

**TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİ İLE GIDA
BİLEŞENLERİNİN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN
TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES AND FOOD
COMPONENTS**

Nurdan ERSÖZ

Doç. Dr. F. CEYDA DUDAK ŞEKER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

'Her başlangıçta yeni bir anlam vardır.'

Tüm emekçi kadınlara..

ÖZET

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİ İLE GIDA BİLEŞENLERİNİN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

NURDAN ERSÖZ

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER

Ocak 2023, 88 sayfa

Belirli boyut, biçim ve yüzey özelliklerine sahip olacak şekilde tasarlanan nanopartiküller, özelleştirilmiş fonksiyonları sayesinde tıp, fizik, kimya ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Gıdaların teknolojik özelliklerini geliştirmek amacıyla gıda katkıları olarak kullanılan bazı metal nanopartiküllerin (gümüş, demir, çinko) insan sağlığına zararları ortaya konulmuştur. Tez çalışmasında özellikle 1.5-6 yaş aralığındaki çocukların tükettiği gıdalarda yüksek miktarda bulunan farklı çaplardaki (30 nm, 100 nm ve 250 nm) TiO₂ nanopartiküllerinin gerçek gıda ortamı olarak süt ile etkileşimi incelenmiştir. Bu etkileşimin, nanopartikül morfolojisi, partikül yüzey yükü, korona yapısı ve toksik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. İlk aşamada, süt ortamının iyonik yükünü taklit eden tamponda nanopartiküllerin davranışı izlenmiş ve 30 nm, 100 nm ve 250 nm çaplarındaki partiküller için sırasıyla 2900.3 ± 411.9 nm; 3271.0 ± 131.2 nm ve 2276 ± 347.7 nm büyüklüklerinde agregat yapıları tespit edilmiştir. Nanopartiküller süt ile etkileştiğinde, ortamda bulunan bileşenlerin agregat büyüklüklerinde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, oluşan korona yapısı SDS-PAGE ile incelendiğinde, bu yapıda büyük oranda kazein proteinleri olduğu tespit edilmiştir. İkinci aşama olarak tez çalışması kapsamında, gıda ve tampon ortamında bulunan TiO₂ nanopartiküllerine sindirim simülasyonu uygulanmış, sindirim sürecinde partiküllerin geçirdiği değişimler takip edilmiştir. Bu süreçte tampon ortamındaki nanopartiküllerin

ağızdan, mide ve barsak ortamına gidildikçe agregat çaplarının kucldğ gözlenmiştir. Süt ortamında ise nanopartikül agregat çaplarının sindirim öncesinde de olduğu gibi azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte tampon ortamındaki nanopartiküllerin üzerinde yeni bir korona yapısı gözlenmiştir. Ayrıca, TiO₂ nanopartiküllerinin sindirim ortamlarındaki diğer bileşenler ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla, nanopartiküllerle etkileşmiş sindirim enzimlerinin aktiviteleri llmştir. Bu noktada nanopartiküllerin amilaz enzimi aktivitesini azaltmadığı, pepsin enzimi üzerinde sadece tampon ortamında aktivite azalmasına neden olduğu ve lipaz enziminde hem tampon ortamında hem de gıda ortamında aktivite azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Son aşamada farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin sindirim sonrası sitotoksik etkileri memeli ve bakteri hücreleri üzerinde incelenmiştir. Nanopartiküllerin Caco-2 hücresinin canlılığına etkisini doza bağlı gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca 3 farklı çaptaki nanopartiküller hücre canlılığına tampon ortamında etki etmezken, gıda ortamında hücre canlılığını azaltmıştır. Nanopartiküllerin oksidatif stres öncülü etkisinin incelendiği analizlere göz atıldığında çapı 30 nm olan nanopartiküller memeli hücresi üzerinde tampon ortamında ciddi bir stres oluştururken bu etki gıda ortamında azalmıştır. apı 100 nm olan nanopartiküller oksidatif stres nclnnn üretilmesine yüksek konsantrasyonlarda hem gıda hem tampon ortamında neden olmuştur. 250 nm çapındaki nanopartikülünün oksidatif stres etkisi yalnızca tampon ortamında ölçülürken, gıda ortamında stres etkisi azalmıştır. Nanopartiküllerin bakteri hücresinin üzerine etkileri incelendiğinde etkilerin yine doza bağlı ve tampon ortamında fazla olduğu gözlenmiştir. Bakteri hücresi üzerinde en fazla stres etkisi tampon ortamdaki 250 nm çapındaki nanopartiküller ile llmştir, bu etki gıda ortamında azalmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan korona yapısının farklılığının sitotoksik etkilerini değiştirdiği gözlenmiştir. Tez alışması sonucunda TiO₂ nanopartikülünün gerçek gıda ortamındaki davranışı ve bu davranışın sindirim sürecindeki değişimi ilk kez incelenmiştir. Böylece nanopartikülün gıda bileşenleri, sindirim enzimleri ile sindirim epitel hücresi ve bakteri hücreleri gibi farklı hücreler ile etkileşimi hakkında detaylı bilgi edinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Titanyum dioksit, Nanopartikül, Sindirim simülasyonu, Sitotoksosite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES AND FOOD COMPONENTS

NURDAN ERSÖZ

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER

January 2023, 88 pages

Engineered nanoparticles have led to their use in a variety of fields, including physics, chemistry, medicine, and agriculture. Some metal nanoparticles (silver, iron, zinc) used as food additives to improve the technological properties of foods have been shown to harm human health. In this study, the interaction of TiO₂ nanoparticles of different diameters (30 nm, 100 nm and 250 nm) with milk as a real food medium, which is found in high amounts in the foods consumed by children aged 1.5-6 years, was investigated. The effects of milk on nanoparticle morphology, particle surface charge, corona structure and cytotoxicity were studied. Firstly, the behavior of the nanoparticles in the buffer simulating the ionic charge of the milk medium (whole, skim and serum) was analysed and hydrodynamic diameters for particles with diameters of 30 nm, 100 nm and 250 nm were found 2900.3 ± 411.9 nm, 3271.0 ± 131.2 nm and 2276 ± 347.7 nm, respectively. When the nanoparticles interacted with the milk, the aggregate sizes of the medium's components decreased. However, when the corona structure was examined, it was discovered that it contained a high proportion of casein proteins with SDS-PAGE. The second step of the thesis study digestion simulation applied to TiO₂ nanoparticles in the food and buffer mediums and the changes in the particles were measured during digestion. The aggregate diameters of the nanoparticles in the buffer decreased from the mouth to

the stomach and intestinal mediums. The diameters of the nanoparticle aggregates decreased in the milk medium, as they did before digestion. Additionally a new corona structure has been detected on nanoparticle surface in buffer medium after digestion. Furthermore, the activities of digestive enzymes that interact with the nanoparticles were measured to investigate the interaction of TiO₂ nanoparticles with other components during digestion. At this point, it was determined that the nanoparticles did not reduce the activity of the amylase enzyme, caused a decrease in the activity of the pepsin enzyme only in the buffer medium, and caused a decrease in the activity of the lipase enzyme in both the buffer and milk. In the final step, the cytotoxic effects of digested TiO₂ nanoparticles of various diameters on mammalian and bacterial cells were examined. The effect of nanoparticles on the viability of the Caco-2 cell was found to be dose-dependent. Additionally, while nanoparticles of three different diameters had no effect on cell viability in buffer medium, they had an adverse effect on it in food medium. According to the results of the oxidative stress precursor effect of nanoparticles, nanoparticles with a diameter of 30 nm cause significant stress on mammalian cells in the buffer, but not in the food medium. At high concentrations, nanoparticles with a diameter of 100 nm also caused the production of oxidative stress precursors in both food and buffer mediums. While the oxidative stress effect of the 250 nm diameter nanoparticle was only measured at high concentrations in buffer medium. When the effects of nanoparticles on bacterial cells were investigated, it was discovered that the effects were dose-dependent and occurred more in the buffer environment. The maximum stress effect on the bacterial cell was measured in the buffer medium with nanoparticles with a diameter of 250 nm; this effect decreased in the food medium. The differences between corona structures of buffer and food medium has affected the cytotoxicity of nanoparticles. With this study, the behavior of the TiO₂ nanoparticle in the real food environment and the change of this behavior in the digestion process were investigated for the first time. Thus, detailed information was obtained about the interaction of nanoparticle with food components, digestive enzymes and different cells such as digestive epithelial cells and bacterial cells.

Keywords: Titanium dioxide, nanoparticle, digestion simulation, cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Öncelikle kimi zaman yağmurlu kimi zaman oldukça güneşli fakat her zaman öğretici günler geçirdiğim ve hayatımın en önemli yolculuklarından biri olan doktora eğitimim boyunca ne zaman karanlıkta kalsam benden ışığını eksik etmeyen, her sohbetimizde zihnimde sayısız pencere açan ve sadece danışmanım değil yol göstericim olan sayın Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e teknik, psikolojik ve saymadığım her türlü desteği için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Kendimi ne zaman yorgun ve umutsuz hissetsem yolumu zeytin bahçesine çeviren, bana turuncu bir gün batımı izler gibi sevinç veren can dostlarım Kübra TAYYARCAN, Hafize Öz'e hayatıma kattıkları renkler ve başımı koyacak omuz oldukları için çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimime başlamamı sağlayan, bu yolda kaybetsek de elimi bırakmayan, bana desteğini bir şarkının satır aralarında bile hissettiğim, halimden anlayan Dr. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU'na teşekkür ederim. Gülmek kadar ağlamanın da arkadaşlığa dahil olduğunu yan yana bir ağaç altında tattığımız değerli arkadaşım Dr. Ecem Evrim ÇELİK'e desteği için çok teşekkür ederim.

Ansızın kaybettiğimiz, deliliğimi en çok kabul eden ve yaşımı çocuk bırakan sayın Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM'e lisansüstü eğitimim boyunca üzerimdeki emekleri için teşekkür eder, saygı ile anarım.

Çalışmalarım boyunca benden teknik ve psikolojik desteklerini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Merve ÇANGA, Nazım Sergen MISIRLI, Kamil URGUN, Esin BAYAN ve Berfin Ece ŞEN YEŞİLYURT'a çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini arkamda her zaman hissettiğim başta annem Firdes ERSÖZ'e, abim Cumhuriyet ERSÖZ ve Aslı ERSÖZ'e, ablam Aydan BEKTAŞ ve Emrah BEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Hayat ağacımın bahar dalları yeğenlerim Defne Su ERSÖZ, Belis Lina BEKTAŞ ve Yaman Ali BEKTAŞ'a bana verdikleri enerji için teşekkür ederim.

Ayrıca bana Ankara'da aile olan ÖZ, TAYYARCAN ve ÖZDEMİR ailelerine saygılarımı ve teşekkürlerimi iletirim.

Araştırma sürecim boyunca kapısını bana daima açık tutan Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak ŞEKER'e teşekkürü bir borç bilirim. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümün sayın öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve personeline verdikleri destek için teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca dostluklarıyla bana güç veren Dilara UÇAR SARIYILDIZ, Irmak SARIYILDIZ, Gözde ÖZDEMİR, Hakan ŞENGÜL, Ceren SÖZEN, Zeyneb GÜNEYSU, Mücahide KÖKSAL KAVRAK, İlkay Çisil KÖKSALDI, Merve YAVUZ, Sedef DİNÇER İNCE ve Eda KAVUKLU KÖSE'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca doktora yolculuğum boyunca ilk günden son ana kadar şarkılarıyla benimle olan Sezen AKSU'ya teşekkür ederim.

I am thankful to Tuğçe AYDOĞDU and Fatma KOÇ for making my life in Ireland more easy at home and portable when I had to work late hours at work. I want to thank to Rebecca KEARNS for boosting my energy. I feel so lucky to have your emotional support and kindness even I was unavailable to give them back to you during this stressful year. I am also grateful for the support of Dr. Diarmuid SHEEHAN, Dr. Kieran KILCAWLEY, MSc. David MANNION, MSc. Iwona SKIBINSKA, Dr. Monica A. MECHOUD, Thomas J. KELLY, Varsha JOSEPH and MSc. Fiona LYNCH.

