha toksik olmaktadır (2,3,78,79).

2.7.3. Şekil (geometri)

Nano gümüşün şekli de sitotoksitesinde ve immün cevap oluşturmada önemlidir. Yapılan bir çalışmada, nano çubuklar ve nano küreler akciğer toksisitesi adına kıyaslanmış ve nano kürelerin çok daha az toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu durum nano çubukların hücre içine girmekten ziyade doğrudan daha geniş bir yüzeyle hücreye temas etmesinin bir sonucu olarak yorumlanmıştır (124).

2.7.4. Hücre Tipi

Gümüşün doku dağılımı incelenirken, farklı hücrelerin farklı davranışlar gösterdiği de dikkate alınmalıdır. Örneğin, kolon kanseri hücreleri ve fibroblast hücreleri gümüşe maruz bırakıldıklarında birbirlerinden çok farklı tepkiler vermektedir. Gümüşe maruz bırakılan fibroblast hücreleri mitokondrial apoptozu stimüle eden çok daha fazla ROS ve c-Jun N-terminal kinaz üretirken kanser epitelium hücreleri böyle davranmamaktadır. Çünkü bu hücrelerde anti apoptotik protein bcl-2 aktive olmakta ve apoptozu engellemektedir (59). Nişasta kaplı gümüş nano parçacıklar, IMR-90 olarak bilinen fibroblast hücrelerinde ve glioblastoma hücrelerinde (U215) genotoksik özellik göstermektedir. Her iki hücre türünde de nano gümüş mitokondri ve nükleusa geçebilmektedir. Bu durum mitokondrial disfonksiyona ve ROS seviyesinde artışa neden olmaktadır. Bunun sonucunda da DNA hasarı, kromozomal anormallikler ve hücre siklusunda duraklamalar oluşmaktadır. Fibroblast hücreleri,

glioblastom hücrelerine göre daha az zarar görmektedir çünkü bir şekilde hücre siklusundaki duraksamadan kurtulabilmektedirler (8). Bu arada, PVP kaplı nano parçacıklar astrositlerde ciddi bir toksik etki göstermemektedir ancak akciğer kanseri hücrelerinde biriktiklerinden çok daha fazla birikmektedirler (104). Bunun sebebi, içeri alınan nano gümüşten olan gümüş iyon salınımının fazla oluşu ve astrositlerde kümelenmeleri dolayısı ile daha az toksik hale dönmeleridir. Benzer sonuçlar, normal hücrelerle kanser hücrelerinin nano gümüşe verdiği cevabı irdeleyen makalelerde de dile getirilmiştir. Çünkü hücre tiplerine göre lizozomal membranların dayanıklılığı değişkenlik göstermektedir (138). Ayrıca her iki grup hücrenin oksidatif strese dayanma gücü birbirinden farklıdır (144).

2.7.5. Gümüşün Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Mekanizması

Oksidatif stres, çeşitli laboratuvar modellerinde azalmış GSH seviyeleri, artmış lipid peroksidasyonu, inflamasyon, DNA hasarı, bozulmuş hücre döngüsü ve proliferasyon kapasitesi, apoptozis ve nekroz gibi çok çeşitli hücresel olaya neden olmaktadır. ROS üretimi ve gümüş iyonlarının serbestleşmesi hücreler üzerindeki etkide iki anahtar faktördür.

Genel anlamda, nano gümüş aracılı hücresel etkinin kaynağını söylemek zordur. Nano gümüş çok düşük dozlarda ($<1.0 \text{ ug/mL}$) hepatoma hücrelerine (Hep G2) ciddi toksik etki göstermezken hücreleri fazla miktarda DNA onarımı ile ilişkili genlerin ekspresyonuna zorlayarak DNA ve kromozomlarda bozulmalara sebep olmaktadır (69). Gelişmiş gen ekspresyon analizi tekniği, nano gümüş, Ag_2CO_3 ve gümüş iyon inhibitörü sistein, nano gümüş aracılı hücresel etkinin incelenmesinde kullanılmıştır. Görülmüştür ki hem nano gümüş, hem de gümüş iyonları DNA hasarı yapan oksidatif streste etkilidir. Gümüş iyonları, başlıca sitotoksik ve stres aracılı etkilerden sorumludur. Nano boyutlu gümüş tek başına ihmal edilebilir düzeyde toksik etki göstermektedir. Gümüş iyonları oksijen türevleri olduğunda ROS üretimini katalize eden bir görev yaparlar (69). İlginç olarak, nano gümüşün kendisi de ROS ve oksidatif stres yaratırlar ve bu durum da yine yüzeylerinden salınan gümüş iyonlarına bağlıdır. Elektron spine rezonans (ESR) ile yapılan çalışmalar, sitoplazmayı ve endo/lizozomları taklit eden yapay ortamlarda (in vitro) ROS üretimini saptamış

durumdadır. Yüzeyden kopan gümüş iyonları, asidik ortam ve hidrojen peroksit varlığında hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevlerinin üretimini artırmaktadır. Hücre içerisinde hidrojen peroksin çok az bulunması bile, nano gümüşün çözünmesini artırmakta ve daha güçlü oksidatif strese sebep olmaktadır (52,53).

GSH, tioredoksin ve SOD gibi bazı redoks ilişkili proteinlerin oksidatif strese aracılık yaptığı bilinir. Bu anti oksidan moleküllerin nano gümüş partikülleri veya gümüş iyonları ile etkileşimi kısmen de olsa gümüşün zararlı etkilerini antagonize etmeye yeterli olabilir (40). Bu arada, ciddi ROS üretiminin bu moleküllerin yapısını ve işlevini bozabileceği de unutulmamalıdır (30,31). Gümüş iyonları kloridlere, inorganik sülfidlere ve thiol gruplarına bağlanmayı daha çok tercih etmektedir. Ancak, bu bağlanma sonucunda olabilecek zararlı ve yararlı etkilerin pek çoğu hala tam olarak bilinmemektedir.

2.8. TOKSİKOKİNETİK

Nano gümüş solunması, beklenebileceği gibi, akciğerlerde gümüş birikime sebep olmaktadır. Nano gümüş, dermal, sindirim sistemi ya da nefes yolu ile uygulandığında kolaylıkla sistemik dolaşıma geçebilmektedir. Bu geçişin iyon haliyle mi nano parçacık haliyle mi olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Diğer taraftan, pek çok çalışma nano altının parçacık şeklinde geçtiğini belirtmektedir. Bu durumun gümüş için de bu şekilde olup olmadığı bu gün için net değildir. Zira altın, gümüşe göre çok daha inerttir. Eğer gümüş iyon şeklinde alınıyor ise, literatür bu durumda mekanizmayı açıklayacak yeterli veriye sahiptir. Nano gümüş maruziyetini takiben, gümüşün öncelikle karaciğer ve deri hücrelerini tercih ettiği ve buralarda biriktiği bilinmektedir. Böbrek, dalak, beyin ve testisler de hedef organ konumundadır. Nano altın için de benzer hedef dağılımı mevcuttur. Gümüşün metabolizması ve atılımı detoksifikasyon sürecini takiben asıl olarak dışkı ile olmaktadır. İdrarla da kısmen atılımı mevcuttur. Yüksek dozlarda gümüş ciltte birikerek arjiye neden olur ve genellikle geri dönüşsüz olduğu düşünülür. Ancak eğer gümüş nano parçacık halinde alınıyor taşınıyor ve atılıyorsa literatür henüz bu konuda yetersizdir. Altın partikülleri de idrar ve dışkı ile atıldığı için, gümüş

açısından da böyle bir itrah mekanizması hayal edilebilir. Her iki durumda da, gümüşün toksikokinetik davranışı, gelecekteki çalışmaların ana konusu olacak ve alınan sonuçlar, toksikolojik çalışmalarda bir sonuca varılmasına yardımcı olacaktır. Tüm bu olumsuzluklara rağmen bu gün için bilinen, en azından veriliş yolu ne olursa olsun, gümüşün hedef organlarda biriktiği gerçeğidir

2.8.1. Toksik etkinin mekanizması

Son zamanlarda yapılan pek çok çalışma, gümüşün toksik etkilerinin, artmış oksidatif strese bağlı olarak üretimi artan ROS olduğu konusunda hem fıkirdir. Bu, oksijen duyarlı sinyal yolaklarını aktive etmekte ve yüksek dozlarda verildiğinde inflamasyonu stimüle etmektedir. Bu inflamasyon ise sonrasında ikincil genotoksisite ve hücre ölümü (apopitoz ve/veya nekroz) ile sonuçlanmaktadır. ROS üretiminin düşük olması durumunda ise, koruyucu mekanizmalar aktive olmakta ve protektif etki gözlenmektedir. Görünüşe göre nano gümüş toksisitesinde bir eşik değer söz konusudur. Diğer taraftan, küçük parçacıklar (muhtemelen daha geniş yüzey alanına sahip olukları için) daha potenttir. Eğer gümüş, iyon değil partikül haliyle emiliyorsa, bu durumda da yine küçük parçacıkların biyolojik bariyerleri daha kolay geçtiği savı desteklenebilir. Gümüşün, diğer bazı metallere göre daha fazla spermotoksik olduğu ile ilgili sınırlı sayıda literatür vardır. Genotoksik ve mutajenik olduğunu dolaylı yoldan belirten az sayıda makale dışında bu konuda yapılmış yeterli çalışma yoktur. Tüm bu literatüre ve gümüşün aslında bir eşik değer üzerinden toksik etki yaptığı biliniyor olmasına rağmen hala insanlar için belirlenebilecek net bir eşik değer söz konusu değildir. Literatür halen bu noktada karanlık alanlar barındırmaktadır.

Bu çalışma günümüzde spinal cerrahide yaygın olarak kullanılan implantların antibakteriyel ve antifungal özellik kazandırılma sürecinin ve bu süreç sonunda ortaya çıkan son ürünün toksik potansiyelinin araştırılması amacıyla tasarlanmıştır. Özellikle bu implantların vücuda etkisi, olası toksisitesi ve biyogüvenilirliği üzerinde durulmak istenmiştir. Gümüş (Ag), Bakır(Cu) ve Çinko(Zn) kaplamalı implantların vücuda yerleştirildikten sonra ne etkileri olduğu, dokularda bu metallerin birikme miktarı, dokuların ve organizmanın kaplamalı implantlara olan tepkisi araştırılmıştır.

Antibakteriyel ve antifungal kaplamalı implantların organizma üzerinde negatif etkisi olmadığı, olası etkilerin ise geri dönüşümlü olduğu hipotezi öne sürülmüştür. Bunun nedeni kaplamada kullanılan metallerin vücuda toksisite oluşturabilecek miktarda olmaması ve yine bu metallerin ekskresyon (atılım) mekanizmalarının var olmasıdır. Bu nedenle dokularda kaplama materyallerinin toksik dozda birikmeyeceği ve belirgin / kalıcı hasar oluşturmayacağı düşünülmüştür.

Geçmişte gümüş, kronik yaraların ve yanıkların tedavisinde kullanılmıştır. 1940'larda penisilin kullanıma geçmesinden sonra gümüşe olan ilgi oldukça azalmıştır (32). 1960'larda, %0.5 gümüş nitratın yanık tedavisinde kullanmaya başlanması ile gümüş tekrar sahneye çıkmıştır. Çalışmalara göre bu solüsyon epidermal proliferasyonu etkilememekte ancak *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *E.coli* üzerinde oldukça etkili olmaktadır (17). 1968'de gümüş nitrat, sülfonamid ile kombine edildi ve gümüş sülfadiazin krem bulundu. Bu ürün, sahip olduğu geniş antibakteriyel özelliği sebebi ile yanıklarda hala kullanılmaktadır. Gümüş sülfadiazin, başta *E.coli*, *S.aureus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp olmak üzere pek çok bakteriye karşı etkilidir. Aynı zamanda kısmen anti fungal ve anti viral etki de gösterir (44). Son zamanlarda, antibiyotik direncinin çok artması nedeni ile klinisyenler özellikle yara örtülerinde ve yanık hastalarında tekrar gümüş içeren ürünlere dönüş yapmış durumdadır.

2.8.2. Akut Toksisite

2.8.2.1. Oral

Cha ve arkadaşları (24), 15 nm boyutundaki ve 2-3.5 mikro metre boyutundaki gümüş parçacıklarını doğrudan farelerin midesine vermiş 3 gün sonra karaciğerde lenfosit artışı ve inflamasyon saptamışlardır. Her iki türe de benzer cevap alınmış ancak nano formda inflamatuvar cevabın daha fazla olduğu görülmüştür. Bu çalışma nano formun daha potent olduğunu ortaya koyabilse de kullanılan gümüş dozu (2.5 mg) çok yüksektir. Bu durumun bir benzeri de in vitro hücre kültüründe karaciğer kanseri hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada gözlenmiştir ancak yine çok yüksek (3 mg) gümüş kullanılmıştır.

2.8.2.2. İnhalasyon

Akut inhalasyon toksisitesi ile ilgili bir veri yoktur ancak uzamış inhalasyon ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Bunlar “tekrarlayan doz uygulamaları” başlığında anlatılacaktır.

2.8.2.3. Dermal

Pek çok çalışma, yara bakımında gümüş içeren yara örtülerinin etkisi/faydası üzerinde durmaktadır. Trop ve arkadaşlarının (134) yayınladığı bir vaka sunumunda, %30 yanık sahasına sahip bir hastada Acticoat olarak bilinen bir gümüşlü yara örtüsü ile tedavi sırasında olanlar anlatılmıştır. Hasta, tedavinin 1.haftasında arjiri bulguları göstermeye başlamış, uygulama hemen kesilmiş, zaman içerisinde arjiri düzelirken kan gümüş seviyeleri 7 hafta kadar uzun kalmaya devam etmiştir. Bu çalışmada doz hakkında bilgi mevcut değildir. Ancak, bütünlüğü bozulmuş ciltten gümüşün kana geçebildiği ve dokularda birikebildiği gösterilmiş durumdadır. Arora ve arkadaşları (7,8) cilt kanseri hücre kültüründe çalışmış, bu hücrelere gümüşün toksik olduğunu bulmuşlardır. Bu hücrelerde apoptoz için gereken dozun, nekroz için gereken dozdan çok daha az olduğu vurgulanmıştır.

Yapılan bir çalışma (84), 20 nm boyutunda ve sitrat kaplı nano gümüşün ve 40 nm boyutunda ve silika kaplı gümüşün izole perfüze domuz deri flebinde (IPPSF) lokal dağılımını incelemiştir. Kısaca, IPPSF, 4 saat boyunca 0.84 mg/L sitrat kaplı nano gümüşle veya silika kaplı nano gümüşle perfüze edilmiş ardından da 4 saat boyunca normal şekilde perfüze edilerek bir nevi yıkama süreci yaratılmıştır. Flebin arteriyel ve venöz gümüş konsantrasyonları ölçülmüş, nonkompartmantal ve iki kompartmanlı farmakokinetik model oluşturulmuştur. Bu şekilde gümüşün arteriyel kompartmandan venöz kompartmana geçişi irdelenmiştir. Non kompartmantal analiz, her iki tip nano gümüş için tahmin edilen klirensin 1 ml/dak olduğunu göstermiştir. Bu oran, flebin perfüzyon hızına eşittir ve çok az bir eliminasyonun varlığına işaret eder. T_{1/2} değeri sitrat kaplı grupta 44 dakika ve silika kaplı grupta 59 dakika olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, deride gümüşün farmakokinetiğini belirlemede oldukça faydalı olacaktır.

2.8.2.4. Periton içi uygulama

Sarhan ve Hussein (159), intraperitoneal uygulamada nano gümüşün akut dozlarının farelerde mortalite ve morbidite yapmadığını belirtmektedir. Ancak, histopatolojik incelemeleri böbrek ve karaciğer hasarını ortaya koymaktadır. Yaptıkları çalışmada böbrekte renal tübül hasarı, sitoplazmik vakuolizasyon, hipertrofiye nükleoluslar, glomerul bazal membranında kalınlaşma gibi olumsuz etkiler saptamışlardır. Karaciğeri incelediklerinde ise, hasarlı hepatositler, ve Kupffer hücrelerine ve bunların içerisinde çok sayıda yağ globüllerine rastlamışlardır. Fragmente sisternalar, endoplazmik retikulum hasarı, şişmiş ya da zarar görmüş mitokondriler de bulguları arasındadır. Ne var ki bu çalışmada da kullanılan doz çok yüksektir. Kan parametrelerinde olumsuz değişiklikler de mevcuttur.

2.8.3. Tekrarlayan Doz Toksisitesi (Kronik Toksisite)

2.8.3.1. Oral

Kim ve ark. (70,72), oral yolla 28 gün boyunca verilen nano gümüşün sıçanlardaki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmayı bir risk analizi çalışması olarak alamayız çünkü kullanılan dozlar yine çok yüksektir. Çalışmada düşük (30 mg/kg/gün), orta (300mg/kg/gün) ve yüksek (1000 mg/kg/gün) nano gümüş kullanılmıştır. Karaciğerde doz bağımlı inflamasyon saptanmıştır. Bu durum yine bu organın ana hedef doku olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu konuda yeterli literatür çalışmasının olmaması nedeni ile oral alım için bir “yan etki görülme (No-observed Adverse Effect, NOAEL)” sınırı belirlenemeyecektir. İnsanlarda oral alımın çok uzun süre devam etmesi ve aşırıya kaçması durumunda arjiri ile karşılaşıldığı bilgiler arasındadır (25,137), bu dozu kabaca hesaplamışlardır. Yayınladıkları vaka sunumunda kişi 450 ppm gümüş içeren koloidal ürünü 10 ay boyunca günde 3 defa (450 ml/gün) içmiş ve arjiri oluşmuştur. Chang ve arkadaşlarının (25) ve Kim ve arkadaşlarının (70,72) çalışmalarında ise doz belirtilmemiştir. Bu durum bilinçsiz tüketimin ne kadar kolay gerçekleşebileceğini aydınlatmak adına önemlidir.

2.8.3.2. İnhalasyon

Hyun ve ark (60), inhalasyon çemberindeki sıçanlara farklı dozlarda nano gümüş içeren hava solutmuşlardır. 28 gün boyunca haftada 5 gün, günde 6 saat (bir işçinin maruziyetini taklit edebilmek adına) boyunca yapılan çalışmada düşük (0.5 mg/m³), orta (3.5 mg/m³) ve yüksek 61 mg/m³) gümüş içeren havayı soluttukları çalışmalarında solunum mukozasındaki nötral müsinlerde etkilenme dışında bir bulguya rastlamamışlar ve bu uygulamanın zararsız olduğunu belirtmişlerdir. Ji ve arkadaşları (63) neredeyse aynı çalışmayı yapmışlar ve bir miktar hepatik nekroz dışında olumsuz bir durumla karşılaşmadıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan dozlar bir önceki ile aynı tutulmuştur.

Sung ve arkadaşları ise (125,126), aynı çalışmayı çok daha yüksek dozlarla tekrarlamışlardır. Çalışmalarında kullandıkları dozlar sırası ile 49 mg/m³, 133 mg/m³ ve 515 mg/m³ olarak seçilmiştir. Tüm dozlarda doza bağımlı olmak şartı ile akciğer fonksiyonlarında bozulma saptanmış, ölüm yaşanmamıştır. Sung ve arkadaşları, histopatolojik verilerini de yorumlayarak gümüşün inhalasyon yolu ile alınmasında en düşük toksik dozun (lower adverse effect level, LOAEL) 100 mg/m³ olduğu yorumunu yapmışlardır. Bu durumda NOAEL ise 133 mg/m³ olarak hesaplanmıştır. Bu veriler, en düşük toksik dozu ve toksik olmayan dozun üst sınırlarını belirlemede oldukça faydalıdır.

2.8.3.3. Dermal

Kronik maruziyet adına yapılmış bir çalışma yoktur. Var olan kısıtlı akut maruziyet durumu ise ilgili başlıkta daha önce irdelenmiştir.

2.8.4. Hedef Organ Toksisitesinde Biyolojik Mekanizma

2.8.4.1. Akciğer toksisitesi

Asha Rani ve arkadaşları (9,10), nişasta kaplı nano gümüşü normal akciğer fibroblastlarına ve insan glioblastoma hücrelerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bulguları, toksik etkinin mitokondrial solunum zincirini bozmak yolu ile ROS sentezinde artış ve ATP üretiminde aksama sebebi ile olduğu yönündedir. Bu durum, sonrasında DNA hasarı yapmaktadır. Soto ve ark (122), akciğer epitelyumu ve makrofajlarda toksisite saptamışlar ve makrofajların daha dayanıklı olduğu göstermişlerdir.

2.8.4.2. Karaciğer toksisitesi

Toksikokinetik bölümünde anlatıldığı üzere, gümüşün sistemik toksisitesinde ana hedef organ karaciğerdir. Hussain ve arkadaşları (58), insan hepatoma hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında gümüşün karaciğerde ROS sentezinde artış ve oksidatif strese artış yaparak toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Yazarlar, gümüşün uygulama dozuna bağlı olarak mitokondrial membran potansiyelinde ve hücre sağ kalımında olumsuz etkiler saptamışlardır. Cha ve ark (24), nano gümüşe maruz kalan hepatoma hücrelerinde DNA miktarında artış saptamışlar ve bunun apoptoz belirtici olduğunu söylemişlerdir. Diğer taraftan, nano formun, mikro formdan daha toksik olduğunu da dile getirmişlerdir. Arora ve arkadaşları (7) fare fibroblastları ve karaciğer hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında yüksek dozun apoptoz ve nekrozla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Düşük dozlarda ise aynı dokular üzerinde koruyucu etki görmüşlerdir.

2.8.5. Oksidatif, İnflamatuar ve genotoksik etki

Diğer nano partiküllerde olduğu gibi, gümüş nano partiküllerde de toksisite, artmış oksidatif stresin neden olduğu genotoksik ve sitotoksik etkilerin sonucunda gerçekleşmektedir. Artmış ROS üretimi, oksidasyon duyarlı sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu ise inflammatuar, genotoksik ve sitotoksik sonuçlar

doğurmaktadır. Bu etki mekanizması çok sayıda araştırmacı tarafından net olarak ortaya konulmuş durumdadır (23,28,59). Sonuç olarak, düşük doz oksidatif stres koruyucu etki yaparken yüksek dozda oksidatif stres zararlı etkilerde bulunmaktadır. Bu durum, bu tür bir etki için bir eşik değerin varlığına işaret etmektedir.

2.8.5.1. Nano gümüş uygulamasının oksidatif, inflamatuvar ve genotoksik sonuçları

Tüm nano metallerde olduğu gibi gümüşün de zararlı etkilerde bulunmasının sebebinin hücre içi artmış oksidatif stres, olduğu gösterilmiştir (28,29) bu ise genotoksisite ve sitotoksisite yapmaktadır. (9,10,58). Sonuç olarak, gümüş, etkilerini ardışık bir dizi olayı tetikleyerek yapmaktadır. ROS artışı oksidan bağımlı sinyal yollarını stimüle etmekte, bu ise sonuçta inflamatuvar, genotoksik ve sitotoksik sonuçlar doğurmaktadır. Pek çok çalışma bunun böyle olduğunu ortaya koymaktadır. Carlson ve ark (23) sıçan alveolar makrofaj hücrelerinde gümüşün (15, 30, 55 nm) 100 ug/ml dozunun 24 saat uygulamasıyla oksidatif stresi artırdığını göstermiştir. Hücre içine alınan partiküller nedeni ile hücrelerin morfolojik yapıları ciddi derecede bozulmuştur. Tüm partiküller ROS üretiminde artış ve hücrel GSH seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bu durum partiküllerin oksidatif cevap oluşturduğunun ispatıdır. Tümör nekroz faktör alfa'nın, Interlökin 1 betanın ve makrofaj inflamatuvar protein 2'nin üretimi artmıştır. Bunlar da bir tür inflamatuvar cevaptır. En sonunda, nano gümüş hücre yaşamını etkilemektedir. Daha önce de belirtildiği gibi, nano gümüşün etki mekanizmasında boyut çok önemli bir parametredir, küçük parçalara verilen cevap daha fazladır. Bu çalışma, gümüş nano partiküllerin oksidan aracılı cevabını ortaya koymaktadır. Bu durum ise oksidatif stresi ve sonrasında sitotoksik sonucu doğurmaktadır. Hsin ve ark (59), fare fibroblast hücreleri, sıçan vasküler düz kas hücreleri ve insan kolon kanseri hücreleri üzerinde çalışmıştır. Çalışmalarında <100 nm ve <250 mikrometre partiküller kullanmışlar, doz olarak da 0.0005 ug/ml-500 ug/ml dozları seçmiş, bu dozları adı geçen hücrelere 72 saat boyunca uygulamışlardır. Nano partiküller gümüş hücre yaşayabilirliğini azaltırken daha büyük partiküllerde durum böyle olmamıştır. Ardından bu sitotoksisitenin altında yatan mekanizma incelenmiştir. Sitotoksisite apoptotik mekanizma ile olmaktadır.

İnsan kolon kanseri hücreleri bu etkiye en az duyarlı olanları olmuştur. Bcl 2 proteininin bu hücrelerde up-regüle olması olaydan sorumlu tutulmuştur. Bu bulgular ayrıca gümüşün etkilerinin hücre-spesifik olduğunu da ortaya koymaktadır. Zira bazı hücreler gümüş toksisitesine çok duyarlı iken bazıları dirençlidir. Ayrıca, öncesinde apopitoz önleyici N-asetil sistein (NAC) verilen hücrelerin toksik etkiden etkilenme oranlarında da iyileşme saptanmıştır. Bir seri olay gümüş sitotoksitesinden sorumlu tutulmuştur. Jun-N-terminal kinaz ve p53 (apopitoz regülatörleri) stimüle olmakta ve mitokondri aracılı apopitozu (sitokrom c salınımı ve bax translokasyonu yaparak) uyarmaktadır. Ahamad ve ark. (2) kaplanmamış ve polisakkarid kaplanmış gümüşün fare embriyonik kök hücrelerine ve fibroblastlarına olan etkisi üzerinde çalışmışlardır (25 nm, 50 ug/ml, 72 saat). Kaplanmamış gümüş kümelenme gösterirken, kaplanmış gümüşte bu durum yaşanmamıştır. Yazarlar, bu durumun, yani kümeleşmenin hücre dağılımını etkilediği, bu yüzden de nükleus ve mitokondride gösterilemediklerini öne sürmüşlerdir. Ne var ki, hücre içine alınma her zaman toksisite için yeterli sebep değildir. Partiküllerin hücre yüzeyine teması ve çözünebilirliği de toksisiteyi etkileyen parametrelerdir. Protein p53 (aktivasyonu DNA hasarı yapar) ve Rad51 (DNA çift sarmal onarımından sorumludur) artmıştır ve h2AX fosforilasyonu suçlanmıştır (genellikle DNA çift sarmal kırıklarında artar). Sonuçta nano gümüş, DNA hasarı yapmaktadır. Azalmış hücre yaşayabilirliği de nano gümüş maruziyeti ile yakın ilişkilidir ve DNA hasarına bağlı apopitoz bu durumdan sorumlu tutulmaktadır. Polisakkarit kaplanmış nano gümüş, kaplanmamış olanına göre çok daha sitotoksik bulunmuştur. Bu durum da bir kez daha nano gümüşün yüzey kimyasının sitotoksik ve genotoksik etkide ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Her ne kadar her iki tür nano gümüş de hücre yaşamını olumsuz etkilese de, bu durum polisakkarit kaplanmış olanlarda daha belirgin ve ciddidir. Chi ve arkadaşları (28), asellüler biyokimyasal ortam kullanarak gümüş genotoksitesini çalışmışlar ve çok zayıf genotoksik özelliğinin olduğunu söylemişlerdir ancak kurguladıkları deney tartışmaya açıktır. Böyle bir sistem doğrudan genotoksiteyi ortaya koymakta yeterli ilken ROS sentezine bağlı hücresel olayların neden olduğu genotoksiteyi açıklamaktan uzaktır.

2.9. İRİTASYON, KOROZİF ETKİ VE SENSİTİZASYON

Bu konuda yeterli bilgi mevcut değildir. İnhalasyon sonrası gelişen iritasyon için ilgili bölümde literatür değerlendirmesi yapılmıştır. Nano gümüşün cilt üzerinde iritatif ya da alerjik etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Mevcut bilgiler ışığında nano gümüşün korozif olmadığı da bilinmektedir.

2.10. MUTAJENİTE VE KARSİNOJENİTE

Bu konuda yapılmış yeterli çalışma yoktur. 28 gün oral maruziyet sonrasında (tekrarlayan doz toksisitesi başlığında anlatılmıştır), kemik iliği mikro nükleus testi için alınmış ve genotoksisiteye rastlanılmamıştır (73,74). Ancak bu çalışmada pozitif kontrol kullanılmamıştır. Ne var ki daha önce diğer başlıklar altında da belirtildiği gibi, nano gümüşün sitotoksik olduğu kadar genotoksik potansiyelli de vardır. Nano geno toksikoloji alanında yapılan son review'da, Singh ve ark (118), kısıtlı sayıda gümüş genotoksitesi çalışması olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar, Ahamad ve arkadaşlarının (2) yaptığı çalışmaya atıfta bulunarak gümüşün genetik değişiklikler yapma potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir. Gelecekte bu konuya daha çok odaklanmış çalışmaların varlığına ihtiyaç duyulacaktır. Ayrıca karsinojenite üzerine yapılmış bir çalışma da mevcut değildir. Bu konunun da ileride daha kapsamlı araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

2.11. ÜREME SİSTEMİNE OLAN TOKSİSİTESİ

2.11.1. Fertilizasyona Etkisi

Braydich-Stolle ve Ark (21), fare sperm hücrelerinin nano gümüşe verdiği cevabı in vitro olarak incelemişlerdir. 15 nm boyutundaki nano gümüşün molibdenyum trioksit ve alüminyumdan daha zararlı olduğunu bulmuşlardır. Diğer taraftan, tüm metallerde doz bağımlı olarak artan spermatotoksik etki saptanmıştır. Mevcut toksikokinetik bilginin eksikliği ve literatürün yetersizliği sebebi ile bu konuda kesin kanıya varmak şu gün için imkansız görünmektedir. Wiwanitkit ve ark (140), nano altının doğrudan

spermatazoa üzerinde toksik etkilerinin olduğunu belirtmiştir. Benzer durumun gümüş nano parçacıklar için de olması muhtemeldir. İlgili çalışmada, spermatazoa motilitesi azalmış ve sperm baş ve kuyruklarında nano altın saptanmıştır. Yine de bu verilerin gümüşe uyarlanabilirliği tartışmalıdır.

2.11.2. Gelişimsel toksisite

Bar-Ilan ve arkadaşları (15), zebra balığı embriyolarında koloidal gümüş ve altın nano parçacıklarının ölümcül ya da sakatlık yapıcı olduğunu bulmuştur. Bulguları gümüşün toksik, altının ise daha inert olduğu yönündendir. Ayrıca nano gümüşün etkilerinin boyut bağımlı olduğu da belirtilmiştir. Lee ve ark (88) benzer bir çalışma yapmış ve gümüş nano parçacıkların koryon kanalından geçerek embriyo içine girdiğini ve zararlı etkilerde bulunduğunu belirtmiştir. Çalışmacılar koryon kanallarından geçerek embriyoda biriken gümüşün ve yaptığı zararlı etkinin uygulama dozu ile çok yakın ilişkisi olduğu kararına varmıştır. Bu verinin insanlarda da bu şekilde olacağı kesinlik kazanmamıştır.

