

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİTANYUM DİOKSİT VE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

BEYTULLAH ATKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ADİYAMAN, 2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİTANYUM DİOKSİT VE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Beytullah ATKAN

Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
Yıl : 2022, Sayfa sayısı: 41

Jüri : Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
Doç. Dr. Murat GENÇ
Dr. Öğr. Üyesi Esra BARIM

Bu çalışmada, ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) glutatyon redüktazı (GR), titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO_2 NP'lerinin) ve çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO NP'lerinin) 0, 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L (ppm) konsantrasyonlarına *in vitro* olarak maruz bırakılmıştır. TiO_2 NP'lerinin 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde glutatyon redüktaz enzim aktivitesindeki yüzde değişimler sırasıyla -3,12 ; -0,87 ; -2,12 ; -2,12 ve -1,50 olduğu hesaplanmıştır. ZnO NP'lerinin 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde glutatyon redüktaz enzim aktivitesindeki yüzde değişimler sırasıyla -2,01 ; +1,88 ; +0,38 ; -2,51 ve +0,75 olduğu hesaplanmıştır. Bu çalışmada, TiO_2 NP'lerin ve ZnO NP'lerin konsantrasyonları arttırıldığında, kontrol gruplarına kıyasla GR enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığını gözlemlenmiştir ($p > 0.05$, $N=3$). Sonuç olarak, TiO_2 ve ZnO NP'leri, GR üzerine herhangi bir inhibisyon yapmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon Redüktaz; Nanopartikül; Titanyum Dioksit Nanopartikülü; Çinko Oksit Nanopartikülü.

ABSTRACT

MSc Thesis

COMPARISON OF THE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES ON GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME ACTIVITIES

Beytullah ATKAN

Adiyaman University
Graduate Education Institute
Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ
Year : 2022, Number of pages: 41

Jury : Assoc. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ
Assoc. Prof. Dr. Murat GENÇ
Asst. Prof. Dr. Esra BARIM

In this study, baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glutathione reductase (GR) were exposed to 0, 25, 50, 100, 250 and 500 mg/L (ppm) concentrations of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in vitro. Percentage changes in glutathione reductase enzyme activity under the effect of 25, 50, 100, 250 and 500 ppm TiO₂ NPs were -3.12 ; -0.87 ; -2.12 ; -2.12 and -1.50 respectively. Percentage changes in glutathione reductase enzyme activity under the influence of 25, 50, 100, 250 and 500 ppm ZnO NPs were -2.01 ; +1.88 ; +0.38 ; -2.51 and +0.75 respectively. In this study, it was observed that when the concentrations of TiO₂ NPs and ZnO NPs were increased, there was no statistically significant change in GR enzyme activities compared to the control groups ($p > 0.05$, N=3). In conclusion, TiO₂ and ZnO NPs did not exert any inhibition on GR.

Key Words: Glutathione Reductase; Nanoparticle; Titanium Dioxide Nanoparticle; Zinc Oxide Nanoparticle.

DESTEKLER

Bu tez çalışması, Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ADYUBAP) tarafından FEFYL/2020-0003 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Titanyum Dioksit ve inko Oksit Nanopartiküllerinin Glutasyon Redüktaz Enzim Aktiviteleri  zerine Etkilerinin Karşılaştırılması” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Beytullah ATKAN
 mza

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Hasan KARADAĞ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde bilimsel desteklerinden dolayı Adıyaman Üniversitesi Kimya Bölümü hocalarımdan hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm çalışmalarımda maddi manevi her zaman yanımda olan sevgili eşim Kevser ATKAN'a, beni bu günlere kadar en güzel şekilde yetiştirmeye çalışan annem Melehat ATKAN'a ve babam Hamdi ATKAN'a ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen eniştem Cem TAŞTAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak Yüksek lisans projemize maddi ve manevi olarak destek olan Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına, ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Beytullah ATKAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	2
2.1. Nanoteknolojinin Tanımı.....	2
2.1.1. Tıp Sektörü	2
2.1.2. Tekstil Sektörü	3
2.1.3. Veri İşleme ve Depolama	3
2.1.4. Otomotiv	3
2.1.5. Enerji ve Elektrik Üretimi.....	3
2.1.6. Güvenlik ve Koruma Sektörü.....	4
2.1.7. Gıda Sektörü.....	4
2.2.Nanopartiküller.....	4
2.2.1.Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartikülleri.....	4
2.2.2.Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri.....	6
2.3.Glutatyon Redüktaz Enzimi.....	7
2.4.TiO ₂ ve ZnO Nanopartiküllerinin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.....	8
2.5. Çalışmanın Önemi.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Kimyasallar.....	10
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Protein Tayini	11
3.2.2. Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	12
3.2.3. Enzim ve Nanopartiküllerin Etkileşimi	12
3.2.4. İstatistik	12
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	13
4.1. Bulgular.....	13
4.1.1. TiO ₂ Nanopartiküllerinin Glutatyon Redüktaz Üzerine Etkisi.....	13
4.1.2. ZnO Nanopartiküllerinin Glutatyon Redüktaz Üzerine Etkisi	14
4.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Analizleri.....	16
4.1.3.a) ZnO Nanopartiküllerinin TEM Analizi.....	16

4.1.3.b) TiO ₂ Nanopartiküllerinin TEM Analizi.....	16
4.1.4. Tane Büyüklüğü Ölçümü (Zeta Sizer) and TEM Analizleri.....	18
4.1.5. İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Analizleri.....	19
4.2. Tartışma.....	20
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	22
5.1. Sonuçlar.....	22
5.2. Öneriler.....	22
KAYNAKLAR.....	23
KİŞİSEL BİLGİLER.....	29



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 TiO ₂ NP'lerinin GR aktivitesine etkileri.....	13
Çizelge 4.2 ZnO NP'lerinin GR aktivitesine etkileri.....	15
Çizelge 4.3 Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ve Tane Büyüklüğü Ölçümü (Zeta Sizer) ile TiO ₂ ve ZnO nanoparçacıklarının karakterizasyonu.....	18



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Titanyum dioksitin kristal yapıları.....	5
Şekil 2.2	Hekzagonal çinko oksit yapısı.....	7
Şekil 2.3	Glutasyon redüktazın üç boyutlu yapısı	8
Şekil 3.1	GR protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik	11
Şekil 4.1	TiO ₂ NP'lerinin GR aktivitesine etkileri.....	14
Şekil 4.2	ZnO NP'lerinin GR aktivitesine etkileri.....	15
Şekil 4.3	ZnO nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.....	16
Şekil 4.4	TiO ₂ nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.....	17

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

eV	: Elektronvolt
pH	: Hidrojen derişiminin eksi logaritması
K	: Kelvin
kDa	: Kilo Dalton
μ	: Mikro
μ L	: Mikrolitre
μ mol	: Mikromol
mL	: Mililitre
UV	: Morötesi

Kısaltmalar

ALT	: Alanin transaminaz
ALP	: Alkalın fosfataz
AST	: Aspartat Aminotranferaz
ZnO	: Çinko Oksit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GR	: Glutasyon redüktaz
CAT	: Katalaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NP	: Nanopartikül
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat redükte
GSSG	: Okside glutasyon
GSH	: Redükte glutasyon
SOD	: Süperoksid dismutaz
TiO ₂	: Titanyum dioksit

1.GİRİŞ

Glutasyon redüktaz (GR) (E.C.1.8.1.7) ilk kez 1951’de tanımlanmıştır. GR enzimi indirgenmiş piridin nükleotidleri ve disülfür substratları arasındaki elektron transferini katalizlemektedir.



GR enziminin en büyük amacı hücredeki GSH/GSSG oranını korumaktır. Eritrosit hücrelerinde bu oran 500/1 civarındadır. Oran düştüğü takdirde eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır [1]

Titanyum yer kabuğunda en çok bulunan dokuzuncu elementtir. Titanyum dioksit, geçiş metal oksitleri ailesinin bir üyesidir. Kokusuz beyaz toz halindedir. 79,9 g/mol molekül ağırlığına, 2972 °C kaynama noktasına, 1843 °C erime noktasına, 25 °C’de 4.26 g/cm³ yoğunluğuna sahiptir. Derişik sülfürik asit ve hidroflorik asitte yüksek sıcaklıklarda çözülebilir [2]

ZnO, genellikle kokusuz beyaz bir toz olarak görünen anorganik bir bileşik [3] olup, 100 nanometreden daha küçük çaplara sahiptir. Boyutlarına ve yüksek katalitik aktivitelerine göre daha geniş bir yüzey alanına sahiptirler. Çinko oksit nanoparçacıklarının fiziksel ve kimyasal özellikleri, sentezlendikleri farklı yollara bağlı olarak farklı özellik gösterirler [4].