Tez çalışması 1190505 proje kodu ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmalarım boyunca BİDEB 2211-C Öncelikli alanlar Yurtiçi Doktora Burs Programı ve YÖK 100/2000 Doktora Bursu ile destekledikleri için kurumlara teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	3
2.2. Nanopartiküller	5
2.3. Nanotoksosite.....	7
2.4. Nanopartiküllerde Korona Oluşumu	8
2.5. Titanyum Dioksit.....	10
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	14
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	14
3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	14
3.3. Süt Örneklerinin Kompozisyonu	16
3.4. Gıda Matrisinin Etkisi	16
3.5. Protein Korona Analizi.....	17
3.6. Sindirim Simülasyonu	18
3.7.Sindirim Enzimleri Aktivitesi.....	20
3.7.1 Amilaz Enzimi Aktivitesi	20
3.7.2 Pepsin Enzimi Aktivitesi	20
3.7.3 Lipaz Enzimi Aktivitesi.....	21
3.8. <i>in-vitro</i> Toksikite Analizleri.....	21
3.8.1. Hücre Bazlı Stres Etkisi Ölçümü.....	22

3.8.2. Barsak Epitel Hücresi Analizleri.....	22
3.9 İstatistik Analizleri	23
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	24
4.1. Gıda Ortamının TiO ₂ Nanopartikülleri Üzerine Etkileri.....	24
4.1.1. TiO ₂ Nanopartikülleri Karakterizasyonu	24
4.1.2. Gıda ortamındaki TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	27
4.1.3. Protein Korona Analizi	36
4.2. Sindirim Simülasyonunun Gıda ile Etkileşmiş TiO ₂ Nanopartikülleri Üzerine Etkileri	42
4.2.1. Nanopartiküllerin Sindirim Enzimleri Aktivitesi Üzerine Etkileri	54
4.3. Gıda ile Etkileşmiş TiO ₂ Nanopartiküllerinin Sitotoksik Etkileri.....	62
4.3.1 Hücre bazlı stres etkisi ölçümü	62
4.3.2. Barsak epitel hücresi analizleri.....	64
5. YORUM	70
6. KAYNAKLAR	73
EKLER	81
EK 1 - Grafikler	81
EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	84
EK 3- Tezden Türetilmiş Bildiriler	85
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	86
ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanopartikül ile sıkı ve gevşek korona yapısı. BioRender.com ile hazırlanmıştır.	10
Şekil 2.2. Titanyum içeren gıdalar [39]	11
Şekil 4.1. TiO ₂ nanopartiküllerine ait ESEM görüntüleri ve çap histogramları. A) 30 nm TiO ₂ (10kV, 80kX Büyütme), B) 100 nm TiO ₂ (10kV, 40kX Büyütme), C) 250 nm TiO ₂ (10kV, 20kX Büyütme).	25
Şekil 4.2. TiO ₂ nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri. A) 30 nm TiO ₂ , B) 100 nm TiO ₂ , C) 250 nm TiO ₂	26
Şekil 4.3. Farklı çaplardaki TiO ₂ nanopartiküllerinin XRD modeli (A, anataz; R, rutile).	26
Şekil 4.4. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden <i>in-situ</i> olarak elde edilen çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri	29
Şekil 4.5. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden <i>ex-situ</i> olarak elde edilen çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri	30
Şekil 4.6. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>in-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 10 kX büyütme)	31
Şekil 4.7. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>ex-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)	32
Şekil 4.8. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>in-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 20 kX büyütme).....	32
Şekil 4.9. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>ex-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı,	

C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)	33
Şekil 4.10. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>in-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)	33
Şekil 4.11. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin <i>ex-situ</i> ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO ₂ , B) Yağlı süt- TiO ₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO ₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO ₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)	34
Şekil 4.12. TiO ₂ nanopartikülüne ait protein korona yapısını gösteren ESEM görüntüsü. A) TiO ₂ (250 nm), B) Yağsız süt- TiO ₂ (250 nm). (10 kV; 160 kX büyütme)	34
Şekil 4.13. Yağsız süt örneği ile etkileştirilmiş 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerine ait STEM görüntüsü ve iki ayrı bölgeye ait EDX grafikleri.....	35
Şekil 4.14. Farklı çaplardaki TiO ₂ nanopartiküllerine ait protein korona yapısını gösteren TEM görüntüsü. Tampon ortamında A) 30 nm TiO ₂ , B) 100 nm TiO ₂ , C) 250 nm TiO ₂ , Yağsız süt ortamında D) 30 nm TiO ₂ , E) 100 nm TiO ₂ , F) 250 nm TiO ₂	36
Şekil 4.15. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05	38
Şekil 4.16. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05	39
Şekil 4.17. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05	40
Şekil 4.18. 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2:yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO ₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO ₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO ₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO ₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO ₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO ₂ (1.6 mg/mL)) a: αs-Kazein, b: β- Kazein, β-laktoglobulin	41

- Şekil 4.19. 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2: yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO₂ (1.6 mg/mL))..... 41
- Şekil 4.20. 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2: yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO₂ (1.6 mg/mL))..... 42
- Şekil 4.21. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO₂, B) Ağız ortamında yağlı süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂..... 49
- Şekil 4.22. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO₂, B) Ağız ortamında yağlı süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂..... 50
- Şekil 4.23. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO₂, B) Ağız ortamında yağlı süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂..... 51
- Şekil 4.24. Tampon ve gıda ortamındaki TiO₂ nanopartiküllerinin simüle barsak ortamından alınan örneklerinin TEM görüntüleri. A) 25 nm TiO₂, B) Yağlı süt + 25 nm TiO₂, C) 100 nm TiO₂, D) Yağlı süt + 100 nm TiO₂, E) 250 nm TiO₂, F) Yağlı süt + 250 nm TiO₂..... 52
- Şekil 4.25. Farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve sindirim sisteminden geçirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE

elektroforetogramlarına ait görüntüler (a: 30 nm, b:100 nm ve c:300nm TiO ₂ nanopartikülünü temsil etmektedir. 1: TiO ₂ +yağlı süt, 2: TiO ₂ +yağlı süt+ağız, 3: TiO ₂ +ağız, 4: ağız+yağlı süt (in situ), 5: ağız 6: marker, 7: TiO ₂ +yağlı süt+mide, 8: TiO ₂ +mide, 9: yağlı süt+ mide (in situ), 10: mide, 11: TiO ₂ +yağlı süt+barsak, 12: TiO ₂ +barsak, 13: yağlı süt+ barsak (in situ),14: barsak) a: α s-Kazein, b: β -Kazein, β -laktoglobulin	54
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlarda 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.	55
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.	56
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.	57
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05	58
Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05	59
Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05	59
Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05	60
Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05; **:p<0.01	61
Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05; **:p<0.01	61
Şekil 4.35. Farklı çaplardaki TiO ₂ nanopartiküllerinin floresan <i>E.coli</i> üzerindeki stres etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 0.4 mg/mL, Turuncu: 4mg/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt	63
Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1 μ m/mL, Turuncu: 100 μ m/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt	65
Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1 μ m/mL, Turuncu: 100 μ m/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt	65

Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1µm/mL, Turuncu: 100µm/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt	66
Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1µm/mL, Turuncu: 100µm/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt.	67
Şekil 4.40. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1µm/mL, Turuncu: 100µm/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt.	68
Şekil 4.41. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO ₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1µm/mL, Turuncu: 100µm/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt.	68
EK1-Şekil 1. Teknik kazein çözeltisi kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	81
Ek 1-Şekil 2. TiO ₂ yüzeyinden alınan EDX spektrumu.....	82
Ek 1-Şekil 3. TiO ₂ korona üzerinden alınan EDX spektrumu.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sık kullanılan gıda katkı maddeleri [2]	4
Çizelge 3.1. Elektrofore sistemine yüklenen örneklerin yükleme tampon içeriği.....	18
Çizelge 3.2. Simüle edilmiş sindirim sıvılarının bileşimi* (100 mL çözelti için).....	19
Çizelge 4.1. TiO ₂ nanopartiküllerinin anataz ve rutil kristal formlarının ağırlıkça yüzdesi	26
Çizelge 4.3. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden <i>in-situ</i> olarak elde edilen zeta potansiyeli değerleri	29
Çizelge 4.4. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden <i>ex-situ</i> olarak elde edilen zeta potansiyeli değerleri	30
Çizelge 4.6. Sindirim simülasyonunun ağız ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri.....	44
Çizelge 4.7. Sindirim simülasyonunun mide ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri.....	46
Çizelge 4.8. Sindirim simülasyonunun barsak ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO ₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri.....	48

ŞİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μ	Mikro
v:v	Hacim/hacim

Kısaltmalar

TiO ₂	Titanyum Dioksit
DLS	Hidrodinamik Çap
BSA	Sığır Serum Albümini
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEM	Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (mod)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
CO ₂	Karbondioksit
DCFH-DA	2',7'- diklorodihidrofloresin Dasetat
MTT	3-(4,5-dimetil-tiyazolil)2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
SMUF	Simüle Edilmiş Ultrafiltrat Tampon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri
LB	Lysogeny Broth
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EDX	Enerji Dağılımı X-ışını Spektrometresi

1. GİRİŞ

Sanayi devriminin önünü açtığı endüstriyel gıda, bilim ve teknolojinin ışığında global bir zincire dönüşmüştür. Bu durum gıdanın ulaşılabilir olmasında önemli bir rol oynamaktadır. Fakat bir gıdanın, dünyanın her yerindeki tüketiciye üretimden çıktığı tazelikte ulaşması; üretim prosesi, taşınma, depolama ve tüketici gibi içinde birçok değişkeni barındıran çok boyutlu bir sorundur. Bu sebeple gıdanın üretimden tüketime standartlaşması için endüstriyel gıda, gıda katkı maddeleri ile desteklenmektedir. Günümüzde bu maddelerin kullanımı Codex Alimentarius'un Gıda Katkı maddeleri standardıyla kontrol edilmektedir. Titanyum dioksit (TiO_2) de gıdalarda sıklıkla kullanılan katkı maddelerinden biridir. TiO_2 'in, yüksek refraktif indeksi sayesinde, ultraviyole (UV) ışığı absorblama veya dağıtma özelliği bulunmaktadır. Ayrıca kimyasal ve termal stabilite ve yüksek parlaklık ve opaklık özelliklerinden dolayı, TiO_2 gıda, kozmetik, boya, enerji depolama gibi alanlarda kendine önemli bir yer bulmuştur. Gıda alanında E171 olarak kodlanan TiO_2 sakız ve şekerlemelerde, süt ürünlerinde, fırıncılık ürünlerinde, içeceklerde sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat yapılan son araştırmalarda gıdalarda kullanılan TiO_2 'in yaklaşık %36'sının nanometre boyutunda olduğunun bulunması çarpıcı bir sonuç olmuştur. Nanopartiküllerin ağızla alındıktan sonra hücrelere geçip oradan da kan dolaşımına katılma ihtimali TiO_2 nanopartiküllerini şüpheli konumuna sokmuştur. Bu sebeple TiO_2 nanopartiküllerinin, sağlık açısından güvenilirliği, bilim dünyasının ilgisini çekmiştir. Bu noktadan sonra TiO_2 nanopartiküllerinin sağlığa etkilerinin farklı araştırma gruplarınca incelendiği ve TiO_2 nanopartikülünün ününün sarsıntıya uğrayacağı bir dönem başlamıştır. Günümüzde ilk kez 2020 yılında Fransa hükümeti tarafından TiO_2 kullanımı, içeren gıdaların satışının durdurulması ile kısıtlandırılmıştır. 2022 yılının ortasından itibaren ise Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından, Titanyum dioksitin Avrupa bölgesindeki kullanımı yasaklanmıştır.

TiO_2 'in sağlığa zararlı olabilecek fonksiyonu çoğunlukla, UV ışığı absorblayarak gösterdiği fotokatalik reaktivitesinden kaynaklanmaktadır. TiO_2 nanopartikülü ışığın UV aralıktaki dalgalarını daha düşük enerji seviyesine absorblarken, serbest aktif elektronlar oluşturur. Oluşan bu elektronlar çevrede bulunan moleküllerle oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına girerek onları radikal anyonlara ve peroksit radikallerine (reaktif oksijen türleri, ROS) dönüştürür. ROS kararsız yapısından dolayı sağlık açısından özellikle hücre

seviyesinde büyük sorunlara yol açmaktadır. TiO₂ nanopartikülünün bu fotokatalitik reaksiyonunu etkileyen parametrelerin arasında morfolojileri (kristal formları, elektriksel yükü ve yüzey kompozisyonu) ve yüzey alanı (kristal çapı ve kristalin agregasyon durumu) gibi karakteristik özellikler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, nanopartiküllerin morfolojilerine bağlı olarak biyomoleküller ile etkileşime girdiği ve 'korona' adı verilen bir kompleks oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu özel durumun nanopartiküllerin reaktivitesi yani toksisitesi üzerinde önemli etkileri bulunduğu bilinmektedir. Ancak bahsedilen çalışmalarda nanopartiküllerin tek bir biyomolekül veya birkaç tane gıda bileşenin birleştirilmesi ile oluşturulmuş temsili gıda ortamlarındaki davranışı incelenmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise ilk kez gerçek bir gıda ortamı kullanılarak gıda katkı maddesi olarak kullanılan TiO₂ nanopartikülünün davranışı ve hücresel toksisitesi incelenmiştir. Bu anlamda yapılan tez çalışmasının literatürdeki ciddi bir açık olan bu konuya önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir.

Önerilen çalışmada gıda katkı maddelerinde de yer alan, TiO₂ nanopartikülünün, süt ortamında gıdalarla bileşenleri ile etkileşime geçtiğinde morfolojik ve yüzey alanı yapılarında olan değişimler gözlenmiştir. Daha sonra bu gıda TiO₂ nanopartikülü kompleksi sindirime sokularak sindirim boyunca nanopartikül ve nanopartikül gıda kompleksinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Sindirim sürecinde TiO₂ nanopartikülü ve gıda kompleksinin sindirim enzimleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın son aşaması olarak da sindirime uğramış nanopartikül gıda kompleksinin sindirim epitel hücreleri üzerinde etkileri ile hücre bazlı stres etkisini ölçmek amacı ile de rekombinant *Escherichia coli* hücresi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, literatürdeki model gıda çalışmalarından farklı olarak, TiO₂ nanopartiküllerinin gerçek gıda ortamındaki davranışı ve sindirim sonuna kadar geçtiği yol boyunca uğradığı değişiklikler hakkında kapsayıcı bir bilgi edinilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, gıdalara gıda isleme sırasında kaybettikleri renk, aroma gibi özellikleri geri kazandırmak veya depolama sırasında bozulmalara karşı korumak gibi sebeplerle gıdalar eklenen maddelerdir. Katkı maddelerinin gıda sektöründe kullanımının önünü, Dünya Sağlık Örgütü'nün 1956 yılında yayınladığı 40'tan fazla ülkeyi kapsayan liste açmıştır [1].