2.11.3. Oral alım sonrası risk

Oral alımla ilgili olarak söylenebilecekler genellikle gümüş içeren preparatların çok yüksek doz alınması ile ilgilidir. Genellikle rapor edilen klinik durum ise arjiri denilen cildin gri-mavi renk almasıdır. Bu durum ise genellikle internet üzerinden satılan gümüş kolloidlerin orantısız kullanımına bağlıdır. Bu vakalarda ortaya çıkan toksisite, aslında medikal anlamda tavsiye edilebilecek dozların çok çok üzerindedir. Normal kullanımda gümüşün zararlı bir etkisine rastlanılmamıştır. Mesleki olarak da bu tür ürünlerin üretiminde çalışan işçilerde nefes yoluyla alınan nano gümüşün mukosiliar aktivite ile yutulması sonrasında ya da el-ağız teması ile olabilmektedir. Yine de oral alım, hatırı sayılır bir maruziyet yolu sayılmamaktadır. Sonuç olarak, mevcut veriler, oral alım için bir risk/zarar/fayda dozu sunabilmekten çok uzaktır. Zaten oral alım, diğer maruziyet yollarına göre daha az risklidir.

2.12. ARJİRİ (ARGYRIA)

Ciltte gümüş birikime bağlı olarak gelişen gri-mavi renk değişimi arjiri olarak isimlendirilir. Literatüre koloidal gümüş ürünlerini kontrolsüzce kullanan kişilerde görülmekle birlikte, (25) vaka sunumu olarak anlatılan bir hastanın da gümüşlü yara örtüleri kullanımı sonrasında arjiri geliştirdiği raporlar arasındadır (134). Arjiri genellikle vücudun güneş ışığına maruz kalan yerlerinde, yani ellerde ve yüzde daha belirgindir. Bu nedenle, Wadhera ve Fung, (137) bu olayın bir de fotosensitif komponenti olduğunu Chang ve ark, (25) ise melanositlerin ışık ile aktive olarak bu duruma neden olduğunu ileri sürmüştür. Mekanizması hala tam olarak aydınlatılmış değildir.

Diğer taraftan, ciltteki gümüş iyonlarının UV ışığa maruz bırakılmalarının fotoredüksiyona neden olarak, tıpkı eski fotoğraf kağıtlarında olduğu gibi, iyonik gümüşü metalik gümüşe indirgediği de söylenmektedir (25,130). Arjiri mekanizmasında ileri sürülen bir diğer sav ise, sülfidril içeren proteinlerin ve metal bağlayıcı proteinlerin oluşturduğu bir protein kompleksi olduğudur. Söz konusu bu depozitler, periferik sinirler etrafında ve kan beyin bariyerinde de gözlenmiş ancak her hangi bir zararlı etkisi saptanamamıştır.

2.13. GÜMÜŞÜN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİ

Gümüş iyonları antibakteriyel ve anti fungal etkilerinden dolayı yüzlerce yıldır kullanılmaktadır. Gümüş tuzları, erken İslamiyet dönemine ait hekimlerce 8. yüzyılda tedavi amacı ile kullanılmıştır (157). İbn-i Sina, MS.980’li yıllarda gümüşü kan temizleyici, çarpıntı giderici ve ağız kokusu tedavilerinde reçete etmiştir. 19. yüzyılda gümüş epilepsi tedavisinde ve diğer bazı sinir sistemi hastalıklarında kullanılmıştır. Bu yüzyılın erken dönemlerinde, gümüş, arsefaminle kombine edilerek sifiliz tedavisinde kullanılmıştır (157).

Gümüşün anti bakteriyel etki mekanizmasını inceleyen literatüre göre; gümüş sülfidril enzimlerini inaktive eder, amino, imidazol, karboksil ve fosfat grupları ile bağ oluşturur. Bu durum ise hem bakteri solunum zincirini hem de DNA replikasyonunu bozarak prokaryotlarda mitozu durdurur (13,14,123). Diğer taraftan

bakteri hücrelerinin seçici geçirgenliğini bozar (18) doku proteinleri ile bağ oluşturur ve bu durum proteolitik bakterilerin çoğalmasını engeller *P.aeruginosa*'da log fazındaki DNA 'ya bağlanarak çoğalmasını engeller (34). Ayrıca gümüş, *E.coli*'de glukoz, gliserol, süksinat, D-laktat ve L-laktat oksidasyonunu bozarak solunum zincirini inhibe eder. Diğer taraftan gümüş, B-galaktosidaz enzimini inhibe ederek *E.coli*'de bakterisidal etki gösterir. Secinti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar da başta MRSA, *E.coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* olmak üzere pek çok bakteri üzerinde gümüşün etkili olduğunu göstermiştir (114,115,116).

2.14. NANO GÜMÜŞÜN ANTİFUNGAL AKTİVİTESİ

Mantarlar üzerine yapılmış çok fazla çalışma yoktur. Bu konuya odaklanmış bir çalışma (87), *T.mentagrophides* ve *Candida* türlerinde gümüşün IC₈₀ değerinin 1-25 ug/ml arasında olduğunu göstermektedir (yani adı geçen mantarların %80'inin inhibe olması için gereken gümüş miktarı 1-25 ug/ml'dir, bir başka ifade ile 1-25 ppb'dir). Bu çalışmada çok iyi bilinen bir antifungal olan Amfoterisin B için bu değer 1-5 ug/ml ve flukanazol için aynı değer 10-30 ug/ml olduğu belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada gümüşün amfoterisinden daha az toksik olduğu belirtilmiştir. Aşağıdaki tablo bu çalışmayı özetlemektedir.

Tablo 3. Fungal patojenlerin %80'inin etkisiz hale gelmesi için gereken medikasyon miktarı

Fungal Türler (alt türlerin sayısı)	IC 80 (ug/ml)		
	Nano Ag	Ampfoterisin B	Flukanazol
<i>C. albicans</i> (4)	2-4	5	10-16
<i>C. tropicalis</i> (2)	7	2-4	13
<i>C. glabrata</i> (4)	1-7	2	10-16
<i>C. parapsilosis</i> (3)	4-25	2	13
<i>C. krusei</i> (1)	13	4	13
<i>T. mentagrophytes</i> (30)	1-4	1-2	20-30

Pek çok antifungal molekülün klinik kullanımı sınırlıdır. Çünkü insan kanında hemoliz yapma potansiyelleri vardır. Bu çalışmada, nano gümüşün hemolitik aktivitesi, onun sitotoksik potansiyelini ortaya koyacağı düşüncesi ile incelenmiştir. 1-25 ug/ml konsantrasyonunda nano gümüşün yaptığı hemoliz diğer anti fungallerle kıyaslanmıştır. Tablo 3 bu çalışmayı özetlemektedir. Tablodan da anlaşılabileceği gibi, 1.25 ug/ml, 2.5 ug/ml ve ug/ml konsantrasyonlarda kullanıldığında ne nano gümüş, ne de Amfoterisin B hemoliz yapmamaktadır. Ancak 10 ug/ml Amfoterisin B, kanın %10’unda hemolize neden olurken aynı miktarda nano gümüş sadece %6 hemoliz yapmaktadır. Buradan çıkarılabilecek 2 sonuç; nano gümüşün en azından kan hücrelerine karşı kullanımı kabul görmüş bir ilaç olan Amfoterisin B’den daha az toksik olduğu ve 5 ug/ml (5 ppb) ve altındaki dozlarda hiçbir şekilde hemoliz yapmadığı olacaktır.

Tablo 4. Antifungal medikasyonların doz bağımlı hemoliz etkisi

İçerik	Hemoliz yüzdesi ve ilaç konsantrasyonu (ug/ml)			
	10	5	2.5	1.25
Nano Ag	6	0	0	0
Amfoterisin B	10	0	0	0

2.15. GÜMÜŞÜN MEMELİ DOKUSUNA ETKİLERİ

Bu rapor hazırlanırken, gümüşün toksik etkilerini ortaya koyan çok az in vivo (canlı hayvanda yapılan) çalışma mevcuttu. Muhtemelen gelecekte çok daha geniş ve güvenilir çalışmalar yapılacaktır. Ancak, eldeki mevcut çalışmalar bile, gümüşün kesinlikle toksik olduğunu ama bu etkinin öncelikle kullanılan doza bağlı olduğunu ortaya koymaya yetecek düzeydedir. Bundan sonra yapılması gereken ise, tıbbi uygulamalarda ve özellikle bu raporun yazılma amacı olan “gümüş kaplamalı implant” kullanımında güvenli bir eşik değer olup olmadığını ortaya koymaktır. Literatürdeki çalışmaların geneli solunum, cilt ya da sindirim sistemi ya da intravenöz (damar içi) enjeksiyon yoluyla alınan nano gümüşün doku dağılımı üzerine odaklanmış durumdadır. Bu durum, parçacık toksisitesinde potansiyel hedef organları belirlemede oldukça faydalı olmuştur. Bu hedef organları tek tek inceleyecek olursak:

2.16. AKCİĞERLERE OLAN ETKİSİ

Nano parçacıkların eskiye göre daha fazla üretiliyor olması, mesleki açıdan bu tür maruziyetlerin de artacağını göstermektedir. Ancak, hala akciğerlerde gümüş maruziyeti sonrasında olabilecekler karanlıktadır ve gelecekte aydınlatılması umulmaktadır. Takenaka ve arkadaşları (127) pulmoner nano gümüş maruziyeti sonrasında akciğerlerde biriken gümüş üzerine bir çalışma yapmıştır. Çalışmalarında sıçanlara 6 saat boyunca 3×10^6 parçacık/cm³ konsantrasyonda (133 ug/m³) ve 4-10 nm boyutunda nano gümüş içeren hava solutmuşlar ve işlem sonrasında 0, 1, 4 ve 7. günlerde inceleme yapmışlardır. İşlemden hemen sonra yapılan çalışmalar akciğerlerdeki gümüşün 1.7 ug/g (**1.7 ppb**) olduğu bulunmuştur. 7. günde bu miktarda %4'lük bir azalma saptanmıştır. Akciğerlerdeki birikim, nazal kavitedeki birikimle doğru orantılı bulunmuş ve akciğeri drene eden lenf nodlarında da gümüş saptanmıştır. Ayrıca, 0.günde gümüşün kan değeri 8.9 ng/g (**8,9 ppb**) olarak saptanmıştır. Bu miktar zamanla azalmış ve bu durumun gümüş atılımı ya da akciğerlerden dolaşıma geçerek başka dokulara geçmesi nedeni ile olabileceği iddia edilmiştir. Bu gümüşün çözünmüş gümüş mü yoksa nano partiküler gümüş mü olduğu açıklık kazanmamıştır. Çalışmacılar ayrıca parçacık fagosite etmiş akciğer makrofajına rastlamadıklarını belirtmişler ancak bu incelemenin ışık mikroskopu ile mi elektron mikroskopu (TEM) ile mi yapıldığını belirtmemişlerdir. Takenaka ve arkadaşları ayrıca nano gümüş olarak da adlandırılabilir elementel gümüşün akciğer dokusunda birikmeye daha meyilli olduğunu, ancak suda çözünebilen gümüş nitratın dokulardan daha kolay atılabildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, çalışmacılar, deneklerin sağlık durumları veya gümüş birikime bağlı gelişen bir sağlık sorunundan bahsetmemişlerdir. Bu durumun, çalışmayı bu açıdan kurgulamadıkları için mi yoksa deneklerde her hangi bir sağlık sorununa rastlamadıkları için mi böyle olduğu yazdıkları metinden net olarak çıkarılamamıştır.

Farklı bir çalışmada, Hyun ve arkadaşları (60), tekrarlayan gümüş (13-15 nm) inhalasyonunun nazal respiratuar mukozaya etkisini incelemişlerdir. Çalışmada bir solunum çemberi içindeki sıçanların 28 gün boyunca haftada 5 gün ve günde 6 saat düşük (1.73×10^4 partikül/cm³, 0.5 ug/m³) orta (1.32×10^5 partikül/cm³, 3.5 ug/m³) ve yüksek (1.32×10^6 , 61 ug/m³) dozlarda gümüş soluması sağlanmış ve her

hangi bir toksik etkiye rastlanılmamıştır. Bu çalışmada kullanılan en yüksek doz 61 ug/m³ olup Takenaka'nın çalışmasındaki dozun (133 ug/m³) yaklaşık yarısıdır. İki çalışma arasındaki ilişkinin lineer olduğunun ispatı olmasa da, Hyun'un çalışmasında eğer ölçülmüş olsa idi kan gümüş konsantrasyonunun, Takenaka'nın çalışmasındaki sonuçların yarısı kadar olacağı (yaklaşık **4.5 ppb**) ön görülebilir. Hyun ve arkadaşları, yukarıda bahsi geçen çalışmalarında açıkça “toksikolojik açıdan bir fark saptamadıklarını” belirtmişlerdir. Bu durumda, bu iki çalışmadan çıkarılabilecek ortak sonuç, 8.9 ppb'lik kan gümüş konsantrasyonunun ne ölçüde toksik olduğu veya daha doğru bir ifade ile toksik olup olmadığı anlaşılamasa da en azından 4.5 ppb lik kan konsantrasyonunun toksik olmadığı belirlenmiş olmasıdır.

Sung ve arkadaşları (125) benzer bir çalışmayı daha farklı dozlarla yapmıştır. Bu çalışmada da yine düşük (49 ug/m³) doz, orta doz (133 ug/m³) ve yüksek doz (515 ug/m³) kullanılmıştır. Tüm dozlarda alveollerde inflamasyon saptanmış, akciğer fonksiyonlarında dalgalanma yaşanmıştır. Ayrıca, kan gümüş seviyelerinde yükselme saptanmış, gümüşün akciğerlerden kana geçtiği gözlenmiştir. Dahası, karaciğer, olfaktör bulbus, beyin ve böbreklerde gümüş saptanmıştır. Beyin ve olfaktör bulbustaki gümüşün komşuluk sebebi ile nöral yapılar boyunca taşındığı söylenebilir. Yine de daha ileri incelemeler gereklidir. Bu çalışmada akciğer ve karaciğer ana hedef organlar olarak öne çıkmaktadır. Oysa neredeyse aynı çalışmanın tekrarını yapan Jeong ve arkadaşları (63), düşük doz 0.48 ug/m³), orta doz (3.48 ug/m³) ve yüksek doz (61 ug/m³) gümüşe aynı şekilde ve sürede maruz bırakılan sıçanlarda her hangi bir zararlı etki gözlememişlerdir. Çalışmalarında saptadıkları en yüksek kan gümüş değeri **6.96 ng/g**'dir (6.96 ppm) ve erkek sıçanlarda gözlenmiştir. Düşük dozlarda beyin dokusunda gümüş gözlenmezken doz arttıkça beyin dokusunda da gümüş gözlenmeye başlanmıştır ancak kan gümüş seviyesinin çok altındadır. Çalışma boyunca tüm deneklerde normal su ve gıda tüketimi ve sağlıklı kilo alımı gözlenmiştir. Her hangi bir sağlık sorununa rastlanılmamıştır. Buradan da anlaşılacağı gibi, gümüş toksisitesi her şeyden önce doz bağımlı bir olaydır. Gümüşün karaciğere geçtiği yine gözlenmiş ancak dalak, beyin ve olfaktor bulbusta gümüşe rastlanılmamıştır. Sonuçta ortaya çıkan gerçek, gümüşün sıçan akciğeri üzerine çok önemli bir toksik etkisinin olmadığı yönündedir ki yazarların ifadesi de bu yöndedir. Buradan çıkartılabilecek bir diğer sonuç ise, kan gümüş seviyesinin

6.96 ppm'e çıkması durumunda çeşitli organlarda gümüş birikimi olabileceği ancak bunların denek sağlığı üzerinde en azından akut dönemde zararlı bir etkisinin olmadığıdır. Ne var ki, bu çalışma sadece 28 gün sürdürülmüş ve çalışma sonunda denekler sakrifiye edilmiştir. Bu çalışma, yaklaşık 7 ppm gibi yüksek kan gümüş seviyelerinin bile erken dönemde zararsız olduğunu gösterdiği için oldukça önemli olsa da, aynı çalışmanın daha uzun süreler kullanılarak tekrar yapılmasında fayda olduğu ortadadır. Gümüşün bir atılımının olduğu bilinir. Bu nedenle de 28 günlük gümüş maruziyetini takiben geçen zamanda, gümüşün dokulardaki ve kandaki seviyesi tekrar ölçülmeli ve akut maruziyet sonrası artmış gümüşün ne kadar sürede normale geldiği -veya gelip gelmediği- ve bu süre sonunda deneklerin sağlık durumlarının ne olduğu belirlenmelidir. Bu şekilde kurgulanmış bir çalışma daha güvenli bilgiler sunacaktır.

2.17. GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN CİLT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Tian ve arkadaşları (131) ısı hasarı yaptıkları fare modelinde 0.48 mg gümüş içeren yara örtülerinin yara iyileştirme kapasitesine bakmışlar ve yaraların bu uygulama ile standart tedavi olarak kabul edilen gümüş sülfadiazine kıyasla daha hızlı iyileştiğini saptamışlardır. Aynı zamanda, gümüş içeren yara örtülerinin amoksisilin ve metranidazole göre de daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu durum, gümüşün antibakteriyel etkisinin çok daha yüksek olduğunu ortaya koyması bakımından önemlidir. Sonuç olarak gümüş nano partikülleri, yara dokusunda sitokin üretimini modüle ederek interlökin-6, interlökin-10, interferon gama ve transformik growth faktör beta üretimini düzenlemekte ve buna bağlı olarak da yanık yarasındaki inflamatuvar cevabı azaltmaktadır. Bu durumun ispatı ise yarada azalmış nötrofil seviyesidir. Tüm bunların bir getirisi olarak da, yara daha hızlı iyileşmekte ve skar dokusu daha ılımlı olmaktadır. Vlachou ve arkadaşları (136), Acticoat denilen bir gümüş içerikli yara örtüsünün uygulandığı hastalarda kan gümüş seviyesinin arttığını saptamışlardır. Tedavinin başlangıcından 9 gün sonra maksimum kan gümüş seviyesine ulaşılmıştır (229 ug/L) (**229 ppb**). Kullanılan Acticoat yüzey alanı arttıkça bununla paralel olarak kan gümüş seviyesi de artış göstermiştir. Daha geniş yanıklarda daha fazla yara örtüsü kullanmak ve daha uzun tedavi süreleri kullanmak

zorunluluğu kan gümüş konsantrasyonunu artış yönünde etkilemiştir. Tedavinin kesilmesinden 6 ay sonra kan gümüş seviyeleri normale dönmüştür. Ayrıca bu çalışmadan çıkarılabilecek bazı dip notlar şu şekildedir: Bazı hastalar, tedavi için yazarların kliniğine başvurmadan önce Acticoat veya benzeri gümüş içerikli yara örtüleri veya gümüş sülfodiazin içeren yanık kremleri kullanmıştır. Bazı hastalar ise böyle ürünler kullanmamıştır. Yazarlar, çalışmaya alınan her hastanın kan gümüş seviyelerini çalışma öncesi ölçmüştür. Çalışmaya alınmadan önce gümüşlü bir yanık ürünü kullanan hastaların kan gümüş seviyeleri ortalama **5 ppb**, böyle bir ürün kullanmayan hastaların kan gümüş seviyesi ise ortalama **0.4 ppb (400 ppt)** olarak belirlenmiştir. Bu da demektir ki, hiçbir şekilde gümüşlü ürün kullanmamış bireylerin de kanlarında gümüşe rastlanabilmektedir. Zaten yazarlar normal bir bireyin kan gümüş seviyesinin **1-5 ppb** arasında olabileceğini belirtmiştir. Çalışmalarında, hastaların kan gümüş seviyesinin en geç 6 ay içerisinde normale döndüğünü belirtirken de bu verilere göre “**normal**” sınırını belirlediklerinin altını çizmektedir. Hiç gümüş kullanmamış bireylerin kanlarında nasıl olup da gümüş saptanabildiği konusu ise bu raporun ilerleyen bölümlerinde ve özellikle de içme sularında izin verilen gümüş sınırlarının anlatıldığı başlıklarda tartışılacaktır. Yazarlar ayrıca, bazı deneklerde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede hematolojik değişiklikler ve özellikle bir tür karaciğer fonksiyon göstergesi olan AST’de yükselme saptamıştır. Böbrek fonksiyonlarında ise bir değişiklik belirleyememiştir. Ne var ki, hastaların kan gümüş seviyelerine baktıklarında, saptadıkları hiçbir bozulmanın kan gümüş seviyesindeki artışla ilişkili olmadığını fark etmişlerdir. Yani hiçbir hastada artmış gümüş miktarı ile ilişkilendirilebilecek sağlık sorunu yaşanmadığı için yazarlar Acticoat uygulamasının zararsız olduğu sonucuna varmışlardır.

Trop ve arkadaşları (134) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise saptanan karaciğer enzimlerinde yükselme ile kan gümüş seviyesi arasında ilişki kurulamadığı için gümüşün karaciğere zarar vermediği yönünde yorumlanmıştır. Yaptıkları çalışmaya göre, vücut alanının %30’unda yanık olan 17 yaşındaki bir erkekte, tüm yanık alanını Acticoat denilen gümüşlü yara örtüsü ile kapatmışlar ve 7 gün boyunca 3 defa bu örtüyü yenilemişlerdir. Önce sağlık durumu iyiye giden ve iştahı açılan hastada uygulamanın 7.gününde iştahsızlık başlamış ve cilt rengi gri-mavi bir hal

almıştır. Yapılan tüm tetkiklerin normal gelmesi üzerine bunun arjiri (argyria) denilen gümüşe bağlı bir etki olduğunu düşünerek hastanın kan ve idrarındaki gümüş miktarına bakmışlardır. Serum ve idrar seviyeleri uygulamanın 7.gününde artış göstermiş, tedavi kesilmesine rağmen 7 hafta boyunca yüksek kalmıştır. Serum seviyeleri normale döndükçe arjiri de düzelmiştir. Bu vaka takdimi göstermiştir ki, gümüş, dermal uygulama sonrasında sistemik dolaşıma geçebilmekte, arjiri yapabilmektedir ancak tedavinin kesilmesini takiben haftalar içerisinde tekrar normale dönmektedir. Bu vaka sunumunun detaylarına ve rakamlarına biraz daha odaklanmak, bu raporun daha sağlıklı bir şekilde yazılmasına olanak sağlayacaktır. Şöyle ki; Kullanılan Acticoat'ın her bir miligramında 0.2-0.3 mg gümüş vardır. Yani gümüş içeriği **200-300 ppm**'dir ki bu rakam aslında çok yüksektir. Tian ve arkadaşlarına göre (131) de her bir cm² sinde 0.04 mg gümüş vardır (Makalenin verileri incelenerek hesaplanmıştır). Trop'un makalesinde kullanılan toplam gümüş miktarını hesaplamak bu raporun ilerleyen satırlarında kullanılmak üzere değerli bilgiler verecektir. Böyle bir hesaplama için ise kişinin vücut yüzey alanının hesaplanması gerekmektedir. (Vücut yüzey alanını (VYA) hesaplamak için kullanılan formüller şu şekildedir: Mosteller'e göre $VYA = (ağırlık \times boy / 3600)^{1/2}$, Boyd'a göre $VYA = (0.0178 \times boy^{0.5} \times ağırlık^{0.484})$, DuBois'e göre $VYA = (0.00718 \times boy^{0.725} \times ağırlık^{0.425})$ (158). Trop ve arkadaşlarının sunduğu vakada kendileri hesaplamamış olsa bile, VYA, DuBois formülü ile yaklaşık 2.048 m² olarak hesaplanmaktadır (sundukları vakanın boyu 170 cm ve kilosu 61 kg olarak belirtilmiştir). (Acer ve arkadaşlarının çalışmasında, az önce belirtilen her 3 formülde de birbirine çok yakın sonuçların çıktığı ve aradaki farkın ihmal edilebilir düzeyde olduğu ortadadır.) Yine Trop ve arkadaşlarının sunduğu vakada, yanık oranı, vücut yüzey alanının %30'u olarak hesaplanmıştır. Buradan, basit bir hesaplama ile, sundukları vakanın yanık alanının 600 cm² olduğu görülecektir. Tüm yanık alanını kapatacak şekilde Acticoat uygulaması yaptıklarını belirttiklerine göre, hastada kullandıkları Acticoat'ın 600 cm² (0.6 m²) olduğu anlaşılır. Tian ve arkadaşlarının yaptığı ve bu başlığın ilk kaynağı olarak yukarıda bahsi geçen çalışmada ise 12 cm² yüzey alanına sahip Acticoatın 0.48 mg gümüş içerdiği belirtilmektedir. Tian ve Trop'un çalışmalarındaki veriler dikkatli bir şekilde ve karşılaştırmalı olarak incelendiğinde 600 cm² yara örtüsünün 24 mg gümüş içerdiği hesaplanmaktadır.

Yani hastaya tek bir uygulamada 24 mg gümüş verilmiştir ve 7 gün içerisinde bu uygulama 3 defa tekrar edilmiş, sonuçta hastaya 72 mg gümüş verilmiştir. Bu şartlar altında bile, ölçülen en yüksek kan gümüş değeri **107 ppb**, en yüksek idrar gümüş değeri ise **28 ppb** olarak rapor edilmiştir. Üstelik, 97.günde kan gümüş değeri **13.3 ppb**'ye, idrar gümüş miktarı ise **1.5 ppb**'ye düşmüş ve yazarlar bu durumu “**normale dönmek**” olarak raporlamışlardır. Yani, yazarlara göre **13.3 ppb (13.8 ug/L) kan gümüş seviyesi normaldir**. Böbrek fonksiyonlarında hiçbir bozulma olmamasına rağmen, idrarda gümüş saptanmış olması, bazı yazarların savunduğu gibi, gümüşün böbrek yolu ile atılımının ispatı olabilir. Genel kabul gören düşünce ise gümüş atılımının daha çok dışkı yolu ile olduğu yönündedir. Bu konu ve ilgili makaleler, gümüşün farmakodinamiği anlatılırken belirtilecektir. Trop ve arkadaşların makalesinde mevcut literatüre göre daha farklı olarak arjirinin geçici olması da ayrıca önemlidir. Çünkü bilinen tüm diğer çalışmalar, arjirinin masum ama kalıcı bir durum olduğu yönündedir.

Tüm bu ve benzeri onlarca çalışma, yaralı cilde gümüş uygulaması sonrasında gümüşün vücuda geçebildiğini ispatlamaktadır. Bu tür uygulamalar, bu raporun yazılma amacı olan “kalıcı implant” uygulaması için uygun modeller olmasa da, artmış kan gümüş seviyesi sonrasında yaşananlar, kalıcı implant uygulaması sırasında olmasından korkulan kan gümüş seviyesi artışının alt veya üst sınırlarını belirlemekte oldukça faydalı olacaktır. Sonuçta, gümüşün vücuda hangi yolla alındığı onun vücuda geçen miktarını belirlese de, vücuda geçen gümüşün orada ne yaptığının incelenmesi söz konusu olduğunda gümüşün hangi yolla alındığının bir önemi kalmamaktadır. Dermal uygulamalar sonrası olabilecekler üzerinde daha ileri çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktaysa da tüm yazarlar böyle bir durumda ilk hedef organın karaciğer olduğu konusunda hemfikirdirler. Gümüşün yara iyileşmesini hızlandırıcı özelliği bu çalışmalarca ortaya konulmuş ve geleneksel gümüş sülfadiazin tedavisinden daha iyi sonuçlar alındığı belirlenmiştir. Ancak halen bu tür uygulamaların güvenlik sınırları sağlıklı olarak belirlenebilmiş değildir. Bu tür ürünlerin fayda-zarar dengesi iyi irdelenmelidir. Çünkü yaralanmış ciltten gümüş kolaylıkla kana ve ardından da dokulara geçebilmektedir.

2.18. GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN İNTRAPERİTONEAL (KARIN İÇİ) ENJEKSİYONU

Rahman ve arkadaşları (105), 25 nm boyutundaki nano gümüşün etkilerini beyin farklı bölgelerinde incelemişlerdir. Bunun için farelere intraperitoneal (karın içine enjeksiyon şeklinde) olarak 100, 500 ve 1000 mg/kg gümüş vermiş ve 24 saat sonra yaptıkları incelemede kaudat nükleusta, frontal kortekste ve hippokampusta gen ekspresyonunda değişimler saptamışlardır. Araştırmacılar alınan bu sonuçları, gümüşün nörotoksisite yaptığı ve gen ekspresyonunu oksidatif stresi artırmak yoluyla gerçekleştirdiği şeklinde yorumlamışlardır. Bu deneyde kullanılan gümüş aslında çok yüksektir (ppm cinsinden ifade ile **100 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm**) ve incelenen dokuların gümüş seviyesi hakkında bir açıklama yoktur. Gümüşün istenmeyen etkilerinin öncelikle doz bağımlı olduğu artık ispatlanmıştır. Neredeyse her çalışma, yayınlanan metnin bir yerinde bu bilgiden bahsetmektedir. Durum böyle iken, kurgulanan bu çalışma doz seçimi konusunda oldukça hatalıdır ve bu rapor için sadece kötü bir örnek teşkil etmekten ileri gidemeyecektir. Kullanılan en düşük doz olan 100 mg/kg gümüş, 70 kg ağırlığındaki bir insana oranlandığında 7000 mg (7 gram) gümüş anlamına gelir ki, yaptıkları çalışmaya göre 70 kilogramlık bir insanın gümüşe bağlı genetik bozulma yaşaması için 24 saat içerisinde 7 gram gümüşü doğrudan vücuduna alması gerekmektedir ve bu alım vücut içerisine enjeksiyon şeklinde olmalıdır. Çünkü daha sonra (farmakokinetik başlığı altında) anlatılacağı gibi, ağız yolu ile alınan gümüşün yaklaşık %90'ı dışkı ile atılmaktadır. Yani, bir başka ifade ile kişinin 7 gram gümüşü vücuduna alıp genetik bir bozulma yapabilmesi için ağız yolu ile bir gün içerisinde 70 gram gümüş almalıdır ki bu durum hayatın olağan akışına terstir. Gümüşün gen ekspresyonunda bozulma yaptığının ortaya konulması açısından değerli bir çalışma olsa da, daha mantıklı dozlar ile çalışmanın tekrar edilmesi gerekmektedir.