Bu çalışmada titanyum dioksit ve çinko oksit nanopartiküllerinin glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması incelenmiştir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Nanoteknoloji ve Tanımı

Nanoteknoloji farklı tanımlara sahip olsa da genel olarak aynı anlamı taşımaktadır. Nanoteknoloji kelimesi 1974 yılında yayınlanan bir makalede Norio Taniguchi tarafından ilk kez kullanılmıştır. Nanoteknoloji “malzemelerin atom ya da molekül olarak işlenmesi, ayrılması, bir araya getirilmesi ve parçalanması” olarak tanımlanmıştır [5].

Nanoteknolojiyi bu kadar ilginç yapan şey; malzemelerin nano boyutta olduklarından, makro dünyadan farklı davranmalarıdır. Kuantum etkileri nedeniyle malzemeler nano ölçekte farklı özellikler gösterirler. Örneğin külçe halindeki altın, diğer maddelerle reaksiyona girmek istemezken, nano boyutlu altın için tam olarak tersi görülmektedir. Bu özelliğinden dolayı bilim insanları, maddelerin nano ölçekli hallerini araştırarak problemlere çözüm bulmaya çalışmaktadırlar [6].

Nanoteknolojinin avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

- Her atomu tam olarak istediğiniz alana yerleştirme olanağı
- Atom düzeyinde fizik ve kimya yasalarının meydana getirebileceği her malzemeyi üretme imkanı,
- Ekonomik sıkıntı olmadan üretim imkanı [7].

2.1.1.Tıp Sektörü

Nano boyutlu gereç ve cihazların gelişmesi ile eski teknolojik cihazlara kıyasla vücudumuz ve canlı sistemlerimiz hakkında daha detaylı çözümleme ve buluşlar yapmak olası hale gelmiştir. [8].

2.1.2.Tekstil Sektörü

Nanoteknoloji ile tekstil malzemelerine birçok özellik eklenebilmektedir. Bunlar; bilgi ve enerji depolama, UV radyasyonu yakalama, iletişim ve korumadır [9].

2.1.3.Verİ İşleme ve Depolama

Nanoteknoloji, bilgisayarlar için ultra yüksek tümleşik mantık üretimi, ultra yüksek depolama yoğunluğu, minyatürleştirilmiş yığın bellekleri ve yeni, kalıcı, yüksek performanslı çalışma bellekleri potansiyelini açar. [10].

2.1.4.Otomotiv

Nanoteknoloji otomotiv alanında da uygulama alanı bulmaktadır. Örneğin;

- Araba lastiklerinde dolgu maddesi olarak,
- Ekranlar ve aynalar için yansıma önleyici kaplamalar olarak,
- Aynalar ve ekranlar için buhar önleyici kaplama olarak hidrofilik yüzey kaplamalarında,
- İlerlemiş yakıt hücresi teknolojisi ve hidrojen depolama alanlarında (inceleme aşamasında) kullanılması için çalışmalar devam etmektedir [10].

2.1.5.Enerji ve Elektrik Üretimi

Pil elektrotlarında yüksek yüzey alan oranlı karbon nanotüplerin kullanılması, diğer geleneksel yöntemlere kıyasla çok yüksek ve verimli bir elektrik çıkışı sağlar. Ayrıca yakıt hücrelerinin verimliliğini artırmak için nano mühendislik malzemeleri kullanır. Yeni nesil yakıt pilleri de evler, işyerleri ve hatta fabrikalar gibi daha büyük yapılarda elektrik üretme gücüne ulaşmıştır. [10].

2.1.6.Güvenlik ve Koruma Sektörü

Savunma sanayi ile yakından ilgili olan yeni keşiflerin daha küçük boyutlarda üretilmesi, onları taşınabilir ve hareketli hale getirmiş ve tek tek elde edilmesini basitleştirmiştir. İnsan vücuduna dışarıdan gelebilecek her türlü tehlikeye karşı koruma teknolojileri güncel olarak yerini almaktadır [10].

2.1.7.Gıda Sektörü

Nanoteknolojinin gıda sektöründe de uygulamaları vardır. Gıdaların raf ömrünü, tazeliğini, güvenliğini ve kalitesini artırmaya olanak sağlayan, nanopartiküllerle güçlendirilmiş, gaz geçirgenliği düşük polimerlerin kullanımı bu uygulamalar arasındadır [10].

2.2. Nanopartiküller

Nanoboyutlu madde olarak isimlendirilen bu yapıların üstünde durulmasının ana nedeni, maddelerin hacimsel özelliklerinden farklı olarak belirli bir boyut aralığında olağandışı özellikler ve işlevsellik göstermeleridir [11,12].

100 nm ve altındaki tanecikler olarak tanımlanan nanoparçacıklar, nano boyutlu malzemelerin ve bundan dolayı nanoteknolojinin kaynağını meydana getirmektedir. [12,13]. Bu parçacıklar, genellikle diğer maddelere göre üstün özellikler gösterirler. Çoğunlukla söz edilen nanoparçacık özelliklerinin çekiciliğinin önemli nedeni özellikle yüksek yüzey/hacim oranıdır [14].

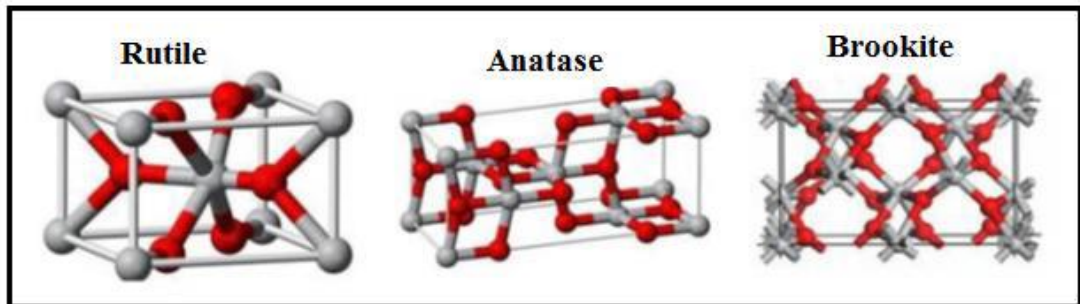
2.2.1.Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartikülleri

Titanyum dioksit, doğal olarak çeşitli kayalarda ve mineral kumlarında bulunmaktadır. Doğal olarak oluşan titanyum dioksit kırmızı kahverengimsi görünümündedir. Bu renk, toplam titanyum içeriğinin %10'una karşılık gelen demir, krom, vanadyum ve zirkonyum kontaminasyonundan kaynaklanmaktadır [15].

Titanyum yer kabuğunda en çok bulunan dokuzuncu elementtir. Titanyum dioksit, geçiş metal oksitleri ailesinin bir üyesidir. Kokusuz beyaz toz halindedir. 79,9 g/mol molekül ağırlığına, 2972 °C kaynama noktasına, 1843 °C erime noktasına, 25 °C’de 4.26 g/cm³ yoğunluğuna sahiptir. Titanyum dioksit suda, seyreltik asitlerde ve yaygın organik çözücülerde tamamen çözülmez. Derişik sülfürik asit ve hidroflorik asitte yüksek sıcaklıklarda çözülebilir[2].

Geniş bant aralığına sahip bir yarı iletkenidir. Anatas, rutil, brokit formları için bant aralıkları sırasıyla 3.2, 3.02 ve 2.96 eV’dur. Bu nedenle, anatas formunda diğer formlardan daha yüksek foto aktivite gösterir. Anatas ve rutilin valans bant enerjileri düşük seviyelerde olduğu için hem anatas hem de rutilinin valans bandında oluşan boşluklar yüksek oksidasyon gücüne sahiptir. Bant aralığı enerjilerinden dolayı anatas sürekli n tipi yarı iletken özelliği gösterirken, rutil kararsız p tipi yarı iletken özelliği gösterir. Bununla birlikte, anatas-rutil faz dönüşümlerinden dolayı titanyum dioksit 1200 K sıcaklıkta ve yüksek oksijen atmosferinde n ve p tipi geçişli bir yarı iletken olarak sınıflandırılır. Rutil, yoğun atomik yapısı ve yüksek yoğunluğundan dolayı diğer polimorfik yapılardan daha serttir (Mohs sertliği: 6.5-7.0). Anatas rutilden daha serttir (Mohs sertliği 5.5) [16].