'Gıda katkı maddesi', Avrupa Parlamentosu'nun 2008 tarihli regülasyonuna göre

“normalde kendi başına gıda olarak tüketilmeyen ve besleyici değeri olsun veya olmasın gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak normalde kullanılmayan, üretimde teknolojik bir amaç için gıdaya kasıtlı olarak ilave edilen, bu tür gıdaların işlenmesi, hazırlanması, işlenmesi, paketlenmesi, taşınması veya depolanması, kendisinin veya yan ürünlerinin doğrudan veya dolaylı olarak bu gıdaların bir bileşeni haline gelmesi beklenen maddeler”

olarak tanımlanmıştır [2].

Gıda katkı maddelerinin işlevi, tüketici beklentilerini karşılamak amacıyla gıdanın besinsel niteliğini (koruyucular, antioksidanlar) artırmak, bir gıda maddesinin görünümünü ve tadını iyileştirmek (renklendirici maddeler, tatlandırıcılar, aroma arttırıcılar), gıda maddesine istenen bir doku (kıvam arttırıcılar, jelleştirici maddeler) vermek ve ürünün stabilizesini korumak (emülgatörler, topaklanma önleyici maddeler, stabilizatörler) olarak ifade edilmiştir. Gıda katkı maddeleri doğal, doğaya özdeş ve yapay olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar [3].

Gıda katkı maddelerinin kullanımı, Codex Alimentarius un Gıda Katkı maddeleri standardıyla kontrol edilmektedir. Avrupa komisyonunun takip ettiği bu standarda göre gıda katkı maddeleri kullanımlarına verilen izin kontrol altında olduğunu ifade etmek üzere bu maddelere E kodu verilmeye başlanmıştır. Kısacası E kodu bulunan bir gıda katkı maddesi sağlık ve gıda araştırmacıları tarafından araştırılmış, katkı maddesinin güvenliği ilgili otoritelerce onaylanmış anlamına gelmektedir [4]. Buna göre gıdalarda kullanılan renklendiriciler (E1), koruyucular (E2), antioksidanlar ve asitliği düzenleyiciler (E3), kıvam arttırıcılar, stabilizatörler ve emülgatörler (E4), Asitliği

düzenleyiciler, topaklanmayı önleyiciler (E5), aroma artıcılar (E6), tatlandırıcılar, gazlar ve parlaticılar (E9) ve diğerleri (E10) olmak üzere farklı kodlarla tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1) [5]. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre, gıda katkı maddelerinin adı, E kodu ve kullanım amacının gıda paketlerinde belirtilmesi zorunludur [6].

Çizelge 2.1. Sık kullanılan gıda katkı maddeleri [2]

Adı	Türü	Uygulama alanı	Kodu
Titanyum dioksit (TiO ₂)	Doğal	Renklendirici	E171
Sodyum nitrat	Doğal	Koruyucu	E251
Askorbik asit	Doğal	Asitliği düzenleyici	E300
Aljinik asit	Doğal	Kıvam artırıcı	E400
Silika dioksit (SiO ₂)	Doğal	Topaklanmayı önleyici	E551
Mono sodyum glutamat	Yapay	Aroma artırıcı	E621
Aspartam	Yapay	Tatlandırıcı	E951
Polietilen glikol (PEG)	Yapay	Bağlayıcı	E1521
Vanilya	Doğala özdeş	Aroma verici	-

Gıda katkı maddeleri, insan sağlığı üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkiler göz önünde bulundurulduğunda sıkı denetim altında bulunması gerekmektedir. Bu sıkı denetim mekanizmasının ana bileşenleri; katkı maddelerinin gıda ile eşdeğer saflıkta olması, izin verilen sınırın altında kullanımı ve sağlığa etkilerinin araştırılması olarak tanımlanabilmektedir. İnsan sağlığına etki, ilk bakışta tüketim miktarına bağlı akut sağlık problemleri düşünülse de gıda katkı maddelerinin, iz miktarda bile alındığında bu maddelere duyarlı kişilerde sağlık problemlerine yol açabileceği de ifade edilmektedir. Ek olarak yapılan çalışmalarda gıda katkı maddelerinin kullanım sınırın altında alındığında dahi, kronik sağlık sorunlarına sebep olabileceği gösterilmiştir [7, 8]. Bu gibi sebeplere gıda katkı maddelerinin insan sağlığına etkileri, akut, genetik, nörolojik, toksikoloji ve kanserojen çalışmaları yapılarak araştırılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin yol açabileceği sağlık problemleri içinde en sık görülenleri; deri ve solunum rahatsızlıkları, intolerans, alerji, iç organlarda birikme, sindirim organlarına zarar, hücre hasarı, üreme sisteminde olumsuz etkiler, hemoglobun yıkımı, nörolojik rahatsızlıklar olarak özetlenebilir [9, 10].

2.2. Nanopartiküller

Nanometre birimi tarihte ilk kez 1925 yılında mikroskopta altın parçacıkları ölçmek için tanımlanmıştır. Fakat daha sonra Richard Feynman'ın çok ses getiren “There's Plenty of Room at the Bottom” konuşmasında nanometrenin bir uzunluk birimi olmasının yanı sıra maddelere yeni özellikler kazandıran bir boyut olduğu kabul edilmiştir [11]. Bu konuşmadan sonra bilim ve teknoloji dünyasında büyük bir ilgi görmeye başlayan nanoteknoloji, maddelerin yeni özellikler gösterdiği bu yeni boyutun pratik bir amaç için kullanılması olarak tanımlanmıştır. Bu kapsamda maddeleri atomik düzeyde yeni bir fonksiyon kazandırmak üzere işlemenin mümkün olduğu ifade edildikten sonra nanoteknoloji çalışmaları 1980'li yıllardan itibaren altın çağını yaşamaya başlamıştır. Bu gelişmelerin sonucu olarak da tasarlanmış nanopartiküller tıp, fizik, kimya ve tarım gibi çok geniş alanlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Nanoteknoloji, boyutlarından en az biri 100 nm'den küçük malzemelerin (nanomalzemeler) üretimi, işlenmesi ve kullanımı ile ilgilenmektedir. Boyutsal bazda nanomalzemeler; üç boyutun da nanometre olduğu nanopartiküller, iki boyutun nanometre olduğu nanotüp veya nanoçubuklar ve son olarak tek boyutun nanometre olduğu nanoplakalar olarak gruplandırılmaktadır [12]. Ayrıca nanomalzemeler kompozisyonlarına göre de inorganik, organik, karbon bazlı ve kompozit nanomalzemeler olarak dört farklı sınıfa ayrılmaktadır. İnorganik nanomalzemeler gümüş, altın, titanyum gibi metal ve bunların metal oksit formlarını içerirken, organik nanomalzemeler ise organik kaynaklardan elde edilmiş malzemelerdir. Organik karbon içeren siklodekstrin, fosfolipid bazlı lipozomlar organik nanomalzemelere örnektir. Karbon bazlı nanomalzemeler ise yapılarında sadece C atomu bulunduran karbon nanotüp, grafen gibi malzemelerin ait olduğu gruptur. Kompozit nanomateryaller ise bu üç grubun kombinasyonlarından oluşan kompleks yapılardır [13].

Nanomalzemelerin, mikrometre ve daha yüksek boyutlara göre yüzey alanı çok daha fazladır. Bu durum, ilgili malzemenin fonksiyonunu karşılamak üzere kullanılacak malzeme miktarını düşüreceği ve malzemedan alınacak verimi de artıracığından nanomalzemeler, endüstrinin de ilgisini hızlıca çeken potansiyel bir girdi olmuştur. Böylelikle nanobilim, kimya, fizik, biyoloji ve mühendislik alanlarından araştırmacıları bir araya getiren ve birçok endüstride büyük ilgi uyandıran çok disiplinli bir alan olarak popüler araştırma alanları arasında yerini almıştır [14]. Gıda ve tarım endüstrisinde de

nanoteknoloji uygulamaları üretim, işleme, paketlenme ve nakliyeden depolamaya kadar geniş bir alanda kendine yer bulmuştur. Örnekler arasında çoğunlukla beslenme/sağlığa yararlı bileşenler, yeni aromalar ve ayrıca daha az şeker, tuz, yağ ve yapay koruyucular, renkler ve tatlar gibi katkı maddesi içeren geliştirilmiş gıda ürünleri sayılabilir. Nanoteknolojinin gıda ambalajı uygulamaları, gıda maddelerini nakliye sırasında güvenli, daha uzun süre taze ve patojenlerden uzak tutabilen hafif ancak güçlü ambalaj malzemelerinin geliştirilmesine de olanak sağlamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda paketlenmiş bir gıda bozulmaya başladığında tüketiciyi uyarmak için nanopartiküller içeren yenilikçi akıllı etiketler geliştirilmektedir [12]. Besin takviyeleri, nutrasötikler, kozmetikler ve hedeflendirilmiş biyoaktif maddeler de ortaya çıkan bir başka Ar-Ge alanı olmuştur [15]. Bu tür çalışma alanlarında genellikle lipozomlar ve doğal veya sentetik polimerlerden oluşan enkapsüle edilmiş biyoaktif bileşenler araştırılmaktadır. Gıda endüstrisinde çoğunlukla organik, -tasarlanmış- inorganik veya bu ikisinin hibriti nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır. Organik nanopartiküllere örnek olarak vitaminler, enkapsüle antioksidan, renk ve aroma bileşenleri; inorganik nanopartiküllere örnek olarak demir, gümüş, titanyum, silika ve selenyum elementlerinin kendileriyle veya başka atomlarla (fosfor, oksijen vb) oluşturduğu nanopartiküller verilmektedir. Hibrit nanopartiküllere örnek olarak ise metal ve organik/biyoaktif bileşenleri birlikte kullanıldığı sistemler olarak kitosan-çinko oksit nanopartiküller örnek verilebilir [16-22]. Nanoteknolojinin gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmasıyla ‘nanogıda’ terimi kullanılmaya başlamıştır. Temel olarak nanogıda, gıdaların üretim, işleme ve paketlenme aşamalarında nanoteknoloji araçlarının kullanıldığı gıdaları tanımlamaktadır [23]. Nanogıda, terim olarak kullanılmaya başlandıktan sonra kamunun ve medyanın ilgisini çekmeye başlamıştır. Bu noktada kamuoyu nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanılmasını savunanlar ve karşı çıkanlar olmak üzere ikiye bölünmüştür. 2008 yılında ilk kez İngiltere ve İrlanda Cumhuriyeti, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)’ne etiketlere E koduna ek olarak nanometre boyutundaki bileşenlere “n” ibaresinin eklenmesini önermiştir. Bu durum nanoteknoloji araçlarının gıdalarda kullanılması üzerine regülasyonların belirlenmesinin ilk adımı olmuştur [24]. Daha sonra EFSA nanomalzemelerin kontrol edilmesi amacıyla 2008 yılında gıda katkı maddesi ve gıda enzimleri regülasyonu (Reg. 1333-1332/2008), 2009 yılında gıda ile temas eden akıllı bileşenler regülasyonu (Reg. 450/2009), 2011 yılında tüketiciler için gıda bilgilendirmesi regülasyonu (Reg. (EU) 1169/2011) ve en son olarak 2015 yılında da gıda

ile temas eden plastik maddeler regülasyonlarında (Reg. (EU) 2283/2015) güncelleme yapmıştır [25-27]. Regülasyonların konulmasından sonra gerek nanomalzemelere yönelik risk değerlendirmesinin yapılmasında literatürün yetersiz ve eksik kalması, gerekse nanomalzemelerin faydalarının göz ardı edilemeyecek kadar fazla olması gibi sebeplerle bu regülasyonların uygulamaları zayıf kalmıştır. Bu noktada gıda endüstrisinde kullanılan nanomateryallerin gıda içerisindeki fonksiyonunu ve insan vücudu ve sağlığı üzerindeki etkilerini sunacak bilimsel çalışmaların önemi artmıştır.