Sarhan ve Hussein'in (159) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada ise, 40-60 nm boyutundaki gümüş partikülleri intraperitoneal olarak (2000 mg/kg yani **2000 ppm**) verilmiş ve 48 saat sonra beyin böbrek ve karaciğer elektron mikroskopi ile incelenmiştir. Bu çalışmada da gümüşün adı geçen organlarda zararlı etkilere neden olduğu ancak sıçanların sağlık durumlarında her hangi bir değişimin olmadığı

saptanmıştır. Gümüşe maruz bırakılan deneklerin böbrek ve karaciğerlerinde morfolojik değişimler saptanmıştır. Bu çalışmada, böbrek korteksi ve parankiminde hücrel şişme, sitoplazmada çok sayıda membranöz vakuoller, hipertrofiye olmuş nükleollü nükleuslar, tübüler epitelyumda şişme, sitoplazmik vakuolizasyon, glomerüler sellülaritede artış, Bowman mesafesinde tıkanma, şişmiş hepatik hücreler, sinüzoidal lümende daralma ve hipertrofiye olmuş Kupffer hücreleri gözlenmiştir. Deneklerin karaciğer ve böbrek fonksiyonlarındaki bozulmalar laboratuvar olarak da ispatlanmış, karaciğer enzimleri ile üre ve kreatinin değerlerinde artış gözlenmiştir. Kan sayımlarında da artmış hemoglobin değerlerine rastlanılmıştır. Ne var ki bu çalışmada da kullanılan gümüş dozu çok yüksektir. Bir sıçanın ağırlığının ortalama 200-300 gram olduğu düşünülürse, her bir sıçana 400 ila 600 miligram kadar gümüş verildiği hesaplanacaktır. Ya da aynı dozun 70 kg ağırlığındaki bir insana verilmesi durumunda gereken gümüşün 140 gram olması, oral yolla alındığında %90'ının atıldığı düşünülünce de kişinin 1400 gram (1.4 kg) gümüş alması gerektiği görülecektir. Bu miktarın klinik uygulamalarda yer bulması imkansızdır. Bu deneyin daha düşük dozlarla tekrarlanmasının uygun olduğu açıktır. Zaten yazarlar da, gümüşün klinik kullanımının gerekli/faydalı olduğunu açıkça belirtmeseler de, dolaylı yoldan bundan bahsetmişler ve sınır dozun belirlenebilmesi için daha farklı dozlarla benzer deneylerin tekrarlanması gerektiği konusunda hemfikir olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca, bu çalışma, her ne kadar mantıksız derecede yüksek dozlarla yapılmış olsa da, bize en azından bir insana 140 gram gümüş enjekte ettiğimizde bile ciddi sağlık sorunu yaratmayacağını, sadece böbrek ve karaciğer üzerinde ılımlı değişiklikler yapabileceğini gösterdiği için ilginç ve değerlidir. Halbuki Wadhera ve Fung, (137) gümüş nitrat için öldürücü dozun 10 mg olduğunu belirtmektedirler.

2.19. GÜMÜŞ NANO PARÇACIKLARA ORAL MARUZİYET

Gümüş içeren ürünlerin oral yolla alınması daha çok internet kaynaklı bilgiler doğrultusunda artrit ve hatta bazen kanser tedavisi umudu ile kontrolsüz kullanımı neticesinde olmaktadır. Bu durum, yani kontrolsüz tüketimi, barsak ülserlerine ve hatta arjiriye neden olsa da önlenememektedir. Oral yolla alınan gümüş kolaylıkla sistemik dolaşıma geçmektedir (137).

Cha ve ark. (24), 15 nm boyutundaki nano partikülleri ve 2-3.5 um boyutundaki mikro partikülleri doğrudan fare midesine verdikleri çalışmalarında, maruziyeti takiben 3.günde fare karaciğerinin ciddi boyutta lenfosit artışı yani inflamasyon gösterdiğini saptamışlardır. Takiben, ticari olarak temin edilen insan karaciğer hücre kültüründe bir seri çalışma yaparak mitokondrial aktivite ve bazı gen ekspresyonlarına ve hücrelerin DNA içeriklerine bakmışlardır. Ne var ki bu çalışma, kendi içinde mantıksız ve tutarsız 2 ayrı çalışmayı barındırmakta ve çokça soru işareti taşımaktadır. Çalışmaya daha detaylı bakacak olursak, öncelikle farelere ağız yolu ile 2.5 gram gümüş vermişlerdir. Metinde belirtilmemiş olsa da deney farelerinin ağırlığı yaklaşık 30 gramdır. Bu ağırlıktaki fareye 2.5 gram gümüş vermek, standart bir insana (70 kg), 8 kg gümüş vermeye eşdeğerdir. Çalışmacıların – kendi makalelerinde rakamsal bir hata yapmamışlarsa- neden bu kadar yüksek bir doz kullandıkları açıklanabilir olmaktan uzaktır. Ardından, bu farelerin karaciğerleri çıkartılmış ve sadece ışık mikroskopisi incelemesi yapılmıştır ve karaciğerde herhangi bir gümüş tayini yoluna gidilmemiştir. Oysa ki bunu yapmak böyle bir çalışma için elzemdir. Üstelik, bu kadar yüksek doz gümüş kullanılmasına rağmen mikroskopik olarak çok da korkutucu sonuçlar alınmamıştır. Diğer taraftan, çalışmanın bu ilk kısmı ile tamamen ilişkisiz olarak, insan karaciğer hücre kültüründe yaptıkları çalışmalarda **0.24 ppb**'den başlayarak **2400 ppb**'ye (**2.4 ppm**)'e çıkan dozlarda gümüş kullanmışlardır. Bu çalışmaları sonrasında inflamasyondan sorumlu 4 genin ekspresyonunun değiştiğini göstermişlerdir. Mitokondri fonksiyonlarında hiçbir değişiklik görmemişler ancak hücrelerin DNA içeriğinde ciddi azalma saptamışlardır. Bu azalma, kendi ifadelerine göre kesinlikle doz bağımlı değildir. Bu bilgi ise mevcut literatürle çelişmektedir. Ayrıca, sitosokside çalışmalarında ise kullandıkları hiçbir dozun sitotoksik olmadığını bulmuşlardır. Çalışmalarının 4. sayfasındaki tabloda bu durum açıkça görülmektedir. Oysa ki, çalışmanın in vitro aşamasını, gümüş verdikleri farelerin karaciğer hücreleri ile yapmış olsalardı sonuçlar çok daha farklı olabilirdi. Çünkü, ticari olarak satın alınan hücre kültürlerinin çok sayıda pasajlanması (yani çok fazla sayıda aynı hücrelerden yeni hücreler üretilmesi) sebebi ile giderek daha dengesiz bir yapıya sahip oldukları ve DNA hasarına meyilli hale geldikleri bilinir. Bu bilgiyi Arora ve arkadaşları da desteklemektedir. (7,8) Çalışmanın asıl soru işareti taşıyan kısmı ise,

0.24 ppb ile bunun 10.000 katı olan 2400 ppb arasında DNA bozulması açısından anlamlı fark olmamasıdır. Bu durum, elde ettikleri sonucun gümüş dışında bir başka etkene bağlı olduğu anlamına gelebilir. Bu çalışmanın aynı dozlarla ama farklı kişilerce tekrar edilmesi gerektiği ortadadır. Diğer taraftan, farelere verilen partiküllerin sistemik dolaşıma geçip geçmediği, uygulama bölgesinde toksik etkinin varlığı ya da yokluğu, dışkı ile elimine edilme miktarı gibi noktalar da çalışmanın kapsamı dışında tutulmuştur.

Kim ve ark. (72), farelerde 60 nm boyutunda nano gümüşün tekrarlayan oral dozunun doku dağılımını ve toksikolojisini incelemişlerdir. Bu çalışmada düşük (30mg/kg/gün), orta (300mg/kg/gün) ve yüksek (1000mg/kg/gün) doz gümüşe maruz bırakılan 3 grup oluşturmuşlardır. Toplamda 28 gün süren bu uygulama sonrasında çeşitli dokularda gümüş birikimi ve gümüş seviyesinde artış saptanılan bu çalışmada kullanılan gümüş dozu da çok yüksektir ve muhtemelen çok büyük bir yüzdesi dışkı ile atılmıştır. Çalışma bu noktada bu verilerden yoksundur. Gümüş birikimini beyin, karaciğer, böbrek, akciğer ve testiste ölçmüşler ve karaciğerin belirgin hasarlandığını saptamışlar ama her hangi bir gruptaki her hangi bir denekte sağlık sorunu veya gıda alımında azalma saptamamışlardır. Bu bulgular da yine literatür ile uyumludur. Ancak, serum biyokimya değerlerine bakıldığında, sadece yüksek (1000 mg/kg/gün) doz gümüş verdikleri deneklerde bir takım değişimler saptamışlardır. Çalışmanın ilginç olan tarafı ise, bu değişimlerin ALP, total kolesterol ve total protein değerlerinde olmasıdır. Çünkü bu çalışma dışındaki tüm diğer çalışmalar başta AST olmak üzere başka bir takım parametrelerde değişiklik saptamış, ALP, kolesterol ve protein değerlerinde normalden sapma saptamamışlardır. Deneklerin tam kan sayımlarına bakıldığında ise, erkek farelerde MCV, dişi farelerde ise RBC, Hb ve HCT değerlerinde normalden sapma gözlenmiştir. Bu bulgular ve cinsiyetler arasındaki farklılık diğer çalışmalarla kısmen benzerlik göstermektedir. Bu durumun bir yorumunu yapmak şu an için çok mümkün görünmemektedir. Yine, sadece yüksek doz kullanılan grupta bir “kan pıhtılaşma” belirteci olan APTT değerinde klinik olarak anlamlı olmayan dozda bozulma saptanmıştır.

Çalışmanın devam eden aşamasında, deneklerden alınan kemik iliği örneklerinde genotoksik ve sitotoksik inceleme yapmışlar ve normal farelere kıyasla anlamlı bir

genotoksisite ve sitotoksisite saptamamışlardır. Bu durum, yukarıda bahsedilen Cha ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile tezat teşkil etmektedir. Cha ve arkadaşları **0.24 ppb** gibi bir doz ile genotoksisite saptarken, Kim ve arkadaşları kümülatif olarak toplam 28 günde verilen **28.000.000 ppb** gibi bir dozla bile genotoksisite saptamamıştır. (1000 mg/kg/gün dozundan yola çıkılarak hesaplanmıştır). Sonuçlar arasındaki bu inanılmaz farklılık, her iki deneyde kullanılan yöntemin birbirinden farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü, Cha ve arkadaşları çok daha detaylı ve hassas bir inceleme yapmışlardır. Yine de aradaki farkın bu kadar büyük olması ancak hücre kökenlerinde aranmalıdır. Cha ve arkadaşları, genetik olarak bozulmaya elverişli ticari hücre kültürü kullanırken Kim ve arkadaşları deneklerin kendi hücrelerini kültür ortamında çoğaltıp bunları kullanmıştır. Ayrıca, Kim ve arkadaşlarının çalışmasında, gümüş verilen denekler deney boyunca hayatta olduğu için gümüş metabolizması çalışmış ve detoksifikasyon süreçleri yaşanmış olabilir. Oysa ki Cha ve arkadaşlarının çalışmasında, gümüş nano parçacıkları doğudan hücrelerin üzerine verilmiştir ki, klinik uygulamada hücrelerin yaşayacağı gümüş maruziyeti bu şekilde değil Kim ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibidir. Diğer taraftan, Kim ve arkadaşlarının çalışmasına eleştiri getirecek olursak, yazarların bu çalışmada kullandıkları gümüş dozları, insanlarda kullanılabilecek klinik dozlardan hayli yüksektir. Bu da çalışmanın değerini bir ölçüde düşürmektedir. Kullandıkları en düşük doz olan 30 mg/kg/gün dozu bile ele alınsa, kümülatif dozun standart bir insan için 58.800 mg (58,8 gram) **(58.800 ppm)** olduğu hesaplanacaktır.

Bahsi geçen çalışmada dokuların gümüş içeriklerine bakıldığında ise, diğer bir takım çalışmalarda olduğu gibi dişi deneklerin gümüş biriktirmeye daha meyilli olduğu görülecektir.

Çalışmanın başka ilginç sonuçları da vardır. Erkek kontrol grubunda testislerde 0.1 mg/g gümüş saptanmıştır. Bu 100 mg/kg demektir ki 100 ppm'e denk gelir. Aynı kontrol grubunda böbreklerde 20 ppm, karaciğerde 20 ppm, beyinde 30 ppm, akciğerde 40 ppm, midede 20 ppm ve kanda 10 ppm gümüş saptanmış olması oldukça düşündürücüdür. Çünkü bu grup kontrol grubudur ve hiçbir şekilde gümüş verilmemiştir. Dişi farelerde de durum bundan farklı değildir sadece biraz daha düşük miktardadır. Deneklere gümüş verildiğinde ise, her iki cinsiyette de artan doz

ile doğru ilişkili olacak şekilde –beklenildiği gibi- gümüş artışı olmuştur. Ne var ki doz arttıkça, dişilerin organlarında biriken gümüş de daha hızlı artmaktadır. Bu durum, dişi cinsiyetin, gümüş birikimine daha meyilli olduğu anlamına gelebilir. Az önce de belirtildiği gibi, hiç gümüş verilmemiş deneklerde de pek çok çalışmacının “yüksek” olarak adlandırdığı ölçüde gümüş çıkması, literatür ile uyumlu olarak, bu deneklerin fark edilmeden su ve gıda ile gümüş alıyor olduğu anlamına gelir. Çünkü bilindiği kadarı ile gümüşün hayvan ve insan metabolizmasında yeri yoktur. Diğer taraftan, bahsi geçen çalışmada en yüksek gümüş dozu verilen grupta kan gümüş seviyesi 0.80 mg/g (800 ppm) olarak ölçülmüştür. Diğer organlarda sonuçlar bundan çok çok daha yüksektir. Gümüşün tıbbi bir implanta kaplanılarak insan vücudunda kalıcı olarak kullanılması fikrine yeşil ışık yakan bu çalışma da diğer çalışmalar gibi düşündürücü taraflar içermektedir. Burada alınan sonuçlar, gümüş kaplamalı bir implant uygulamasında kullanılacak dozların çok altında olsa da, bu kadar yüksek ppm değerlerinin memeli dokusuna zararsız olduğunu iddia etmek çok mantıklı değildir ve mevcut literatürün büyük bir kısmı ile çelişmektedir. Ayrıca, kontrol grubunda saptanan abartılı gümüş miktarları, bu çalışmanın tekrar yapılması gerektiğinin göstergesidir. Deneklerin çalışma öncesi beslenmelerinde su ve gıda ile farkında olunmadan gümüş alıyor olması teorisi bile rakamsal olarak elde edilen sonuçları karşılamaktan uzaktır.

2.20. İNSANLAR ÜZERİNDEKİ ÇALIŞMALAR

Gümüş nano parçacıklar antibakteriyel etki amacı ile gıdalarda, medikal ürünlerde, endüstriyel ürünlerin kaplanması ve kozmetikte çokça kullanılmaktadır (137). Gümüşün doku dağılım yollarını ortaya koymak için boyut, yüzey geometrisi, yüzey kimyası, uygulama yolu ve süresi asıl dikkat edilmesi gereken özelliklerdir (27). Kişisel maruziyet için çok çeşitli maruziyet yolu belirlemek mümkündür. Doğrudan cilt teması, oral yolla alınması (mide barsak sistemi), solunum yolu ve damar içi uygulamalar sonrasında bu durum gerçekleşebilir (27,3). Deney hayvanının kuyruk veninden verilen nano gümüşün sirkülasyon süresi daha kısa, doku dağılımı daha geniştir (81). Majör hedef organ karaciğerdir, bunu sırası ile dalak, akciğer ve böbrek izler. Daha büyük parçacıklar birincil olarak dalakta birikir. Tekrarlayan

damar içi uygulamada kan gümüş seviyesi enjeksiyon sonrası 6 gün yüksek kalabilir ve zaman geçtikçe bu seviye düşer. Bu durum, gümüşün zamanla vücuttan atıldığının ispatıdır (81).

Gümüşün inhalasyon toksisitesini inceleyen çalışmalardan birisi, Hyun ve arkadaşları tarafından yapılmış ve sıçanların burun mukozalarında çeşitli parametrelere bakmışlardır. Bulgularının hiç birisi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık göstermemiştir (60). Bahsi geçen çalışmada, sıçanlara düşük doz olarak 0.5 ug/m^3 , orta doz olarak 3.5 ug/m^3 ve yüksek doz olarak da 61 ug/m^3 gümüş içeren hava solutmuşlardır. Makaleden hesaplandığı kadarı ile çalışma aralıklarıyla 120 saat sürmüştür. Bu çalışmanın, bu rapora bir anlam katabilmesi için, deney süresince sıçanların ne kadargümüşe maruz kaldığının hesaplanması gerekmektedir. Çünkü kullanılan dozlarda zararlı bir etki gözlenmemiştir ve bu hesaplama sonrasında ulaşılacak değerler, gümüşün güvenli kullanım sınırı için bir başka değerli veri elde etmemizi sağlayacaktır. Literatürde (163) sıçanların dakikada soluk sayısı 70-115 olarak ve her soluktaki hava hacmi ise 0.6-2 ml olarak belirtilmektedir. Her iki verinin de ortalama değerleri alındığında bir sıçanın dakikada 165.6 ml hava soluduğu görülecektir. Yani bir sıçan saatte 9936 ml hava solumaktadır. Çalışma 120 saat sürdürüldüğüne göre, her bir sıçan deney boyunca toplam 1192320 ml hava solumuştur. Bu ise yaklaşık 1.2 m^3 hava anlamına gelmektedir. Buradan düşük doz grubundaki her bir sıçanın deney boyunca 0.65 ug, orta doz grubundaki her bir sıçanın deney boyunca 4.55 ug ve yüksek doz grubundaki her bir sıçanın ise deney boyunca 79.3 ug gümüşe maruz kaldığı hesaplanacaktır (sıçanların ortalama ağırlığı 191 g olarak belirtildiğine göre, yüksek doz grubundaki her sıçan **0.41 ppm** gümüşe maruz bırakılmıştır). Bu rakamlardan en yüksek olanı dahi çalışmacılara göre zararlı olmaktan uzaktır. Diğer veriler gibi bu veri de çalışmanın “karar” kısmında tekrar değerlendirilecektir.

Gümüşün inhalasyon toksisitesini inceleyen çalışmalardan birisi de Song ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (121). Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada denekler, metrekübinde 49 ug, 117 ug ve 381 ug gümüş bulunan havayı solumak zorunda bırakılmıştır. Çalışma 12 haftalık (84 gün) bir deney süresi ve 12 haftalık bir nekahat süresi olacak şekilde planlanmıştır. Belirlenen aralıklarla denekler sakrifiye

edilerek akciğer örnekleri zararlanma açısından incelenmiş ve deney boyunca tüm denekler akciğer fonksiyonları açısından takip edilmiştir. Çalışmalarının sonunda, dişi farelerde anlamlı bozulma gözlenmezken, erkek farelerde ciddi solunum bozuklukları ve histopatolojik olarak da akciğer dokusunda zararlı etkiler görülmüştür. Düşük ve orta doz verilen erkek farelerde nekahat dönemi sonunda anlamlı düzelme saptanırken, yüksek doz verilen erkek farelerde nekahat dönemi sonrasında olumlu bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışma boyunca, her sakrifikasyon periyodunda deneklerin karaciğer, beyin, böbrek, dalak, testis, yumurtalık, göz ve kan dokularındaki gümüş miktarına bakılmış ve özetle, dişi farelerin tüm dozları erkeklerle göre daha iyi tolere ettiği saptanmıştır. Düşük doz uygulanan erkek ve dişi farelerde nekahat dönemi sonunda tama yakın düzelme saptanmış, orta doz gümüş kullanılan grupta ise yine düşük doz grubuna yakın bir düzelme elde edilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak, en çok gümüş birikimi karaciğer ve dalakta olmuştur. Nekahat dönemi sonrasında bu iki organ dışındaki tüm diğer organlarda gümüş neredeyse tamamen temizlenmiş, bu iki organda ise istatistiksel olarak çok anlamlı olmayan ama diğer dokulara göre daha fazla olduğu saptanan gümüş birikimi rapor edilmiştir. Yazarların beyanına göre, solunum yolu ile gümüşe maruz kalmanın sınır değeri (NOAEL) 100 ug/m^3 olarak zaten önceden kabul edilmiştir. Kendi sonuçları da, bu bilgiyi doğrulamaktadır. 49 ug/m^3 ve 117 ug/m^3 gümüş verilen gruplarda hem organ fonksiyonu hem de mikroskopik açıdan kalıcı bir sorun yaşanmazken, NOAEL değerinin çok üzerinde olan 381 ug/m^3 dozunda ciddi ve geri dönüşsüz toksik etkiler saptanmıştır. Daha önceki benzer çalışmaların irdelenmesi sırasında, bir sıçanın bir saatte ne kadar hava soluduğu hesaplanmış ve 9936 ml/saat bulunmuştur. 84 gün boyunca günde 6 saat deneye maruz bırakılan sıçanların her birinin toplamda 5007744 ml gümüşlü hava soluduğu görülecektir. Bu ise yaklaşık 5 m^3 hava anlamına gelmektedir. Demek ki düşük doz grubundaki sıçanlar, deney boyunca 245 ug , orta doz grubundakiler 585 ug ve yüksek doz grubundakiler ise 1905 ug gümüşü doğrudan akciğerlerine çekerek vücutlarına almıştır. Sıçanların ortalama ağırlıklarının dişi ve erkeklerde sırası ile 135 g ve 171 gram olduğu belirtilmiştir. Kabaca, ortalama 150 g oldukları düşünüldüğünde, düşük doz için kümülatif dozun 1.6 ppm (1.6 ug/g), orta doz grubu için 3.9 ppm (3.9 ug/g) ve yüksek doz grubu için 12.7 ppm (12.7 ug/g) olduğu görülecektir. Bu rakamlar da

yine daha önce incelenen çalışmalarda olduğu gibi “karar” kısmında tekrar tartışılmak üzere hesaplanmıştır.

2.21. GEBELERDE GÜMÜŞ KULLANIMI

Zebra balığı ile yapılan bir çalışmada (85), gümüşün embriyoya geçebildiği gösterilmiştir. Buradan, hamile kadınların, gebelikleri boyunca gümüş maruziyetinden kaçınması gerektiği sonucu çıkmaktadır. Bu oldukça değerli bir bilgidir. Çalışmacılar, gümüşü hamile balığa vermek yerine doğrudan içinde embriyo olan balık yumurtasına vermişlerdir. 8-64 hücreden oluşan tek bir balık embriyosu için 0.19 nM yani 20.5 ng gümüş kullanmış ve bu miktarı embriyoda gelişim kusuru ve hatta ölüm oluşması için sınır değer olarak belirtmişlerdir. Bu değer, bir zebra balığı embriyosunun ağırlığı tartılamadığı için insana yansıtılamasa da, bir balık embriyosu ile insan vücudu oranlandığında hamile bir kadının kazara maruz kalabileceği dozdan çok fazla olduğu, yani aslında klinik uygulama için düşünüldüğünde, makul dozlarda gümüşün insan embriyosunda zarara yol açmayacağı kestirebilir. Bu ifadeler, hamile bir kadının gebeliğinde gümüşlü bir ürün kullanmasına izin verilebileceği anlamına gelmemelidir. Bu rapor, daha önce de defalarca belirtildiği üzere, gümüş kaplı implantların insanda kullanımının güvenlik sınırlarını belirlemek adına yazılmıştır. Burada sorulması gereken soru, daha önceden gümüş kaplı bir implant kullanılmış bir kadın hamile kaldığında, anne karnındaki çocuğun bundan etkilenip etkilenmeyeceği olmalıdır. Bu makaleden yola çıkarak kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Ancak, kullanılması planlanan implant sisteminin içerdiği / içermesi ön görülen toplam gümüş miktarı bilindiğinde ve konu hakkında yazılmış başka çalışmalarla da desteklendiğinde bir sonuca varmak daha mümkün olacaktır.

Bu nedenle de, aşağıda, bu konuya odaklanmış başka çalışmalara değinilmiştir. Hamile farelere gümüş verildiğinde yavruların öğrenme sorunu yaşayıp yaşamadığı sorusunu irdeleyen bir çalışmada (164), 0.427 mg gümüş verilen farelerin yavrularında öğrenme sorunu olduğu saptanmıştır. Çalışma 0.407 mg polivinilpirolidin (PVP) kaplı gümüşle ve 0.013 mg gümüş içeren gümüş nitrat kompleksi ile tekrarlandığında böyle bir sorun yaşanmamıştır. Bu çalışmada, yavru

farelerin beyin dokuları da incelenmiş ve özellikle öğrenme ile ilgili olan hipokampus bölgesinde gümüş miktarının arttığı saptanmıştır. Bu sayede, hem gümüşün hamile bireyden yavruya geçebildiği hem de hiç masum olmadığı bilgisine ulaşılmış olmaktadır. Ne var ki, çalışmacılar, kendi çalışmalarında bile, gümüşün zararlı etkilerinin doz ve zaman bağımlı olduğunu belirtmiş olsa da, çalışmalarını tamamen yanlış kurgulamıştır.

Austin ve arkadaşların yaptığı bir başka çalışmada (165), gebe farelere farklı dozlarda gümüş verilmiş ve hem farelerin kendisinde hem de henüz doğmamış yavrularında gümüş miktarına bakılmıştır. Anne farelerin neredeyse tüm dokularında, verilen doz ile orantılı olarak gümüş birikimi saptanmasına rağmen, özellikle anne farenin beyinde ve yavrularda çok daha düşük dozlarda gümüş birikimi saptanmıştır. Bu çalışma, bir taraftan, gümüşün anne karnındaki çocuğa geçebildiğini göstermekte diğer taraftan da bu geçişin korkulacak düzeyde olmadığı belgelemektedir. Kullanılan kümülatif doz, gebe fare başına 35 ve 66 ug olarak belirlenmiştir (bu dozun fare başına 1-2 ppm olduğu rahatlıkla hesaplanabilmektedir). Bu dozu 1 defada değil, gebeliğin 7., 8. ve 9. günlerinde olmak üzere (yani organogenez safhasına denk gelecek şekilde) damar içinden 3'er eşit doz halinde vermişler (kendi ifadelerine göre 0.4 mg/kg/gün ve 0.73 mg/kg/gün) ve son enjeksiyonu takiben 24 saat sonra denekleri öldürerek örnekler almışlardır. Çalışma sonunda, hiçbir yavru farede organ gelişiminde bozulma saptamamışlardır.

2.22. IN VİTRO ÇALIŞMALAR

Nano gümüş toksisitesinin kapsamını ve mekanizmasını ortaya koymada biyokimyasal belirleyiciler kullanılabilir. Oksidatif stresle ilgili genlerde up regülasyon, metallothionein mRNA ekspresyonu ve ısı-şok proteini 70'in up-regülasyonu bu belirteçlerden bazılarıdır (2,27). Son zamanlarda, bu biyokimyasal belirleyiciler üzerine odaklanmış çalışmalar da yapılmaya başlanılmıştır (89).

Literatürde gümüş nano parçacıklarla yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Mevcut çalışmalar da genellikle cilt, sindirim sistemi, karaciğer toksisitesi ve

akciğerler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar bazen tek bir hücre tipine yoğunlaşırken bazen de organı ele almıştır.

2.23. DERMAL MODELLER

Gümüş nano parçacıkların özellikle yara örtülerinde kullanımı bir miktar suistimal ediliyor gibi görünmektedir. Bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılması, partiküllerin penetrasyonunun incelenmesi ve hedef organlar için risk analizinin tamamlanması gerekmektedir. Arora ve ark (7), hem insan fibrosarkom hücrelerinde hem de insan deri kanseri hücrelerinde bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, hücreler 24 saat boyunca 50 ug/mg gümüşle muamele edilmiştir (7-20 nm). Ardından, hücrelerin metabolik yeterlilikleri XTT hücre proliferasyon çalışması ile ölçülmüştür. IC 50 değerleri, fibrosarkom hücreleri için 10.6 ug/ml ve insan cilt kanseri hücreleri için 11.6 ug/ml bulunmuştur. Gümüş iyonlarının IC 50 değerinin yaklaşık yarı dozunda (6.25 ug/ml) hücre içinde oksidatif stresi artırdığı saptanmıştır. Bu şekilde düşünülmesinin nedeni, bu dozlarda artmış lipid peroksidasyonu ve GSH seviyelerinde azalma saptanmış olmasıdır. Apoptoza neden olacak konsantrasyon da ayrıca hesaplanmıştır ve fibrosarkom hücreleri için **0.78 ug/ml**, cilt kanseri hücreleri için ise **1.56 ug /ml** bulunmuştur. Nekroz için ise bu değer **12.5 ug/ml** olarak ölçülmüştür. Az sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, gümüş nano parçacıkların deri hücrelerinde oksidatif stresi artırarak etki ettikleri kesin gibidir. Ne var ki, gümüşün canlı dokuda bunu yapabilmesi için öncelikle derinin katmanlarını geçmesi gerekmektedir. Sağlam cildin gümüş geçişine karşı güçlü bir direnci vardır. Cilt bütünlüğü bozulduğunda bu durum değişmektedir. Çalışmacıların da belirttiği gibi, gümüşün pek çok gram pozitif ve gram negatif bakteri için MIC değeri (bakterilerin yarısını öldürebilmek için gereken en düşük gümüş dozu) 1.56-6.25 ug/ml'dir ve bu dozun aslında sağlıklı memeli hücrelerine zararsız olduğu kabul edilir. Çalışmacılar da bununla örtüşen bir sonuç bulmuşlar ve bakteri öldüren dozun, memeli hücresine zarar vermediğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışma, aslında 2 ayrı tür cilt kanseri hücresi ile yapılmıştır ve içerdiği üzeri kapalı mesaj "gümüşün antikanserojen olduğu"dur. Sağlıklı hücreyi öldürmeyen nano gümüş dozlarının belirlenip bu dozların kanserli hücrelerde denenmesinde fayda olduğu açıktır.

2.24. KARACİĞER MODELLERİ

Karaciğer toksisitesi, gümüş nano partiküllerin en çok biriktiği organ olması nedeni ile neredeyse en çok çalışılan konudur. Hussain ve ark (58), gümüşün karaciğer toksisitesini ilk çalışanlar olmuştur. BRL 3 A karaciğer epitelyum hücreleri ile yaptıkları çalışmada, 2.5-50 ug/ml gümüş kullanmışlar ve bu işlemi 6-24 saat sürdürmüşlerdir. Farklı metallerle de yapılan bu çalışma en potent metalin gümüş olduğunu göstermiştir. Onlara göre, gümüş partikülleri fazla miktarda reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimine neden olmaktadır. Ayrıca GSH seviyesi düşmektedir. Çünkü gümüş GSH'ya bağlanmakta, ya da GSH sentezinde kullanılan proteinlere bağlanmakta ve onları inaktive etmektedir. Bu çalışmada dikkati çeken ayrıntı kullanılan dozlardadır. Çalışmacılar, açıkça, “**2.5 ile 5 ug/ml** gümüş dozunun incelenen tüm parametreler üzerinde etkisiz olduğunu ve sitotoksikite yapmadığını belirtmektedirler. Zararlı etkinin başladığı doz ise 5-10 ug/ml arasında, yani 5 ug/ml (**5 ppm**)’den sonradır. Bu dozdan sonra ise dozla orantılı olarak hücrelerin girdiği stres ve yaşadığı zararlanma katlanarak artmaktadır. Bu çalışmanın bu rapor için değerli olmasının asıl sebebi, gümüşün karaciğer hücreleri üzerindeki zararlı etkisinin hangi dozdan itibaren başladığını açıkça ortaya koymasıdır.