Titanyum dioksit nanopartiküller çok ince titanyum dioksit, nano kristal titanyum dioksit ya da mikro kristal titanyum dioksit olarak da isimlendirilirler. Titanyum dioksit partiküllerin çapı 100 nm’den daha küçüktür. Doğal olarak oluşabildiği gibi sentetik kaynaklardan da elde edilebilirler. Titanyum dioksitin sahip olduğu kristal yapı, üretim metoduna ve sıcaklığına bağlıdır. En yaygın üç kristal yapısı anatas, rutil ve brokittir (Şekil 2.1) [17].



Şekil 2.1 Titanyum dioksitin kristal yapıları [17]

2.2.2.Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri

ZnO, genellikle kokusuz beyaz bir toz olarak görünen anorganik bir bileşik [3] olup, 100 nanometreden daha küçük çaplara sahiptir. Boyutlarına ve yüksek katalitik aktivitelerine göre daha geniş bir yüzey alanına sahiptirler. Çinko oksit nanoparçacıklarının fiziksel ve kimyasal özellikleri, sentezlendikleri yollara bağlı olarak farklı özellik gösterir [4].

Ultraviyole (UV) ışığı etkili bir şekilde emdikleri ve görünür ışığa tamamen şeffaf olacak kadar geniş bir bant aralığına sahip oldukları için kullanılırlar. ZnO nanoparçacıklarının en yaygın kullanımı güneş kremidir [18]

Birçok çalışma çinko oksit nanoparçacıklarının ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağladığını göstermiştir. Aynı zamanda antioksidan ve antibakteriyel etkileri olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca, gıda ambalajlarında gıdaların raf ömrünün uzatılmasında koruyucu olarak ve diş macunlarında koyulaştırıcı olarak da kullanılır [19].

ZnO nanoparçacıkları, UV dalga boyu aralığındaki absorpsiyon özellikleri nedeniyle güneş kremlerinde ve kozmetiklerde de kullanılmaktadır. [20].

ZnO nanopartiküllerinin bu kadar geniş kapsamlı kullanılmasını mümkün kılan, geniş bant aralıklı yarı iletkenliği, yüksek mekanik, termal ve kimyasal kararlılığı, yüksek bağlanma enerjisi, fiyatının yüksek olmaması, elektriksel karakteri ve elverişli elementlerle katkıldığında yüksek iletkenlik özellikleri göstermesidir [21,22].

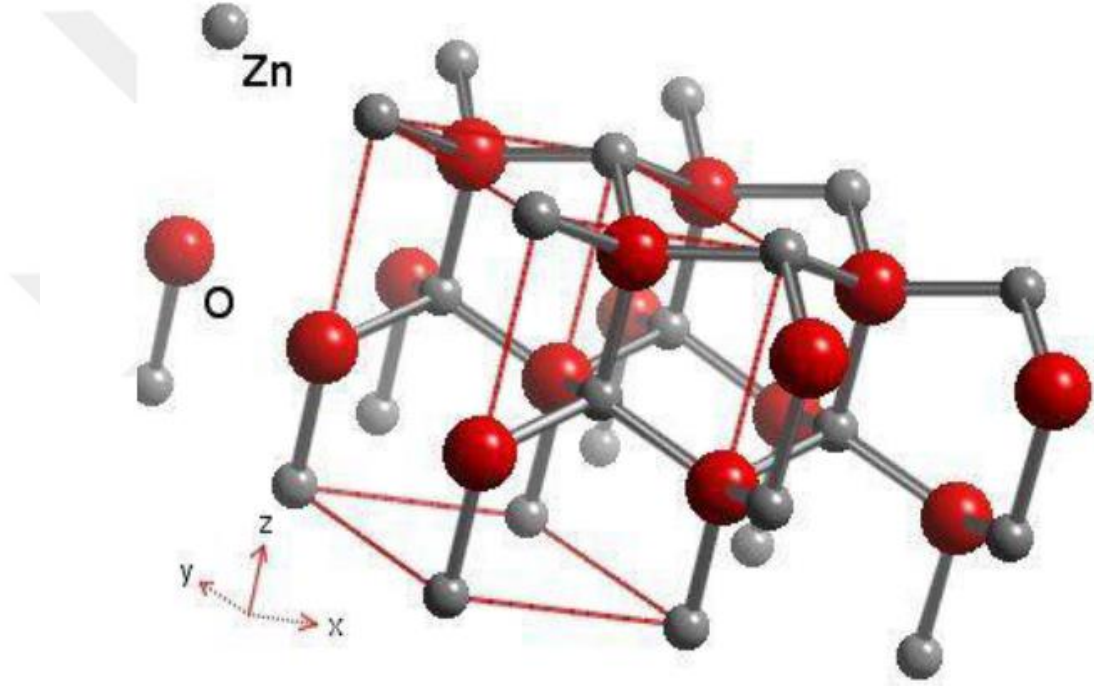
ZnO nanoparçacıklarının, titanyum dioksit nanoparçacıkları ve silikon dioksit nanoparçacıkları ile birlikte en çok üretilen üç nanomalzemeden biridir [23,24,25].

Çinko oksidin toksik olmadığı geleneksel konseptte yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak ZnO nanoparçacıkları üzerindeki toksikolojik çalışmalar uygulama oranlarının gerisinde kalmıştır [26].

Literatürde, ZnO'nun memeli hücrelerinde genotoksitesinden ve etkilerinden bahseden çalışmalar varken [27,28,29,30], in vivo ve in vitro test sistemlerinde genotoksiteye neden olmadığını gösteren halihazırdaki çalışma da mevcuttur [31].

Tekstil gibi UV koruyucu malzemelerde zararlı mikroorganizmaları yok etme amacına yönelik çalışmalar da devam etmektedir [32].

Hekzagonal kristal yapılı ZnO (Şekil 2.2), 81,4 g/mol atom ağırlığına, 5,6 g/cm³ yoğunluğa, 1975 °C erime noktasına ve 40,3 J/mol K ısı kapasitesine sahiptir [33].



Şekil 2.2 Hekzagonal çinko oksit yapısı [33]

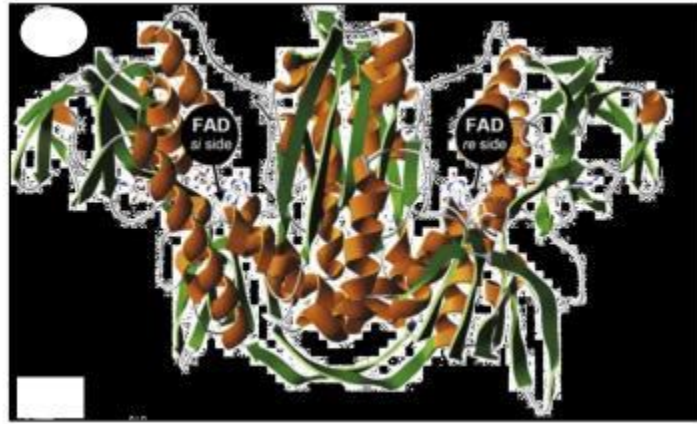
2.3. Glutasyon Redüktaz Enzimi

Glutasyon redüktaz enzimi (GR) (E.C.1.8.1.7) ilk kez 1951’de tanımlanmıştır. GR enzimi indirgenmiş piridin nükleotidleri ve disülfür substratları arasındaki elektron transferini katalizlemektedir. GR enziminin en büyük amacı hücredeki GSH/GSSG oranını korumaktır. Eritrosit hücrelerinde bu oran 500/1 civarındadır. Oran düştüğü takdirde, eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır [1].

Hücre içindeki glutasyon (GSH), indirgenme yükseltgenme olayında önemli bir role sahiptir. Ayrıca glutasyon redüktaz enzimi, GSH/GSSG oranını arttırarak hücre içindeki –SH /–SS oranını korumayı, başarmaktadır [34].