2.3. Nanotoksosite

Toksikoloji, organizma ve çevrenin maruz kaldığı çoğunlukla kimyasal maddeler ile biyolojik ve fiziksel etmenlerin zararlı, istenmeyen veya olumsuz etkilerini araştıran bir bilim dalı olarak tanımlanmıştır [28]. Daha genel ifadeyle toksikoloji alanında doz-etki mekanizması üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Toksikolojinin odak noktası olan doz kavramı, nanopartiküller için farklı işlemektedir. Silika dioksit (SiO_2) nanopartikülleriyle ilgili yapılan bir çalışmada farklı dozlarda SiO_2 ile beslenen farelerin iç organlarında tespit edilen nanopartikül miktarının dozdan bağımsız olduğu gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda organlarda biriken nanopartikül miktarının değişmemesi sebebi olarak, yüksek konsantrasyonlarda nanopartiküle görülen agregasyon artışı olarak açıklanmıştır [29]. Bu sebeple araştırma dünyasında nano boyuttaki materyallerin toksik etkilerinin incelendiği yeni bir alt alan ihtiyacı ortaya çıkmış ve nanopartiküllerin, canlı sağlığına ve çevreye etkilerinin incelendiği bu yeni alana nanotoksikoloji adı verilmiştir. [30] Aynı elemente ait farklı morfolojiye sahip nanopartiküller; farklı çap, agregasyon durumu, yüzey karakteristiği ve yükü gibi özelliklerden dolayı farklı toksik etkiye sahip olmaktadır. Çünkü bu nanopartiküllerin insan vücuduna adsorpsiyonu, vücut içindeki dağılımı, doku ve organlardaki metabolizması ve dışarı atılması (Adsorpsiyon, Distribüsyon, Metabolizma, dışarı atılım (Ekskresyon); ADME) gibi davranışları farklı olacaktır [31]. Bu sebeple nanotoksikoloji incelenirken, uzun ve kısa dönemli klasik toksikoloji çalışmalarının yanı sıra hedef odaklı; genetik, nörolojik, immünolojik ve kanserojenik toksisitelerin de incelendiği çalışmalar yapılmaktadır [32]. Nanopartiküllerin insan sağlığı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda nanopartiküllerin ilk hedefi olarak barsak mukozası olarak işaret edilmektedir. Nanotoksitenin ilk basamağı olarak mukozaya adsorbe olan nanopartiküller çeşitli mekanizmalar ile epitel hücrelerine giriş yapmaktadır. Epitel hücrelerinden de kan ve lenf

dolaşımına katılan nanopartiküller dolaşım yoluyla ya organlara ulaşarak burada birikmekte ya da vücut dışına atılmaktadır. Bu noktada bilim insanları, nanopartiküllerin değişken özelliklerine karşı ADME davranış değişimlerine *in vitro* ve *in vivo* olarak odaklanan toksikokinetik çalışmalar yaparak nanopartiküllerin sağlık açısından risklerini daha detaylı tanımlamışlardır. Hillyer ve ark. (2001) [33] fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada 5 - 60 nm arasında değişen çaplara sahip altın nanopartiküllerin vücuttaki dağılımının farklı olduğu ve nanopartiküllerin, çapın azalmasıyla farelerin vücudunda daha fazla organa dağıldığı görülmüştür. Değişken çaplara ek olarak, yapılan çalışmalarda TiO₂ nanopartiküllerinin 2 farklı kristal formu olan anataz ve rutil arasında toksisite farkı bulunmuştur. Çalışmalarda, anataz formu rutil formundan daha toksik olduğu ifade edilmiştir [34-36]. Wang ve ark (2018) [37] yaptığı bir çalışmada, yüzey yükü ile epitel hücreleri ve iç organ dağılımı arasında farklılık tespit edilmiştir. Hem *in vitro*, hem de *in vivo* yaklaşımlarının kullanıldığı bu çalışmada pozitif yüklü PEG nanopartiküllerinin en fazla ince barsak hücrelerine adsorbe olduğu, yüksüz nanopartiküllerin ise karaciğerde biriktiği gözlenmiştir [38].

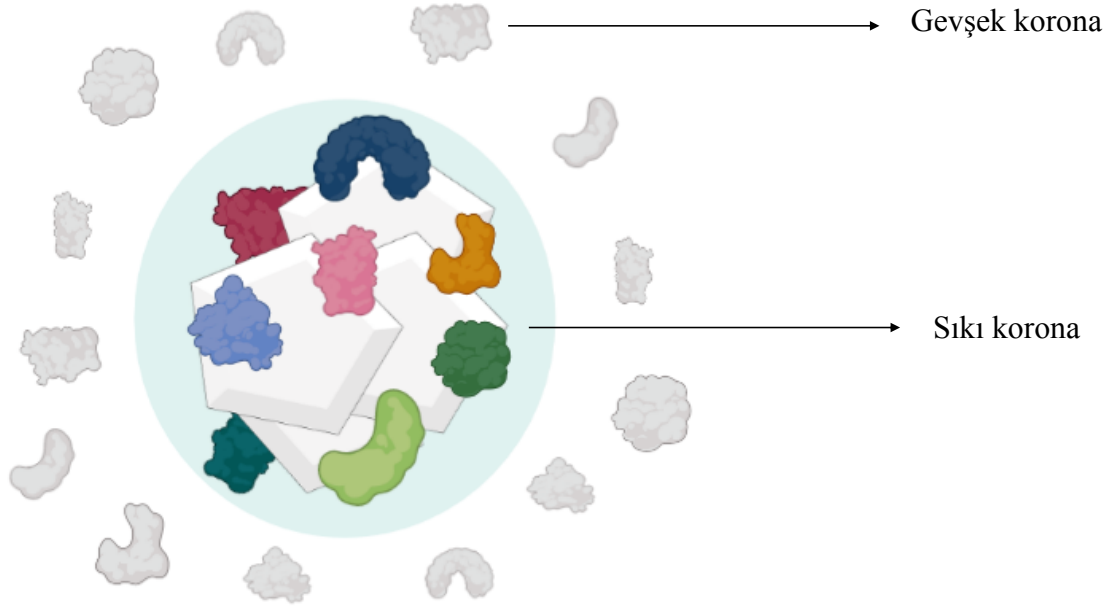
Nanopartiküllerin en fazla dikkat çeken toksik özelliklerinden biri de hücresele toksisiteye yol açabilecek serbest radikal oluşumuna (ROS) yol açmasıdır. Nanopartiküller, hücre zarına adsorbe olduklarında bazı reaksiyonlar ile, yüzey yüklerine bağlı olarak, kuantum etkisiyle (kuantum noktalar için) veya foton enerjisi (fotokatalitik reaktivite) ile hücre içi veya hücre dışı ROS oluşturmaktadır. Bu durum hücre içi radikal dengesini değiştirerek hücre zararına sebep olmaktadır. Bu zararlar; hücre sinyal mekanizmasını bozulması, hücre içi biyomoleküllerin oksidasyonla bozunması, DNA zararı ve bunların sonucunda hücreyi ölüme, veya aşırı çoğalma gibi abnormal aktivitelere götürme olarak tanımlanmıştır [39].

2.4. Nanopartiküllerde Korona Oluşumu

Nanopartiküllerin fonksiyonunu bir diğer ifadeyle reaktivitesini belirleyen faktörler yüzey alanı (kristal çapı ve kristalin agregasyon durumu) ve morfoloji (kristal formları, elektriksel yükü ve yüzey kompozisyonu) olarak sınıflandırılabilir. Nanopartiküller belirli bir kristal çapta olmak üzere üretilse de çözelti içerisinde çoğu zaman birbirlerine sıkıca bağlanmış agregatlar olarak gözlenmektedirler. Bu durum nanopartiküller arası çekim kuvvetinin, nanopartikül çözelti arasındaki itme kuvvetinden çok daha büyük olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarla nanopartiküllerin çözelti

içerisindeki agregasyon/dispersiyon durumunun, toksisiteyi etkilediği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda agregasyonun, nanopartikülün hücreye girişini ve hücre toksisitesini azaltacağı saptanmıştır [21]. TiO₂ agregatlarını inceleyen bazı çalışmalarda ise büyük çaplardaki agregatlarda hücre yüzeyinde biriken nanopartikül miktarının daha fazla olmasından dolayı, toksisitenin etkilendiği bulunmuştur [22, 23]. Bu sebeple nanopartikülün agregasyon durumunun tespiti, nanopartikülün toksisitesini tanımlama açısından önemlidir. Ayrıca nanopartiküllerin elektriksel yükü ve yüzey kompozisyonu da nanopartiküllerin bağlanma mekanizmaları üzerinden reaktivitelerini belirleyen önemli faktörlerdir. Elektriksel yük nanopartikülün çözelti içindeki dispersiyon durumunu etkilediği için reaktivite mekanizmasını direkt olarak etkileyen bir özellik olarak ifade edilmiştir. Yapılan bir çalışmada organik asit ortamında bulunan çinko nanopartikülünün elektriksel yükünün değiştiği ve bu durumun nanopartikülün toksisitesini arttırdığı gösterilmiştir [24]. Nanopartiküllerin, biyomoleküllerin etraflarına kaplanmasıyla 'korona' adı verilen bir kompleks oluşturduğu yapılan çalışmalarca tespit edilmiştir [25]. Literatürde daha çok 'protein korona' olarak ifade edilse de aslında bu durum nanopartiküllerin biyomoleküller ile oluşturduğu yüzey kompozisyonu olarak da belirtilmektedir. Literatürde korona yapısının, yukarıda açıklanan nanopartiküle ait özelliklerin yanı sıra, nanopartiküllerin buldukları ortamın özelliklerine, biyomoleküllerin konsantrasyonuna ve temas süresine göre değiştiği gösterilmiştir [40]. Nanopartikül yüzey özelliklerine bağlı olarak korona oluşumunu etkileyen ikincil bir faktör ise nanopartikül ve biyomolekül arasında kurulan bağ tipleridir. Kurulan bağların güçlü ve zayıf olması temeline dayanarak 2 farklı korona türü vardır: sıkı korona ve gevşek korona. Sıkı korona nanopartikül biyomolekül ortamına girdiğinde saniyeler içerisinde kurulan ilk bağlarla oluşur. Bu bağların afinitesi yüksektir ve nanopartikül yüzeyine direkt bağlanır. Gevşek koronanın oluşması ise nanopartikül ortama girdikten sonra saatleri bulabilir ve bağlar biyomolekül ve sıkı korona yapısının arasında oluşur. Gevşek koronayı oluşturan bağlar genellikle zayıf bağlardır ve kolayca kopabilmektedir (Şekil 1.1) [41]. Ayrıca yapılan bir çalışma, altın nanopartiküllere ait protein korona kompleksinin, ortamda safra tuzu miktarının artmasıyla birlikte, değiştiği ve safra tuzu korona yapısına döndüğünü göstermiştir [19]. Bir diğer ifadeyle ortamda farklı biyomoleküllerin aynı anda bulunmasıyla oluşan korona yapısı dinamik bir yapı göstermiştir. Korona yapısının, biyolojik bir ortamda dolaşımı, dağılımı ve hücre geçişi ile sitotoksikite ve oksidatif stres üzerine etkileri olduğu bulunmuştur [42-44]. Hedefli

nanopartiküllerin kullanıldığı sistemlerde, özellikle protein korona yapısının hücre zarı tarafından tanınmadan hücre içine geçmesini sağladığı ve hücre içine giren nanopartiküllerin reaktif özelliklerini gösterdiği tespit edilmiştir [45]. Bu sebeple gıdalarla birlikte tüketilen nanopartiküllerin sindirim sisteminden kana geçişinde gözlenebilecek bu etkileşimler açısından korona yapısının incelenmesi önemlidir.

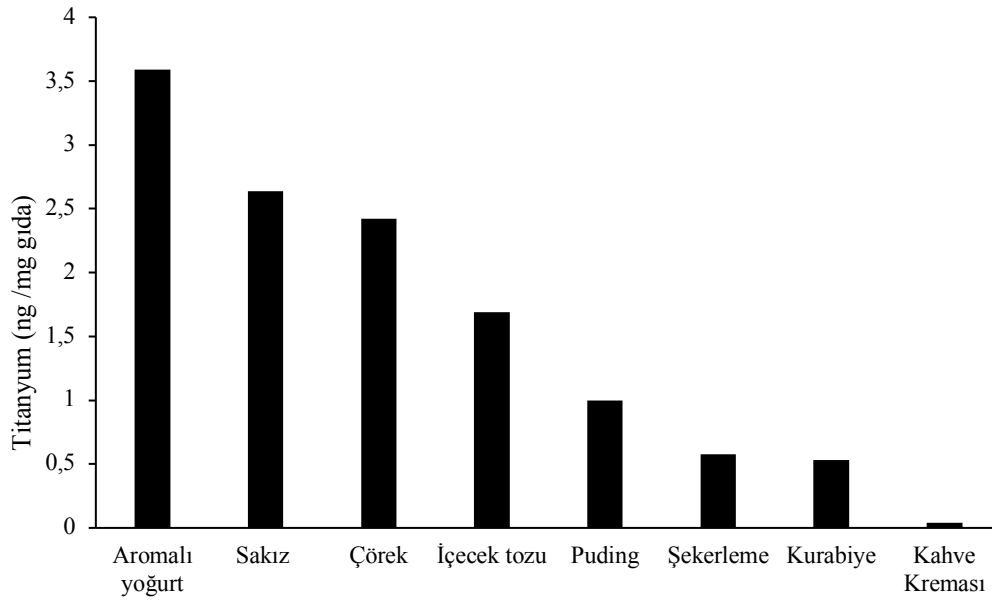


Şekil 2.1. Nanopartikül ile sıkı ve gevşek korona yapısı. BioRender.com ile hazırlanmıştır.