Cha ve arkadaşları (24), hem mikro partiküllerin hem de nano partiküllerin etkilerini insan karaciğer kanseri hücrelerinde incelemişlerdir. Bu çalışma nano form ile mikro formu kıyaslayan ender çalışmalardandır. Yazarlar hiçbir konsantrasyonda (**maximum 2.4 ug/ml**) 72 saat boyunca mitokondri fonksiyonları üzerine herhangi bir toksik etki saptamamışlardır (Hussain ve arkadaşları da aynı sonucu bulmuştur). Bu değerler, pek çok in vitro deneyin kullandığı dozun çok altındadır. Bu kadar düşük doz kullanmak nano gümüş kaplamalı implantların zararsız dozunu bulmakta ya da zararlı olup olmayacağını ortaya koymakta önemli olsa da, risk analizi hesaplamaları için uygun değildir. Ayrıca GSH seviyesini tek bir zaman noktasında ölçmek de yanlıştır. Çünkü süreç “zaman bağımlı”dır ve ilerleyen zamanlarda yapılacak GSH ölçümleri normale dönüşü gösterebilirdi. Ayrıca 72 saatlik zaman da bir miktar uzundur ve muhtemelen ilk 24-48 saatlik zaman diliminde olanları kaçırmıştır.

Arora ve ark (8) 7-20 nanometre boyutundaki gümüş parçacıklarını fare fibroblastları ve karaciğer hücreleri üzerinde denemişlerdir. 24 saat boyunca gümüşe maruz bıraktıkları fibroblast hücrelerinde IC₅₀ değerini (yani hücrelerin yarısını inhibe eden doz) 61 ug/ml ve karaciğer hücrelerinde 449 ug/ml olarak belirlemişlerdir. Ancak, öncesinde, 25 ug/ml ve 100ug/ml dozundaki gümüşün hücrelerde her hangi bir morfolojik veya fonksiyonel sorun yaratmadığını gösterişlerdir. IC₅₀ dozu belirlendikten sonra kendi ifadeleri ile bir meydan okuma yapmışlar ve bu IC₅₀ dozunun yarısı ile çalışmayı tekrarlamışlardır. Bu çalışma sonucunda mitokondri ve sitoplazmada siyah elektron dens agregatlar saptamışlardır. Bu agregatların içeriği analiz edilmemiş ancak yazarlar bunların gümüş nano parçacıklar olduğunu beyan etmişlerdir. Aynı dozda (IC₅₀ dozunun yarı dozunda) gümüş nano parçacıklar primer fibroblastlarda koruyucu etki göstermiş, GSH seviyelerinde artış ve lipid peroksidasyonunda azalma sağlamıştır. Hepatositlerde de artmış anti oksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri saptanmıştır. Düşük doz oksidatif stres koruyucu mekanizmaları aktive ediyor gibi görünürken, fazla oksidatif stres pro-inflamatuar yanıtta artışla sonuçlanmakta gibi görünmektedir. Çalışmanın bir başka aşamasında, her iki hücre grubunda da nekroz 8 hücre ölümü) yapan dozu belirlemişlerdir. Bu doz fibroblastlar için 100ug/ml ve karaciğer hücreleri için 500 ug/ml olarak ölçülmüştür. İlginç olan bulgu ise, apoptoz (programlı hücre ölümü-hücre intiharı) için gereken dozun, nekroz yapan dozdan çok daha düşük olmasıdır. Apoptoz dozu fibroblast ve karaciğer hücreleri için sırası ile 3.12 ug/ml ve 12.5 ug/ml olarak bulunmuştur. Çalışmada yüksek doz gümüş kullanılmamıştır. Aslında göreceli olarak düşük konsantrasyonlardaki gümüşün (fibroblastlarda 3.12 ug/ml, hepatositlerde 12.5 ug/ml) pro apoptotik sinyal enzimi kaspaz-3'ü aktivite edebildiği söylenmektedir. Arora ve ekibi, tıbbi uygulamalar için kullanılabilecek topikal kremlerin (20 ug/g) güvenli olduğunu belirtmektedir. Bu dozlarda, karaciğerde zararlı etkiden çok faydalı etkiler olacağını da dile getirmektedirler. Ne var ki, çalışmaları incelendiğinde, bu dozu nasıl hesapladıkları anlaşılamamaktadır. Arora ve ekibinin ifadesine göre, hücreler gümüşe maruz kaldığında oksidatif stres yaşanmaktadır ve bu stres yeterince fazla olduğunda hücre ölümü (nekroz) gelişmektedir. IC₅₀ değerinde gelindiğinde ise yine hücrelerin en az yarısı ölmektedir ancak bu sefer ölüm şekli nekroz değil programlanmış hücre ölümü

olarak bilinen apoptoz ile olmaktadır. İşte bu sebeple, IC50 değerinin yarısı ile çalışmayı tekrarlamışlar ve hücrelerin strese girmelerini sağlamışlardır ve görmüşlerdir ki, bu seviyedeki hücresel stres, hücrelerde hiçbir şekilde nekroz veya apoptoz şeklinde bir ölümle sonuçlanmamaktadır. Aksine, koruyucu mekanizmaları aktive ederek zarar yerine fayda sağlamaktadır. Bu koruyucu doz, fibroblastlar için 3.12 ug/ml ve karaciğer hücreleri için 12.5 ug/ml olarak belirlenmiştir. Yine kendi ifadelerine göre, benzer çalışmalar hamster böbrek hücrelerinde ve insan kalın barsak kanseri hücrelerinde de yapılmış ve ancak 44ug/ml dozun üzerine çıkıldığında hücre ölümü saptanmıştır. Çalışmacılar, ayrıca, 2008 yılında yaptıkları ve bu raporda daha önce bahsettiğimiz kendi çalışmalarına atıfta bulunmuşlardır. Bahsi geçen 2008 çalışmalarında, sekonder (ikincil – yani fibroblastların kanserli türevlerini) hücreleri kullanmışlardır. Bu çalışmada ise aynı hücrelerin primer halini, yani farelerden çıkarılmış normal hücreleri kullanmışlardır. Ve görmüşlerdir ki, primer hücreler, kanserli hücelere göre gümüşün zararlı etkilerinden kaçmayı daha iyi başarmaktadırlar. Rakamlarla konuşmak gerekir ise, fibroblast hücrelerinin sağlıklı olanlarını öldüren gümüş dozu 61 ug/ml iken aynı hücre türlerinin kanserli hallerini öldüren gümüş dozu 10.6 ug/ml olarak ölçülmüştür. Aslında bu bilgiler, bir taraftan gümüşün insan sağlığında güvenli kullanımı için aradığımız eşik değerleri bize sağladığı için önemli iken, diğer taraftan da sağlıklı hücrelerin, kanserli hücelere göre gümüşe daha dayanıklı olduğunu söylemesi bakımından daha da değerli hale gelmektedir. Bu gün fayda-zarar dengesi tartışılan nano gümüş, çok belli ki ileride kanser tedavisinde kullanılabilecektir.

Kesin olan bilgi, gümüşün karaciğer hücrelerinde oksidatif stresi artırarak toksik etkilere aracılık ettiğidir ancak bu durum kesinlikle doz bağımlıdır. Düşük dozlarda koruyucu antioksidan prosesler aktive olurken yüksek dozlarda apoptoz ve nekroza kadar gidebilen hücresel olaylar zincirini tetiklemektedirler. Yine dozun nano partikül toksisitesindeki önemi ortaya çıkmaktadır. Daha sonraki çalışmaların koruyucu etkiyi de ortaya koymak adına çok daha düşük dozlarda yapılması gerekebilir.

Bu raporun birincil amacı, nano gümüşün her hangi bir toksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi ve eğer var ise bu etkinin ne ölçüde ve ne dozda meydana

geldiğinin açıklığa kavuşturulmasıdır. Bunun ortaya konulabilmesi için ise öncelikle nano gümüşün insan veya hayvan vücuduna girdiğinde ne yaptığının ve bunu nasıl yaptığının ortaya konulması, yani gümüşün farmakokinetiğinin ve farmakodinamiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Geçmişte gümüş, kronik yaraların ve yanıkların tedavisinde kullanılmıştır. 1940’larda penisilin kullanıma geçmesinden sonra gümüşe olan ilgi oldukça azalmıştır (32) 1960’larda, %0.5 gümüş nitratın yanık tedavisinde kullanmaya başlanması ile gümüş tekrar sahneye çıkmıştır. Çalışmalara göre bu solüsyon epidermal proliferasyonu etkilememekte ancak S.aureus, P.aeruginosa ve E.coli üzerinde oldukça etkiliydi. (17). 1968’de gümüş nitrat, sülfonamid ile kombine edildi ve gümüş sülfadiazin krem bulundu. Bu ürün, sahip olduğu geniş antibakteriyel özelliği sebebi ile yanıklarda hala kullanılmaktadır. Gümüş sülfadiazin, başta E.coli, S.aureus, Klebsiella sp., Pseudomonas sp olmak üzere pek çok bakteriye karşı etkilidir. Aynı zamanda kısmen anti fungal ve anti viral etki de gösterir (44). Son zamanlarda, antibiyotik direncinin çok artması nedeni ile klinisyenler özellikle yara örtülerinde ve yanık hastalarında tekrar gümüş içeren ürünlere dönüş yapmış durumdadır.

Çeşitli kimyasallar ve ilaçlar adına çok çeşitli PBPK modeli geliştirilmiş olmasına rağmen nano gümüş ile ilgili pek az çalışma vardır. Bu çalışmalardan bazıları, Takenaka ve arkadaşlarının 2001, Tang ve arkadaşlarının 2008, Lankveld ve arkadaşlarının 2010, Van der Zande ve arkadaşlarının 2012, Dziendzikowska ve arkadaşlarının 2012 yılında sıçanlar üzerinde, Ahamed ve arkadaşlarının 2010 yılında zebra balıkları üzerinde, Xue ve arkadaşlarının 2012 yılında fareler üzerinde ve Lee ve arkadaşlarının 2013 yılında tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmalardır. Bu tez ise sayısı bu kadar az olan nano gümüş çalışmasına ek bilgi sağlamak adına yapılmıştır.

Daha önce altın üzerine yapılan çalışmalar da gümüşe üzerine yapılmış bu çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir ve potansiyel olarak gümüş nano parçacıkları gibi uygulama sahasından vücuda geçerek dokularda biriktiğini göstermiştir. Semler-Behnke ve ark (117), 1.4 nm ve 18 nm boyutundaki iki farklı nano altını işaretleyerek sıçanlara intratrakeal olarak vermişler ve 18 nm boyundaki altının)

99,8'inin akciğerde kaldığını ancak 1.4 nm altının akciğerde kalan kısmının %91.5 olduğunu ve kalan %8.5'luk kısmın kan ve karaciğer dahil pek çok ikincil hedef dokuda biriktiğini saptamışlardır. Böylelikle daha küçük parçacıkların akciğerdeki hava-kan bariyerini geçebildiğini göstermişlerdir.

Gümüş nano partiküller üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmaların büyük bir çoğunluğu, dağılım için ilk seçilen organın karaciğer olduğunu göstermektedir. Bunu dalak ve böbrek izlemektedir. Oral, intravenöz, subkutan veya inhalasyon yoluyla verilmesi durumu değiştirmemektedir.

Ahamed ve arkadaşlarının zebra balıkları ile yaptığı çalışmaların, genotoksisite açısından insanlara yansıtılabilecek sonuçlar verdiği kabul edilmektedir. Çünkü bu balıkların genetik yapısı insanın genetik yapısına çok yakındır ve insanla benzer genler taşımaktadır. Genetik çalışmalarda zebra balığı modeli bu sebeple artık kabul görmüş bir modeldir. Araştırmacılar çalışmalarında 30 mg/L, 60 mg/L ve 120 mg/L yani 30, 60 ve 120ppm dozlar kullanmışlardır. Bu çalışma (161) incelendiğinde balıklar için ölümcül dozun 250 ppm olduğu göze çarpmaktadır. 30 ppm gümüş kullanılan grupta önemsiz bir takım bozulmalar saptanmış ama 60 ve 120 ppm nano gümüş kullanılan gruplarda ciddi boyutta genetik değişiklikler belirlenmiştir. 30 mg/L gümüşe maruz bırakılan deneklerin karaciğerlerinde 0.29 ng/mg (**290 ppb**) gümüşe rastlanırken, 120 ppm (120 mg/L) gümüşe maruz bırakılan deneklerin karaciğerinde 2.4 ng/mg (**2.4 ppm**) gümüşe rastlanılmıştır. Buradan anlaşılabileceği üzere kullanılan doz 4 kat arttığında, dokuda biriken doz 4 kat değil 8 kat artmıştır. Bu durum, gümüşün dokulardaki birikiminin dozla doğru orantılı olarak arttığını doğrularken bu artışın lineer değil parabolik bir artış olduğunu göstermektedir. 30 ppm dozunda bir maruziyet sonrasında dokuda biriken gümüş miktarının 0.29 ppm (yaklaşık 0.3 ppm) olması, alınan gümüşün sadece %1'inin karaciğerde biriktiğini göstermektedir ve bu orandaki gümüş karaciğer için toksik değildir.

Asharani ve arkadaşlarına (160) ait bir çalışmada 5-100ppm arası doz kullanılmış ve bu yüksek dozlarda zebra balığında embriyo gelişim kusurları ve artmış embriyo ölümü saptanmıştır. **5 ppm** nano gümüş kullanılan grupta ılımlı sayılabilecek düzeyde anomaliler saptanırken, **25 ppm** ve sonrasında artmış embriyo ölümü saptanmıştır. Sonuçlar ışığında bu çalışmanın 5 ppm'den daha düşük dozlarla tekrar

yapılması önerilmektedir. Çünkü bu çalışma, mevcut hali ile 5 ppm'lik dozun toksik olmadığını iddia edememekte, sadece dolaylı yoldan bu dozun (5 ppm) toksik etkinin başladığı doz olduğunu ima etmektedir.

Lankveld ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları farmakokinetik çalışma, aslında gümüşün dokulara alınması ve tekrar atılması konularında çok değerli bilgiler vermektedir. Çalışmaları, özellikle fizyoloji temelli farmakokinetik modeller (PBPK) oluşturabilmek adına yol göstericidir (81).

Lankveld ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 20, 80 ve 110 nm boyutundaki gümüş parçacıklarını birbirine yakın konsantrasyonlarda kuyruk veninden damar içi olarak vermişlerdir. 20 nm boyutundaki gümüşün mililitresinde 23.8 ug, 80 nm boyutundaki gümüşün mililitresinde 26.4 ug ve 110 nm boyutundaki gümüşün mililitresinde 27.6 ug gümüş bulunmaktadır. Çalışmada tüm gruptaki sıçanlara, 5 gün boyunca günde 1 ml gümüş içeren sıvı enjekte etmişlerdir.

Tek doz gümüş verilmesi ile neler olduğunu anlamak için, enjeksiyon sonrası her gruptan ilk enjeksiyonu takip eden 2., 5., 10, 20, 30. ve 60. dakikalarda kan almışlar ve her gruptan 2 sıçanı öldürerek doku örnekleri almışlardır (beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak ve testis). Kümülatif (birikimsel) dozun hangi organda ne kadar biriktiği, bu birikimin doza mı, parçacık boyutuna mı yoksa organın kendisine mi bağlı olduğunu anlamaya çalışmak için ise geride kalan sıçanlara 5 gün boyunca günlük 1 ml gümüş enjekte etmeye devam etmişler ve bu sıçanlardan 2., 3., 5., 6., 8., 11. ve 17. günlerde 2 şer adedini öldürerek yine kan ve doku örnekleri almışlardır.

3. günde alınan kan örneklerinde 23.8 ug gümüş verilen 20 nm boyutlu gümüş grubunda ilk ölçümde elde edilen kan gümüş değeri 0.2 ppm iken, 26.4 ug gümüş verilen 80 nm boyutlu gümüş durumunda aynı değer 0.3 ppm, 27.6 ug gümüş verilen 110 nm grubunda ise 0.6 ppm olarak ölçülmüş ama 30. dakikada tekrar ölçüm yapmışlar ve tüm grupta kan gümüş değerinin neredeyse 0 ppm olduğu görülmüştür. 5.gün örneklerinde de benzer durum saptanmıştır. Dokuların gümüş içeriğine bakıldığında ise, tek doz gümüş uygulaması sonrasında 20 nm boyutlu parçacıklar karaciğerde birikmiş ve ölçülen değer 0.2 ppm'in altında bulunmuştur. 80 ve 110 nm boyutlu parçacıklar ise, tek doz enjeksiyonu takiben belirgin şekilde

dalakta birikmiş ve ölçülen değer, 110 nm boyutlu parçacıklar için 1.6 ppm'e kadar çıkmıştır.

Tüm organlar için ölçülen en yüksek değerler son enjeksiyonu takiben, 6.günde alınan örneklerde gözlenmiştir. 20 nm grubunda kan gümüş değeri 6. gün 1143 ng, 17.gün ise 0 ng ölçülmüştür. Aynı grupta, en yüksek doku birikimi karaciğerde gözlenmiş olup 6.günde bu değer 10968 ng iken 17. günde aynı değer 1855 ng olarak ölçülmüştür. Vücuda enjekte edilen toplam dozun 6.gün için %11'inin ve 17.gün için ise sadece %2'sinin dokularda kaldığı görülmüştür. 80 nm grubunda kan gümüş değeri 6. gün 684 ng, 17.gün ise 0 ng ölçülmüştür. Bu grupta vücuda enjekte edilen toplam dozun 6.gün için %22'sinin ve 17.gün için ise sadece %12'sinin dokularda kaldığı görülmüştür. 110 nm grubunda ise kan gümüş değeri 6. gün 1016 ng, 17.gün ise 0 ng ölçülmüştür. Bu grupta ise vücuda enjekte edilen toplam dozun 6.gün için %21'inin ve 17.gün için ise sadece %11'inin dokularda kaldığı görülmüştür. Özet olarak damar içi verilen gümüşün kandan hızlıca uzaklaştığı ve 2 hafta gibi bir süre sonunda verilen ilk gümüşün %12 ila %2'sinin vücutta kaldığı görülmüştür. Bu çalışmadan 20 nm boyuttaki gümüş parçacıklarının vücutta daha az birikmekte olduğu ve daha kolay atıldığı çıkarılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın deney kısmında denek olarak Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarından temin edilen 63 adet rat kullanılmıştır.

Çalışma öncesi Ankara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Dosya No: 2014-99, Karar-No: 2015-4-87).

Tüm deney boyunca 36 adet titanyum implant kullanılmıştır. “Sol gel yöntemi” kullanılarak tüm implantların deney kurgusuna uyacak şekilde nano gümüş, nano çinko ve nano bakır ile kaplanması yapılmıştır.

Deney hayvanlarından sakrifikasyon sırasında beyin, karaciğer ve böbrek dokusu alınmış ve analiz edilmiştir. İntrakardiyak yolla 5 cc kan ve intravesikal olarak idrar örneği alınmıştır. Deney süresi boyunca belirlenen her bir sakrifikasyon döneminde, sakrifiye edilen deneklerin iliak arterlerinden 5 cc kan alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi laboratuvarlarına gönderilmiştir. Biyokimya laboratuvarına gönderilen örneklerden karaciğer-böbrek fonksiyonları ve serum elektrolitlerinin incelenmesi, hematoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden sadece tam kan sayımı yapılmıştır.

Akut toksisitenin test edilmesi için 2. günde her gruptan 3'er denek sakrifiye edilerek tarif edilen doku örnekleri alınmıştır.

Subakut toksisitenin belirlenmesi için 30. günde her gruptan 3'er denek sakrifiye edilerek tarif edilen doku örnekleri alınmıştır.

Enjeksiyon kesildikten sonraki zaman diliminde (ilk 30 günden sonra) nekahat döneminin değerlendirilmesi, hasarlanmaların geri dönüşümlü olup olmadığı, geri dönüşümlü ise bu durumun doz bağımlı olup olmadığı ve ağır metal itrahının belirlenmesi için her gruptan geriye kalan 3'er denek 60. gün sakrifiye edilerek aynı şekilde doku örnekleme yapılmıştır. Deney süresi boyunca farklı tarihlerde yapılan sakrifikasyonlardan elde edilen karaciğer, böbrek, beyin örnekleri deney sonuna kadar formaldehit içerisinde fiks edilerek saklanmıştır. Deney sonunda tüm örnekler

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilerek kaplamada kullanılan ağır metallere bağlı doku hasarı olup olmadığı incelenmiştir.

Deneyin 2, 30 ve 60. günü alınan doku örnekleri Ankara Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.B.D. tarafından incelenmiştir. Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı 4µ'luk parafin kesitler ışık mikroskopik olarak incelenmiştir.

Patoloji örnekleme için çıkarılan dokuların bir kısmı %2.5 gluteraldehit içerisinde fikse edilerek bekletilmiştir ve deney sonunda toplu halde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Anatomi Anabilim Dalı'na gönderilerek aynı amaçla elektron mikroskopunda incelenmiştir.

Dokulardaki ağır metal miktarının belirlenmesi amacı ile, deney süresi boyunca farklı tarihlerde yapılan sakrifikasyonlardan elde edilen karaciğer, böbrek, beyin örnekleri önce hassas terazide tartılmış, ağırlıkları not edilmiş, daha sonra ise deney sonuna kadar 2 cc hacmindeki eppendorf tüplerinde ve serum fizyolojik içerisinde dondurularak saklanmıştır ve deney sonunda Aksaray Üniversitesi ICP-MS labortauvarına gönderilmiştir. Gönderilen örneklerden bakır, çinko ve gümüş analizi yapılmıştır. Benzer şekilde, her sakrifikasyon döneminde alınan serum örnekleri ve idrar örnekleri de biyokimya tüplerinde saklanılarak aynı tarihte aynı laboratuara gönderilmiş ve yine ağır metal analizi yapılmıştır.

Çalışmada toplam 7 grup oluşturulmuştur. Her grupta toplam 9 denek bulunmaktadır. Kontrol grubundaki ratlara deney boyunca her hangi bir nano metal enjeksiyonu yapılmamıştır. Diğer gruplara yapılan enjeksiyonların getirebileceği stres faktörünü ekarte edebilmek adına sadece günlük 1 cc intraperitoneal serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup I deki ratlara deneyin 0. Günü intraperitoneal olarak gümüş kaplamalı implantlar yerleştirilmiştir. Her bir denek için toplamda 50 nanograma eşdeğer gümüş maruziyeti vardır. Bu gruba ilk 30 gün 1cc SF intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Ardından 2. gün 3 adet rat sakrifiye edilerek beyin, böbrek ve karaciğer dokuları alınmıştır. Sakrifikasyon sırasında kan ve idrar örneği alınmıştır. Bu grupta, geriye kalan 6 rat için 30. Güne kadar her gün 1 cc SF periton içerisine enjekte

edilmiştir. 30. Gün 3 adet rat daha sakrifiye edilerek doku, kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Geriye kalan son 3 rat ise 60. Gün sakrifiye edilmiştir.

Grup II deki ratlara deneyin ilk gününden 30. Güne kadar 1cc intraperitoneal gümüş enjeksiyonu yapılmıştır. İlk 30 gün boyunca her gün 5µgr (5000 ng) gümüş enjekte edilen ratlar 3'erli gruplar halinde 2., 30. ve 60. günlerde sakrifiye edilmiştir ve gerekli örnekler alınmıştır.

Grup III'teki ratlara deneyin ilk gününden 30. güne kadar intraperitoneal gümüş enjeksiyonu yapılmıştır. Bu süre boyunca, her gün 50µgr (50.000 ng) gümüş enjekte edilen ratlar 3'erli gruplar halinde 2., 30. Ve 60. Gün sakrifiye edilmiştir ve gerekli örnekler alınmıştır.

Grup IV teki ratlara deneyin ilk gününden 30. Güne kadar intraperitoneal gümüş enjeksiyonu yapılmıştır. Her gün 250µgr (250.000 ng) gümüş enjekte edilen ratlar 3'erli gruplar halinde 2., 30. Ve 60. Gün sakrifiye edilmiştir ve gerekli örnekler alınmıştır.

Grup V teki ratlara deneyin 0. Günü intraperitoneal olarak 20'şer nanogram gümüş, bakır ve çinko kaplamalı implantlar yerleştirilmiştir. Ardından 2. Gün 3 adet rat sakrifiye edilerek beyin, böbrek ve karaciğer dokuları alınmıştır. Sakrifikasyon sırasında kan ve idrar örneği alınmıştır. Bu gruptaki ratlara 30. Güne kadar her gün 1 cc SF periton içerisine enjekte edilmiştir. 30. Gün 3 adet rat daha sakrifiye edilerek doku, kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Geriye kalan son 3 rat ise 60. Gün sakrifiye edilmiş, yine aynı amaçla aynı örnekler alınmıştır.

Grup VI daki ratlara deneyin ilk gününden 30. Güne kadar intraperitoneal 20'şer µgr gümüş, bakır ve çinko enjeksiyonu yapılmıştır (toplam enjeksiyon hacmi 1 cc). Ratlar 3'erli gruplar halinde 2., 30. ve 60. günlerde sakrifiye edilmiştir ve gerekli örnekler alınmıştır.

Grup IV için planlanan doz 500 µgr olacakken 250 µgr verilmesinin sebebi, enjeksiyon sıvısı hazırlanırken verilebilecek maksimum konsantrasyonunun 250 µgr/1cc olmasıdır. 30 gün boyunca 1 cc enjeksiyon yapılacak olan ratlarda 500 µgr vermek için 2cc enjeksiyon yapılması gerekecekti. 2 cc enjeksiyon günlük olarak

yapılan ratlarda sıvı yüklenmesi, intestinal konjesyon, kalp yetmezliği gibi durumlar oluşturabileceğinden sıvı miktarı 1 cc ile kısıtlanmıştır. Bu nedenle ancak 250 µgr verilebilmiştir. Tablo 5, anlatılan deney kurgusunu toplu halde göstermektedir.

Tablo 5. Çalışma kurgusu, grup bilgileri ve doz tablosu.

Grup Kodu	Grup Bilgisi	Yapılan işlem(ler)	Süre	Kümülatif Doz (2.gün)*	Kümülatif Doz (30.gün)**
K	Kontrol (n=9)	Periton içi serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	0 mg/rat 0 mg/kg 0 ppm	0 mg/rat 0 mg/kg 0 ppm
GI	Gümüş Kaplı implant (n=9)	Periton içi implant yerleştirilmesi (50 nano gram Ag) + Periton içi SF enjeksiyonu	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	50 ng/rat 200ng/kg 0.0002 ppm	50 ng/rat 200ng/kg 0.0002 ppm
GII	Nano gümüş enjeksiyonu (n=9)	Periton içi nano gümüş enjeksiyonu (5ug Ag/gün)	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	10ug/rat 40ug/kg (0.04 ppm)	150ug/rat 600ug/kg 0.6 ppm
GIII	Nano gümüş enjeksiyonu (n=9)	Periton içi nano gümüş enjeksiyonu (50 ug Ag/gün)	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	100ug/rat 400ug/kg 0.4 ppm	1500ug/rat 6000ug/kg 6 ppm
GIV	Nano gümüş enjeksiyonu (n=9)	Periton içi nano gümüş enjeksiyonu (250 ug Ag/gün)	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	500ug/rat 2000ug/kg 2 ppm	7.5mg/rat 30mg/kg 30ppm
GV	Gümüş+Bakır+Çinko Kaplı İmplant (n=9)	Periton içi implant yerleştirilmesi [her bir metal türü için 20 ng (toplam 60 ng)] + Periton içi SF enjeksiyonu	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	60 ng/rat 240ng/kg 0.00024 ppm	60 ng/rat 240ng/kg 0.00024 ppm
GVI	Nano Gümüş+ Nano Bakır+ Nano Çinko enjeksiyonu (n=9)	Periton içi nano gümüş+ nano bakır +nano çinko enjeksiyonu [her bir metal için 2ug/gün (toplam 6 ug/gün)]	İlk 30 gün (günde 1 defa, 1 cc)	12ug/rat 48ug/kg 0.48 ppm	180ug/rat 720ug/kg 0.72ppm

Grup I'in Grup V ile kıyaslanması, her grupta da implant kullanıldığı için daha doğrudur. Grup VI ise kendisine en yakın doz kullanılan Grup II ile kıyaslanmalıdır.

Grup I, Grup II, Grup III ve Grup IV ise, artan gümüş miktarlarına bağlı olarak alınan sonuçların değerlendirilmesi için birbirleri ile kıyaslanmalıdır.

(*) 2.güne ait kümülatif doz sütunudur. İmplant kullanılan gruplarda (GI ve GV) günlük olarak nano metal enjeksiyonu yapılmadığı için, kümülatif doz zaman ile değişmemektedir. Bu sütun, çalışmanın 2.gününde her gruptan 3'er ratın sakrifiye edilmiş olması nedeni ile oluşturulmuştur. Bu sütundaki kümülatif dozlar, 2.gün sakrifiye edilen deneklerin diğer sonuçları ile birlikte yorumlanmalıdır.

(**) 30.güne ait kümülatif doz sütunudur. İmplant kullanılan gruplarda (GI ve GV) günlük olarak nano metal enjeksiyonu yapılmadığı için, kümülatif doz zaman ile değişmemektedir. Bu sütun, çalışmanın 30.gününde her gruptan 3'er ratın sakrifiye edilmiş olması nedeni ile oluşturulmuştur. Bu sütundaki kümülatif dozlar, 30.gün sakrifiye edilen deneklerin diğer sonuçları ile birlikte yorumlanmalıdır.

2. ve 30.günlere ait kümülatif doz sütunlarında her bir grup için 3 ayrı bilgi olduğu görülecektir. mg/rat, ug/rat veya ng/rat ile ifade edilen ilk satırlar, denek başına verilen kümülatif nano metal dozunu ifade etmektedir. mg/kg, ug/kg veya ng/kg olarak verilen ifadeler, denek'in kilogramı başına düşen dozları belirtmektedir (ortalama denek ağırlığı 250 gramdır). ppm şeklindeki ifadeler ise, ortak bir ifade şekli oluşturulması için kullanılmıştır. Gerçekte kg başına kullanılan nano metalin mg olarak oranını ifade etmektedir. Bir başka ifade ile $ppm = mg(nanometal)/kg(rat)$ olarak düşünülmelidir. (Örn. GIV için 2000ug/kg ifadesi, 2 mg/kg ifadesi ile, bu ifade ise 2 ppm ifadesi ile aynıdır)

(Kümülatif doz (60.gün) isimli bir sütun oluşturulmamıştır. Çünkü hiçbir deneğe 30.gün ile 60. gün arasında nano metal enjeksiyonu yapılmamıştır. Bu dönem, nekahat dönemi olarak kurgulanmıştır.)