Hüresel antioksidan sisteminin çok önemli bir enzimi olan glutasyon redüktaz, okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş hale (GSH), NADPH bağımlı bir

mekanizma ile indirger. 1935 yılından itibaren birçok hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan GR enzimi saflaştırılmıştır. Prostetik grup olarak iki FAD molekülü taşıyan GR enzimi, homodimerik yapıda bir flavoproteindir. NADPH tarafından FAD grupları indirgenir. Dimerik olan enzimin mol kütlesi yaklaşık 100-120 kDa arasında değişmektedir. Enzimin stabilitesi ve ısıya dayanıklı enzim olduğu çeşitli organizmalarda incelenerek bulunmuştur [35].



Şekil 2.3 Glutasyon redüktazın üç boyutlu yapısı [36]

2.4. TiO₂ ve ZnO Nanopartiküllerinin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Yapılan bazı çalışmalarda nanopartiküllerin enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Bunlara örneğin, Mahboob ve ark. [37] yaptığı çalışmada, TiO₂ nanopartiküllerinin 1 ve 2 mg/L'nin *Clarias gariepinus* (karabalık)'taki kas antioksidan sistemi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. TiO₂ NP'lerine maruz kalan balıklarda SOD, CAT, GR, GPx ve GST aktivitelerinin, kontrole kıyasla önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Alkaladi [38] yaptığı çalışmada, Nil Tilapiasını 1 ve 2 mg/L ZnO NP'lerine maruz bırakmıştır. Glutasyon (GSH) miktarının azaldığını ve glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon-S-transferaz (GST) aktivitelerinin ise inhibe olduğunu belirlemiştir. Canlı ve ark. [39] Oral gavaj (0, 0.5, 5, 50 mg / kg vücut ağırlığı / gün) yoluyla olgun dişi sıçanlara Al₂O₃, CuO ve TiO₂ nanopartiküller 14 gün boyunca uygulamıştır. Veriler, Al₂O₃'in parametreler dışında, birkaç vaka dışında bir değişikliğe neden olmadığını, CuO ve TiO₂ uygulanan

sıçanlarda katalaz ve süperoksid dismutaz aktiviteleri önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda nanopartiküllerin enzim aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Palandökenli; *Oreochromis niloticus*'un kan dokusunda ZnO nanoparçacıkları ve ZnSO₄'ün biyokimyasal parametreler ve enzim aktivitesi üzerindeki tesirleri üzerine çalışmıştır [40]. Balıkları 4 ve 28 gün boyunca 0,5 mg / L ve 1,5 mg / L ZnO NP ve 0,5 mg / L ve 1,5 mg / L ZnSO₄ ile etkileştirmişlerdir. 28 günün sonunda hem ZnSO₄ hemde ZnO NP ile etkileştirilen balıkların enzim aktivitelerinde (Alkalen fosfataz, Aspartat aminotrasferaz, Alanin aminotransferaz ve laktat dehidrojenez) artma olduğunu belirlemişlerdir. Connolly ve ark. [41] nanopartikül ZnO'nun (Çinko oksit) yüksek konsantrasyonun etkisinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusunda etoksiresorufin O-Deetilaz (EROD) aktivitesinin arttığını bulmuşlardır.

2.5. Çalışmanın Önemi

UV radyasyonunu önlemek için güneş koruyucu kremlerde TiO₂ nanopartikülleri ve ZnO nanopartikülleri kullanılmaktadır. Bu nanopartiküllerin kazara yutulmasından veya cildin aşınmış veya kızarıklık bölgelerine güneş kremi uygulanmasından kaynaklanan potansiyel riskler vardır. Güneş kremi yıkandığında nanopartiküller akan suya girebilir ve besin zincirine girebilir [42,43]. Bu nedenlerle bu nanopartiküllerin GR üzerindeki etkilerinin araştırılması uygun görülmüştür.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Saflığı % 99,995 olan (Titanyum (IV) oksit) rutil yapıdaki titanyum dioksit nanopartikülleri ve % 99,5 saflığa sahip küresele yakın çinko oksit nanopartikülleri Nanography Nanotechnology, Ankara, Türkiye'den temin edilmiştir. Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glutathione reductase, Sigma-Aldrich'ten elde edilmiştir. L-glutathione oxidized $\geq$ %98, Serva'dan elde edilmiş, β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt $\geq$ % 95 ise, Roth'tan elde edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar analitik derecedeydi.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

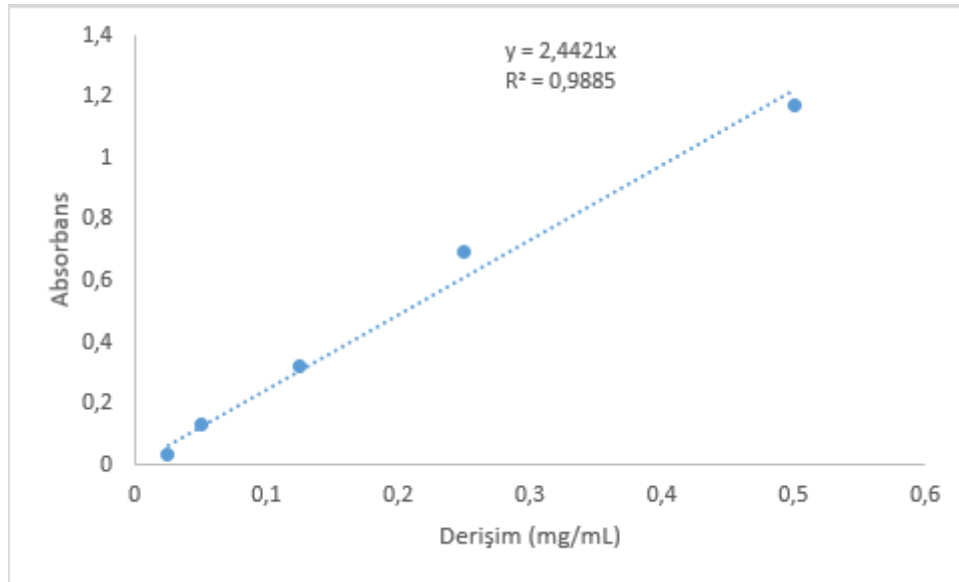
Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM), nanopartikül görüntüsü, TEM (Hitachi High-Tech HT7700) kullanılarak, zeta boyutu, polidispersite indeksi, potansiyel ve hareketlilik iletkenliği, Malvern Zetasizer Nano ZSP kullanılarak, gerçek titanyum ve çinko miktarları, İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Agilent 7800 Quadrupole ICP-MS kullanılarak belirlenmiştir.

Aktivite tayinleri, Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji ve Kimya Bölümü cihazları olan inkübatörlü UV-1800 UV-VİS Shimadzu Spektrofotometre, Thermo Scientific Orion 2-Star pH Metre, otomatik pipet, Ohaus Adventurer Pro Elektrikli Analitik Terazisi, ISOLAB ultrasonik banyo, Protech Etüv, Regal No Frost Buzdolabı ve Velp Scientifica Vortex kullanılarak belirlenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

Glutatyon redüktazın (GR) protein konsantrasyonu, Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre (1951) 750 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [44]. GR konsantrasyonunu belirlemek için standart olarak sığır serum albümini kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu amaçla dört çözelti hazırlandı, yani (A): 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 g sodyum sitrat dihidrat 100 mL distile su içinde çözülmüş; (B): 2 g Na_2CO_3 ve 0,4 g NaOH mL distile su içinde çözündürülmüş ve 100 mL'ye yine distile su ile tamamlanmış; (C): 100 mL B solüsyonuna 2 mL A solüsyonu eklenmiş ve (D): 15 mL distile suya 15 mL Folin–Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Daha sonra 0,5 mL GR çözeltisine 2,5 mL C çözeltisi eklenmiş, çalkalanmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 0,25 mL D çözeltisi eklenmiş, çalkalanmış, 30 dakika inkübe edilmiş ve GR konsantrasyonunun belirlenmesi için 750 nm'de okunmuştur.