2.5. Titanyum Dioksit

Doğada en sık bulunan bileşenlerden biri olan TiO_2 yüksek refraktif indeksi ve buna bağlı olarak sahip olduğu yüksek opaklık-kapaticılık özelliğinden dolayı genel olarak titanyum beyazı olarak bilinmektedir. TiO_2 içerisinde boya, baskı, gıda, diş macunu, ilaç ve kozmetik gibi farklı geniş bir çeşitliliği barındıran endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. TiO_2 ilk kez 1966 yılında Amerikan Ulusal Gıda ve İlaç Ajansı (FDA) tarafından, miktarı gıda ağırlığının %1'ini geçmeyecek şekilde, gıda katkı maddesi olarak kullanılmasını kabul edilmiştir [38]. Bu süreçte gıdada kullanılan miktarı ve kabul edilen anataz kristal formuna alternatif olarak rutil formunun da güvenli kabul edilmesi dışında, TiO_2 'in gıdalarda kullanımında bir değişiklik olmamıştır. Gıda sektöründe E171 koduyla renklendirici olarak kullanılan TiO_2 'in en çok kullanıldığı gıdalar pastacılık ürünleri ile tatlılar, sakız ve şekerlemeler, çikolatalar, kahve beyazlatıcılarıdır (Şekil 2.2). Her ne kadar kullanımına izin verilen TiO_2 nanopartikül olarak kabul edilmemişse de 2012

yılında yapılan bir çalışmada gıda sektöründe kullanılan TiO_2 'in yaklaşık %36'sının nanometre boyutunda olduğu bulunmuştur. TiO_2 'in en sık bulunduğu gıdalar göz önüne alındığında, bu nanopartiküle en fazla maruz kalan yaş aralığı, yetişkinlere göre 2-4 kat farkla çocuklardır [39].



Şekil 2.2. Titanyum içeren gıdalar [39]

TiO_2 nanopartikülü ışığın UV aralıktaki dalgalarını absorblarken, bir üst enerji seviyesine geçen serbest aktif elektronlar oluşturmaktadır. Oluşan bu elektronlar çevrede bulunan moleküllerle oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına girerek onları radikal anyonlara ve peroksit radikallerine (reaktif oksijen türleri, ROS) dönüştürmektedir [46]. ROS kararsız yapısından dolayı sağlık açısından özellikle hücre seviyesinde büyük sorunlara yol açmaktadır. ROS'un en başta DNA zararı ve kontrolsüz çoğalma olmak üzere, hücre içi sinyalleri bozma ve hücre ölüme kadar giden bir çok zararı literatürde tespit edilmiştir [47]. 2006 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi'nin (IARC) TiO_2 nanopartiküllerinin solunum yoluyla muhtemel karsinogenik olduğunu açıklamasıyla, gıdalarda kullanılan TiO_2 'in güvenilirliği sorgulanmaya başlanmıştır [40].

Gıda katkısı olarak kullanılan ve TiO_2 nanopartiküllerini de içerdiği bilinen E171'e dair ilk bulgu, Bettini ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmaya göre akut ve kronik etkileri gözlemek amacıyla 7 gün ve 100 gün beslenen farelerin %40'ında hastalık gelişimi görülmüştür. Akut etki olarak barsak kanaması ve barsak iltihaplanması öncülü gözlenirken, kronik etki olarak da barsak iltihabı ve kanser öncülü lezyonlar gözlenmiştir [41]. Yine aynı dönemde yapılan başka bir çalışmada, kullanılan

30 nm TiO₂ nanopartikülünün *in vitro* barsak hücre kültürü üzerinde ROS oluşumunu ve iltihap öncülü sinyalini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca nanopartikülün barsak villus yüzeyine zarar verdiği ve ortamda bulunan besinsel bileşenlerin emilimini azalttığı bulunmuştur [42]. Bir diğer yaklaşım olarak da, TiO₂ nanopartikülünün barsak mikrobiyotasına etkisini fareler üzerinde inceleyen bir çalışmada, mikrobiyota kompozisyonunda değişiklikler olduğu rapor edilmiştir [43]. Yine TiO₂'nin hayvan barsak sağlığı üzerine etkilerini inceleyen başka bir çalışmada, mikrobiyotanın yanı sıra, TiO₂ nanopartiküllerinin hayvanların iskelet-kas sistemi üzerinde de olumsuz etkileri gözlemlenmiştir. Bu bulgu sonucunda araştırmacılar, her ne kadar fareler üzerinde patolojik bir reaksiyona sebep olmasa da, TiO₂ nanopartikülünün nörotoksik etkilerinin olabileceğini savunmuşlardır [44]. Proquin ve ark. (2017) E171'in ROS oluşumu ve DNA zararı gibi genotoksik etkilerinin olduğunu göstermişlerdir [45]. Zhou ve ark. (2021), yaptıkları bir çalışmada farklı gıda bileşenlerinin varlığının, TiO₂ nanopartiküllerinin sindirimin farklı aşamalarında morfolojisi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir [46]. Başka bir çalışma da, standartlaştırılmış bir gıda modelinde bulunan biyomoleküllerin varlığının, mide sindirimi üzerine TiO₂ nanopartiküllerinin özellikleri ve hücrel toksisitesi üzerindeki önemini ortaya koymuştur [47]. Ayrıca literatürde TiO₂ nanopartiküllerinin lipaz inhibisyonuna neden olduğunu ifade eden bir çalışmada, tampon ortamında nanopartikülün lipaz aktivitesi üzerinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur [19].

Artan araştırma sonuçlarından sonra, Fransa hükümeti 2020 yılı Ocak ayından itibaren TiO₂ içeren gıdaların satışının durdurulacağını açıklamıştır [48]. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), 2016, 2017 ve 2019 yıllarında yapılan revalüasyon ve regülasyon toplantılarında TiO₂'nin güvenli olduğunu defalarca kabul etmiştir. Ancak Guillar ve ark (2020) yılında yaptığı çalışmada, hamile kadınların plesantasında ve fetüslerde TiO₂ tespit edince topluluk yeniden toplanma kararı almış ve Mayıs 2021 yılında TiO₂ “güvenli değil” olarak ilan etmiştir [49, 50]. EFSA 2022 yılı Ocak ayında Avrupa birliği ve ekonomik bölgesindeki TiO₂ kullanımını 2022 yılı Ağustos ayı itibariyle yasaklamıştır [51]. Amerika Gıda ve İlaç Dairesinin Temmuz 2022 tarihinde yayınladığı rapora göre TiO₂'in Amerika gıda endüstrisinde ikamesinin henüz mümkün olmayan bir katkı maddesi olduğu belirtilmiştir [48]. Yine dairenin internet sitesinde yayınlanan makaleye göre ise TiO₂'nin daha önceki kısıtlamalara (gıda ağırlığının %1'nin geçmeme) bir ekleme yapılmadan kullanılmaya devam edilecektir [49].

Dünyanın birçok yerinde TiO₂ gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya devam edilmekte ve insanlar, özellikle çocuklar, TiO₂ nanopartiküllerine maruz kalmaktadır. Diğer tüm nanopartiküllerde olduğu gibi, TiO₂ nanopartiküllerinin özellikleri ve toksisiteleri buldukları ortama göre değişiklik göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da bu durum dikkate alınmış ve farklı gıda bileşenlerinin TiO₂ nanopartiküllerinin özellikleri üzerine etkileri ortaya konmuştur. Fakat bu çalışmalarda TiO₂ nanopartikülü gerçek ve tam bir gıda ortamında kullanılarak, bu ortam içindeki davranışı incelememiştir. TiO₂ gerçek bir gıda ile tüketildiğinde, sindirim sürecince göstereceği değişiklikler ve sindirim sonucunda barsak ve bakteri hücreleri üzerindeki etkileri literatürde önemli bir açıktır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

TiO₂ nanopartikülleri (30nm), teknik kazein, amilaz, pepsin, hemoglobulin ve trikoloasetik asit, lipaz enzim aktivite analiz kiti (MAK046), kazein, dimetil sülfoksit (DMSO), metanol, Tris-HCl, sodyum klorür (NaCl), fosfat tamponu tuzları, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT), floreskamin, 2',7'-diklorofluoresin diasetat (DCFH-DA), Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri (DMEM), ve Lysogeny Broth (LB) besiyeri Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) ve Hank's balanced tuz çözeltisi (HBSS), Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA), ditiyotreitol (DTT) Thermo-Fisher Scientific (Massachusetts, ABD) firmasından temin edilmiştir. Diğer çap değerlerindeki (100 nm ve 250 nm) TiO₂ nanopartikülleri Nanografi A.Ş. (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Yağlı ve yağsız süttozu Enka Süt ve Gıda Mam. San. Tic. A.Ş. (Konya, Türkiye) firmasından sağlanmıştır. Sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi için gerekli tüm malzemeler ise Biorad Laboratories, Inc.'den (Hercules, CA, ABD) temin edilmiştir.

Barsak epitel hücresi (Caco-2/An1) Türkiye Şap Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) alınmıştır. Rekombinant *E. coli* hücresi ise Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak Şeker (Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye) tarafından hediye edilmiştir.

3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

İlk aşamada, nanopartiküllerin büyüklükleri ve morfolojileri çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, TiO₂ nanopartikülleri saf suda hazırlanmış ve 15 dk boyunca sonike edilmiştir. Elde edilen çözelti metal örnek taşıyıcılara damlatılmış ve kurutulmuştur. Taşıyıcılar üzerinde sabitlenen örneklerde iletken bir yüzey elde etmek için kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) kullanılarak, örnek taşıyıcılar 5 nm altın-paladyum kaplanmıştır. Kaplama aşaması sonrasında görüntüler ESEM (FEIQuanta 200 FEG, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Farklı özellikteki ve çaplardaki nanopartiküllerin net görüntülerinin elde edilmesi amacıyla 3 farklı spot genişliği ve voltajda (3 spot genişliği, 10 kV; 4 spot genişliği, 20 kV; 5 spot genişliği, 30 kV) görüntüler alınmıştır. ESEM cihazından elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı (NIH, Maryland, ABD) kullanılarak nanopartiküllerin

ortalama çapları ve çap histogramları elde edilmiştir. Veriler, 3 farklı mikrograftan en az 500 ölçüm alınarak belirlenmiştir.

Daha sonra, partiküller Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile de incelenmiştir. TEM görüntüleri için TiO₂ nanopartikülleri saf suda hazırlanmış ve 15 dk boyunca sonike edilmiştir. Hazırlanan örneklerden 15 L alınarak, 300 mesh karbon kaplı Formvar® bakır TEM gridlerine aktarılmıştır. Ayrıca rnelere aynı cihazın STEM modu ile elementel analiz (EdX) yapılmıştır. Örneklerin TEM analizleri Bilkent Üniversitesi, UNAM'da gerçekleştirilmiştir.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için partiküllerin zeta potansiyelleri, çok dağılımlılık endeksleri (polydispersity index, PDI) ve hidrodinamik çapları llmştir. Bu aşamada hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçüm analizleri Zetasizer Nano Zs (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Birleşik Krallık) cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla her nanopartikül çapı için stok zeltiler süt ultrafiltratını simüle eden tampon (SMUF) [50] içerisinde (0.02 M Tris base, 0.05 M, NaCl 0.003 M CaCl₂, pH 6.8) hazırlanmış ve 15 dk boyunca sonike edilmiştir. Hidrodinamik ap ve zeta potansiyel ölçüm analizleri kapiler zeta ölçüm küvetine her örnekten 700 L aktararak yapılmıştır. Her iki ölçümde de partikül olarak TiO₂; üzücü ortamı olarak TBS buffer (pH 6.8) seçilmiştir. Üzücü ortamının dielektrik sabitinin 70'ten fazla olması sebebiyle zeta ölçümlerinde *Smoluchowski* [51] eşitliği kullanılmıştır. Ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiş olup 10 farklı yürütmenin ortalaması 1 ölçüm olarak hesaplanarak Şekilde 3 farklı ölçüm alınmıştır. Ölçümler 2 farklı paralel üzerinde gerçekleştirilmiştir.

TiO₂ nanopartiküllerinin kristal fazları X-ışını Difraksiyonu (XRD) (PANalytical X'Pert³ Powder, Malvern Panalytical Ltd., İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz edilecek nanopartikül numuneleri katı stoklardan hazırlanmıştır. Cu-K ışınmasına (45 kV, 40 mA) sahip XRD lmleri, 10° - 80° (2θ) (λ=0.154nm) aralığında, 0.01° tarama adım boyutunda, sürekli tarama modu kullanılarak yapılmıştır. TiO₂ nanopartiküllerinde anataz / rutil kristallerinin oranı, Spurr Meyers denklemi kullanılarak elde edilmiştir [52]. Eşitlik 3.1 ve eşitik 3.2'de IA, 2θ = 25.25°deki anataz pikinin; IR, 2θ = 27.42° ise rutil pikinin intensitesidir. XA ve XR, anataz ve rutil kristallerinin ağırlıkça yüzdesidir.

$$XA (\%) = 100 / (1 + 1.265 IR / IA) \quad (3.1)$$

$$XR (\%) = 100 / (1 + 0.8 IA / IR) \quad (3.2)$$

3.3. Süt Örneklerinin Kompozisyonu

Çalışmada kullanılan gıda ortamı olarak, yağlı ve yağsız süt tozundan deiyonize su kullanılarak hazırlanmış olan rekonstitüe sütler kullanılmıştır. Süt serumunu hazırlamak amacı ile yağsız rekonstitüe süte 1N HCl ilavesi ile pH'nın 4.6'ya ayarlanmasının ardından oluşan pıhtı 15000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantın pH'sı tekrar NaOH ilavesi ile süt pH'sına (pH 6.7) ayarlanmıştır. Süt örneklerinde, standartlara uygunluğu belirlemek amacı ile kuru madde (KM), protein, yağ, % asitlik (laktik asit cinsinden), pH ve yoğunluk analizleri yapılmıştır. Kuru madde, % asitlik ve yoğunluk analizleri Türk standartlarına (1018) göre yapılmıştır [53]. Yağsız kuru madde miktarı, toplam kuru madde miktarı ölçüm sonucundan yağ miktarı çıkartılarak elde edilmiştir. Örneklerin protein miktarları, Bradford metodu ile belirlenmiştir [54]. Analizlerde kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacı ile teknik kazein kullanılmıştır. Toplam yağ miktarı ise Türk Standartlarına uygun olarak Gerber yöntemi kullanılmıştır [55].