Bu çalışmanın daha iyi anlaşılabilmesi için ppm, ppb ve ppt terimlerinin ne olduğunun ve g, mg, ug, ng birimlerinin birbirine çevrilmesinin açıklanmasına gerek duyulmuştur:

Ppm: part per million, yani milyonda birlik oranı ifade eder. Bir başka ifade ile 1 litrelik (1000 mg) (suyun özgül ağırlığı yaklaşık olarak 1 kabul edildiğinde) suyun içerisinde bahsi geçen maddeden 1 mili gram (mg) olduğunu anlatır. mg/L, mg/kg veya ng/g aynı oranı ifade eder.

Ppb: part per billion, yani milyarda birlik oranı ifade eder. Bir başka ifade ile 1 litrelik (1000 mg) suyun içerisinde bahsi geçen maddeden 1 nano gram (ng) olduğunu anlatır. ng/L, ng/kg, ug/mL ug/g aynı oranı ifade eder.

Ppt: part per trillion, yani trilyonda birlik oranı ifade eder. Bir başka ifade ile 1 litrelik (1000 mg) suyun içerisinde bahsi geçen maddeden 1 mikro gram (ug) olduğunu anlatır. ug/L ve pg/mL aynı oranı ifade eder. (pg: pikogram)

1kg=1000g=1.000.000mg olduğu için, 1 mg/kg ifadesi 1mg/1000.0000 mg şeklinde de yazılabileceğinden ve ppm terimi “milyonda birlik oran”ı ifade ettiğinden, bu ifade aynı zamanda 1 ppm olarak da yazılabilir.

[1 ug (mikrogram)= 1000 ng(nanogram) ve 1mg=1000 ug(mikrogram)]

4. BULGULAR

Deney sırasında kullanılan toplam 63 adet rat deney öncesi tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi.

Tablo 6. Deney sırasında ölçülen rat ağırlıkları

Grup/Rat (gr)	0.gün	2.gün	30.gün	60.gün
KR1	181	179	212	220
KR2	190	194	200	205
KR3	186	188	215	223
KR4	202	200	190	X
KR5	217	217	220	X
KR6	197	196	237	X
KR7	186	189	X	X
KR8	192	190	X	X
KR9	201	207	X	X
G1R1	198	199	196	202
G1R2	209	211	240	238
G1R3	243	239	Ex	Ex
G1R4	198	195	236	X
G1R5	186	190	223	X
G1R6	200	203	212	X
G1R7	197	197	X	X
G1R8	186	186	X	X
G1R9	190	189	X	X
G2R1	188	191	206	223
G2R2	229	213	242	252
G2R3	207	205	238	241
G2R4	193	193	204	X
G2R5	194	190	221	X
G2R6	235	229	250	X
G2R7	185	189	X	X
G2R8	199	190	X	X
G2R9	228	211	X	X

Tablo 6 Devamı. Deney sırasında ölçülen rat ağırlıkları

Grup/Rat (gr)	0.gün	2.gün	30.gün	60.gün
G3R1	205	203	212	228
G3R2	190	192	190	210
G3R3	216	203	196	209
G3R4	181	179	236	X
G3R5	184	189	230	X
G3R6	188	192	206	X
G3R7	223	225	X	X
G3R8	208	210	X	X
G3R9	216	214	X	X
G4R1	180	180	204	234
G4R2	208	209	200	210
G4R3	208	208	220	218
G4R4	208	212	240	X
G4R5	195	193	223	X
G4R6	191	190	227	X
G4R7	205	205	X	X
G4R8	198	199	X	X
G4R9	228	226	X	X
G5R1	205	203	242	238
G5R2	200	200	221	230
G5R3	185	183	215	227
G5R4	178	180	237	X
G5R5	220	218	224	X
G5R6	222	223	240	X
G5R7	202	205	X	X
G5R8	223	220	X	X
G5R9	206	209	X	X
G6R1	217	215	227	235
G6R2	206	203	199	210
G6R3	252	250	260	254
G6R4	256	252	260	X
G6R5	198	200	213	X
G6R6	216	215	220	X
G6R7	195	195	X	X
G6R8	229	229	X	X
G6R9	243	245	X	X

(K: kontrol, G: grup, R: rat, x: rat sakrifiye edilmiştir.)

Deneye katılan tüm ratlar deneyin 0, 2, 30 ve 60. günlerinde tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Ratların hemen hepsinde deney süresinde kilo alımı olduğu görülmüştür. Bu durum beslenmelerinin iyi olduğu genel sağlık durumlarının bozulmadığı ve katabolik süreçlere girmediklerini düşündürmüştür. Tüm ratlar deney süresince Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarlarında veteriner kontrolünde bakılmıştır. Taze su ve gıda verilmiştir. Ratlar kendi gruplarındaki toplam 9 rat için uygun büyüklükteki kafeslerde bakılmıştır. Her kafes üzerinde grup numarasını gösteren renkli sayılar kullanılmıştır. Ratların ilk 30 gün içerisindeki enjeksiyonları veteriner kontrolünde yapılmıştır.

Ratların sakrifikasyon gününde veteriner eşliğinde intraperitoneal ketamin ile anestezisi yapılmıştır. Operasyon için tespit edilen ratlara flebotomi ile sakrifikasyon yapılmıştır. Bu sırada kan örneği alınmıştır. İntravesikal idrar örneği alınmıştır. Ardından karaciğer ve böbrek dokuları alınmıştır. Foramen magnumdan başlayarak geniş kraniektomi Metz makas ile yapılmıştır. Beyin dokusu örneği alınmıştır. Alınan doku örnekleri tartılarak formaldehit solüsyonu içinde saklanmıştır ve kaydedilmiştir.

4.1. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ

Tablo 7. Ratlardan alınan dokuların histopatolojik incelemesine ait tablo.

	KARACİĞER	BÖBREK	BEYİN/SEREBELLUM
KR1D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR2D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR3D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR4D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR5D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR6D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
KR7D2	NORMAL	YOK	NORMAL
KR8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
KR9D2	NORMAL	KONJESYON	NORMAL
G1R2D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G1R3D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G1R4D30	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G1R5D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G1R6D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G1R7D2	NORMAL	YOK	NORMAL
G1R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G1R9D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL

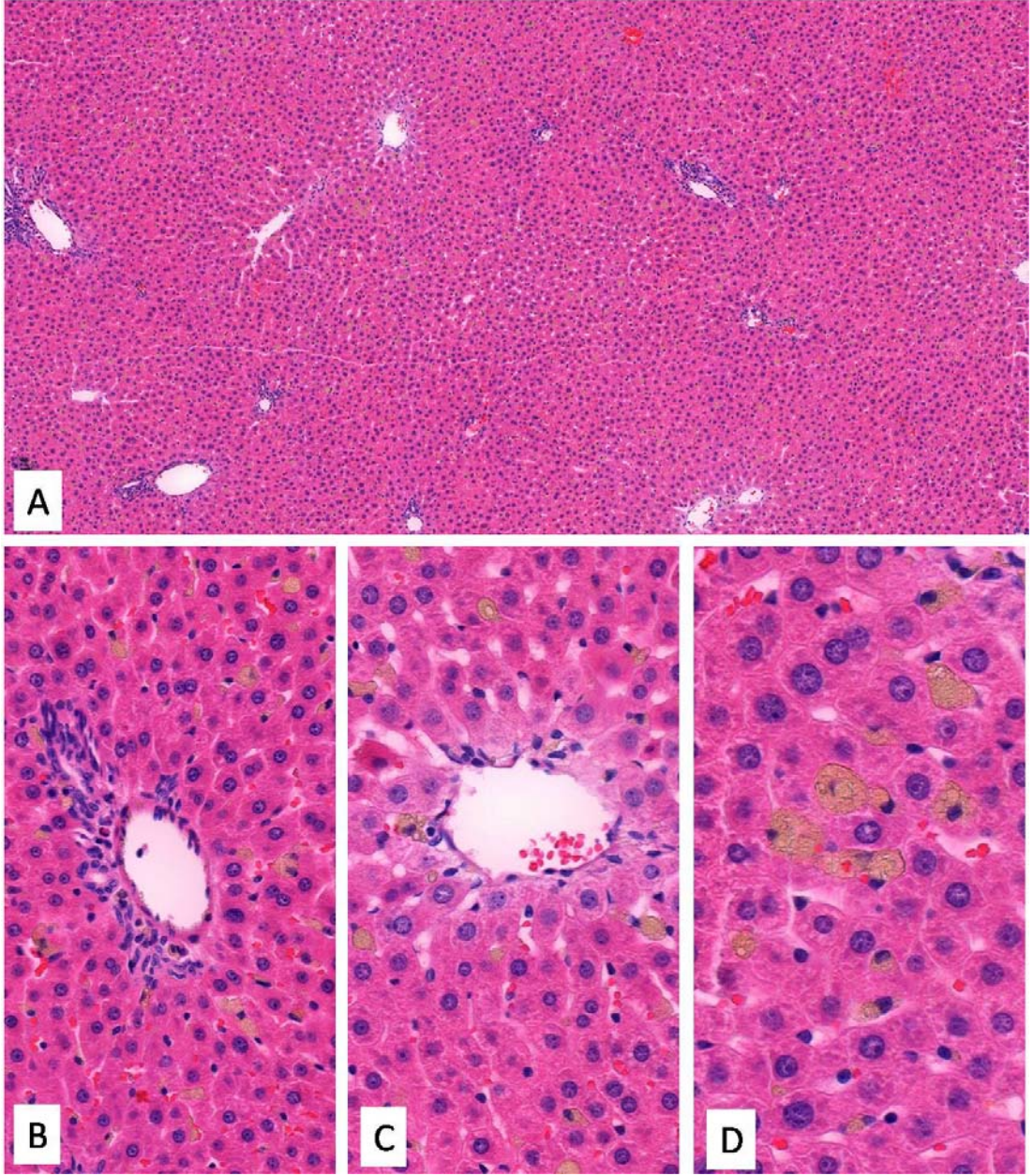
Tablo 7 Devamı: Ratlardan alınan dokuların histopatolojik incelemesine ait tablo.

	KARACİĞER	BÖBREK	BEYİN/SEREBELLUM
G2R2D60	KONJESYON	NORMAL	NORMAL
G2R4D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G2R5D30	NORMAL	KONJESYON	NORMAL
G2R6D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G2R7D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G2R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G2R9D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G3R1D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G3R2D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G3R4D30	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G3R5D30	NORMAL	KONJESYON	NORMAL
G3R6D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G3R7D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G3R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G3R9D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G4R2D60	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G4R3D60	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G4R4D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G4R5D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G4R6D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G4R7D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G4R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G4R9D2	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G5R1D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G5R2D60	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G5R3D60	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G5R4D30	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G5R5D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G5R6D30	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL
G5R7D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G5R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G5R9D2	NORMAL	KONJESYON	NORMAL
G6R1D60	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R2D60	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R3D60	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R4D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R5D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R6D30	PİGMENT BİRİKİMİ	NORMAL	NORMAL
G6R7D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G6R8D2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
G6R9D2	KONJESYON	KONJESYON	NORMAL

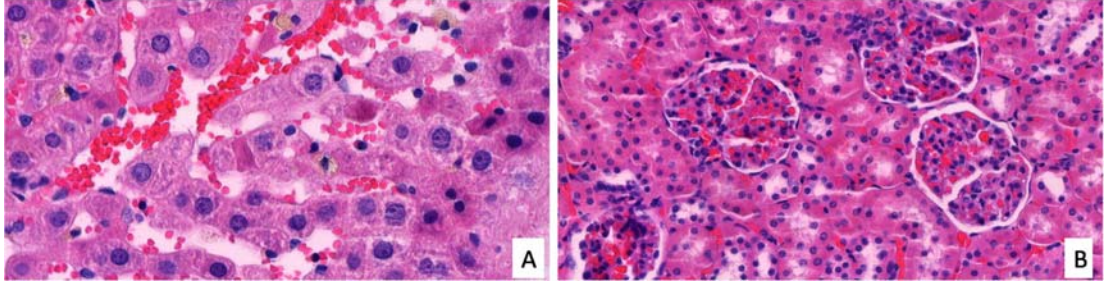
(K: Kontrol, G:grup, R:Rat, D: Gün (Day). Örneğin KR6D30: Kontrol grubundaki 6.ratın 30.gün sakrifikasyonundan alınan örnekleri ifade etmektedir.)

60. günde kurban edilen G4 ve G6 kodlu hayvanların tümünde karaciğer dokusunda disse aralığında, periportal ve perivenüler alanlarda krem renkli pigment yüklü histiyosit birikimi dikkati çekmiştir (Resim 1A-D). Diğer hayvanlarda karaciğer ve böbrek dokularında vasküler konjesyon dışında kayda değer patolojik

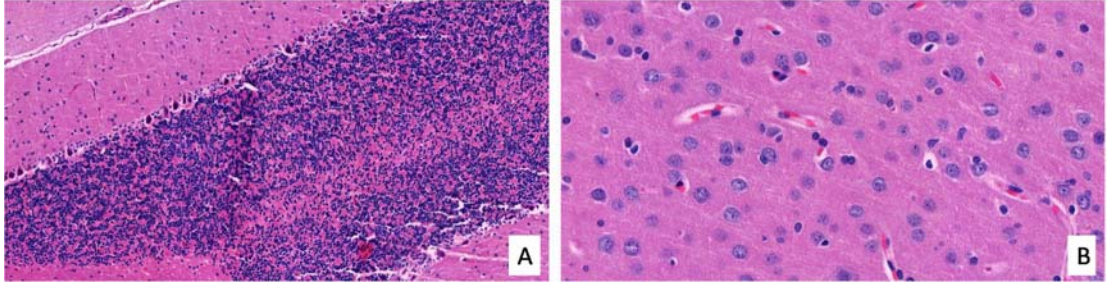
bulguya rastlanmamıştır (Resim 2 A,B). Serebellum/beyin dokuları tüm hayvan gruplarında doğal histomorfolojik görünümde izlenmiştir (Resim 3 A,B).



Resim 1. A-D. Karaciğer dokusunda sırasıyla periportal alan, perivenüler alan ve disse aralığında krem renkli pigment yüklü histiyosit birikimi (H&Ex94, x581, x697, x1003).



Resim 2. A, B. Karaciğer ve böbrek dokularında vasküler konjesyon (H&Ex836, x484).

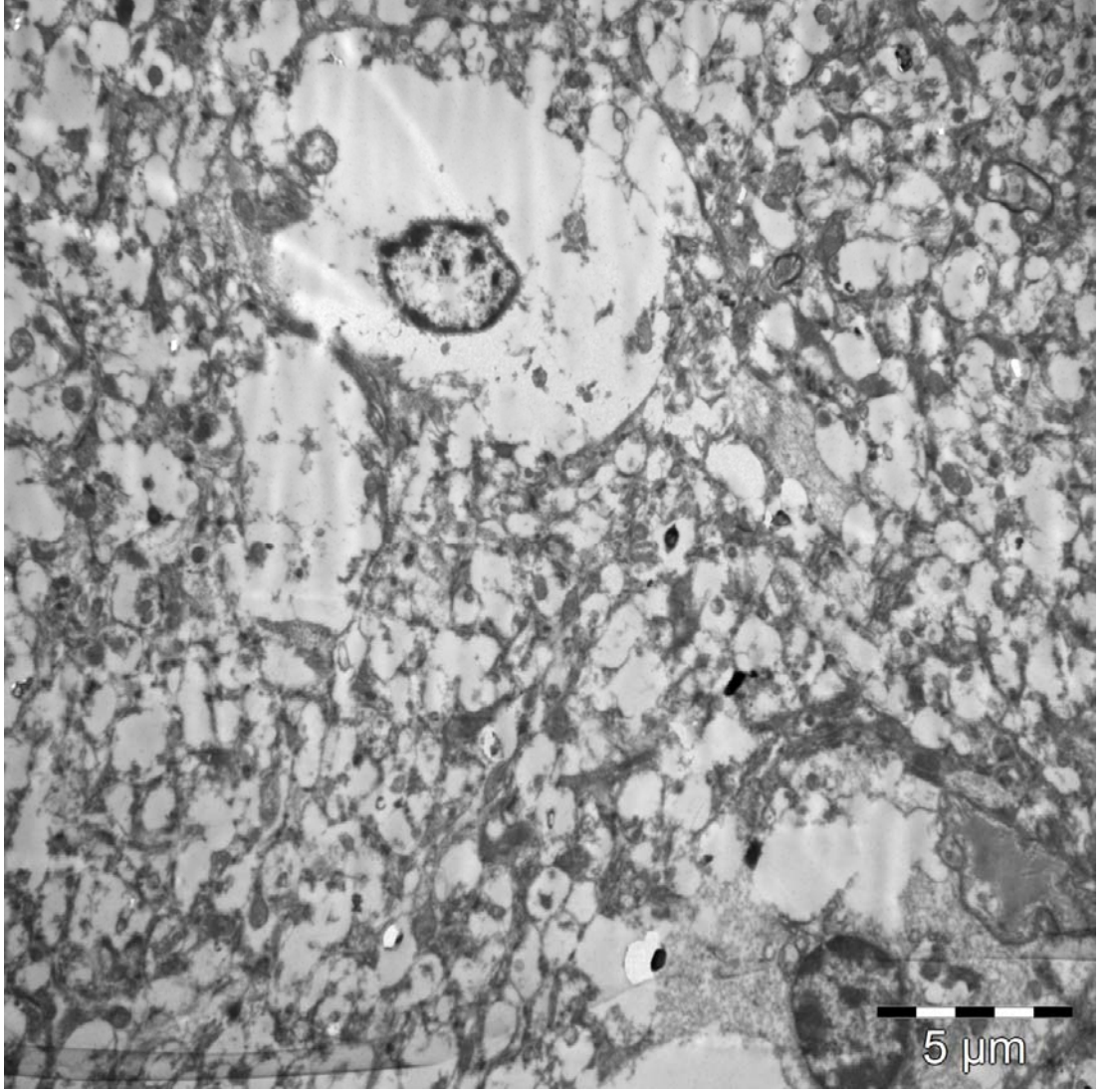


Resim 3. A, B. Normal histopatolojik görünümdeki serebellum/beyin dokuları (H&Ex194, x581).

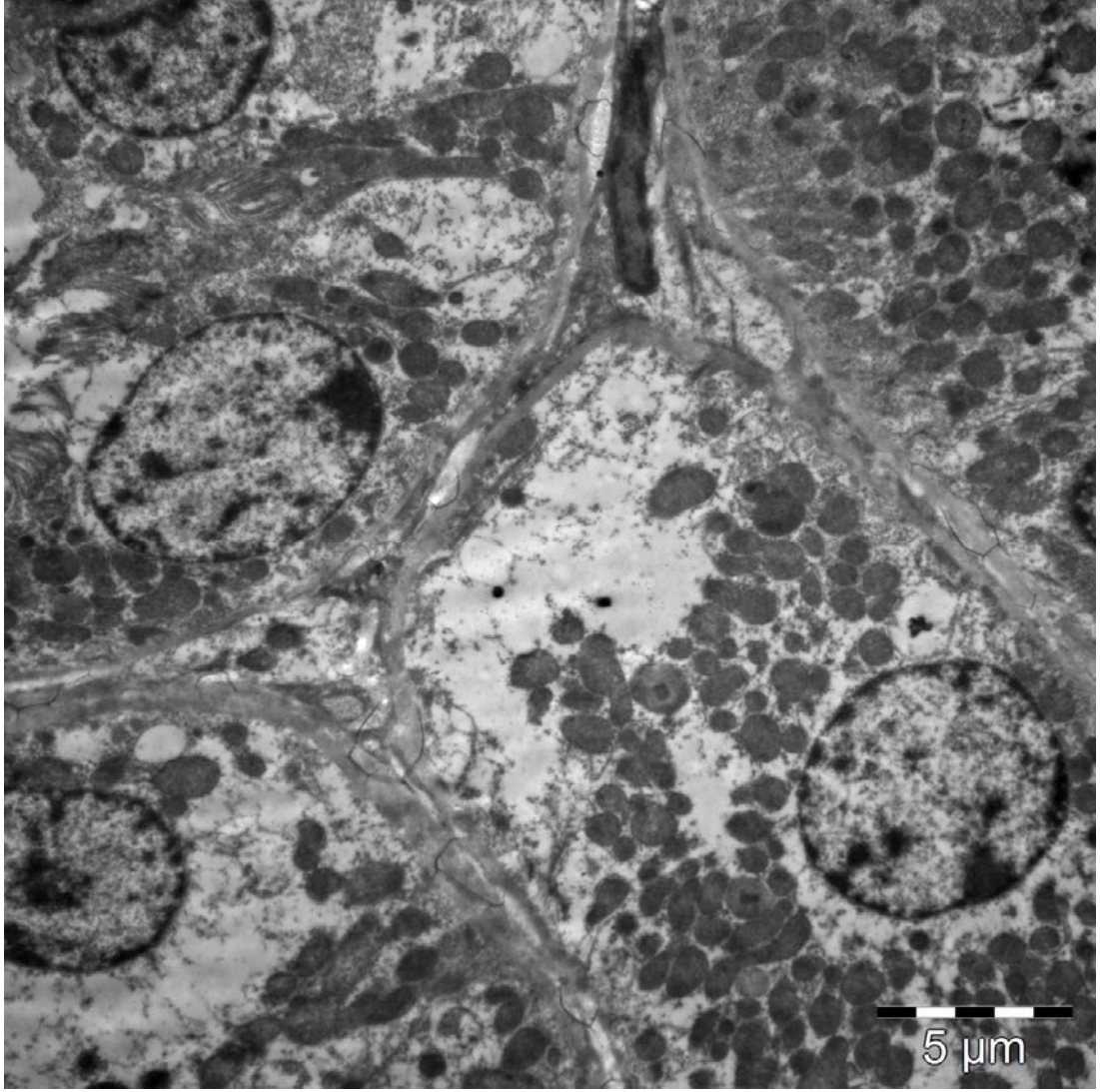
60. günde alınan doku örneklerinin patolojik incelemesi sonucu dokularda toksisite görülmemiş olması, kullanılan antibakteriyel ve antifungal kaplamaların organlarda hasar yaratmadığını desteklemektedir.

4.2. Elektron Mikroskopisi

Deney sırasında ratlardan alınan doku örnekleri Hacettepe Üniversitesi Anatomi Anabilim dalı laboratuvarlarında elektron mikroskopisi ile incelendi. 2., 30. ve 60. gün alınan doku örnekleri yorumlandı. Görüntülerin tamamında orjinalin 5000 katı büyütme sağlandı.

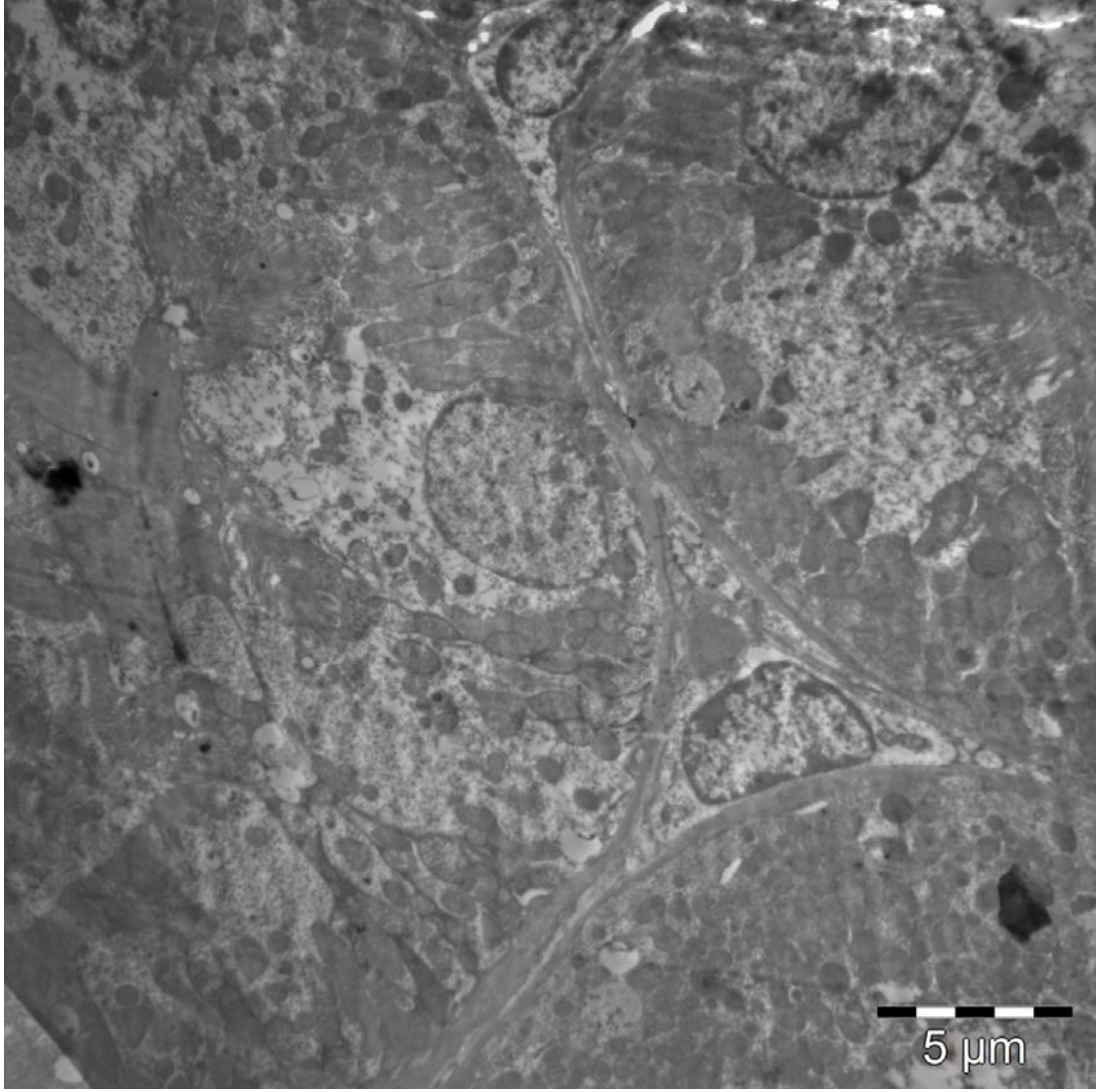


Şekil 1. Elektron mikroskopisinde Grup IV, 2. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D2) alınan beyin dokusunda çekirdek etrafında ödem ve axonal şişme görülmektedir (x5000).

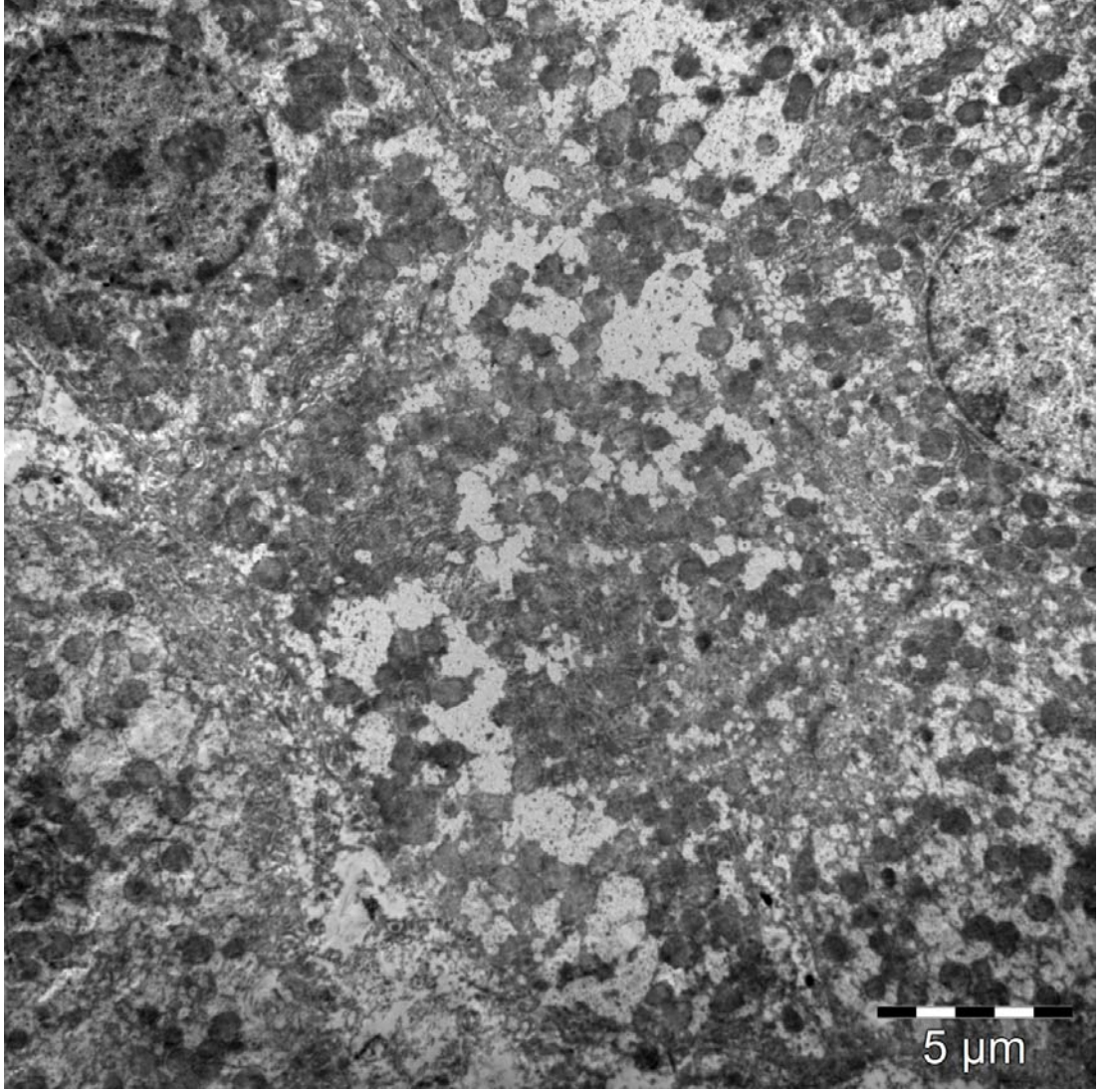


Şekil 2. Elektron mikroskopisinde Grup V, 2. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G5D2) alınan böbrek dokusunda çekirdek çevresinde perinükleer ve mitokondriyal ödem görülmüştür (x5000).