Şekil 3.1 GR protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik

3.2.2. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi

GR aktivitesi, UV-1800 UV-VIS inkübe edilmiş spektrofotometre (Shimadzu Scientific Instruments) kullanılarak belirlenmiş ve absorbanstaki değişiklikler, 37°C'de GSSG tarafından NADPH'nin NADP⁺'ya oksidasyonu sırasında 340 nm'de okunmuştur (Carlberg ve Mannervik 1975) [45]. 1 mL'lik reaksiyon sistemi, 1,0 mM GSSG, 0,12 mM NADPH ve 0,10 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,6) içermiştir. Bir ünite (U) GR aktivitesi, bu koşullar altında 1 µmol NADPH/dk'nın GR tarafından oksidasyonu olarak tanımlanmıştır. 340 nm'de NADPH'nin milimolar ekstiksiyon katsayısı 6,22 olarak alınmıştır. Önce GR aktivitesi U/mL olarak hesaplanmış, ardından GR'nin spesifik aktivitesi U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Enzim ve Nanopartiküllerin Etkileşimi

TiO₂ nanopartiküllerin (NP) veya ZnO NP'lerin iki adet 5000 mg/L stok çözeltisi 2 mL distile su içinde hazırlanmış, vortekslenmiş ve agregatları önlemek için ultrasonik banyoda (ISOLAB) 25°C, 50 kHz ve 60 W'da 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra distile suda 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L TiO₂ ve ZnO NP lerin konsantrasyonları ayarlanmış ve potasyum fosfat tamponu pH 7,6'da hazırlanan 700 µL GR solüsyonu eklenmiştir. Bu konsantrasyonlar *in vitro* enzim aktivitelerini belirlemek için kullanılmıştır (Karadağ 2021) [46]. Kontrolde veya 0 mg/L konsantrasyonda, 700 µL GR çözeltisine 300 µL distile su ilave edilmiştir. Karışımlar, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve GR aktiviteleri, 37°C ve 340 nm'de spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.4. İstatistik

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Student–Newman–Keul's testi ve SPSS versiyon 22 ile yapılmıştır.

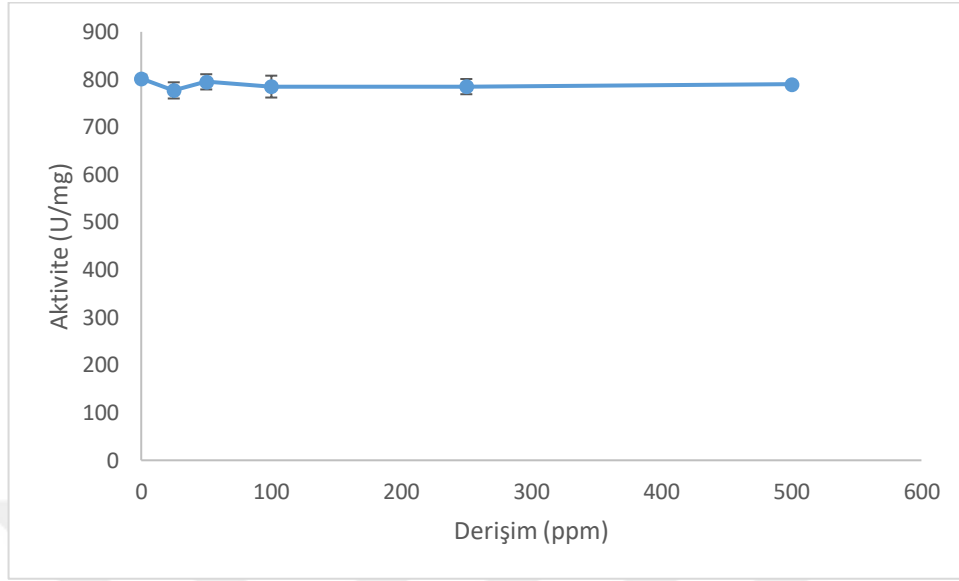
4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. TiO₂ Nanopartiküllerinin Glutasyon Redüktaz Üzerine Etkisi**

TiO₂ nanopartiküllerinin 0'dan 500 ppm'e kadar derişimlerinin GR üzerindeki etkileri değeriendirilmiştir. Sonuç verileri çizelge 4.1 ve şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 TiO₂ NP'lerinin GR aktivitesine etkileri

Derişim (ppm)	Aktivite ± Standart sapma (U/mg)
0	802±8 ^a
25	777±17 ^a
50	795±16 ^a
100	785±23 ^a
250	785±16 ^a
500	790±0 ^a

Çizelgedeki "a" harfi, "kontrol ile karşılaştırıldığında aktivite seviyeleri arasında istatistiksel bir fark olmadığını gösterir (p > 0.05, N=3).



Şekil 4.1 TiO₂ NP'lerinin GR aktivitesine etkileri

TiO₂ Nanopartiküllerinin derişiminin artmasıyla GR enzim aktivitesinde hafif bir azalma olmuş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p > 0.05$, $N=3$). 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm TiO₂ nanopartiküllere maruz kalma ile GR aktivitelerinin yüzde değişimler -3,12 ; -0,87 ; -2,12 ; -2,12 ve -1,50 olarak belirlenmiştir.

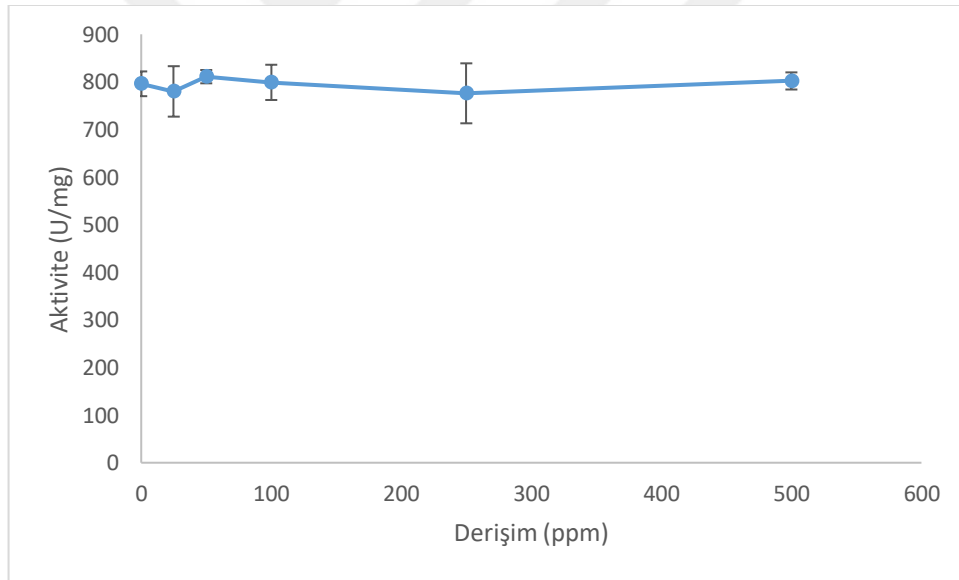
4.1.2. ZnO Nanopartiküllerinin Glutatyon Redüktaz Üzerine Etkisi

ZnO Nanopartiküllerinin 0'dan 500 ppm'e kadar derişimlerinin GR üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç verileri çizelge 4.2 ve şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 ZnO NP'lerinin GR aktivitesine etkileri

Derişim (ppm)	Aktivite $\pm$ Standart sapma (U/mg)
0	796 $\pm$ 26 ^a
25	780 $\pm$ 53 ^a
50	811 $\pm$ 14 ^a
100	799 $\pm$ 37 ^a
250	776 $\pm$ 63 ^a
500	802 $\pm$ 18 ^a

Çizelgedeki “a” harfi, “kontrol ile karşılaştırıldığında aktivite seviyeleri arasında istatistiksel bir fark olmadığını gösterir ($p > 0.05$, $N=3$).