3.4. Gıda Matrisinin Etkisi

Farklı çap değerlerine sahip stok nanopartikül çözeltileri inkübasyona gireceği ortamlara (tampon, yağlı süt, yağsız süt, süt serumu) son konsantrasyonları 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.6 mg/mL olacak şekilde ilave edilmiş ve 1 saat boyunca 25°C'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Bu doğrultuda, yağlı süt, yağsız süt ve serum ile etkileştirilmiş farklı çaplardaki nanopartiküllerin morfolojileri *in-situ* ve *ex-situ* olarak incelenmiştir. *In-situ* analizler için gıda ortamı, tampon içerisindeki nanopartiküller ve gıda matrisi-nanopartikül kompleksi direkt olarak analiz edilmiştir. *Ex-situ* analizler için tampon içerisindeki nanopartiküller, gıda ortamı ve gıda matrisi-nanopartikül kompleksi 4000xg'de 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen pelletler tekrar çözündürülerek analize alınmıştır. Gıda matrisi ile etkileşen nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu için ESEM, TEM görüntüleri alınmıştır. Bunun yanında gıda matrisi ile etkileşen partiküllerin zeta potansiyeli, hidrodinamik çap ve çok dağılımlılık indeksi ölçülmüştür.

3.5. Protein Korona Analizi

Tez kapsamında, gıda matrisi ile etkileşen nanopartiküllerin üzerinde bulunan korona yapısındaki protein miktarlarının belirlenmesi için, yağlı süt, yağsız süt ve süt serumunun farklı çap ve konsantrasyonlardaki nanopartiküller (30 nm, 100 nm ve 250 nm çaplarında ve 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL konsantrasyonlarında) ile etkileşimi *ex-situ* olarak incelenmiştir. Öncelikle nanopartiküller 15 dk boyunca sonike edilmiş ve ardından gıda matrisi ile karıştırılarak 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda partiküller 4000xg'de 15 dk santrifüj işlemi ile ortamdan ayrılmıştır. Aynı zamanda kontrol olarak nanopartikül eklenmemiş gıda matrisleri de santrifüj edilmiş ve supernatantları alınmıştır. Bir sonraki aşamada öncelikle kazein ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve sonrasında gıda ortamından izole edilen nanopartikül yüzeyinde yer alan protein miktarları belirlenmiştir. Kontrol olarak gıda matrisi tek başına santrifüj edilmiştir. Nanopartiküller analizde girişime neden olduğundan, gıda matrisi ile etkileşen partiküller santrifüj işlemi ile ayrıldıktan sonra supernatanttaki adsorbe olmayan protein miktarları belirlenmiş ve gıda matrisindeki başlangıç protein miktarları ile karşılaştırılarak yapıdaki protein oranları tespit edilmiştir. Bu bağlamda protein miktarı belirlenmiş olan yağsız süt örneği ile 0-900 µg/ml aralığında seri dilüsyonlar, SMUF kullanılarak hazırlanmıştır. Şeffaf tabanlı siyah mikropalakaların kuyucuklarına numunelerden ve hazırlanan standartlardan 3 tekrarlı olacak şekilde 150 µl konulmuştur. Ardından mikropalaka çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve her oyuğa DMSO içerisinde çözüldürülmüş 50 µl 10.8 mM (3 mg/mL) floreskamin ilave edilmiştir. Floreskamin ilave edildikten sonra plaka bir dakika çalkalanmıştır. Örneklere ait floresans intensiteleri 365 nm uyarma ve 470 nm emisyon dalgaboyunda floresans plaka okuyucusu, (Synergy H1, BioTek Instruments, Winooski, VT) kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir. Böylelikle nanopartikül eklenmemiş örneklerdeki protein miktarları, santrifüj sonrası supernatantlardaki protein miktarları ile karşılaştırılarak nanopartikül ile etkileşmiş protein miktarı tespit edilmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Gıda matrisi ile etkileştirilen nanopartiküllerin korona yapısındaki proteinlerin belirlenmesi amacı ile Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) kullanılmıştır [56]. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileştirilen nanopartiküllerin santrifüj ile ayrımı gerçekleştirilmiş ve %5.7'lik sıralama jeli ile %12.5'lik ayırım jeli kullanılarak SDS-

PAGE ile analiz edilmiştir. TiO₂ nanopartiküllerinin interaksiyon ortamındaki son derişimleri 0.4 mg/mL ve 1.6 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Serum ve nanopartikül etkileşiminden elde edilen pelletler 2 kat, yağlı ve yağsız süt ile nanopartiküllerin etkileşiminden elde edilen pelletler ise 4 kat saf su ile seyreltilerek jellere yüklenmiştir. Nanopartikül ile etkileşime sokulmadan doğrudan analiz edilen süt ve serum örnekleri için sırasıyla 20 kat ve 5 kat seyreltme oranları kullanılmıştır.

Yıkama aşaması ile bağlanmayan proteinlerden uzaklaştırılan nanopartikül çözeltileri, örnek yükleme tamponunda (Çizelge 3.1) çözdürülmüştür. Daha sonra çözeltiler 90°C’de 15 dakika boyunca denatüre edilmiştir. Denatüre edilen çözeltiler elektroforez sistemine yüklenerek sabit akımda (önce 10 mA, sonra 15 mA; voltajın <200 V olduğu kontrol edilerek) yürütülmüştür. Yürütme sonrası jellerin boyanmasında Coomassie Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Jeller 1 saat destaining çözeltisinde (hacimce %10 asetik asit, %30 metanol ve %60 deiyonize su) karıştırıldıktan sonra 1 gece deiyonize suda bekletilmiştir. Jel görüntüleri FotoLook software (Agfa-Gevaert Group, Mortsel, Belçika) kullanılarak alınmıştır.

Çizelge 3.1. Elektrofore sistemine yüklenen örneklerin yükleme tampon içeriği

Örnek Yükleme Tamponu	Miktar
250 Mm Ditiotreitol	9.5 mL
Gliserol	4.5 mL
SDS	1gr
Bromfenol Mavisi	20 mg
1 M Tris-Cl (pH 6.8)	2.5 mL
Saf Su	2.5 mL

3.6. Sindirim Simülasyonu

Bu aşamada, gıda matrisi ile etkileşen nanopartiküllerin sindirim esnasında karakteristik özelliklerindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ağız, mide ve barsak ortamlarını taklit eden çözeltiler Sohal vd. (2018b)’a ait çalışmada anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Simüle barsak sıvısının hazırlanması için oniki parmak bağırsağı sıvısı ve safra sıvısı 2:1 oranda karıştırılmıştır [57]. Farklı çaplardaki TiO₂,

nanopartikülleri stok çözeltileri yağlı süt ortamında seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.6 mg/mL) hazırlanmış ve 25°C'de karıştırılmalı olarak 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Gıda matrisi ile etkileşen nanopartiküller 4000xg'de 15 dk santrifüj edilerek ortamdaki ayrılmış ve elde edilen pellet SMUF kullanılarak aynı hacimde çözündürülmüştür. Bu işlem sonucunda edilen gıda-nanopartikül kompleksi 1:1 oranında ağız ortamı ile karıştırılmış ve ağız ortamında 5 dakika boyunca etkileştirilmiştir. Sonrasında ağız ortamından alınan örnekler 1:1 oranında mide sıvısıyla karıştırılmış ve 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Son aşamada mide ortamından alınan örnekler 1:1 oranında barsak sıvısı ile karıştırılmış ve 2 saat boyunca inkübe edilmiştir [58].

Çizelge 3.2. Simüle edilmiş sindirim sıvılarının bileşimi* (100 mL çözelti için)

Ağız Sıvısı (pH 6.5 ± 0.1)	Mide Sıvısı (pH 2 ± 0.1)	OnikiParmak Bağırsağı Sıvısı (pH 8. ± 0.1)	Safra Sıvısı (pH 8.0 ± 0.1)
20 mg Üre	8.5 mg Üre	10 mg Üre	25 mg Üre
89.6 mg KCl	65 mg D-Glukoz	5 mg MgCl ₂ •6H ₂ O	37.6 mg KCl
20 mg KSCN	2 mg Glukuronik asit	56.4 mg KCl	578.5 mg NaHCO ₃
102.2 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	33 mg D-Glukozamin hidroklorür	8 mg KH ₂ PO ₄	525.9 mg NaCl
57 mg Na ₂ SO ₄	30.6 mg NH ₄ Cl	338.8 mg NaHCO ₃	600 mg Safra tuzu
29.8 mg NaCl	40 mg CaCl ₂ •2H ₂ O	701.2 mg NaCl	180 mg BSA
14.5 mg α-amilaz	82.4 mg KCl	300 mg Pankreatin	22.2 mg CaCl ₂ •2H ₂ O
1.6 mg Ürik asit	275.2 mg NaCl	50 mg Lipaz	
	30.6 mg NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	100 mg BSA	
	100 mg BSA	20 mg CaCl ₂ •2H ₂ O	
	100 mg Pepsin		

*(Sindirim sıvılarının pH'sı 1 N HCl ve 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.) (α -amilaz (≥ 400 units/mg protein), pepsin (≥ 250 units/mgkatı), lipaz (type VII, ≥ 700 unit/mg katı), ve pankreatin ($8 \times$ USP specifications)) KCl: Potasyum klorür; KSCN: Potasyum tiosiyanat; NaH₂PO₄•H₂O: Sodyum fosfat monobazik; Na₂SO₄: Sodyum sülfat; NaCl: Sodyum klorür; NH₄Cl: Amonyum klorür; CaCl₂•2H₂O: Kalsiyum klorür dihidrat; MgCl₂•6H₂O: Magnezyum klorür heksahidrat; KH₂PO₄: Potasyum fosfat monobazik; NaHCO₃: Sodyum bikarbonat; BSA: Sığır serum albumini.

3.7.Sindirim Enzimleri Aktivitesi

Nanopartiküllerin serbest sindirim enzimlerinin (α -amilaz, pepsin, lipaz) aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

3.7.1 Amilaz Enzimi Aktivitesi

Amilaz enzim aktivitesinin tayini için Xiao et al. (2006) [59] tarafından geliştirilen nişasta-iyot yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Farklı çap değerlerindeki TiO₂ partikülleri son konsantrasyonları 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL olacak şekilde SMUF tampon çözeltisi ve yağlı süt ortamı içerisinde hazırlanmış ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 4000xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek partikül pelletleri elde edilmiştir. Üç defa tekrarlanan yıkama işleminin ardından partiküller tampon çözelti içerisinde çözündürülmüştür. 2 μ g/mL konsantrasyonda PBS içerisinde hazırlanan amilaz çözeltisi partiküller ile 4:1 (v:v) oranında karıştırılmış ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Kör karışımlarına enzim çözeltisi yerine, eşit hacimde fosfat tamponu eklenmiştir. Bu karışımlar saf ile hazırlanan 1.5 mg/mL nişasta çözeltisiyle 1:1 (v:v) oranında olacak şekilde karıştırılmış ve 37 °C'de 10 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda eşit hacimde 1 M HCl ve iyot çözeltisi reaksiyonu durdurmak amacıyla eklenmiştir. Daha sonra 580 nm'de absorpsiyon ölçümleri alınarak, amilaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.7.2 Pepsin Enzimi Aktivitesi

Bu amaçla pepsin aktivitesi Anson (1938)'de belirtilen protokol modifiye edilerek belirlenmiştir. Farklı çaplardaki TiO₂ partikülleri son konsantrasyonları 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL olacak şekilde SMUF tampon çözelti ve yağlı süt ortamı içerisinde hazırlanmış ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 4000xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek partikül pelletleri elde edilmiştir. Üç defa tekrarlanan yıkama işleminin ardından partiküllerin tampon çözelti içerisinde dağılması sağlanmıştır. Pepsin enzimi

çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda 10 mM HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi partiküller ile 4:1 (v:v) oranında karıştırılmış ve 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra 25 mg/mL konsantrasyonunda hemoglobin çözeltisinden 0.5 mL enzim-nanopartikül karışımı ile 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra karışımlara 1 mL %5'lik TCA çözeltisi reaksiyonu durdurmak amacıyla eklenmiştir. Karışımlar bir sonraki aşamada 5 dk sonra 4000g'de 15 dk santrifüj edilerek süpernetantlardan örnek alınmış ve örneklerin absorbans değerleri 280 nm'de ölçülmüştür. Başka bir ortamda ise enzim ve substrat çözeltileri karıştırılarak, bu karışımlara hemen, birbirleri ile reaksiyona girmeden TCA çözeltisi eklenerek tepkimeler durdurulmuştur. Bu çözeltiler kör karışımları olarak belirlenmiştir. Gıda matrisi ile etkileşen ve etkileşmeyen TiO₂ partiküllerinin varlığında pepsin aktivitesinde meydana gelen değişimler hesaplanmıştır.