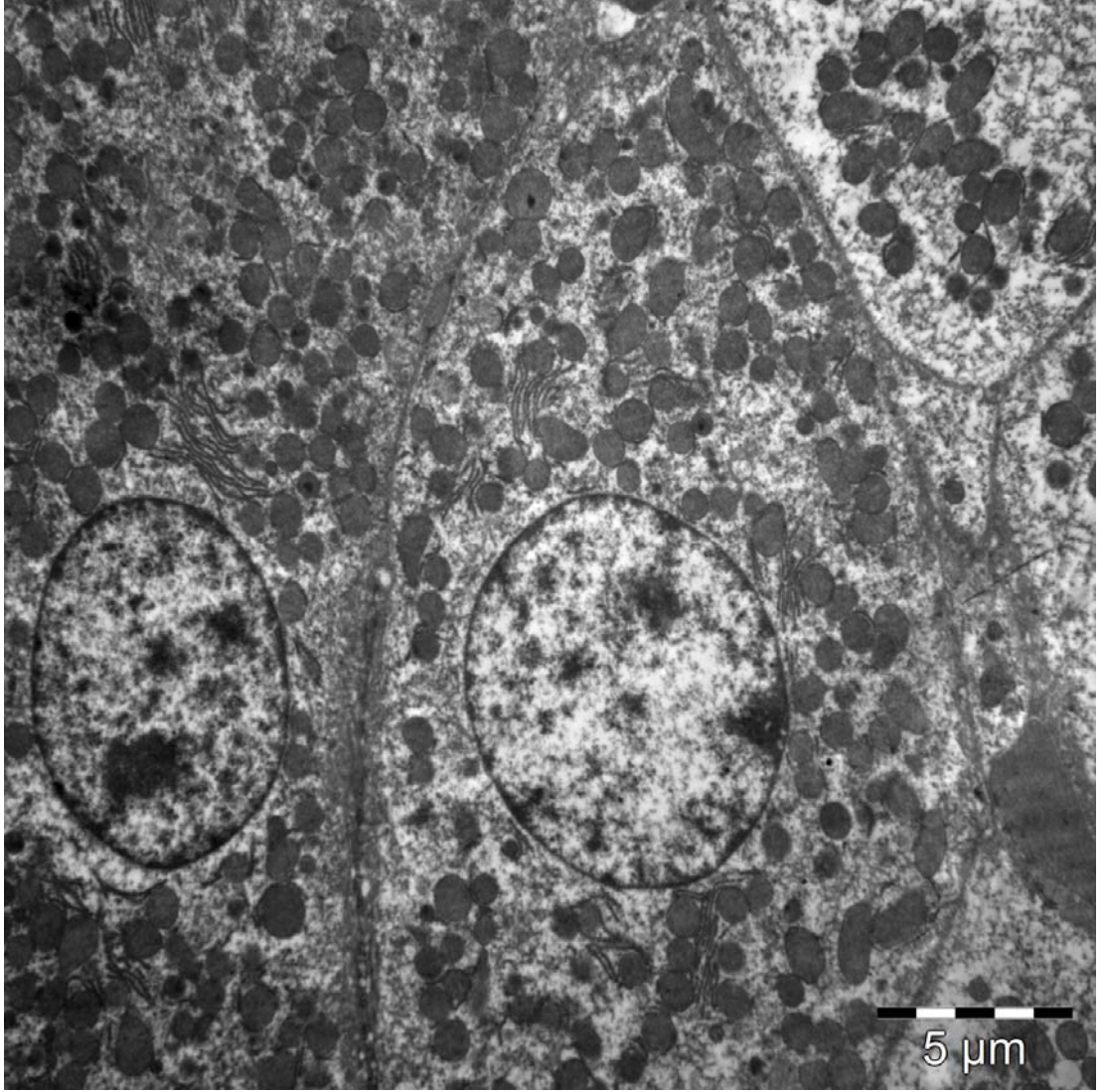
2. günde alınan doku örneklerinde meydana gelen bu doku hasarının verilen antimikrobiyal kaplamalar için kullanılan iyonların etkisine bağlı olduğu ve iyonizan etkiyle doku hasarı oluşturduğu düşünülmüştür.



Şekil 3. Elektron mikroskopisinde Grup IV, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D30) alınan beyin dokusunda doku hasarını gösteren perinükleer ve sitoplazmik ödem görülmektedir (x5000).

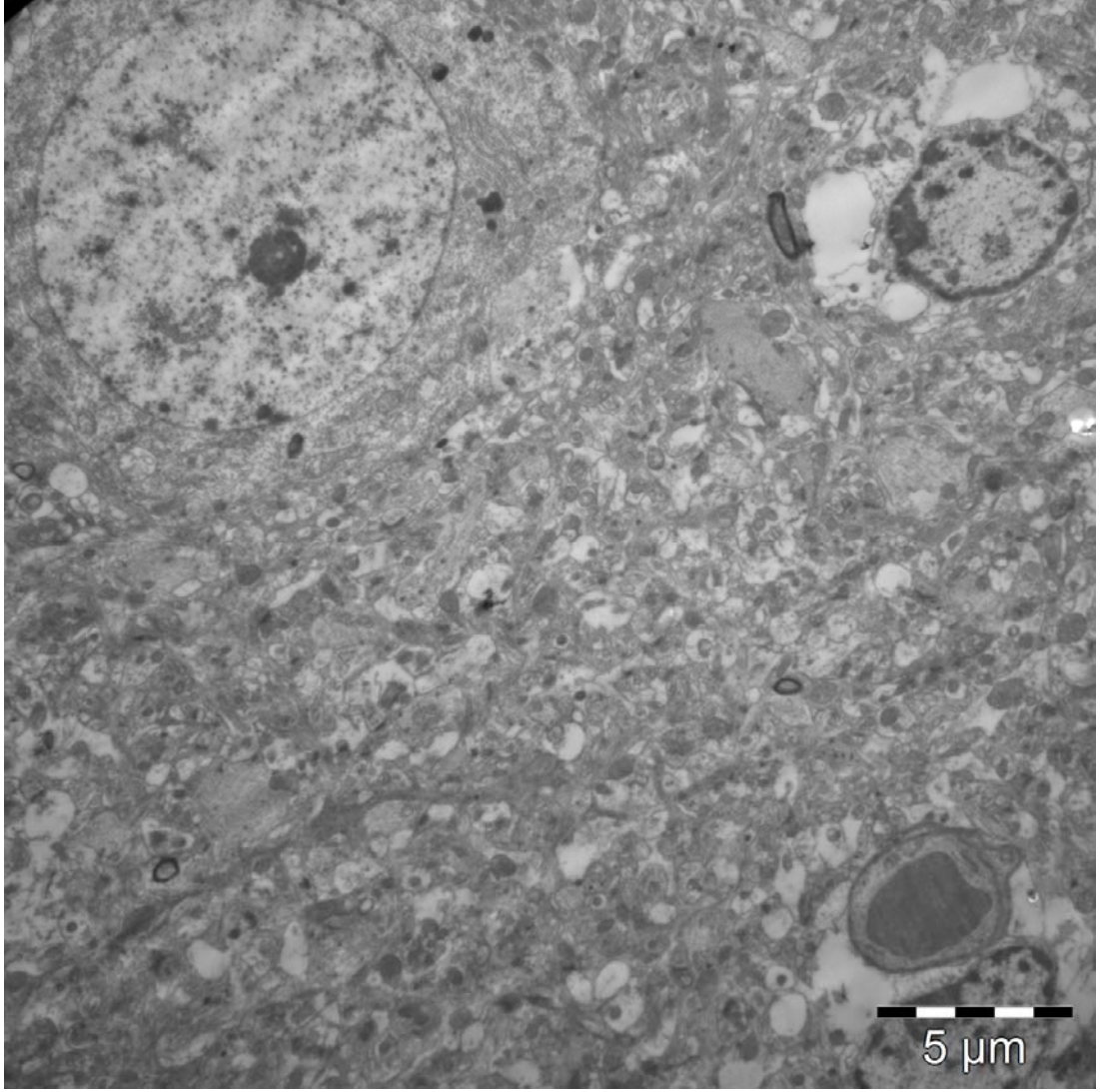


Şekil 4. Elektron mikroskopisinde Grup III, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G3D30) alınan böbrek dokusunda sitoplazma içerisinde vakuollerin geliştiği görülmektedir. Perimitokondriyal ödem az da olsa mevcuttur (x5000).

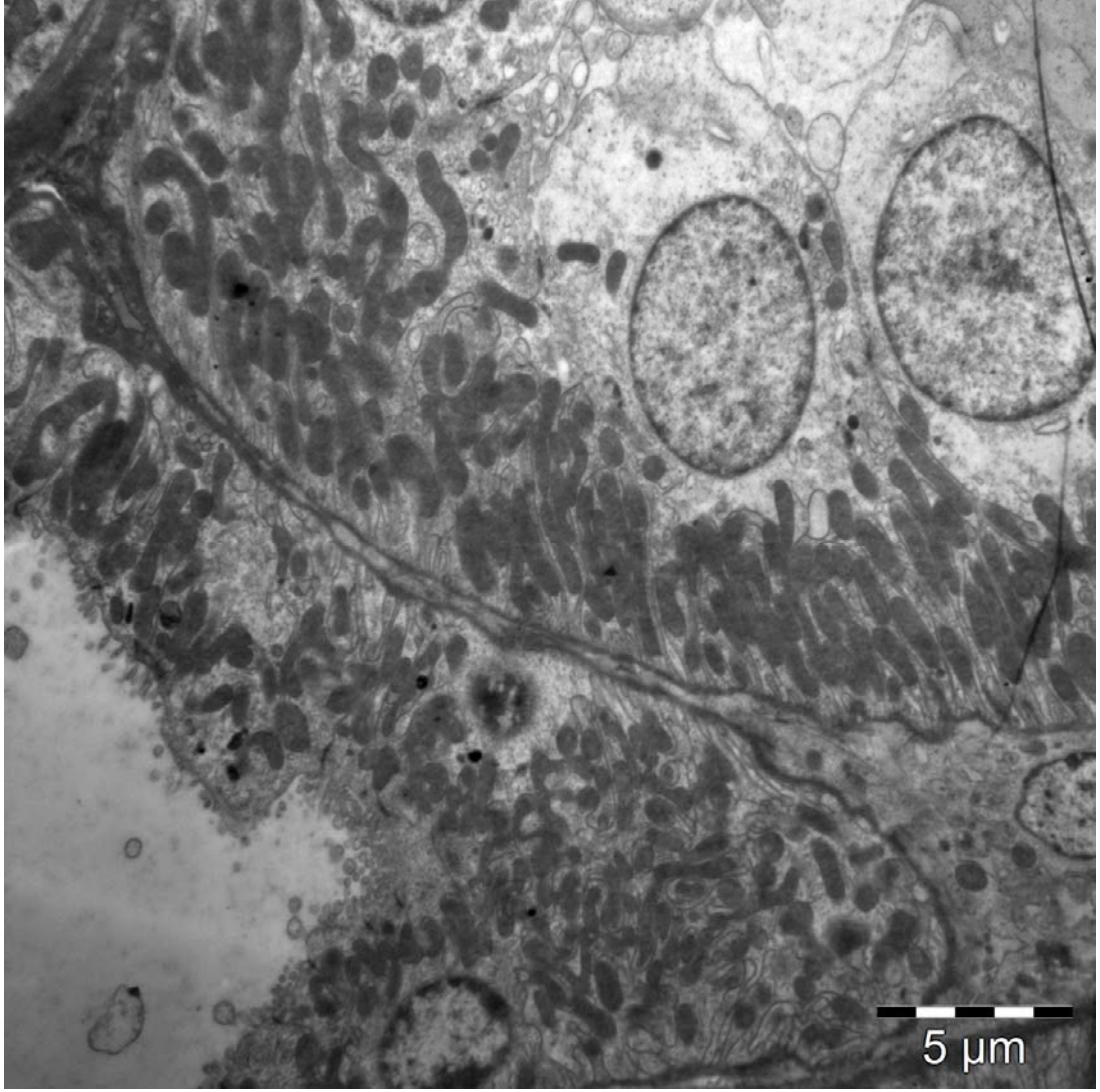


Şekil 5. Elektron mikroskopisinde Grup II, 30. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G2D30) alınan böbrek dokusunda doku hasarının da düzelme başladığı görülmüştür. Perinükleer ödemin azaldığı ve sitoplazmadaki ödemin azaldığı görülmüştür (x5000).

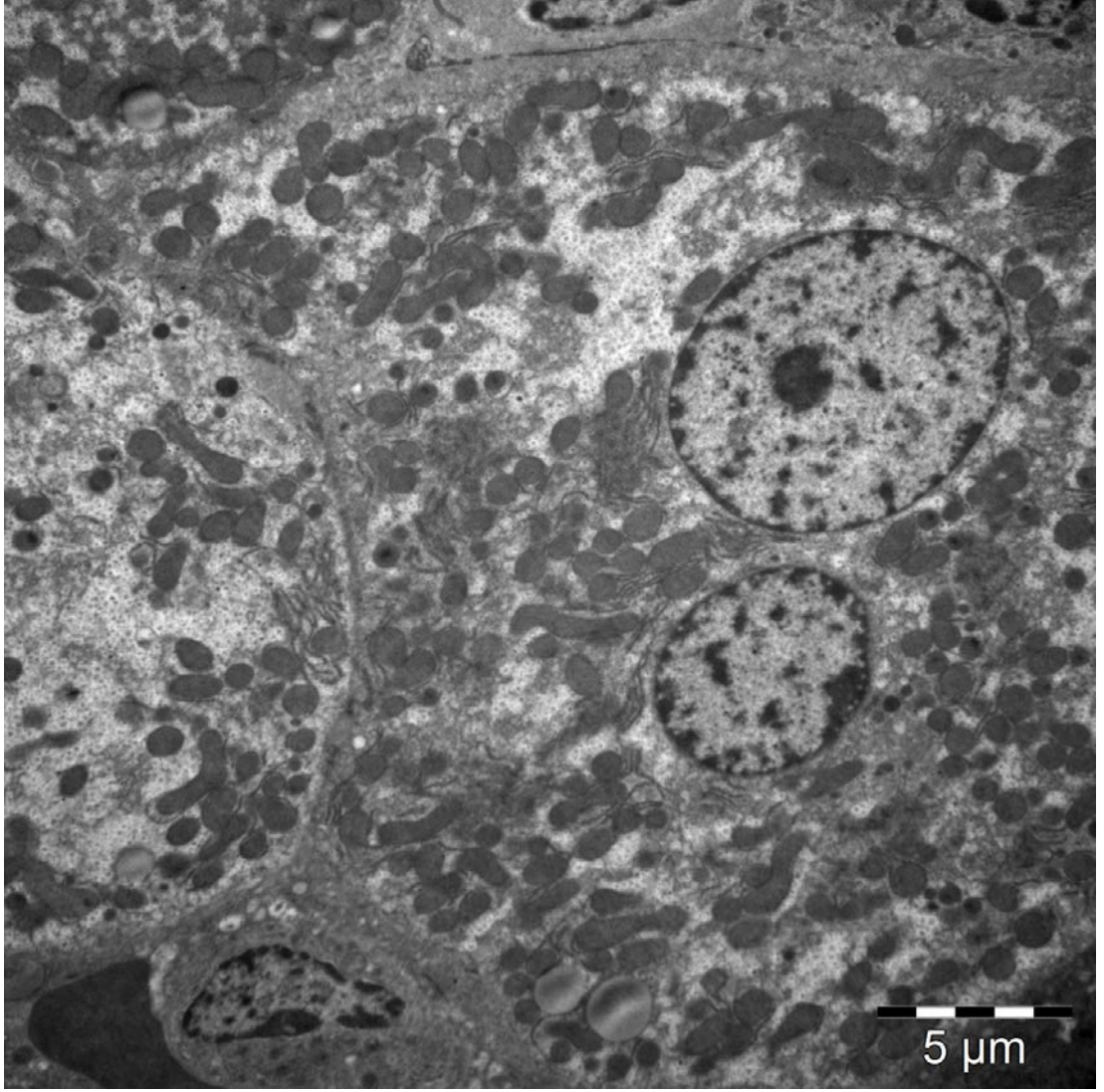
30. günde meydana gelen değişiklikler dokulardaki akut hasarın geri dönüşümlü olduğu ve tamir mekanizmalarının devreye girdiği görülmüştür. Vücuttan itrah edilen iyonlardan geriye kalan dokularda tamir mekanizmalarının devreye girdiği, normale dönülmeye çalışıldığı görülmüştür.



Şekil 6. Elektron mikroskopisinde grup II, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G2D60) alınan beyin dokusunda dokunun tamamen normal beyin dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Yer yer görülen çekirdek etrafındaki vakuollerin geçirilmiş doku hasarı sonrası olduğu düşünülmüştür (x5000).



Şekil 7. Elektron mikroskopisinde Grup IV’te, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G4D60) alınan böbrek dokusunda, tamamen normal böbrek dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Mitokondriyal dizilimin eski düzenine kavuştuğunun saptanması, doku hasarının tamir edildiğini düşündürmüştür (x5000).



Şekil 8. Elektron mikroskopisinde grup VI, 60. Gün sakrifiye edilen ratlardan (G6D60) alınan karaciğer dokusunda dokunun tamamen normal karaciğer dokusuna benzer görünüme kavuştuğu görülmektedir. Mitokondriyal dizilimin eski düzenine kavuştuğunun saptanması, doku hasarının tamir edildiğini düşündürmüştür (x5000).

60. gün sonunda alınan elektron mikroskopisi görüntülemelerinde dokularda meydana gelen hasarın tamir mekanizmaları ile düzeltildiği, vücuda alınan antibakteriyel iyonların itrahi ile eski doku organizasyonlarının sağlandığı görülmüştür. Bu da hasarın geri dönüşümlü olduğunu düşündürmüştür.

4.3. ICP-MS analiz sonuçları

Deneklerden 2, 30 ve 60. Gün alınan doku örneklerinde ICP-MS analiz sonuçları günlere göre incelenerek gruplara bölünerek listelenmiştir. Analizler Aksaray Üniversitesi laboratuvarlarında yapılmıştır.

Tablo 8. 2. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları

Grup		Ağırlık(gr)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	Ag (ppb)
Kontrol	N	14	14	12	9
	Ort.±SS	0.337±0.165	3.057±2.618	12.006±8.290	0.022±0.035
	Ortanca (min-maks)	0.305 (0.090-0.620)	2.280 (0.010-8.574)	11.928 (1.119-26.196)	0.003 (0.000-0.100)
Grup1	N	14	14	12	12
	Ort.±SS	0.375±0.152	2.326±1.398	13.013±8.392	0.021±0.022
	Ortanca (min-maks)	0.325 (0.140-0.640)	2.377 (0.042-4.567)	13.291 (1.769-25.729)	0.016 (0.001-0.080)
Grup2	N	13	13	13	11
	Ort.±SS	0.393±0.167	2.760±1.851	11.447±7.118	0.029±0.063
	Ortanca (min-maks)	0.400 (0.110-0.660)	2.487 (0.083-7.368)	10.700 (0.599-24.565)	0.006 (0.001-0.216)
Grup3	N	15	15	13	13
	Ort.±SS	0.463±0.238	2.627±2.353	11.656±8.525	0.171±0.152
	Ortanca (min-maks)	0.420 (0.080-0.930)	2.179 (0.019-7.493)	11.909 (1.246-26.914)	0.137 (0.005-0.439)
Grup4	N	12	12	8	10
	Ort.±SS	0.364±0.081	2.812±1.933	10.416±8.298	0.289±0.271
	Ortanca (min-maks)	0.360 (0.230-0.510)	2.332 (0.033-6.519)	12.032 (0.516-21.450)	0.245 (0.004-0.940)
Grup5	N	15	13	11	10
	Ort.±SS	0.295±0.133	2.925±2.100	14.979±14.774	0.006±0.008
	Ortanca (min-maks)	0.310 (0.110-0.540)	2.314 (0.143-7.440)	11.268 (0.194-49.269)	0.003 (0.000-0.027)
Grup6	N	15	15	12	6
	Ort.±SS	0.309±0.159	3.244±2.791	20.523±15.642	0.021±0.027
	Ortanca (min-maks)	0.320 (0.009-0.540)	2.186 (0.082-10.278)	16.632 (1.162-55.763)	0.008 (0.002-0.071)
	p değeri	0.115	0.991	0.311	<0.001

2. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları arasında ikili alt gruplara bakıldığında Kontrol-3.Grup ($p=0.028$), Kontrol-4.grup ($p=0.012$), 3.grup-5.grup ($p=0.002$), 4.Grup-5.grup ($p=0.001$) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yaratan gruplardır ($p<0.001$).

Tablo 9. 30. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları

Grup		Ağırlık(gr)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	Ag (ppb)
Kontrol	N	21	21	21	17
	Ort.±SS	0.318±0.147	3.384±3.008	15.727±7.694	0.078±0.143
	Ortanca (min-maks)	0.310 (0.110-0.710)	2.172 (0.592-13.090)	15.345 (3.665-32.103)	0.016 (0.004-0.565)
Grup1	N	14	14	14	4
	Ort.±SS	0.403±0.240	4.582±5.796	17.331±11.997	0.031±0.056
	Ortanca (min-maks)	0.420 (0.020-0.970)	2.985 (0.375-23.030)	15.896 (1.835-51.948)	0.005 (0.000-0.114)
Grup2	N	12	12	10	6
	Ort.±SS	0.415±0.151	3.195±3.223	11.457±5.813	0.016±0.015
	Ortanca (min-maks)	0.390 (0.240-0.740)	2.070 (0.061-9.098)	10.784 (3.716-19.957)	0.010 (0.003-0.040)
Grup3	N	12	12	12	12
	Ort.±SS	0.405±0.136	3.664±3.919	11.079±5.720	0.293±0.305
	Ortanca (min-maks)	0.425 (0.080-0.570)	2.197 (0.122-12.044)	10.833 (2.250-17.854)	0.161 (0.011-1.018)
Grup4	N	12	12	12	12
	Ort.±SS	0.398±0.113	4.817±5.400	10.957±5.737	1.224±1.356
	Ortanca (min-maks)	0.370 (0.220-0.630)	2.636 (0.603-18.574)	10.145 (3.094-17.926)	0.695 (0.067-4.274)
Grup5	N	24	24	24	12
	Ort.±SS	0.355±0.112	3.821±3.994	20.079±32.087	0.068±0.101
	Ortanca (min-maks)	0.345 (0.180-0.690)	2.263 (0.745-16.621)	10.319 (1.223-164.923)	0.030 (0.001-0.293)
Grup6	N	24	24	23	7
	Ort.±SS	0.369±0.108	4.147±5.288	16.893±17.011	0.054±0.055
	Ortanca (min-maks)	0.345 (0.190-0.560)	2.971 (0.018-26.362)	15.025 (3.301-86.571)	0.026 (0.009-0.143)
	p değeri	0.430	0.975	0.524	<0.001

30. gün Ag değerleri için 7 grup arasında ikili alt gruplara bakıldığında Kontrol-4.Grup ($p=0.005$), 1.grup-4.grup ($p=0.008$), 2.grup-4.grup ($p=0.003$), 4.Grup-5.grup ($p=0.012$) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yaratan gruplardır ($p<0.001$).

Tablo 10. 60. gün Ag değerleri için 7 grubun ICP-MS analiz sonuçları

Grup		Ağırlık(gr)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	Ag (ppb)
Kontrol	N	14	13	13	7
	Ort.±SS	0.406±0.205	3.852±3.406	14.660±9.887	0.004±0.003
	Ortanca (min-maks)	0.430 (0.060-0.700)	3.629 (0.127-12.312)	12.313 (3.700-34.100)	0.002 (0.001-0.008)
Grup1	N	14	14	13	7
	Ort.±SS	0.374±0.236	3.026±2.390	12.886±6.709	0.004±0.005
	Ortanca (min-maks)	0.380 (0.040-0.990)	3.232 (0.000-7.739)	15.680 (0.871-23.978)	0.002 (0.000-0.011)
Grup2	N	12	12	12	10
	Ort.±SS	0.383±0.277	3.370±1.706	22.920±15.448	0.007±0.007
	Ortanca (min-maks)	0.320 (0.110-0.980)	3.798 (0.693-5.344)	17.859 (11.784-67.838)	0.006 (0.000-0.021)
Grup3	N	9	9	7	7
	Ort.±SS	0.371±0.212	2.472±2.954	20.258±13.144	0.036±0.040
	Ortanca (min-maks)	0.310 (0.070-0.770)	0.722 (0.013-7.879)	15.354 (5.346-42.820)	0.031 (0.001-0.119)
Grup4	N	13	13	12	12
	Ort.±SS	0.351±0.222	4.126±3.573	22.819±14.397	0.927±1.247
	Ortanca (min-maks)	0.340 (0.050-0.830)	3.304 (0.483-11.513)	17.814 (9.665-60.435)	0.203 (0.004-3.781)
Grup5	N	14	14	13	1
	Ort.±SS	0.391±0.207	2.519±2.090	11.756±7.258	0.004±-
	Ortanca (min-maks)	0.400 (0.090-0.670)	1.728 (0.000-7.484)	10.460 (3.976-24.544)	0.004 (0.004-0.004)
Grup6	N	16	16	15	9
	Ort.±SS	0.434±0.232	2.934±2.745	10.093±6.825	0.028±0.041
	Ortanca (min-maks)	0.380 (0.130-1.010)	1.564 (0.013-7.912)	8.150 (3.327-21.372)	0.010 (0.000-0.114)
	p değeri	0.942	0.660	0.026	0.003

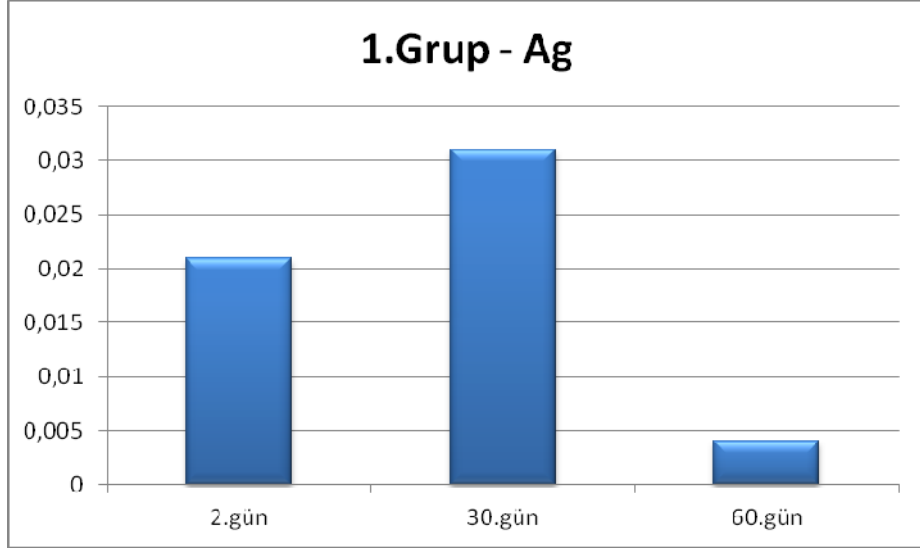
60. gün Ag değerleri için 7 grubun kendi arasındaki ikili alt gruplara bakıldığında Kontrol-4.Grup ($p=0.018$), 1.grup-4.grup ($p=0.008$), 2.grup-4.grup ($p=0.025$) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yaratan gruplardır($p=0.003$).

Datalar incelendiğinde 4.grup, en yüksek doz intraperitoneal nano gümüş verilen gruptur. İmplant grubu olan 1.grubun, implant grubundaki gümüş miktarının 100 katı gümüş kullanılan 2.grubun ve yine implant grubundan 1000 kat fazla gümüş kullanılan 3.grubun kontrol grubuna göre ve birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı gümüş birikimi göstermemesi, ama 4.grup (implant grubunun 5000 katı gümüş kullanılan grup) ile aralarında istatistiksel fark olması, gümüşün dokularda birikme hızının artması veya itrahının azalması için bir eşik değeri olabileceğini düşündürmektedir. Bu tablodaki Ag, Cu ve Zn miktarları, her bir gruba ait her bir denekten alınan tüm örneklerin (beyin, böbrek, karaciğer, kan ve idrar) toplam ilgili metal değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Bu tablo, doku spesifik olarak hazırlanmamıştır. Kontrol grubu dahil ilk 5 gruba (Kontrol, GI, GII, GIII ve GIV) bakır ve çinko verilmemiştir. Ölçülen değerler, deneklerin normal metabolizmalarında bakır ve çinko bulundurmaları sebebiyledir. Bu nedenle de, bu tabloda görülen bakır ve çinko değerleri aslında bakır ve çinkonun normal değerleri adına GV ve GVI için (Cu ve Zn verilen gruplar için) kontrol grubunu oluşturmaktadır.

60. gün Çinko değerleri için 7 grup arasında ikili alt gruplara bakıldığında hiçbir alt grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

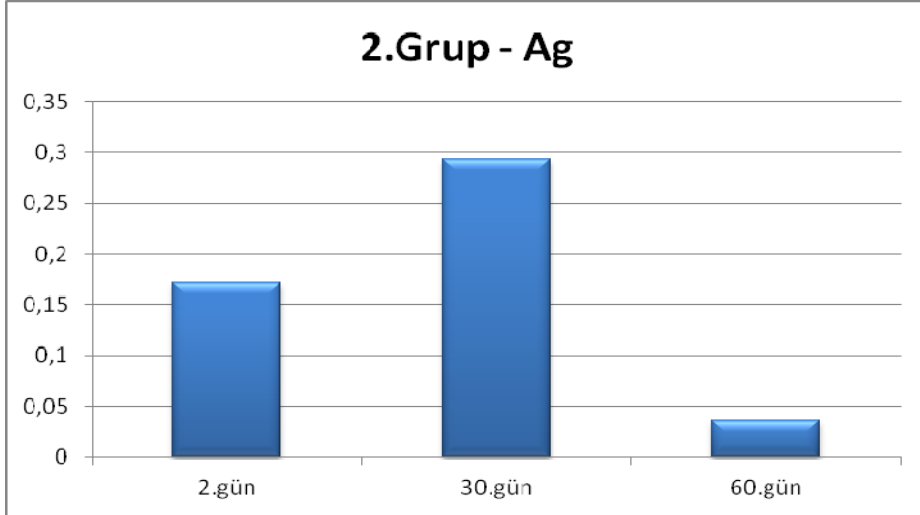
GI (gümüş kaplı implant grubu) için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.029, 0.016, 0.007 olarak bulunmuştur. Burada 2. günden 30. güne ve 30.günden 60.güne dokudaki gümüş miktarı azalış göstermiştir.

GV (bakır-çinko ve gümüş kaplanmış implant grubu) için 2., 30. ve 60. gündeki çinko değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 20.523, 16.893, 10.093 olarak bulunmuştur. Burada 2. Günden 30. Güne ve 30.günden 60.güne dokudaki çinko miktarı azalış göstermiştir.



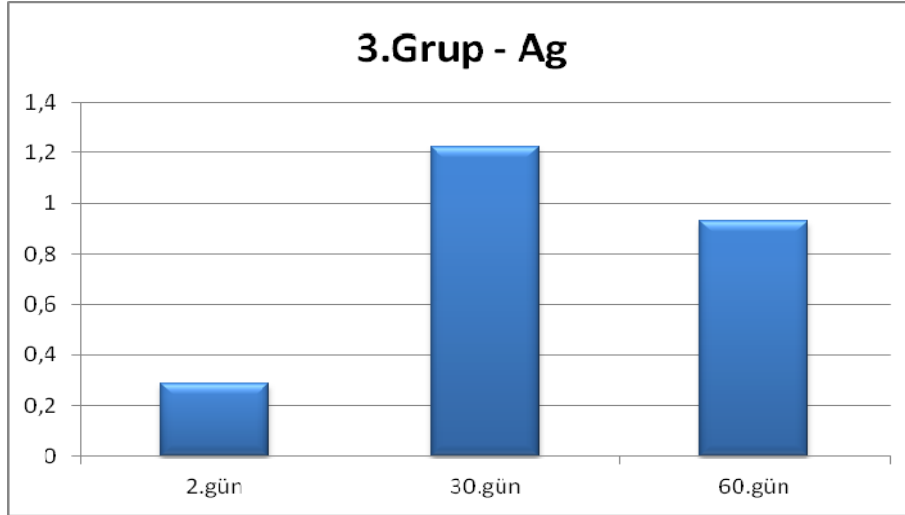
Grafik 1. Grup I'in 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)

1.grup için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.021, 0.031, 0.004 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra dokudaki gümüş miktarı düşmüştür.