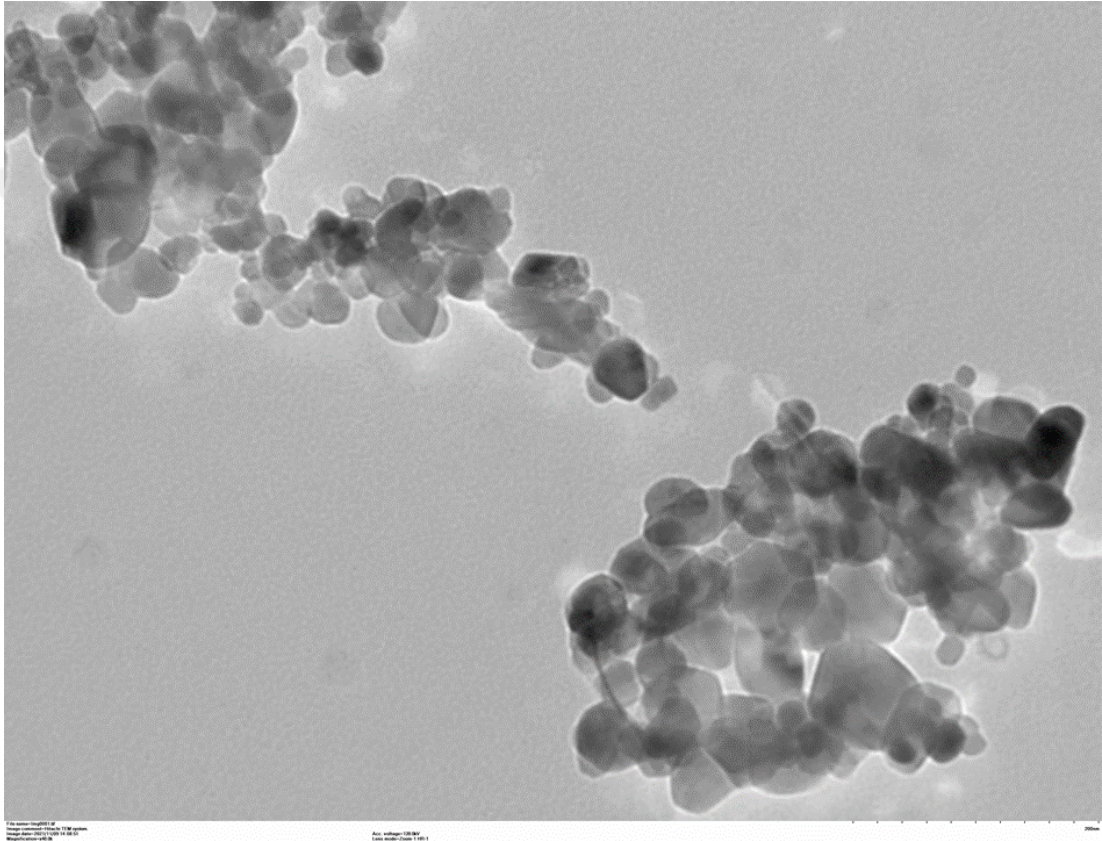


Şekil 4.2 ZnO NP'lerinin GR aktivitesine etkileri

ZnO Nanopartiküllerinin derişiminin artmasıyla GR enzim aktivitesinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p > 0,05$, $N=3$). 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm ZnO nanopartiküllere maruz kalma ile GR aktivitelerinin yüzde değişimler -2,01 ; +1,88 ; +0,38 ; -2,51 ve +0,75 olarak belirlenmiştir.

4.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri**a) ZnO Nanopartiküllerinin TEM Analizi**

ZnO nanopartiküllerinin büyüklüğü TEM ile 41 ± 8 nm bulunmuştur.

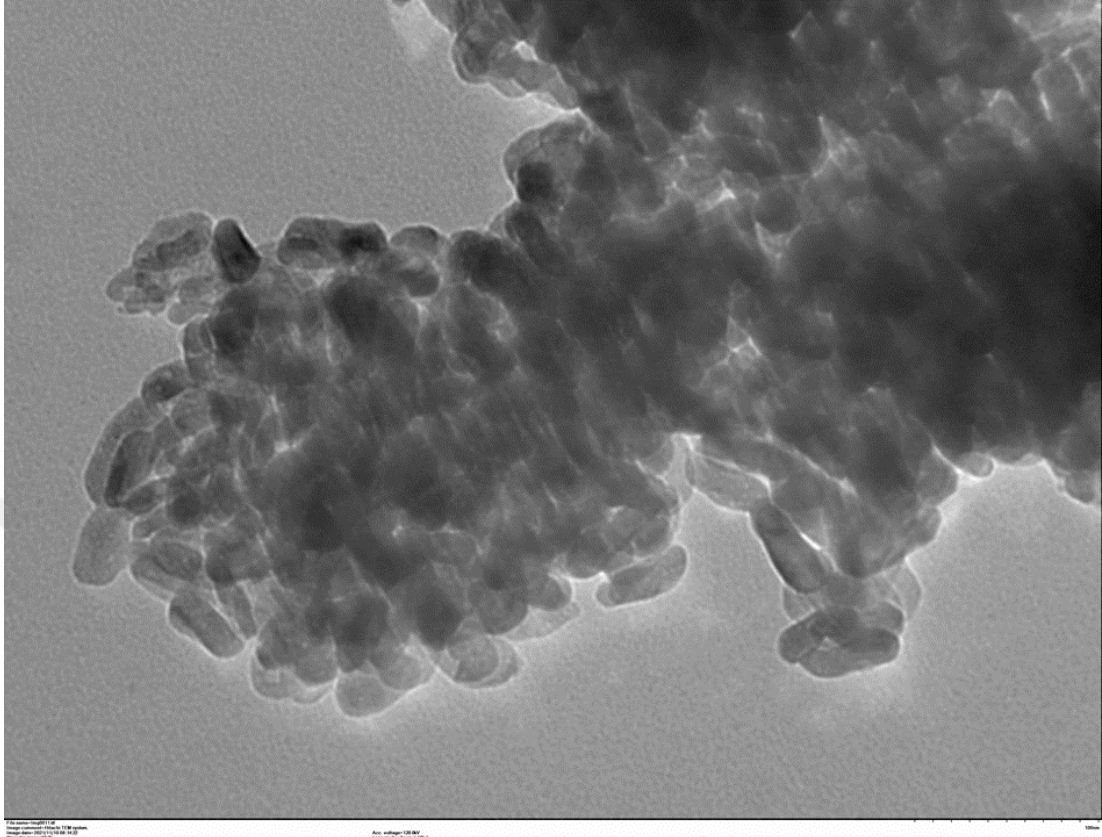


Şekil 4.3 ZnO nanopartiküllerinin TEM görüntüsü

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülünden 0,1 g alınarak saf suda çözülmüş, seyreltilmiş, sonikasyon 15-20 dakika yapılmış, karbon girit (ızgara) üzerine alınıp hava ortamında kurutulmuş ve TEM analizi yapılmıştır.

b) TiO₂ Nanopartiküllerinin TEM Analizi

TiO₂ nanopartiküllerinin büyüklüğü TEM ile 44 ± 7 nm bulunmuştur.



Şekil 4.4 TiO₂ nanopartiküllerinin TEM görüntüsü

Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülünden 0,1 g alınarak saf suda çözölmüş, seyreltilmiş, 15-20 dakika sonikasyon yapılmış, karbon girit (ızgara) üzerine alınıp hava ortamında kurutulmuş ve TEM analizi yapılmıştır.

4.1.4. Tane Büyüklüğü Ölçümü (ZetaSizer) and TEM Analizleri

Çizelge 4.3 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) ve Tane Büyüklüğü Ölçümü (ZetaSizer) ile TiO₂ ve ZnO nanoparçacıklarının karakterizasyonu

Nanopartiküllerin parçacık özellikleri	Yöntem	TiO ₂ NP'leri	ZnO NP'leri
Ortalama boyut (nm)	ZetaSizer ^a	28 ^a	30-50 ^a
Parçacık boyutu dağılımı (nm)	TEM	44 ± 7 ^b	41 ± 8 ^b
Parçacık boyutu dağılımı (nm)	ZetaSizer	2091 ± 37 ^b	3049 ± 110 ^b
Polidispersite İndeksi (PDI)	ZetaSizer	0.365 ± 0.088 ^b	0.711 ± 0.490 ^b
Zeta Potansiyeli (mV)	ZetaSizer	-2.55 ± 1.19 ^b	4.09 ± 0.44 ^b
Hareketlilik (µmcm/Vs)	ZetaSizer	-0.2003 ± 0.0931 ^b	0.3204 ± 0.0338 ^b
İletkenlik (mS/cm)	ZetaSizer	0.0201 ± 0.0036 ^b	0.0278 ± 0.0003 ^b

Değerler ortalama ± standart sapmadır. ^aNanography Nanotechnology'den alınan bilgi, Ankara, Türkiye, ^bTiO₂ NP'lerin ve ZnO NP'lerin seyreltik bir çözeltisi 25 °C'de distile su içinde hazırlanmıştır. Numuneler ölçümlerden önce vortekslenmiş ve ultrasonik banyoda inkübe edilmiştir.