3.7.3 Lipaz Enzimi Aktivitesi

Son olarak, TiO₂ nanopartiküllerinin sindirim enzimlerinden lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri ticari kit kullanılarak incelenmiştir. Bunun için öncelikle lipaz analiz tamponunda 0.5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan enzim, yağlı süt ile etkileştirilen ve etkileştirilmeyen son konsantrasyonları 0.4, 0.8, 1.6 mg/ml olan farklı çaplardaki TiO₂ nanopartikülleri ile 4:1 (v:v) oranında karıştırılmış ve yarım saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda enzim konsantrasyonu 0.05 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Lipaz enzim aktiviteleri kit protokolünde (MAK046, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Gıda matrisi ile etkileşen ve etkileşmeyen TiO₂ partiküllerinin varlığında lipaz aktivitesinde meydana gelen değişimler hesaplanmıştır.

3.8. *in-vitro* Toksikite Analizleri

TiO₂ nanopartiküllerinin sindirim sonrası hücresel bazda etkilerinin gözlenmesi için *Escherichia coli* ve insan bağırsağı epitel hücresi olan Caco-2 olmak üzere 2 farklı hücre kullanılmıştır. Hücrelerin seçilmesindeki amaçlardan ilki nanopartiküllerin hem bakteriler hem de memeli hücresindeki etkilerini gözlemektir. Memeli hücresi olarak seçilen Caco-2 hücreleri ise barsak epitelinde yer alan ve sindirim sonrası kana geçişte bariyer görevi gören hücrelerden biridir. Bu sebeple nanopartiküllerin bu hücrelerden

alınacak veriler nanopartiküllerin insan sağlığına etkilerini inceleme açısından oldukça değerli bir sonuç olacaktır.

Hücrelerden ilki olan *E.coli* hücresi ile TiO₂ nanopartiküllerinin yarattığı stres ölçülmüştür. Bu amaçla genetiği, strese karşı hücre içi yeşil floresans protein üreten, nanopartikül stresini ölçmek üzere özelleştirilmiş *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Hücreler TiO₂ nanopartikülleri ile etkileşime sokulduktan sonra üretilen floresan intensiteleri ölçülerek nanopartiküllerin yarattığı stres ölçülmüştür.

3.8.1. Hücre Bazlı Stres Etkisi Ölçümü

Saltepe ve ark. (2019) geliştirdiği, strese tepki olarak hücre içi yeşil floresans protein üreten *E. coli* hücresi ile canlılık ve ROS oluşumuna ek olarak nanopartiküllerin hücre bazda oluşturduğu stres etkileri gözlenmiştir. Bu amaçla optik yoğunluğu 0.3-0.4 birime ulaşması amacıyla stok hücreler 37°C'de 2-3 saat arası büyütülmüştür. Daha sonra büyütülen hücrelerin nanopartiküller ile etkileşime gireceği sürenin optimizasyonu yapılmıştır. Bu aşama sonunda 4 saatlik etkileşim süresinin yeterli olduğu bulunmuştur. 4 saat sonunda hücreler 10.000xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Daha sonra hücrelerin, akış sitometre cihazı ile (BD Accuri™ C6 Plus, Becton Dickinson, NJ, ABD) hücre sayımları alınmıştır.

3.8.2. Barsak Epitel Hücresi Analizleri

3.8.2.1 Hücre Canlılığı

Nanopartiküllerin neden olabileceği toksik etki nedeniyle hücrelerin canlılığındaki değişim, Mao vd. (2016) [62] protokolüne uygun olarak Mitokondriyal süksinat - tetrazoliumredüktaz (MTT) analizi ile Caco-2 barsak epitel hücreleri üzerinde incelenmiştir. Bu analiz MTT'nin sarı renginin canlı hücre yoğunluğuna bağlı olarak mor renkli bir formazan molekülüne dönüşümünün ölçülerek canlılığının değerlendirildiği kolorimetrik bir yöntemdir. Caco-2 hücreleri öncelikle 24 saat boyunca 37 °C'de (%95 nem, %5 CO₂) büyütülmüştür. Deneyle için 5×10⁴ hücre/kuyucuk yoğunluğuna ulaşana kadar aynı parametreler ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmış ve taze DMEM eklenmiştir. Bu noktada taze besiyerinin içerisinde sindirime uğramış tampon ve gıda ortamı içindeki nanopartiküller (düşük: 1 µg/mL; yüksek: 100 µg/mL) eklenerek hücreler 4 saat boyunca nanopartiküle maruz bırakılmıştır.

Bu aşamadan sonra canlılık ölçmek amacıyla hücre kültürü plakasındaki her bir kuyucuğa 10 µL MTT stok çözeltisi eklenip ve ardından 37°C'de %5 CO₂ altında 4 saat inkübe edilmiştir. Canlılığını yitirmemiş hücrelerde oluşan koyu mavi formazan kristalleri 100 µL deterjan reaktifi ile çözündürülerek ve gece boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı 570 nm'de bir plaka okuyucu ile ölçülmüş (referans değeri 655 nm) ve hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formülle (Eşitlik 3.3) hesaplanmıştır. OD_{örnek} nanopartiküllere maruz kalan hücrelerin, OD_{kontrol} nanopartiküllerle inkübe edilmeyen hücrelerin ve OD_{kör} 655 nm'de ölçülen hücre içermeyen kuyucukların optik yoğunluğudur.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{OD}_{\text{örnek}} - \text{OD}_{\text{kör}}) / (\text{OD}_{\text{kontrol}} - \text{OD}_{\text{kör}}) * 100 \quad (3.3)$$

3.8.2.2. Oksidatif Stres

Bir önceki aşamadaki gibi büyütülen Caco-2 hücreleri, 10 µM DCFH-DA içeren 100 µL HBBS tamponunda 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra Kim ve ark (2020) [63] anlatıldığı gibi hücreleri parçalamak amacıyla DCFH-DA çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucuklara 200 µL RIPA (RIPA; 50mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 2mM EDTA, %0.1 SDS, 1mM DTT) eklenmiştir. Hücreler 5 dakika boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra 13,000xg ve 4°C'e 20 dakika boyunca çöktürülmüştür. Santrifüj işlemi sonrası supernatanttan 100 µL 96 kuyucuklu plakalara aktararak uyarım/salınım 485/530 nm'de ölçüm alınmıştır ve ROS oluşumu floresans intensitesindeki artış ile ölçülmüştür.

3.9 İstatistik Analizleri

Tez kapsamında istatistiksel analizler %95'lik bir güven seviyesinde IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin hidrodinamik çapı için istatistiksel analizler z-testi ile yapılmış ve kalan analizlerde karşılaştırma için bağımsız iki örneklem t-testi uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

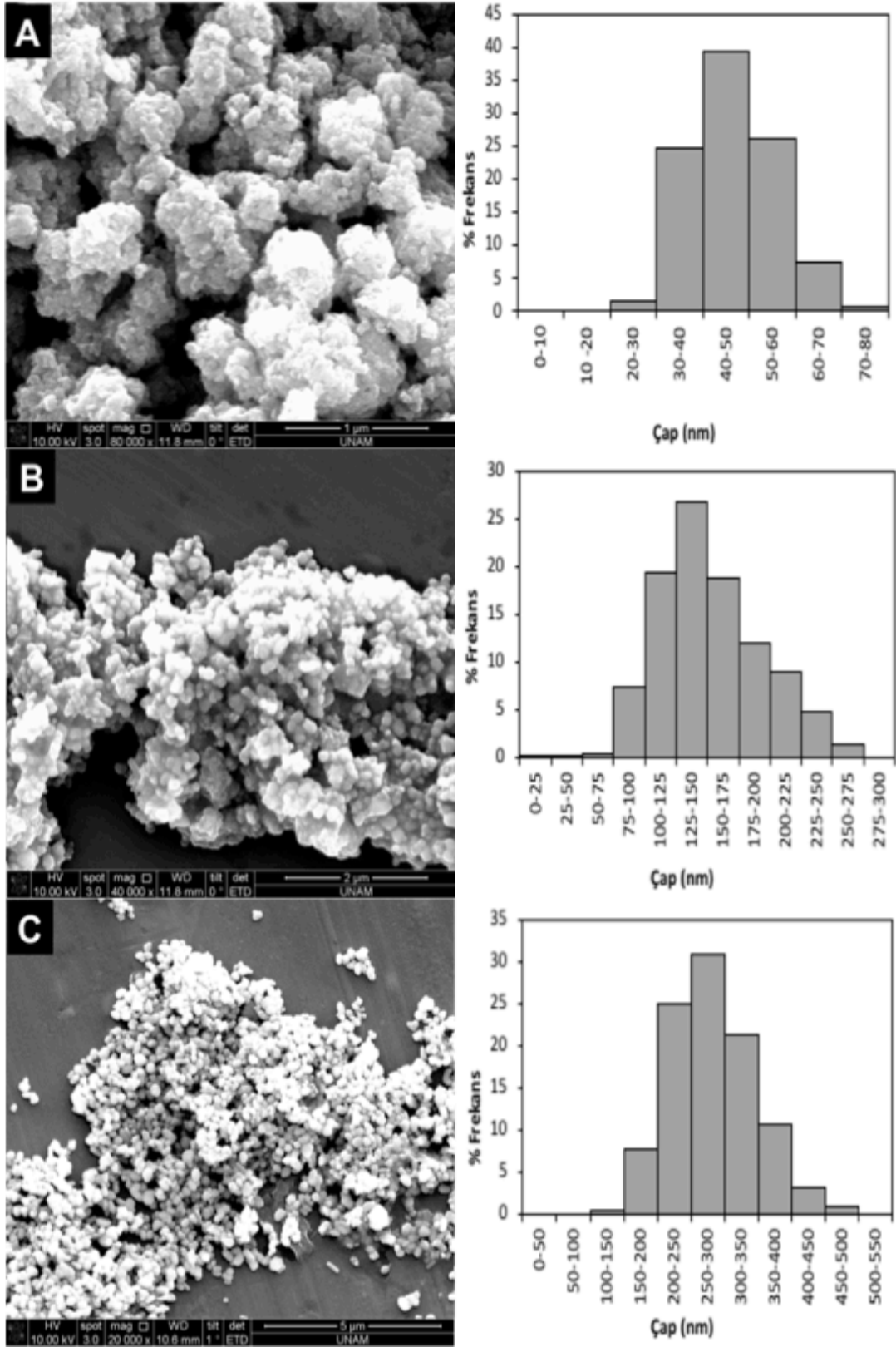
Sunulan tez çalışmasının sonuçları i) gıda ortamının TiO₂ nanopartikülleri üzerine etkileri ii) sindirim simülasyonunun gıda ile etkileşmiş TiO₂ nanopartikülleri üzerine etkileri iii) gıda ile etkileşmiş TiO₂ nanopartiküllerinin sitotoksik etkileri olmak üzere üç temel başlıkta özetlenmiştir.

4.1. Gıda Ortamının TiO₂ Nanopartikülleri Üzerine Etkileri

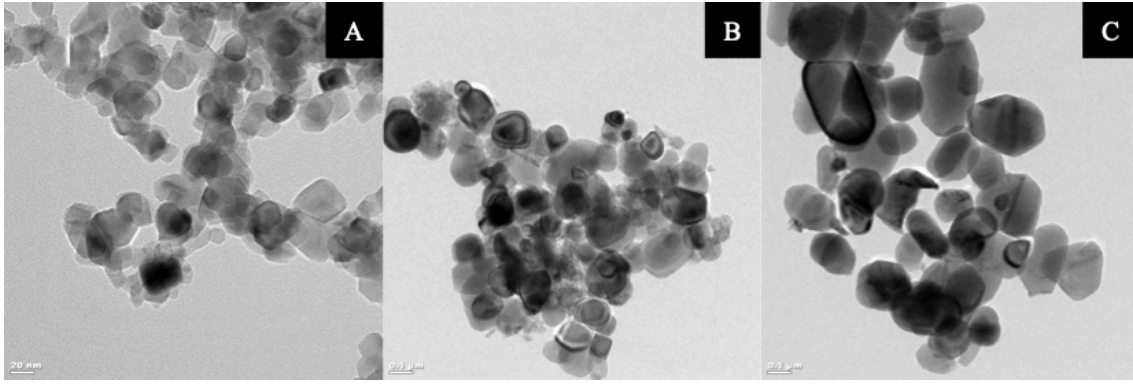
4.1.1. TiO₂ Nanopartikülleri Karakterizasyonu

Görüntüleri ESEM cihazı ile alınıp ImageJ programı ile işlenen TiO₂ partiküllerinin ortalama çapları 30 nm için 37.2 ± 8.8 nm, 100 nm için 131.2 ± 30.1 nm ve 250 nm için 234.0 ± 63.1 olarak bulunmuştur. Elde edilen ortalama çap değerlerinin incelenmek için hedeflenen çap değerlerine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.1 ve 4.2).