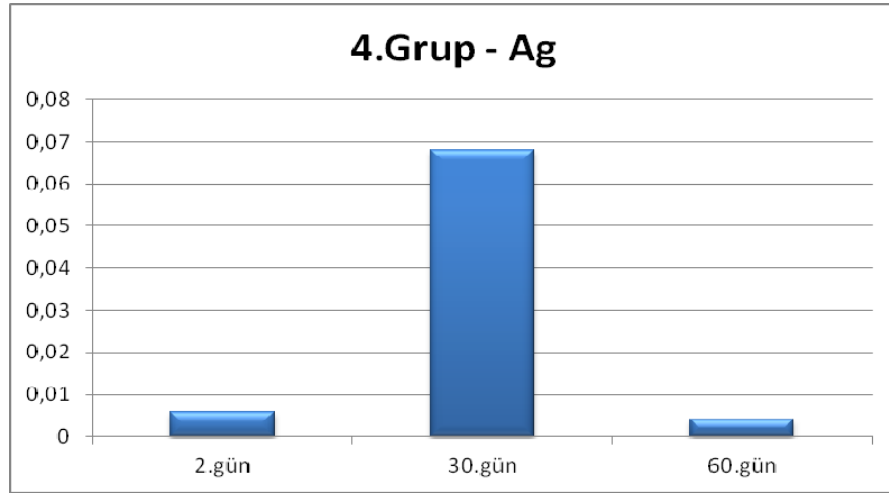
Grafik 2. Grup II'nin 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)

2.grup için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.171 0.293, 0.036 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra gümüş enjeksiyonu kesilince dokudaki gümüş miktarı düşmüştür.



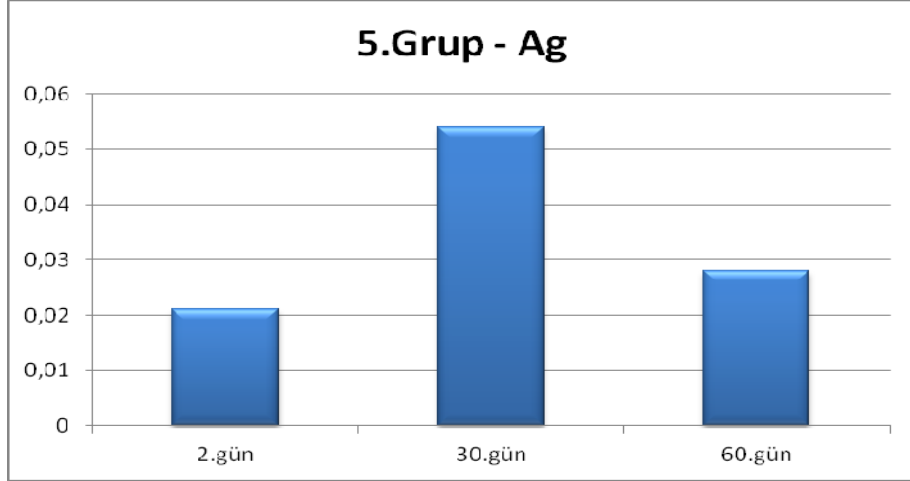
Grafik 3. Grup III'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)

3.grup için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.289, 1.224, 0.927 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra gümüş enjeksiyonu kesilince dokudaki gümüş miktarı düşmüştür.



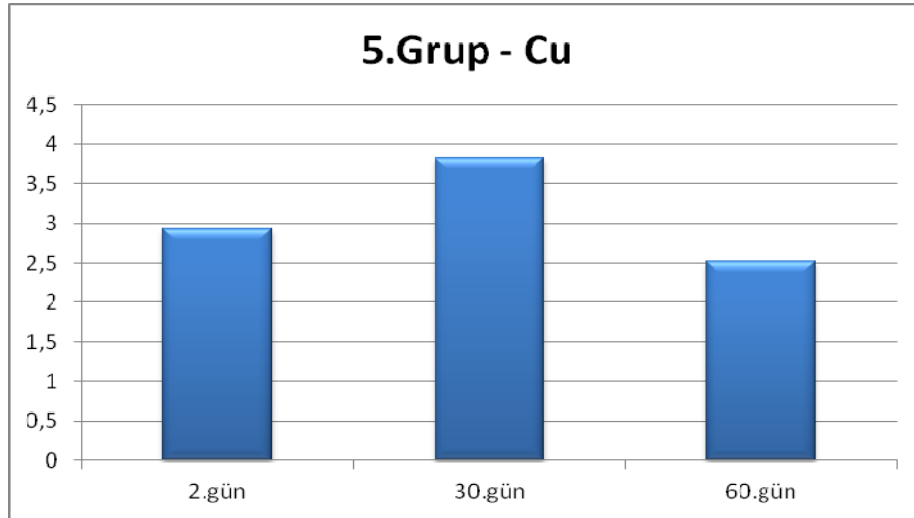
Grafik 4. Grup IV'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)

4.grup için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.006, 0.068, 0.004 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra gümüş enjeksiyonu kesilince dokudaki gümüş miktarı düşmüştür.



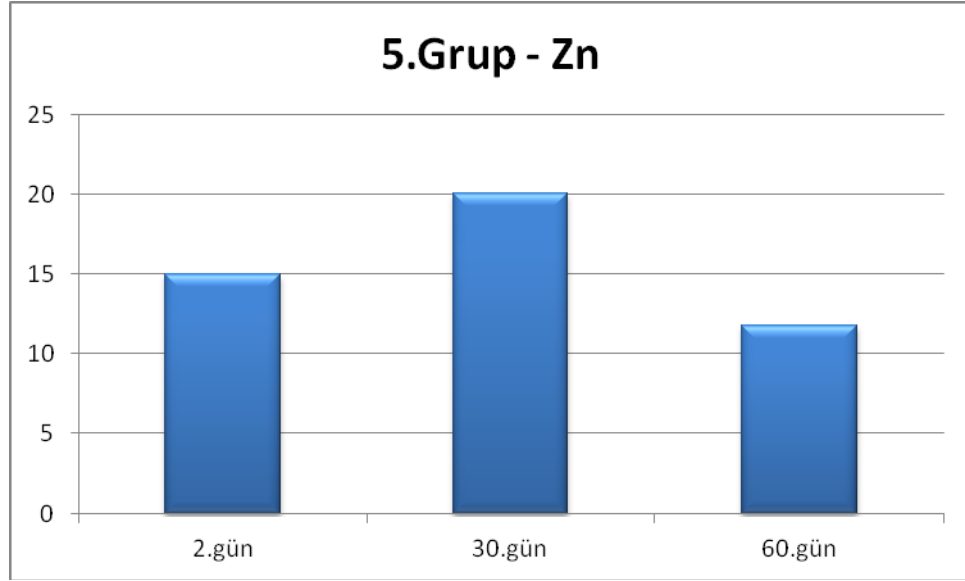
Grafik 5. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki gümüş miktarı (ppb)

5.grup için 2., 30. ve 60. gündeki gümüş değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 0.021, 0.054, 0.028 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra gümüş enjeksiyonu kesilince dokudaki gümüş miktarı düşmüştür.



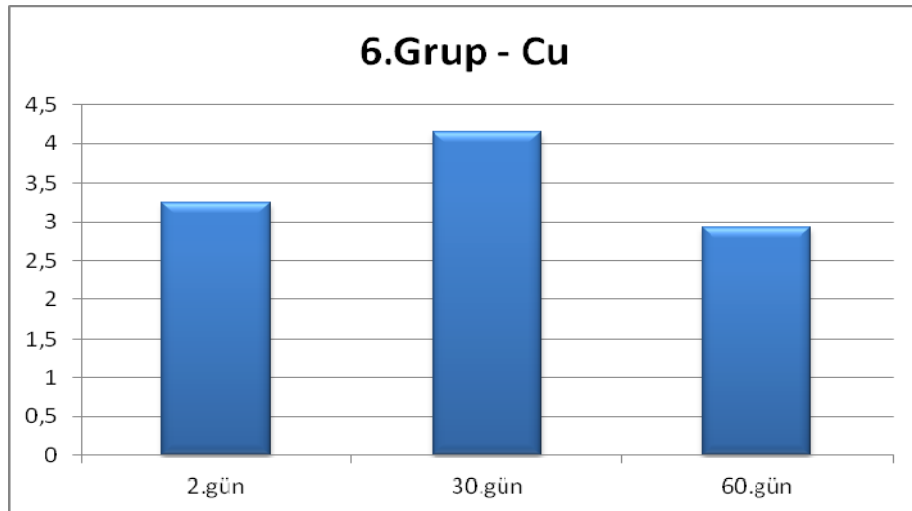
Grafik 6. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki bakır miktarı (ppb)

5.grup için 2., 30. ve 60. gündeki bakır değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 2.925, 3.821, 2.519 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki bakır miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra bakır enjeksiyonu kesilince dokudaki bakır miktarı düşmüştür.



Grafik 7. Grup V'ün 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki çinko miktarı (ppb)

5.grup için 2., 30. ve 60. gündeki çinko değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 14.979, 20.079, 11.756 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki çinko miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra dokudaki çinko miktarı düşmüştür.



Grafik 8. Grup VI'nın 2., 30. Ve 60. Gün dokulardaki bakır miktarı (ppb)

6.grup için 2., 30. ve 60. gündeki bakır değişkenine ait ortalama değerleri sırasıyla 3.244, 4.147, 2.934 olarak bulunmuştur. 2. Günden 30. Güne dokudaki bakır miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra bakır enjeksiyonu kesilince dokudaki bakır miktarı düşmüştür.

4.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Verilerin analizi SPSS 11.5 for Windows sürümünde yapılmıştır. Tanımlayıcı olarak nicel değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca(minimum-maksimum) kullanılmıştır. Nicel değişken için ikiden fazla gruba sahip kategorik değişkenin kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığına, normal dağılım varsayımları sağlanıyorsa One Way ANOVA, sağlanmıyorsa Kruskal Wallis testi ile bakılmıştır. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

5. TARTIŞMA

Deney sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda antibakteriyel kaplamalı implantların biyogüvenilir olduğu düşünülmüştür. Literatürde mevcut olan çalışmalarda nanopartiküller canlılara direkt olarak uygulanmıştır. Fizyolojik dozun çok üstündeki literatür uygulamalarının doku hasarları ile sık karşılaşılmıştır. Bu çalışmanın en önemli farkı, bir taraftan klinik uygulamalar için daha makul dozların seçilmiş olması, diğer taraftan da kaplamalı implantların canlı ratlar içine yerleştirilmesi ve 60 gün takibi sırasında deney datalarının toplanmış olmasıdır. Buna ek olarak, antibakteriyel kaplamalı implantların fizyolojik dozların altında salınım yaptığı ve dokularda kalıcı etkisinin olmadığı, yükselen dozlarda ise dokularda 30. günde geri dönüşümlü hasar gözlenmesi ve 60. gün dokularda devreye giren tamir mekanizmaları sonucu hasarın tamir edildiğinin gösterilmiş olmasıdır.

Çalışmanın ICP-MS aşaması, yani dokulardaki gümüş birikiminin hesaplandığı aşama, tüm çalışmanın temelini ve çıkış noktasını oluşturmaktadır. Literatür, bu tür metallerin vücut içinde her hangi bir amaçla kullanımının yaratacağı olumsuz sonuçları açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Yapılan pek çok çalışma, özellikle gümüş üzerine odaklanmıştır ve kullanılan gümüş dozları klinikte önerilen dozların çok üzerindedir. Alınan sonuçlar, gümüşün nefrotoksik, hepatotoksik, sitotoksik ve genotoksik olduğu yönündedir. Ancak, bahsedilen bu çalışmalarda elde edilen sonuçların klinik kullanım açısından anlamlandırılması ve yorumlanması güçtür ve bu tür bir çıkarıma gidilmesinin yanlış olacağı, çünkü kullanılan dozların çok yüksek olduğu pek çok makalenin tartışma bölümünde dile getirilmiştir. Bir diğer ifade ile, bu tür metallerin zararlı etkiler gösterdiğini ifade eden hiçbir çalışma “mantıklı” olarak kabul edilen bir doz kullanmamış, genellikle klinik uygulamalarda kendisine yer bulamayacak yüksek dozlarla çalışmıştır. Öyle ki, nano gümüşün genotoksik olduğunu iddia eden bir çalışma, deneklere günde 1 mg/kg dozunda nano gümüş vermiştir. Oysa ki, nano gümüş ile yapılan implant kaplamaları bu dozun neredeyse 1/1.000.000’ünü kullanmaktadır. Yapılan çalışmaların bu kadar yüksek dozlar kullanmış olması ve bu nedenle almış oldukları olumsuz sonuçlar, bu tür metallerle

kaplanılan implantlara karşı bir ön yargı oluşturmuş, etkinin “doz bağımlı” olduğu gerçeğini arka plana itmiştir. Bu çalışma, bu eksiği kapatması sebebi ile alanında bir ilktir. Diğer taraftan, antibakteriyel ve antifungal özellikleri olduğu bilinen bakır ve çinko hakkında yapılmış çalışma sayısı yok denilecek kadar azdır. Bu çalışmada her iki eksikliğin de giderilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya gümüşün yanı sıra bakırın ve çinkonun eklenilmesinin asıl amacı budur. Deneklere verilecek gümüş, bakır ve çinko miktarları ise klinik açıdan makul olmakla birlikte atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) ile çalışmak için çok düşüktür. Bu yöntemin Grup I ve Grup V’deki miktarları ölçemeyeceği ortadadır. Çünkü AAS, ppb (particle per billion) düzeyinde ölçüm yapabilirken Grup I ve Grup V’de ppt (particle per trillion) düzeyinde hassasiyet gerekmektedir. Diğer tüm gruplarda ppb düzeyinde, hatta Grup IV’de ppm (particle per million) düzeyinde aktif madde kullanılacaktır. Ne var ki literatür, özellikle gümüşün en az %90’ının dışkı ve idrarla itrah edildiği yönündedir. Bu durum göz önüne alındığında, ppb düzeyinde aktif metal kullanılan grupların da AAS ile incelenmesinin oldukça riskli ve alınacak sonuçların öngörülemez olacağını ortaya koymaktadır. Çünkü neredeyse tüm gruplarda itrah sonrası geride kalacağı ön görülen gümüş, bakır ve çinko seviyeleri ppb düzeyinden ppt düzeyine inecektir. Çalışmanın hiçbir şekilde riske edilmemesi için, doku ve vücut sıvılarında gümüş, bakır ve çinko aranmasını ön gören bu aşamanın AAS ile değil ICP-MS ile yapılması gerekmektedir.

Dokularda bu metallerin seviyesinin belirlenmesi ise hayati derecede önemlidir. Çünkü, yukarıda da bahsettiğimiz gibi, literatür hala sağlıklı ve klinik açıdan kullanılabilir verilerden uzaktır. EM, histopatoloji ve biyokimya incelemelerinden alınacak olumlu ve olumsuz sonuçların hangi dokudaki hangi metal seviyesi ile ilişkili olduğu, ancak ilgili dokudaki metal miktarının mümkün olan en hassas yöntemle incelenmesi ile ortaya konulabilecektir. Alınan sonuçların, dokulardaki gümüş, bakır ve çinko seviyesi ile ilişkilendirilmesinin başka yolu yoktur. Elde edilecek olumlu sonuçlar, klinik uygulamalarda klinisyenin doz sınırlarını belirlerken olumsuz sonuçlar da yine kaçınılması gereken dozları ortaya koyacaktır. Diğer taraftan, bu tür aktif metallerin, özellikle de gümüşün, farmako kinetiği ve farmako dinamiği henüz netlik kazanmamıştır. Kesin olan bilgi, veriliş yoluna bakılmaksızın, bu tür metallerin hayati dokulara geçtiği ve kısmen biriktiği yönündedir. Bu

birikimin zararlı sonuçlar doğurması ve doğurmaması için bilinmesi gereken alt ve üst limitler ise hala karanlıktır. Bu çalışma, alt limitteki belirsizliğe ışık tutabilmek adına grup I ve V'deki dozları çok düşük tutmuştur. Grup II, III ve IV'de kullanılan dozlar da yine literatürde çok fazla kullanılmamış dozlardır ve her bir grup implant grubunda kullanılan toplam gümüş miktarının 100, 1000 ve 5.000 katı olacak şekilde planlanmıştır. Grup IV'de kullanılacak doz ise literatürde kullanılan dozlardan birisidir ancak kısmen düşük bir dozdur. Görüşümüz, literatürde daha yüksek dozlarla yeteri kadar çalışma yapıldığı yönündedir. Grupların dozaj belirleme aşamasında tüm bu veriler göz önünde bulundurulmuştur.

Diğer taraftan, 70 kg bir insanda günlük bakır ihtiyacı 2,5mg/gün (max 10mg/gün), çinko ihtiyacı 10-15 mg/gün dür. Günlük doğal metabolizmanın parçası olan bu metaller için emilim ve itrah mekanizmaları doğal olarak çalışmaktadır. Bu çalışmada grup 5 ve 6 gümüş, bakır ve çinko içeren nanopartiküllere maruz bırakılmıştır. Grup 5'te kullanılan ve 60 güne kadar organizma içerisinde kalan implantlarda toplam 20ngr gümüş, 20ngr çinko ve 20ngr bakır vardır. Grup 6 da ise günlük 2µgr (2000ng) nanopartiküller içeren enjeksiyonlar yapılmıştır. Bu doz, yaklaşık 200 gr ağırlığındaki bir rat için Grup 6 da 1 gr doku başına günlük 0.1µgr gümüş, bakır ve çinko yükü oluşturur. Günlük ihtiyaca göre bakıldığında 70 kg bir insan için 1 gram başına 0,2µgr çinko ihtiyacı vardır. Günlük yapılan enjeksiyonlarda dahi maruz kalınan çinko miktarı günlük alımın yarısı kadar olduğundan toksisite beklenmemektedir.

Günlük 2,5 mg bakır ise günlük insan metabolizmasında kullanılmaktadır. 10 mg bakır ise tolere edilebilmektedir. Çinko ile benzerlik gösteren bu dozlar düşünüldüğünde günlük ihtiyacın altında kalan dozlarda olacaktır. Günlük enjeksiyon yapılmadığı ve yerleştirilen implantların toplamda 3 ayrı nano materyal için her birinden 20ng nano metal içerdiği düşünülürse insan için günlük ihtiyacın çok altında bir alım söz konusudur.

İnsan vücudundaki gümüşün ise literatürde çoğu örnekte eser miktarda olduğu ve insan metabolizmasında kullanılmadığı yönündedir. Gümüş üzerinde çalışan işçilerde yapılan bir araştırmada ise kanda 0.1 – 23 µgr/L gümüş bulunabileceğini göstermiştir. Bu da 70 kg bir insan için 1 gr dokuda 1 nanogram gümüşe eşittir.

Çalışmamızda grup I de 50 nanogram gümüş içeren implant kullanılmıştır. 200 gr ağırlığındaki bir rat için 1 gr doku başına 0,25 nanogram gümüşe eşittir. Bu değer, açıkça görülebildiği gibi “normal” sınırlar içerisinde.

Çalışma verilerine tekrar bakılacak olunursa, tüm gruplarda 2. günden 30. güne dokulardaki gümüş miktarı artış göstermiştir ama 30. Günden sonra gümüş enjeksiyonu kesilince dokudaki gümüş miktarları, beklenildiği gibi düşmeye başlamıştır. 5. ve 6. Grupta bakır için yine benzer olarak 2. Günden 30. Güne artış görülmüş ama 30. Günden sonra bakır enjeksiyonu kesilince dokudaki bakır miktarı düşmüştür. Çinko için ise sadece 5. Grupta 2. Günden 30. Güne artış görülmüş ama 30. Günden sonra çinko enjeksiyonu kesilince dokudaki bakır miktarı düşmüştür.

Gruplar arasında 2. gündeki gümüş miktarı açısından da Kontrol grubundan 4. Gruba doğru verilen gümüş miktarı arttığı için dokularda kalan gümüş miktarı da önceki çalışmalara benzer olarak yüksek doz verilen gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Grup 5 ve 6’yı da kendi içinde bakır gümüş ve çinko açısından değerlendirdiğimizde 6. Gruba bu elementler daha yüksek dozda verildiği için dokularda kalan miktarlar da literatürle uyumlu olarak bu grupta daha yüksek çıkmıştır.

Gruplar arasında 30. gündeki gümüş miktarı açısından da 1. gruptan 4. gruba doğru verilen gümüş miktarı arttığı için dokularda kalan gümüş miktarı da önceki çalışmalara benzer olarak yüksek doz verilen gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Sadece 2. gruptaki gümüş miktarı 1. gruptan daha düşük bulunmuştur. Bu beklenen bir durum değildir ve yorum getirilememiştir. Grup 5 ve 6’yı da kendi içinde bakır ve çinko açısından değerlendirdiğimizde 6. Gruba bu elementler daha yüksek dozda verildiği için dokularda kalan miktarlar da literatürle uyumlu olarak bu grupta daha yüksek çıkmıştır. Bu gruplarda da literatüre aykırı olarak 5. gruptaki dokuda kalan gümüş miktarı 6. grup değerinden daha yüksek bulunmuştur.

Aynı gruplarda 60. gün değerlerine yani dozu kestikten 30 gün sonra dokularda kalan gümüş değerlerine baktığımızda literatürle uyumlu şekilde yüksek doz verilen gruplarda daha yüksek çıkmıştır. Grup 5 ve 6’yı da kendi içinde bakır ve gümüş açısından değerlendirdiğimizde 6. Gruba bu elementler ilk 30 gün daha yüksek dozlarda verildiği için dokularda kalan miktarlar da daha yüksek çıkmıştır. Bu

gruplarda sadece 5. gruptaki dokuda kalan çinko miktarı 6. grup değerinden daha yüksek bulunmuştur.

Çalışma verileri yorumlandığında antibakteriyel ve antifungal kaplamalı implantların biyotoksitesinin olmadığı görülmüştür. Kullanılan Gümüş (Ag), Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) kaplanmış implantların içerdiği nano metallerin, tüm deney boyunca deneklerde her hangi bir hematolojik ve biyokimyasal bozulma yapmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, yapılan beyin, karaciğer ve böbrek dokularının analizlerinde implant yerleştirilen gruplarda ICP-MS analizi sırasında ve elektron mikroskopisinde toksisite oluşturacak düzeyde metal birikimine rastlanmamıştır.

Tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde gümüş, bakır ve çinko içeren implantların kullanılmasının ratlarda biyogüvenilir olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. İnsan metabolizması için bakıldığında ise, kaplama yapmak için kullanılan nano gümüş, nano bakır ve nano çinko dozlarının, literatürün belirlediği toksik dozların çok altında kaldığı ve hatta bakır ve çinko için günlük ihtiyaç dozu dahi karşılamadığı görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibakteriyel ve antifungal özellik kazandırılmak amacı ile nano gümüş, nano bakır ve nano çinko ile kaplanan implantların ratlarda 60 günlük periyotta toksisite yaratmadığı görülmüştür. Elektron mikroskopisi, histopatolojik inceleme, rat ağırlık takibi, dokulardaki ağır metal birikimlerinin ICP-MS analizi sonuçları nano gümüşü nano bakır ve nano çinko kaplamalı implantların biyolojik yan etkiler açısından güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu konu üzerinde ileride yapılacak insan çalışmaları ile elde edilecek datalar yol gösterici olacaktır.

4 farklı üniversite ve 6 farklı bölüm tarafından yapılan, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen, Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamız insan çalışmaları için antibakteriyel ve antifungal kaplamalı implantların güvenilir olduğu yönünde kanıt sağlamaktadır.

ÖZET

Antibakteriyel ve Antifungal Omurga İmplantların Biyogüvenilirliği

İmplant kullanılan cerrahi işlemlerde enfeksiyon oranının arttığı bilinen bir gerçektir. Enfeksiyonun implanta kadar ulaşması ise tedavinin süresini ve maliyeti artırmakta, hastanın sağlık durumunu olumsuz etkilemektedir. İmplant bağımlı enfeksiyonların önlenmesi amacı ile pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu güne dek yapılan implant yüzey modifikasyonları içerisinde en çok başarı sağlayanlar antibiyotik kaplı implantlar olmuştur. Bu implantların maliyetlerinin yüksekliği, sınırlı bir etki spektrumuna sahip olmaları ve antifungal etkilerinin olmaması ise eksik yönleridir. “Sol-gel yöntemi” kullanılarak nano gümüş, nano bakır ve nano çinko kaplanmış implantların, tüm bu eksiklikleri aynı anda gidermesi mümkündür.

Çalışma, 63 adet albino sıçan ile yapılmıştır. Her birisinde 9 adet sıçanın olduğu 7 grup oluşturulmuştur. Bazı gruplara sadece kaplanmış implantlar implante edilirken bazı gruplara sadece nano kimyasal enjeksiyonu yapılmıştır. Deney boyunca alınan dokularda ve vücut sıvılarında gümüş, bakır ve çinko tayini yapılmıştır. Aynı dokuların hem elektron mikroskop, hem de ışık mikroskop incelemesi gerçekleştirilmiştir. Çeşitli doku ve vücut sıvılarında yapılan metal analizleri ise, bu metallerin güvenli klinik kullanım sınırlarını belirlemede değerli bilgiler vermiştir. Bu çalışma bahsi geçen metallerin doz bağımlı yan etkilerinin ortaya çıkarılmasında anahtar rol oynayacaktır.

Elde edilen sonuçta, antibakteriyel kaplamalı implantların ratlarda güvenilir olduğu, insan metabolizmasına orantılandırıldığında ise günlük metabolizma içerisindeki iyon yükünün altında bir dozda gümüş bakır ve çinkoya bireyin maruz kalacağını göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: antibakteriyel, antifungal, implantlar, toksisite

SUMMARY

Biosafety of Antibacterial and Antifungal Spinal Implants

It is a known fact that the rate of infection is increased in surgical procedures using implants. The infection reaches the implant as long as it increases the duration and cost of the treatment and adversely affects the health of the patient. Many studies have been conducted with the aim of preventing implant-dependent infections. The most successful implant surface modifications to date have been antibiotic coated implants. The costs of these implants are high, they have a limited spectrum of effect, and the lack of antifungal effects is an incomplete aspect. Using the "sol-gel method", implants coated with nano silver, nano-copper and nano-zinc, all these deficiencies can go away at the same time. Thanks to this coating system, the implants will have both very strong antibacterial properties and antifungal properties at satisfactory dimensions.

The study was carried out with 63 albino rats. 7 groups, each containing 9 rats, were formed. Some groups were implanted with only coated implants, while some groups received only nano-chemical injections. Silver, copper and zinc containing tissues and body fluids are taken during the experiment. Both electron microscope and light microscope examination of these tissues were performed. This study will help the development of antimicrobial implant surfaces with both safer and wider spectrum of effects. Metals analysis on various tissues and body fluids provides valuable insight into the safe clinical use of these metals and play a key role in revealing dose-dependent side effects of precious metals.

As a result of this study, antibacterial and antifungal coated implants are found to be “bio-safe” in rats. From this result, one can make an intuition that these implants are also bio-safe for humans. The amount of exposed coating materials are below the needed daily uptake.

Keywords: antibacterial, antifungal, implants, toxicity

7. KAYNAKLAR

- 1- Abdelhalim MA. Gold nanoparticles administration induces disarray of heart muscle; hemorrhagic, chronic inflammatory cells infiltrated by small lymphocytes, cytoplasmic vacuolization and congested blood vessels. *Lipids Health Dis.* 2011;10:233–241.
- 2- Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 2010;411:1841-8.
- 3- Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233:404-10.
- 4- Ahmad, Z.; Pandey, R.; Sharma, S. & Khuller, G.K. (2006). Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Indian journal of chest diseases and allied sciences*, Vol. 48, No. 3, (July-September) 171-176, ISSN 0377-9343
- 5- Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H, Shinohara Y. Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. *J Biochem* 2003;134:43-9.
- 6- ANSI. Talking the Talk: Standardizing the Language of Nanotechnology. Nanotechnology Law Report (Nano-Law-Report-WG1_08_08); 2008, August:1–4.
- 7- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 2008; 179:93-100.
- 8- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236:310–318.

- 9- AshaRani PV, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 2009;10:65.
- 10- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3:279-90
- 11- Alt V, Bechert T, Steinrücke P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials.* 2004;25:4383–4391.
- 12- Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dipo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns.* 2007;33:139–148.
- 13- Aydın M, Köksal F, Günay İ, Serin MS, Polat S. The effect of antibacterial silver electrodes and the nature of ion emission in the outer side of inhibition zone. *Ann Med Sci.*; 1997, 5(2):52-57.
- 14- Aydın M, Günay I, Pelit A, Serin MS. Deposition profile of antibacterial anodic silver in root canal systems of teeth. *Applied Biomaterials.*, 1998; 38(1):49-54.
- 15- Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small.* Epub before print.
- 16- Bachler G, von Goetz N, Hungerbuhler K. A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2013, 8:3365–3382.
- 17- Bellinger, C.G. & Conway, H. (1970). Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plastic and reconstructive surgery*, Vol. 45, No. 6, (June) 582-585, ISSN 0032-1052
- 18- Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, Becker RO. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;9(2):357–358.

- 19- Berman E. Topics in Science. In: Thomas LC, ed. Toxic Metals and their Analysis. Chapter 25. 1st ed. London: Heyden International; 1980. p. 121–145.
- 20- Bragg, P.D. and D.J. Rainnie, The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can.J. Microbiol.* 1974; 20(6): 883-889.
- 21- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88:412–419.
- 22- Buur J, Baynes R, Smith G, Riviere J. Use of probabilistic modeling within a physiologically based pharmacokinetic model to predict sulfamethazine residue withdrawal times in edible tissues in swine. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:2344–2351.
- 23- Carlson C, Hussain S, Schrand A, Braydich-Stolle L, Hess K, Jones R, Schlager J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112:13608–13619.
- 24- Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett* 2008;30:1893-9.
- 25- Chang ALS, Khosravi V, Egbert B. 2006. A case of argyria development after colloidal silver digestion. *J Cutaneous Pathol* 33(12):809–811.
- 26- Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52:1636-53.
- 27- Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 2008;176:1-12.
- 28- Chi Z, Liu R, Zhao L, Qin P, Pan X, Sun F, Hao X. (2009). A new strategy to probe the genotoxicity of silver nanoparticles combined with cetylpyridine bromide. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 72:577–581.