4.1.5. İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Analizleri**a) Ortama asit eklenmeden ICP-MS analiz sonucu;**

100 ppm TiO₂ de bulunan Ti dan çözünen % Ti miktarı;

% 0,231 ± 0,003 ya da % 0,23 ± 0,00 Ti

Tespit limiti (LOD) = 0,00525 ppm Ti

Miktar tayin limiti (LOQ)= 0,01750 ppm Ti

Bu oran TiO₂ den titanyumun çok az oranda iyonlaştığını göstermektedir.

Asit eklenmeden 100 ppm ZnO de bulunan Zn dan çözünen % Zn miktarı;

% 2,028 ± 0,083 ya da % 2,03 ± 0,08 Zn

LOD= 0,1990 ppm Zn

LOQ= 0,6634 ppm Zn

Bu oran ZnO ten çinkonun az oranda iyonlaştığını fakat titanyuma göre daha fazla iyonlaştığını göstermektedir.

Geri Kazanım:

100 ppb Ti ve 100 ppb Zn eklenerek elde edilen % geri kazanım;

Ti % geri kazanım= % 96,94 ± 0,46 ya da % 96,9 ± 0,5

Zn % geri kazanım= % 99,34 ± 0,50 ya da % 99,3 ± 0,5

b) Ortama % 2 HNO₃ asit eklenip ICP-MS analiz sonucu;

100 ppm TiO₂ olarak hazırlanan çözeltide ICP-MS te ölçülen TiO₂ oranı:

% 45,978 ± 5,274 ya da % 45,98 ± 5,27 ya da % 46,0 ± 5,3 TiO₂

LOD= 9,483 ppm Ti

LOQ= 31,610 ppm Ti

100 ppm ZnO olarak hazırlanan çözeltide ICP-MS te ölçülen ZnO oranı:

%97,398 ± 1,541 ya da % 97,40 ± 1,54 ya da % 97,4 ± 1,5 ZnO

LOD= 3,714 ppm Zn

LOQ= 12,380 ppm Zn

4.2. Tartışma

Yapılan bazı çalışmalarda nanopartiküllerin enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Bunlara örnek olarak, Mahboob ve ark. [37] yaptığı çalışmada, TiO₂ nanopartiküllerinin 1 mg/L ve 2 mg/L'nin *Clarias gariepinus* (karabalık)'taki kas antioksidan sistemi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. TiO₂ NP'lerine maruz kalan balıklarda SOD, CAT, GR, GPx ve GST aktivitelerinin kontrole kıyasla önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Alkaladi [38] yaptığı çalışma sonucunda, Nil Tilapiasını 1 mg/L ve 2 mg/L ZnO NP'lerine maruz bırakmıştır. Glutasyon (GSH) miktarının azaldığını ve glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon-S-transferaz (GST) aktivitelerinin ise inhibe olduğunu belirlemiştir. Canlı ve ark. [39] Oral gavaj (0, 0.5, 5, 50 mg / kg vücut ağırlığı / gün) yoluyla olgun dişi sıçanlara Al₂O₃, CuO ve TiO₂ nanopartiküllerinin 14 gün boyunca uygulamışlardır. Veriler, Al₂O₃'in parametreler dışında, birkaç vaka haricinde bir değişikliğe neden olmadığını, CuO ve TiO₂ uygulanan sıçanlarda ise katalaz ve süperoksid dismutaz aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, nanopartiküllerin, enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Palandökenler; *Oreochromis niloticus*'un kan dokusunda ZnO nanoparçacıkları ve ZnSO₄'ün biyokimyasal parametreler ve enzim aktivitesi üzerindeki tesirleri üzerine çalışmıştır [40]. Balıkları 4 ve 28 gün boyunca 0,5 mg / L ve 1,5 mg / L ZnO NP ve 0,5 mg / L ve 1,5 mg / L ZnSO₄ ile etkileştirmişlerdir. 28 günün sonunda hem ZnSO₄ hemde ZnO NP ile etkileştirilen balıkların enzim aktivitelerinde (Alkalen fosfataz, Aspartat aminotrasferaz, Alanin aminotransferaz ve laktat dehidrojenez) artma olduklarını belirlemişlerdir. Connolly ve ark. [41] Nanopartikül ZnO'nun (Çinko oksit) yüksek konsantrasyonun etkisinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusunda etoksiresorufin O-Deetilaz (EROD) aktivitesinin arttığını bulmuşlardır.

Bizim çalışmamıza benzer sonuçlar ise Fırat ve Bozat [47] tarafından *in vivo* olarak gözlemlenmiştir. Bu araştırmacılar, *Oreochromis niloticus*'un (tatlı su balığı) solungaçındaki GR enzim aktivitesinin, 4 gün boyunca 1,0 mg/L TiO₂ NP'lerine maruz kalmasının ardından önemli bir değişiklik göstermediğini bulmuşlardır (p > 0,05).

Titanyum dioksit ve çinko oksit nanopartiküllerinin glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerine etkilerini karşılaştırdığımızda; TiO₂ nanopartiküllerinin derişiminin artmasıyla GR enzim aktivitesinde hafif bir azalma olmuş, 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm TiO₂ nanopartiküllere maruz kalma ile GR aktivitelerinin yüzde değişimler -3,12 ; -0,87 ; -2,12 ; -2,12 ve -1,50 olarak belirlenmiş, buna karşın, ZnO nanopartiküllerinin derişiminin artmasıyla GR enzim aktivitesinde, 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm ZnO nanopartiküllere maruz kalma ile GR aktivitelerinde yüzde değişimler -2,01 ; +1,88 ; +0,38 ; -2,51 ve +0,75 gibi hafif azalış ve artışlar belirlenmiş, her iki durumda da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır (p > 0.05, N=3).

Yaptığımız çalışmada, titanyum dioksit ve çinko oksit nanopartiküllerinin glutatyon redüktaz aktiviteleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmadığını gözlemlemedik. Bu, güneş koruyucu kremler gibi birçok alanda kullanılan titanyum dioksit ve çinko oksit nanopartiküllerinin, *in vitro* olarak glutatyon redüktaz enzim aktivitesi açısından zararlı olmadığı sonucunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER**5.1. Sonuçlar**

1. TiO₂ nanopartiküllerinin derişiminde artma olurken GR aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.
2. TiO₂ nanopartikülleri önemli bir inhibisyon yapmamıştır.
3. ZnO nanopartiküllerinin derişiminde artma olurken GR aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.
4. ZnO nanopartikülleri önemli bir inhibisyon yapmamıştır.

5.2. Öneriler

1. Başka metal oksit nanopartiküllerinin GR'ye olan etkileri çalışılabilir.
2. TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin başka antioksidan enzimler üzerine olan etkileri çalışılabilir.
3. TiO₂ ve ZnO nanopartiküllerinin *in vitro* çalışmalarına ek olarak *in vivo* çalışmaları da yapılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] E. Keha, Ö. İ. Küfrevioğlu. *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi, 2000.
- [2] H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao, "Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data", *Part Fibre Toxicol*, vol.10, pp. 1-33, 2013.
- [3] K. Ueda, H. Tabata, and T. Kawai, "Magnetic and electric properties of transition-metal-doped ZnO films", *Applied Physics Letters*, vol. 79(7) pp. 988-990, 2001.
- [4] S.S. Kumar, P. Venkateswarlu, R. V. Rao, G. N. Rao, "Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles", *International Nano Letters*, vol. 3 no. 1, pp. 30, 2013.
- [5] N. Taniguchi, C. Arakawa, And T. Kobayashi, "On The Basic Concep nano Technology" *In Proceedings Of The International Conference On Production Engineering*, 1974-8, Vol. 2, pp. 18-23, 1974.
- [6] D. Westen, T. Bontoux, "The London Centre for Nanotechnology", *Nanomedicine*, vol. 4 no. 8, pp. 869-73, 2009.
- [7] A. Villaverde, "Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories", *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 53, pp. 1-4, 2010.
- [8] C. M. Ralph, "Nanotechnology and Medicine", *Advances in Anti- Aging Medicine*, pp. 277- 286, 1996.
- [9] "Nanotechnology and Lifestyle", Sto.nato.int, file:///C:/Users/leo/Downloads-/EN-AVT-129-04%20(2).pdf. [Erişim tarihi: 10- Temmuz- 2022].
- [10] "International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology", Pf-mh.uvt.rnu.tn/, http://pf-mh.uvt.rnu.tn/455/2_International_Strategy_and_Foresight_Report_on_Nanoscience_and_Nanotechnology.pdf. [Erişim tarihi: 11- Temmuz- 2022].