- 29- Cho W-S, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho H-Y, Han BS, Kim SH, Kim HO, Lim YT, Chung BH, Jeong J. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 236:16–24.
- 30- Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 2011;123:133-43.
- 31- Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 2008;42:3066–3074.
- 32- 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*, Vol. 59, No. 4, (April) 587-590, ISSN 0305-7453
- 33- Costa CS, Ronconi JVV, Daufenbach JE, et al. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem.* 2010;342:51–56.
- 34- Chowlishaw J, Spadaro J.A, Becker R.O; Inhibition of enzyme Induction in E. Coli. *Electromagnetic Biology and Medicine.* 1982; 3(1):295-304.
- 35- Demling, R.H. & DeSanti, L. (2001). Effects of silver on wound management. *Wounds*, Vol. 13, No. Suppl A, 5-15, ISSN 1044-7946
- 36- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29(12):1912–1919.
- 37- Drake PL, Hazelwood KK. 2005. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann Occup Hyg* 49(7):575–585.
- 38- Durán, N.; Marcato, P.D.; De Souza, G.I.H.; Alves, O.L. & Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process

on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*, Vol. 3, No. 2, (June) 203-208, ISSN 1550-7033

- 39- Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, Oczkowski M, Krawczynska A, Chwastowska J, Sadowska-Bratek M, Chajduk E, Wojewodzka M, Dusinska M, et al. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2012, 32:920–928.
- 40- Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem Rev* 2013;113:4708-54.
- 41- Endo, M.; Takesako, K.; Kato, I. & Yamaguchi, H. (1997). Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 41, No. 3, (March) 672-676, ISSN 0066- 4804
- 42- EU. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Official Journal of the European Union. European Union. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EN:PDF>. 2011.
- 43- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 2009;190:156-62.
- 44- Fox, C.L.Jr. & Modak, S.M. (1974). Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 5, No. 6, (June) 582-588, ISSN 0066-4804
- 45- Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, Haberl N, Brunelli A, Kreyling WG, Stone V. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci* 2013, 131:537–547.
- 46- Garza-Ocanas L, Ferrer DA, Burt J, Diaz-Torres LA, Ramirez Cabrera M, Rodriguez VT, Lujan Rangel R, Romanovicz D, Jose-Yacamán M.

Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats. *Metallomics* 2010, 2:204–210.

- 47- Genter MB, Newman NC, Shertzer HG, Ali SF, Bolon B. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicol Pathol* 2012, 40:1004–1013
- 48- Gemmell, C.G.; Edwards, D.I.; Fraise, A.P.; Gould, F.K.; Ridgway, G.L. & Warren, R.E. (2006). Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Vol. 57, No. 4, (April) 589-608, ISSN 0305-7453
- 49- Gong, P.; Li, H.; He, X.; Wang, K.; Hu, J.; Zhang, S. & Yang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄ and Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, Vol. 18, No. 28, (June) 604-611, ISSN 0957-4484
- 50- Gu, H.; Ho, P.L.; Tong, E.; Wang, L. & Xu, B. (2003). Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano letters*, Vol. 3, No. 9, (August) 1261-1263, ISSN 1530-6984
- 51- Han BS, Shin JH, Sung JH, Song KS, Yu IJ. (2007). Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 19:857–871
- 52- He D, Bligh MW, Waite TD. Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2013;47:9148-56.
- 53- He W, Zhou YT, Wamer WG, Boudreau MD, Yin JJ. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* 2012;33:7547-55.
- 54- Hill WR and Pillsbury DM. *Argyria: The Pharmacology of Silver*, The Williams and Wilkens Company, Baltimore, MD, 1939; pp 89-92.

- 55- Hoet PHM, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. (2004). Nanoparticles—Known and unknown health effects. *J Nanobiotechnol* 2:12.
- 56- Hugo, W.B. & Russell, A.D. (1982). *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, Oxford, ISBN 0632041943, London
- 57- Huo Y, Li G, Duan RF, et al. PTEN deletion leads to deregulation of antioxidants and increased oxidative damage in mouse embryonic fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:1578–1591.
- 58- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19:975–983.
- 59- Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 179:130–139.
- 60- Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, Chung KH, Yu IJ. (2008). Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. *Toxicol Lett* 182:24–28.
- 61- ISO. Nanotechnologies—Considerations for the development of chemical nomenclature for selected nano-objects (ISO/TR 14786:2014); 2014:1–38.
- 62- Jang J, Lim DH, Choi IH. The impact of nanomaterials in immune system. *Immune Netw* 2010;10:85-91.
- 63- Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, Shin JH, Sung JH, Song KS, Yu IJ. 2007. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalat Toxicol* 19(10):857–871.
- 64- Jeong J, Han BS, et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2007, 19:857–871.

- 65- Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett* 2013;222:55-63.
- 66- Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 2008;3:145-50.
- 67- Jones HM, Mayawala K, Poulin P. Dose selection based on physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approaches. *AAPS J* 2013, 15:377–387.
- 68- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40:328–346.
- 69- Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol.* 2009;43:6046–6051.
- 70- Kim S, Choi JE, Choi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro.* 2009;23: 1076–1084.
- 71- Kim S, Kim S, Lee S, et al. Characterization of the effects of silver nanoparticles on liver cells using HR-MAS NMR spectroscopy. *Bull Korean Chem Soc.* 2011;32:2021–2026.
- 72- Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008;20:575-83.
- 73- Kim YJ, Yang SI, Ryu JC. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Mol Cell Toxicol* 2010;6:119-25
- 74- Kim Y, Suh HS, Cha HJ Kim SH, Jeong KS, Kim DH. (2009). A case of generalized argyria after ingestion of colloidal silver solution. *Am J Indust Med* 52:246–250.

- 75- Kim WY, Kim J, Park JD, Ryu HY, Yu IJ. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* 2009, 72:1279–1284.
- 76- Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *PartFibre Toxicol* 2010, 7:20.
- 77- Kim JS, Song KS, Sung TH, et al. Genotoxicity, acute oral and dermal eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitization evaluation of silver nanoparticles. *Nantotoxicology*. 2013;7:953–960.
- 78- Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Köller M, Epple M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem Mater* 2010;22:4548-54.
- 79- Kittler S, Greulich C, Gebauer JS, Diendorf J, Treuel L, Ruiz L. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J Mater Chem* 2010;20:512-8.
- 80- Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *BrainRes* 1995, 674:171–174.
- 81- Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de Jong A, Noorlander CW, Van Eijkeren JC, Geertsma RE, De Jong WH. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 2010, 31:8350–8361.
- 82- Lansdown ABG. (2007). Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Crit Rev Toxicol* 37:237–250.
- 83- Larese FF, D’Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 255(1–2):33–37.

- 84- Leavens TL, Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Brooks JD, Oldenburg SJ, Riviere JE. In vitro biodistribution of silver nanoparticles in isolated perfused porcine skin flaps. *J Appl Toxicol* 2012, 32:913–919.
- 85- Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CL, Xu XHN. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano* 1:133–143.
- 86- Lee J, Kim KJ, Sung WS, Kim JG and Lee DG (2010). The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Antifungal Agents, Silver Nanoparticles, David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5
- 87- Lee HA, Leavens TL, Mason SE, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Comparison of quantum dot biodistribution with a blood-flow-limited physiologically based pharmacokinetic model. *Nano Lett* 2009, 9: 794–799.
- 88- Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil KH, Park K. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2013, 7:1120–1130.
- 89- Lee HY, Choi YJ, Jung EJ, Yin HQ, Kwon JT, Kim JE, et al. Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. *J Nanopart Res* 2009;12:1567-78.
- 90- Lee JH, Mun J, Park JD, Yu IJ. A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* 2012;6:667-9.
- 91- Li M, Al-Jamal KT, Kostarelos K, Reineke J. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS Nano* 2010, 4:6303–6317.
- 92- Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm* 2008, 5:496–504.
- 93- Li D, Johanson G, Emond C, Carlander U, Philbert M, Jolliet O. Physiologically based pharmacokinetic modeling of polyethylene glycol-coated polyacrylamide nanoparticles in rats. *Nanotoxicology* 2014,8:128–137.

- 94- Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Wang C, et al. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. *Biomaterials* 2012; 33:1714-21.
- 95- Lin Z, Fisher JW, Wang R, Ross MK, Filipov NM. Estimation of placental and lactational transfer and tissue distribution of atrazine and its main metabolites in rodent dams, fetuses, and neonates with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, 273:140–158.
- 96- Lipscomb JC, Haddad S, Poet T, Krishnan K. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models in toxicity testing and risk assessment. *Adv Exp Med Biol* 2012, 745:76–95.
- 97- Liu R, Sun F, Zhang L, Zong W, Zhao X, Wang L, Wu R, Hao X. (2009). Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin. *Sci Total Environ* 407:4184–4188.
- 98- Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB, Hurt RH. Chemical transformations of nanosilver in biological environments. *ACS Nano* 2012, 6:9887–9899.
- 99- Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 2010;4:319-30.
- 100- Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR, Larsen EH. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol* 2011, 8:18.
- 101- Lu W, Senapati D, Wang S, Tovmachenko O, Singh AK, Yu H, et al. Effect of Surface Coating on the Toxicity of Silver Nanomaterials on Human Skin Keratinocytes. *Chem Phys Lett* 2010;487:92-6.
- 102- Lubick N. (2008). Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both?. *Environ Sci Technol* 42:8617.

- 103- Luoma SN. (2008). Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges. The Pew Charitable Trusts and the Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- 104- Luther EM, Koehler Y, Diendorf J, Epple M, Dringen R. Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes. *Nanotechnology* 2011;22:375101.
- 105- Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett* 2009;187:15-21.
- 106- Rai, M.; Yadav, A. & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, Vol. 27, No. 1, (January-February) 76-83, ISSN 0734-9750
- 107- Riviere JE. Pharmacokinetics of nanomaterials:an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2009, 1:26–34.
- 108- Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 2008;4:707–716.
- 109- Samberg ME, Monteiro-Riviere NA. Silver nanoparticlesin biomedical applications. In: Monteiro-Riviere NA, Tran CL, eds. *Nanotoxicology: Progress Toward Nanomedicine*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2014 Chapter 22, 405–421.
- 110- Samberg ME, Orndorff PE, Monteiro-Riviere NA. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology* 2011, 5:244–253.
- 111- Schabes-Retchkiman, P.S.; Canizal, G.; Herrera-Becerra, R.; Zorrilla, C.; Liu, H.B. & Ascencio, J.A. (2006). Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Optical materials*, Vol. 29, No. 1, (October) 95-99, ISSN 0925-3467

- 112- Schleh C, Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schaffler M, Schmid G, Simon U, Kreyling WG. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* 2012, 6:36–46.
- 113- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, et al. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci* 2010;115:521-34.
- 114- Secinti KD, Ayten M, Kahilogulları G, Kaygusuz G, Ugur HC, Attar A. Antibacterial effects of electrically activated vertebral implants. *Journal of Clinical Neuroscience* 2008; 15(4): 434-439
- 115- Secinti KD, Ozgural O, Tuna H, Attar A. Antibacterial and Antifungal Effects of Weak Direct Current and Silver Ions. *Turkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2009;29(3):577-583.
- 116- Secinti, D. K, Özalp, H, Attar, A, Sargon, F. M. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *Journal of Clinical Neuroscience*.2011; Mar; 18(3): 391–395
- 117- Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, Schmid G, Brandau W. (2008). Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small* 4:2108–2111.
- 118- Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, Wright CJ, Doak SH. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30:3891–3914.
- 119- Singh RP, Ramarao P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 2012;213:249-59.
- 120- Sonavane G, Tomoda K, Sano A, Ohshima H, Terada H, Makino K. (2008a). In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Coll Surf B Biointerfaces* 65:1–10.

- 121- Song KS, Sung JH, Ji JH, Lee JH, Lee JS, Ryu HR, et al. Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. *Nanotoxicology* 2013;7:169-80.
- 122- Soto K, Garza KM, Murr LE. (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater* 3:351–358.
- 123- Spadaro JA. Silver anode inhibition of bacteria. *Proceedings of the First International Conference on Gold and Silver in Medicine*, Bethesda, MD, May 1987;13–14.
- 124- Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puentes V, et al. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2011;8:36.
- 125- Sung J.H, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Cho MH, Kelman BJ, Yu IJ. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 108:452–461.
- 126- Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, Han BS, Kim J, Kim TS, Chang HK, Lee EJ, Lee JH, Yu IJ. 2008. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol* 20:567–574.
- 127- Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 109:547–551
- 128- Tang J. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *J Biomed Eng.* 2008;25:958–961.
- 129- Tavares P, Balbinot F, de Olivera HM, et al. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (AgNPs) in vitro and in vivo. *J Nanopart Res.* 2012;14:791.

- 130- Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Wan Z, Xi T. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Appl Surf Sci* 2008, 255:502–504.
- 131- Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK. (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem* 2:129–136.
- 132- Tiwari DK, Jin T, Behari J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21: 13–24.
- 133- Trickler WJ, Lantz SM, Murdock RC, Schrand AM, Robinson BL, Newport GD, et al. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicol Sci* 2010;118:160-70.
- 134- Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. 2006. Silver coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma* 60(3): 648–652.
- 135- van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, Gremmer ER, Mast J, Peters RJ, Hollman PC, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012, 6:7427–7442.
- 136- Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R, Moiemmen NS. (2007). The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns* 33:979–985.
- 137- Wadhera A, Fung M. 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatology Online Journal* 11(1):12.
- 138- Wang H, Wu L, Reinhard BM. Scavenger receptor mediated endocytosis of silver nanoparticles into J774A.1 macrophages is heterogeneous. *ACS Nano* 2012;6:7122-32.

- 139- Wang L, Liu Y, Li W, Jiang X, Ji Y, Wu X, et al. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. *Nano Lett* 2011;11:772-80.
- 140- Wiwanitkit V, Sereemasapun A, Rojanathanes R. 2009. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa. *Fertil Steril* 91(1):7-8.
- 141- Wu Y, Zhou Q, Li H, Liu W, Wang T, Jiang G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat Toxicol* 2010;100:160-7.
- 142- Xue Y, Zhang S, Huang Y, Zhang T, Liu X, Hu Y, Zhang Z, Tang M. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J Appl Toxicol* 2012, 32:890-899.
- 143- Yang EJ, Kim S, Kim JS, Choi IH. Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials* 2012;33:6858-67.
- 144- Zhang L, Wang L, Hu Y, Liu Z, Tian Y, Wu X, et al. Selective metabolic effects of gold nano rods on normal and cancer cells and their application in anticancer drug screening. *Biomaterials* 2013;34:7117-26.
- 145- Mager DE, Mody V, Xu C, Forrest A, Lesniak WG, Nigavekar SS, Kariapper MT, Minc L, Khan MK, Balogh LP. Physiologically based pharmacokinetic model for composite nanodevices: effect of charge and size on in vivo disposition. *Pharm Res* 2012, 29:2534-2542.
- 146- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ, Warheit DB. (2006). Safe handling in nanotechnology. *Nature* 444:267-269.
- 147- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53: 283-318.

- 148- Moss DM, Siccardi M. Optimizing nanomedicine pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetics modelling. *Br J Pharmacol* 2014, 171:3963–3979
- 149- Moyer, C.A.; Brentano, L.; Gravens, D.L.; Margraf, H.W. & Monafó, W.W.Jr. (1965). Treatment of large human burns with 0.5 percent silver nitrate solution. *Archives of surgery*, Vol. 90, (June) 812-867, ISSN 0272-5533
- 150- Mueller NC, Nowack B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol* 42(12): 4447–4453.
- 151- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004;16:437-45.
- 152- Park K, Park EJ, Chun IK, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch Pharm Res* 2011, 34:153–158.
- 153- Park J, Lim DH, Lim HJ, Kwon T, Choi JS, Jeong S, et al. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chem Commun (Camb)* 2011;47:4382-4.
- 154- Park E, Bae E. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharm.* 2010;30:162–168.
- 155- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55: 329–347.
- 156- Paula MM, da Costa CS, Baldin NC, et al. In vitro effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. *J Braz Chem Soc.* 2009;20: 1556–1560.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı	MURAT ZAIMOĞLU
Doğum yeri ve tarihi	ANKARA – 1 AĞUSTOS 1987
Uyruğu	TÜRK
Medeni durumu	EVLİ – 1 KIZ ÇOCUĞU BABASI
Askerlik durumu	ASKERLİK GÖREVİ YERİNE GETİRİLMİŞTİR
İletişim adresi	Talatpaşa Bulvarı Ibni Sina Hastanesi 7. Kat Beyin Cerrahisi
	Ulus / Ankara Posta kodu: 06230
Email	m.zaimoglu.neurosurgery@gmail.com
Telefon	+90 507 487 03 69

II-Eğitimi

TED Ankara Koleji Vakfı Lisesi (İlkokul ve Lise) 2001-2004

International Baccalaureate (IB) Diploma 2001-2004

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi 2004-2010

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi 2012-2017

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları Yayınları

1. A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical study of the effects of vardenafil on human nasal patency, Aydın E¹, Hizal E, Onay O, Ozgen B, Turhan B, Zaimoglu M, Peskircioglu L, Budakoglu II Am J Rhinol. 2008 May-Jun;22(3):276- 9. doi:10.2500/ajr.2008.22.3169.
2. Intracerebral Pneumocephalus after Endoscopic Odontoidectomy in a Pediatric Patient. A Case report, Kahilogullari G, Meco C, Zaimoglu M, Beton S, Meco BC, Tetik B, Unlu A, Childs Nerv Syst. 2015 Sep;31(9):1595-9. doi: 10.1007/s00381-015-2740-4. Epub 2015 May 8
3. Papillary Tumor of the Pineal Region, International Surgery Journal, Murat Zaimoglu, Fatih Yakar, Ihsan Dogan, Yusuf Sukru Caglar. Int Surg J. 2017 Dec;4(12):4076-4078
4. Subcutaneous schwannoma in the head region, Umit Eroglu, Fatih Yakar, Murat Zaimoglu, Emre Sayaci, Onur Ozgural, Ihsan Dogan, Hasan Caglar Ugur, Department of Neurosurgery, Ankara University Medical School, Ibni Sina Hospital, Ankara, Turkey, Asian Journal of Neurosurgery
5. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York, Endoscopic Endonasal Skull Base Surgery for 38 Pediatric Cases: Ankara University Experience, Gokmen Kahilogullari, Cem Meco, Suha Beton, Murat Zaimoglu, Hazan Basak, Agahan Unlu, J Neurol Surg B 2017; 78(S 01): S1-S156 DOI: 10.1055/s-0037-1600699
6. Eroglu U, Yakar F, Zaimoglu M, Ozates O, Ozgural O, Ugur HC. Pneumorrhachis. Asian Journal of Neurosurgery. 2016;11(2):172-173. doi:10.4103/1793-5482.175641.

VII-Kitap Bölümleri

1. Spinal Meningoseller, (Spinal Meningocele), Gökmen KAHİLOĞULLARI, Murat ZAHİMOĞLU, Ağahan ÜNLÜ, Beyin ve Sinir Cerrahisi AD, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye Klinikleri J Neurosurg-Special Topics 2016;6(2):41-8

IX-Sözlü Sunumlar

1. Relationship of anterior cerebral arter hypoplasia/aplasia and anterior communicating artery aneurysm, U. Eroglu, S. Solmaz, O. Ozgural, M. Bozkurt, M. Zaimoglu, Oral Presentation 351, EANS Venice 2017
2. Endoscopic transnasal approach in pediatric cases: advantages and disadvantages - a review of 20 cases, Gokmen Kahilogullari, Cem Meco, Suha Beton, Murat Zaimoglu, Agahan Unlu, Flash Presentation-015, ISPN 2015, Izmir, Turkey
3. The effect of magnetic resonance imaging on the neural tube of early chicken embryos, Emrah Kantarcioglu, Gokmen Kahilogullari, Murat Zaimoglu, Nazan Yildiz, Ozlem Esin Atmis, Elif Peker, Zeynep Gunhan, Deniz Billur, Esra Erdemli, Ilhan Erden, Agahan Unlu, Flash Presentation-036, ISPN 2015, Izmir, Turkey
4. Manyetik Resonans Görüntüleme Orta Hat Kapanma Defekti Yapar mı? Cıvcıv Embryolarında Laboratuvar Sonuçları, Türk Nöroşirürji Derneği, 29. Bilimsel Kongresi, Sözlü Sunumlar, SS-004[Pediyatrik Nöroşirürji] [Yılın Bildirileri], 2015
5. Pediyatrik Olgularda Endoskopik Transnazal Yol: Avantajları ve Dezavantajları – 20 Olgu İçin Değerlendirme, Türk Nöroşirürji Derneği, 29. Bilimsel Kongresi, Sözlü Sunumlar, SS-055[Pediyatrik Nöroşirürji], 2015
6. Endoskopi yardımcı mikroskopik dermoid epidermoid tümör eksizyonu hasta serisi, Ümit Eroğlu, Fatih Yakar, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Serdar Solmaz, Koral Erdoğan, Mustafa Cemil Kılınç, Eyüp Bayatlı, Onur

Özgüral, Melih Bozkurt, Gökmen Kahiloğulları, Mustafa Ağahan Ünlü, SS-046 [Nöroonkolojik Cerrahi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016

7. Kaş insizyonu kraniyotomi hasta serisi ve cerrahi teknik, Ümit Eroğlu, Fatih Yakar, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Mustafa Cemil Kılınç, Burak Bahadır, Serdar Solmaz, Koral Erdoğan, Emre Yağız Sayacı, Melih Bozkurt, Gökmen Kahiloğulları, Hasan Çağlar Uğur, SS-176 [Nöroonkolojik Cerrahi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
8. Pediatrik Endoskopik Transsfenoidal Cerrahi - Ankara Üniversitesi Vaka Serisi Gökmen Kahiloğulları, Süha Beton, Murat Zaimoğlu, Hazan Başak, Cem Meço, Ağahan Ünlü, SS-007, Yılın Bildirileri, Türk Nöroşirurji Derneği 29. Bilimsel Kongresi, 2017
9. Cep telefonunun erken dönem tavuk embriyolarında nörolojik gelişim üzerine etkisi, Onur Özgüral, Gökmen Kahiloğulları, Murat Zaimoğlu, Ezgi Aydın, Serkan Aygün, Murat Ayberk Aytemiz, Osman Avcu, Serhat Aktan, Ağahan Ünlü, SS-062, Türk Nöroşirurji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 2017
10. Eloquent alanda AVM cerrahisi Melih Bozkurt, Murat Zaimoğlu, Burak Bahadır, Umit Eroğlu, Ihsan Doğan, Onur Özgüral, SS-093, Türk Nöroşirurji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 2017

X- Poster Sunumları

1. Torakolomber Bileşkede Menengioma ile Karışan Arterio-Venöz Malformasyon Olgusu, Tartışmalı Poster Sunumları, TPS-005 [Nöroonkolojik Cerrahi], Türk Nöroşirurji Derneği 29. Bilimsel Kongresi, 2015
2. Hidrosefali Cerrahisinde Nadir bir Uzun Dönem Komplikasyonu: Kalsifiye Subdural Hematom, Elektronik Poster Sunumları, EPS-231[Nörotravma ve Yoğun Bakım], Türk Nöroşirurji Derneği 29. Bilimsel Kongresi

3. Çocuk Hastada Endoskopik Odontoidektomi Sonrası Pnömoşefalus: Olgu Sunumu, Elektronik Poster Sunumları, EPS-598[Pediyatrik Nöroşirürji], Türk Nöroşirürji Derneği 29. Bilimsel Kongresi
4. Foramen Magnum Meningiomas: a review of 13 patients, M. Zaimoğlu, U. Eroğlu, O. Ozgural, H.C. Ugur, H. Tuna, M. Bozkurt, EP- 402, EANS 2017, Venice
5. Arteriovenous malformation surgery in eloquent region, M. Zaimoğlu, U. Eroğlu, I. Dogan, M. Bozkurt, EP – 060, EANS 2017, Venice
6. Spinal arachnoid cysts: a review of 6 cases, M. Zaimoğlu, U. Eroğlu, E. Bayatlı, I. Doğan, H.C. Uğur, EP- 628, EANS 2017, Venice
7. Endoskopik Yardımlı Mikroskopik Yaklaşım ile Ventriküler Tümör Cerrahisi - İKİ vaka sunumu, EPS-064 [Nöroonkolojik Cerrahi], Murat Zaimoğlu, Gökmen Kahiloğulları, Onur Özgür, İhsan Doğan, Melih Bozkurt, Cemil Kılınç, Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 2017
8. Wide multilevel costotransversectomy; as an alternative to combine approach to achieve spinal fusion of 360 degrees in correction for a case of severe congenital kyphosis, İhsan Doğan, Murat Zaimoğlu, Gökmen Kahiloğulları, P-090, ISPN, İzmir, Turkey 2015
9. Using free osirix software in the surgical planning of endoscopic third ventricle approaches in pediatric patients, İhsan Doğan, Murat Zaimoğlu, Gökmen Kahiloğulları, Ağahan Ünlü, P-156, ISPN, İzmir, Turkey 2015
10. Kranial bölgede cilt altında saptanan schwannom: olgu sunumu Fatih Yakar, Ümit Eroğlu, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Burak Bahadır, Serdar Solmaz, Mustafa Cemil Kılınç, Eyüp Bayatlı, Emre Yağız Sayacı, Murat Büyüktepe, Hasan Çağlar Uğur, EPS-055 [Nöroonkolojik Cerrahi], Türk Nöroşirürji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
11. Travma sonrası araknoid kist kanaması ve spontan rezölüsyonu Fatih Yakar, Ümit Eroğlu, Murat Zaimoğlu, Orkhan Mammadkhanlı, Koral Erdoğan,

- Serdar Solmaz, Emre Yağız Sayacı, Mustafa Cemil Kılınç, Murat Büyüktepe, Burak Bahadır, Hasan Çağlar Uğur, EPS-145[Nörotravma ve Yoğun Bakım], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
12. Posterior fossa metastasis of retinoblastoma: the first case in literature Fatih Yakar, İhsan Doğan, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Orkhan Mammadkhanlı, Murat Büyüktepe, Koral Erdoğan, Serdar Solmaz, Burak Bahadır, Mustafa Cemil Kılınç, Emre Yağız Sayacı, Melih Bozkurt, EPS-250[Pediatric Nöroşirurji], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
 13. Far lateral disk hernisi cerrahi seri, Ümit Eroğlu, Fatih Yakar, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, İhsan Doğan, Onur Özgür, Melih Bozkurt, Gökmen Kahiloğulları, Hasan Çağlar Uğur, EPS-341[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
 14. Dural ektazi: olgu sunumu, Fatih Yakar, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Orkhan Mammadkhanlı, Burak Bahadır, Mustafa Cemil Kılınç, Murat Büyüktepe, Emre Yağız Sayacı, Koral Erdoğan, Hasan Çağlar Uğur, EPS-401[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
 15. Schwannom, median sinir, tuzak sendromu Fatih Yakar, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Burak Bahadır, Serdar Solmaz, Koral Erdoğan, Eyüp Bayatlı, Mustafa Cemil Kılınç, Serdar Solmaz, Murat Büyüktepe, Ümit Eroğlu, Gökmen Kahiloğulları, EPS-402[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
 16. Yassı hücreli larinks tümörünün üst torakal vertebra metastazı: olgu sunumu Fatih Yakar, Ümit Eroğlu, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Orkhan Mammadkhanlı, Eyüp Bayatlı, Emre Yağız Sayacı, Serdar Solmaz, Mustafa Cemil Kılınç, Burak Bahadır, Murat Büyüktepe, Mustafa Ağahan Ünlü, EPS-474[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016

17. Pnömoreşi Fatih Yakar, Ümit Eroğlu, Murat Zaimoğlu, Mehmet Özgür Özateş, Orkhan Mammadkhanlı, Koral Erdoğan, Serdar Solmaz, Eyüp Bayatlı, Emre Yağız Sayacı, Mustafa Cemil Kılınç, Hasan Çağlar Uğur, EPS-475[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016
18. İdrar inkontinansı ile seyreden intradural araknoid kist: olgu sunumu Fatih Yakar, Ümit Eroğlu, Mehmet Özgür Özateş, Murat Zaimoğlu, Serdar Solmaz, Burak Bahadır, Mustafa Cemil Kılınç, Eyüp Bayatlı, Emre Yağız Sayacı, Mustafa Büyüktepe, Hasan Çağlar Uğur, EPS-496[Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi], Türk Nöroşirurji Derneği 30. Bilimsel Kongresi, 2016

X- Bilimsel Etkinlikleri Aldığı burslar Ödüller Projeleri Verdiği konferans ya da seminerler Katıldığı paneller

1. Türk Nöroşirurji Derneği, 2017 yılı Yılın sözlü bildirisi ödülü, Pediatrik Olgularda Endoskopik Transnazal Yol: Avantajları ve Dezavantajları – 40 Olgu İçin Değerlendirme

XI- Aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri ve organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

1. TNDER Nöroonkolojik ve Nörovasküler Cerrahi Öğretim ve Eğitim Grubu Birleşik Sempozyumu, İstanbul-Türkiye, 6 - 8 Aralık 2012
2. Pediatrik Nöroşirürji Öğretim ve Eğitim Grubu Pediatrik Nöroşirürji Kursu 6. Dönem 1. Kurs, 9 - 12 Mayıs 2013, Abant-Bolu- Türkiye
3. Pediatrik Nöroşirürji Öğretim ve Eğitim Grubu Pediatrik Nöroşirürji Kursu 6. Dönem 2. Kurs, 30 Nisan - 3 Mayıs 2014, Gaziantep-Türkiye

4. Spinal Cerrahi Eğitim Programı 5. Dönem I. Modül, 26 - 29 Haziran 2014, Gaziantep-Türkiye
5. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroanatomî Toplantısı, 17 Ocak 2014, Ankara-Türkiye
6. Pediatrik Nöroşirürji Öğretim ve Eğitim Grubu Pediatrik Nöroşirürji Kursu 6. Dönem 3. Kurs, 19-22 Mart 2015, İstanbul-Türkiye,
7. Controversies and Solutions in Neurosurgery, EANS 2017, Venice, Italy
8. Kafa kaidesi meningiomları, TURNOG, İstanbul, 2015
9. Türk Nöroşirürji Derneği, Temel Nöroşirürji Kursları, Dönem 4, 1. Kurs, Çeşme, İzmir BEYİN, OMURİLİK, OMURGA ve PERİFERİK SİNİR “ONKOLOJİK CERRAHİ”, 16-20 Mart, 2016
10. Türk Nöroşirürji Derneği 31. Ulusal Kongresi, 2017
11. XVI. WFNS, İstanbul, 2017

EK

ETİK KURUL KARARI



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

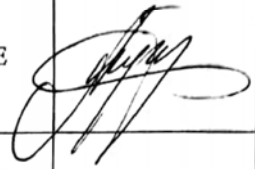
TOPLANTI TARİHİ : 11/03/2015
TOPLANTI NO : 2015-4
DOSYA NO : 2014-99
KARAR NO : 2015-4-87

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 17/12/2014 tarih ve 2014-23-153 sayılı kararı iptal edilerek, Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Ayhan Attar'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Op.Dr.Devrim Seçinti ve Dr.Murat Zaimoğlu'nun katıldığı, " "Antibakteriyel metal iyonu" kaplanmış implantların biyo güvenliliğinin incelenmesi " başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 63
Geçerlilik Süresi : 01/01/2015-01/05/2015

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Türhi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	