- [11] A. Goldstain, *Handbook of Nanophase Materials*, New York: Marcel Dekker Inc, 1997.
- [12] C.N.R Rao, A. Müller, A.K. Cheetham, *The Chemistry of Nanomaterials*. Weinheim: WILEY-VCH, 2005.
- [13] J. C. Miller, R. Serrato, J. M. Represas-Cardenas and G. Kundahl, *The Handbook of Nanotechnology*, Hoboken. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [14] V. T. Liveri, *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems*. New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006.
- [15] Brittain, H G., Barbera, G., DeVincentis, J., et al. Titanium dioxide. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. New Brunswick: Academic Press, 1992
- [16] T. Bak, J. Nowotny, M. Rekas, C.C. Sorrell, "Defect chemistry and semiconducting properties of titanium dioxide: II. Defect diagrams", *J Phys Chem Solids*, vol. 64 no. 7, pp. 1057-1067, 2003.
- [17] R. J. B. Peters, G. Bommel, Z.H. Rivera, J.P.F.G. Helsper, H.J.P Marvin, S. Weigel, P. Tromp, A.G. Oomen, A. Rietveld "Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, pp. 6285-6293, 2014.
- [18] R. Kessler, "Engineered Nanoparticles in Consumer Products: Understanding a New Ingredient", *Environmental Health Perspectives*. Vol. 119, no 3, pp. A120–A125, 2011.
- [19] "Literature review – explosion hazards associated with nanopowders", Hse.gov.uk, http://www.hse.gov.uk/research/hsl_pdf/2004/hsl04-12.pdf. [Erişim tarihi: 1- Temmuz- 2022].

- [20] S. Manzo, M. L. Miglietta, G. Rametta , S. Buono, G. Di Francia, “Embryotoxicity and Spermiotoxicity of Nanosized ZnO for Mediterranean Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*”, *Journal of Hazardous Materials*,; vol. 254-255: pp. 1-9, 2013.
- [21] R. Romeo, D. Leinen, E. A. Dalchiele, J.R Ramos-Barrado and F. Martin, “The effects of zinc acetate and zinc chloride precursors on the preferred crystalline orientation of ZnO and Al-doped ZnO thin films obtained by spray Pyrolysis”, *The Solid Films*, vol. 5151, pp. 1942-1949, 2006.
- [22] B. Ergin, E. Ketenci. and F. Atay, “Characterization of ZnO films obtained by ultrasonic spray pyrolysis technique”, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 34, no:12 pp. 5249-5254, 2009.
- [23] Y. Zhang, Y.R. Leu, R. J. Aitken, M. Riediker, "Inventory of Engineered Nanoparticle-Containing Consumer Products Available in the Singapore Retail Market and Likelihood of Release into the Aquatic Environment". *International Journal of Environmental Research and PublicHealth*. Vol. 12 no.8, pp. 8717-8743, 2015.
- [24] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, B. Nowack, "Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world", *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 14 no. 9 pp. 1109, 2012.
- [25] A. A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva, S. Suh, "Global life cycle releases of engineered nanomaterials", *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 15 no. 6 pp. 1692, 2013.
- [26] R. Roy, S. K. Singh, L. K. S. Chauhan, M. Das, A. Tripathi, P.D. Dwivedi, “Zinc Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis by Enhancement of Autophagy Via PI3K/Akt/mTOR Inhibition”, *Toxicology Letters*,; vol. 227 no. 1, pp. 29-40, 2014.
- [27] V. Sharma , R. K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar , M. Das, A. Dhawan, “DNA Damaging Potential of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Epidermal Cells”, *Toxicol Letter*, vol. 185, no. 3, pp. 211-218, 2009.

- [28] S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, M. Burghartz, R. Hagen, N. Kleinsasser, "Cytotoxic, Genotoxic and Pro-Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Nasal Mucosa Cells In Vitro", *Toxicology In Vitro*, vol. 25, no. 3, pp. 657- 663, 2011.
- [29] S. Hackenberg, F. Z. Zimmermann, A. Scherzed, G. Friehs, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, M. Burghartz, R. Hagen, N. Kleinsasser, "Repetitive Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles Induces DNA Damage in Human Nasal Mucosa Mini Organ Cultures", *Environmental and Molecular Mutagenesis*,; vol. 52, no. 7, pp. 582-589, 2011.
- [30] E. Demir, H. Akça, B. Kaya, D. Burgucu, O. Tokgün, F. Turna, S. Aksakal, G. Vales, A. Creus, R. Marcos, "Zinc Oxide Nanoparticles: Genotoxicity, Interactions with UV-Light and Cell- Transforming Potential", *Journal of Hazardous Materials*, vol 264, no. 15, pp. 420-429, 2014.
- [31] J. Y. Kwon, S. Y. Lee, P. Koedrith, J. Y. Lee, K. M. Kim, J. M. Oh, S. I. Yang, M. K. Kim, J. K. Lee, J. Jeong, E. H. Maeng, B. J. Lee, Y. R. Seo, "Lack of Genotoxic Potential of ZnO Nanoparticles in In Vitro and In Vivo Tests", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 761 pp. 1-9, 2014.
- [32] L. Wang, A. J. Ryan, "Introduction to electrospinning", *Electrospinning for Tissue Regeneration*, Elsevier, pp. 3–33, 2011.
- [33] E. Arığ. "Nanoyapıda Çinko Oksit Partiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2010
- [34] F. Toribio, E. Martinez-Lara, P. Pascual, J. Lopez-Barea, "Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 684, no. 1-2, pp. 77-97, 1996.
- [35] B. Tandoğan, N. N. Ulusu, "Kinetic mechanism and moleküler properties of glutathione reductase. *Fabad J. Pharm. Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 230-237, 2006.

- [36] M. Deponte, “Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, vol. 1830, no. 5, pp. 3217-3266, 2013.
- [37] S. Mahboob, K.A. Al-Ghanim and N.M.A. Al-Mulhim, “Fish exposure to sub-lethal toxicity of nano-titanium oxide and changes in muscular antioxidant enzymes and protective role of vitamins c and e in *Clarias gariepinus*”, *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 19, no. 6, pp. 1505–1510, 2017.
- [38] A. Alkaladi, “Vitamins E and C ameliorate the oxidative stresses induced by zinc oxide nanoparticles on liver and gills of *Oreochromis niloticus*”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 2, pp. 357–362, 2019.
- [39] E. G. Canlı, G. Atli, M. Canlı, “Response of the antioxidant enzymes of the erythrocyte and alterations in the serum biomarkers in rats following oral administration of nanoparticles”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 50, pp.145–150, 2017.
- [40] E.Palandökenlier ”Çinko oksit nanopartikülleri ve çinko sülfatın *Oreochromis niloticus*’un kan dokusunda bazı biyokimyasal parametreler ve enzim aktiviteleri üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 2019.
- [41] M. Connolly, M. Fernández, E. Conde, F. Torrent, J M Navas, M.L. Fernández-Cruz “Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout” *Science of the Total Environment*, vol. 551-552, pp. 334–343, 2016.
- [42] R. Kessler , “Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient”, *Environ Health Persp*, vol. 119, no. 3, pp. A120–A125, 2011.
- [43] Zhang Y, Leu Y, Aitken RJ, Riediker M “Inventory of engineered nanoparticle-containing consumer products available in the Singapore retail market and likelihood of release into the aquatic environment”, *Int J Env Res Pub He*, vol. 12, no. 8, pp. 8717–8743, 2015.
- [44] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr ve R.J. Randall, “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.

- [45] I. Carlberg ve B. Mannervik, “Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, no. 14, pp. 5475–5480, 1975.
- [46] H. Karadag, “Inhibition of Glutathione Reductase Activity from Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) By Copper(II) Oxide Nanoparticles and Copper(II) Chloride”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 106, no. 4, pp. 647-651, 2021.
- [47] Ö. Fırat, R.C. Bozat “Assessment of biochemical and toxic responses induced by titanium dioxide nanoparticles in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*”, *Hum Ecol Risk Assess*, vol. 25, no. 6, pp. 1438-1447, 2019.