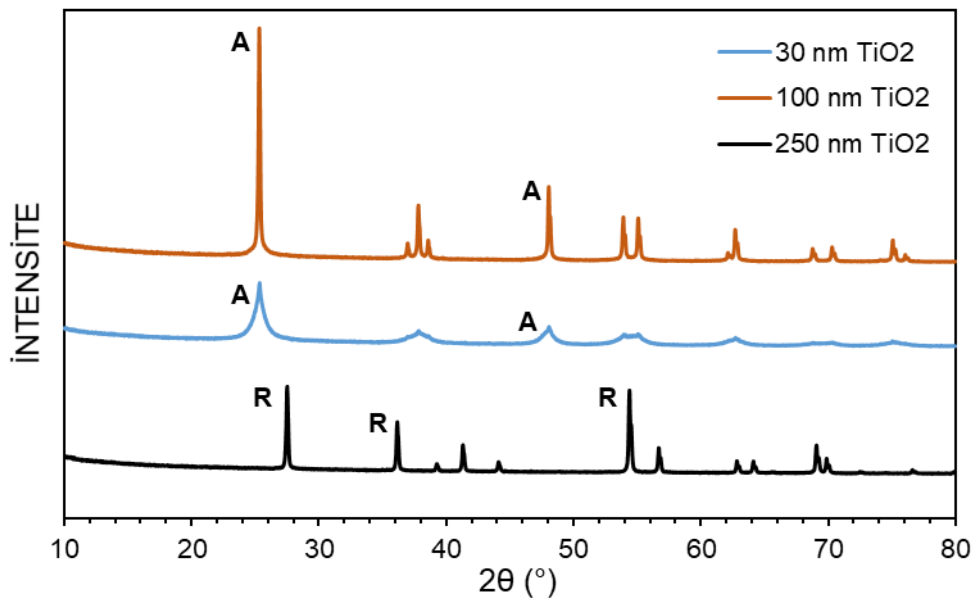
Farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin XRD modeli Şekil 4.3'de verilmiştir. Anataz fazının varlığını 25.25° ve 48.00°deki XRD pikleri gösterirken, 27.42°, 36.00° ve 54.50° pikleri rutil kristallerini göstermektedir [52, 64]. Çizelge 4.1'de TiO₂ nanopartiküllerinin eşitlik 3.1 ve 3.2'den hesaplanan anataz ve rutil formlarının ağırlıkça yüzdeleri verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda 30 nm ve 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin kristal yapılarının anataz formunda olduğu görülmüştür. Çapı 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinde ise rutil kristalleri yoğundur. Rutil formundaki nanopartiküllerin de gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilmesinden dolayı temin edilen 250 nm çapındaki TiO₂ nanopartikülü ile analizlere devam edilebileceğine karar verilmiştir [65]. Böylece tez kapsamında kristal formun toksisite üzerine etkisinin de incelenebileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.1. TiO₂ nanopartiküllerine ait ESEM görüntüleri ve çap histogramları. A) 30 nm TiO₂ (10kV, 80kX Büyütme), B) 100 nm TiO₂ (10kV, 40kX Büyütme), C) 250 nm TiO₂ (10kV, 20kX Büyütme).



Şekil 4.2. TiO₂ nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri. A) 30 nm TiO₂, B) 100 nm TiO₂, C) 250 nm TiO₂.



Şekil 4.3. Farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin XRD modeli (A, anataz; R, rutile).

Çizelge 4.1. TiO₂ nanopartiküllerinin anataz ve rutil kristal formlarının ağırlıkça yüzdesi

Çap (nm)	X _A (%)	X _R (%)
30	80	20
100	91	9
250	13	87

4.1.2. Gıda ortamındaki TiO₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan gıda ortamlarının kurumadde (KM) ve yağsız KM, protein, yağ, %asitlik, yoğunluk ve pH değerleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yağlı ve yağsız rekonstitüe süt örnekleri TS 1018’e uygun bulunmuştur [53].

Çizelge 4.2. Yağlı ve yağsız süt tozundan hazırlanan rekonstitüe süt örneklerinde KM, yağsız KM, protein, yağ, % asitlik, yoğunluk ve pH değerleri

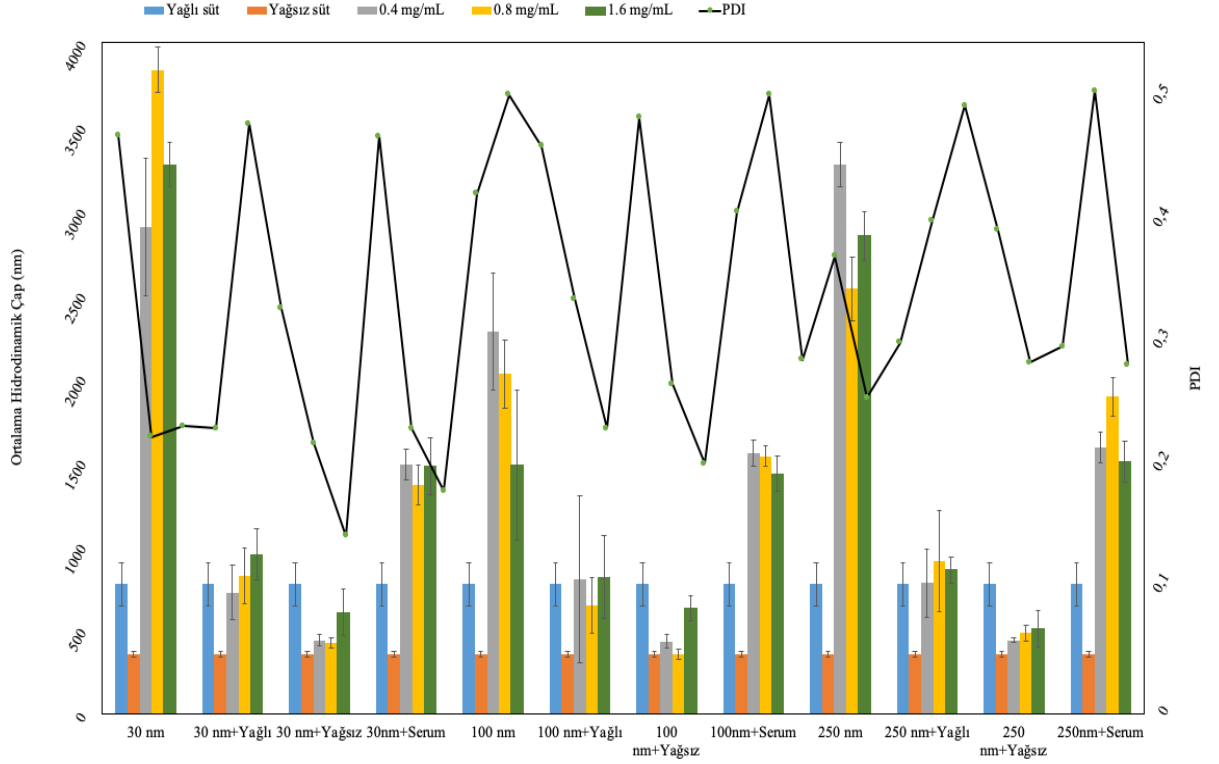
	KM (%)	Yağsız KM (%)	Protein (g/100mL)	Yağ (%)	% asitlik (laktik asit cinsinden)	Yoğunluk (g/cm ³)	pH
Yağlı süt	12.20±0.03	8.85±0.02	3.18±0.04	3.4±0.05	0.171	1.032±0.01	6.72±0.03
Yağsız süt	8.27±0.02	8.17±0.02	2.95±0.05	0.1±0.03	0.164	1.034±0.01	6.70±0.04
Serum	5.82±0.02	-	0.15±0.01	0	-	1.02±0.01	6.70±0.02

Hazırlanan yağlı ve yağsız süt örnekleri ile etkileştirilen TiO₂ nanopartiküllerinin yüzey karakteristiğindeki değişimler incelenmek üzere DLS ile ESEM ve STEM cihazları kullanılmıştır. Analizlerde elde edilen *in-situ* örneklerin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.3 ve 4.4), yağsız süt ve süt serumu literatürle de uyumlu şekilde negatif değer verirken [66], yağlı sütün pozitif zeta potansiyeline sahip olmasının ortamdaki yağ globüllerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ortalama çap ve PDI değerlerindeki artış da yağ globüllerinin ölçüm üzerindeki etkisini destekleyen bir bulgu olmuştur. Tampon çözelti (SMUF) içerisindeki TiO₂ nanopartiküllerinde 30 nm partikülün zeta potansiyel değeri pozitif, 100 nm ve 250 nm nanopartiküllerin değerleri ise negatif çıkmıştır. Nanopartiküller gıda matrisi ile etkileştirildiklerinde, özellikle düşük nanopartikül konsantrasyonunda, kompleksin zeta potansiyel değeri gıda matrisinin zeta potansiyeli değerlerine yakın çıkmıştır. Bu durumun *in-situ* analizlerde ortamda bulunan gıda matrisi bileşenlerinin konsantrasyonunun partikül konsantrasyonuna göre daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

In-situ analizlerde SMUF içerisindeki TiO₂ nanopartikülleri incelendiğinde (Şekil 4.4, Çizelge 4.3), çap ve konsantrasyon değişimiyle nanopartikül agregat büyüklükleri arasında bir ilişki saptanamamıştır. Bütün çap değerlerinde birbirine yakın büyüklükte

agregat çap değerleri görülmüstür. apı 30 nm olan olan TiO₂ nanopartikülleri yağlı süt ve yağsız süt ile etkileştirildiğinde ise partikül agregatlarının küçüldüğü ve ortalama hidrodinamik çapın gıda matrisi çap değerlerine yaklaştığı görülmektedir. Süt serumunda ise TiO₂ nanopartikül agregatlarının çapında önemli bir değişim olmadığı görülmüstür. Bu durumun yağlı ve yağsız süt ortamında bulunup, süt serumunda bulunmayan bir etmenin, nanopartikül çapında değişime yol açtığını göstermiştir. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partiküllerindeki bu değişiklik, 100 nm ve 250 nm çapları için de tekrarlanmaktadır. Örneklere ait çok dağımlılık indeksi değerleri homojeniteye yakın <0.7 bir aralıkta seyretmiştir [67].

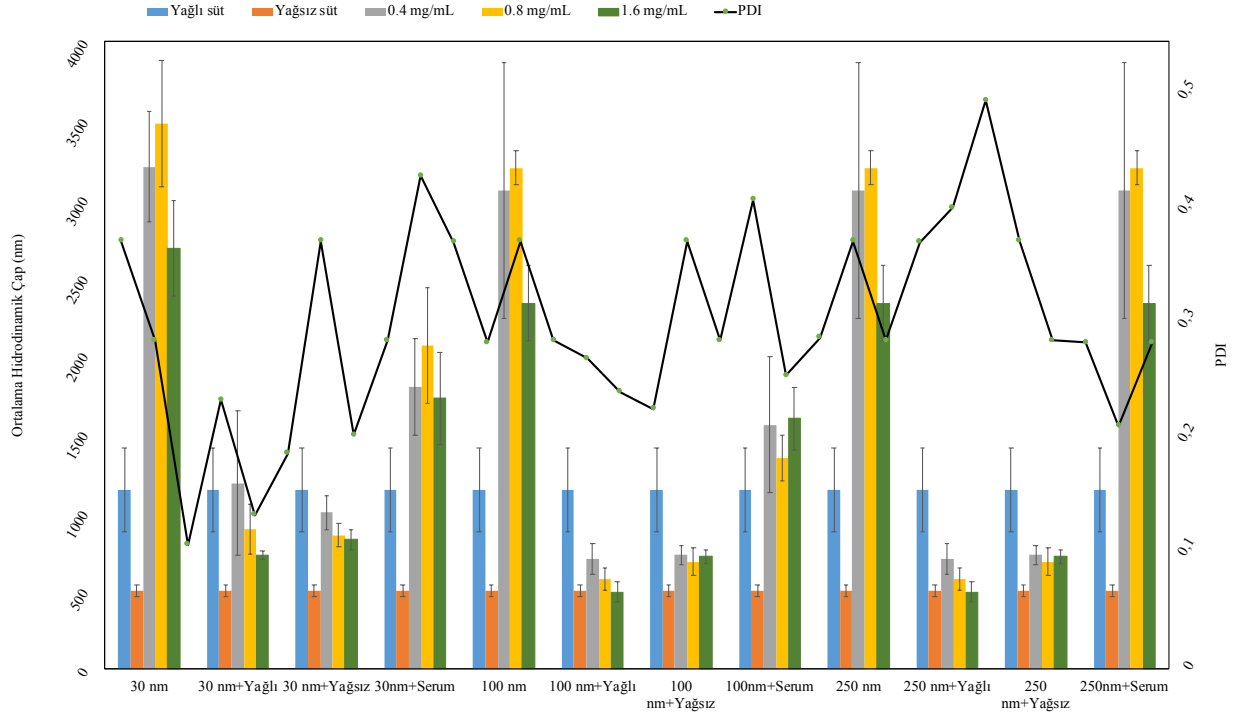
Ex-situ analizlerde ise partiküllerde meydana gelen değişimler *in-situ* analizlere göre daha net görülebilmektedir (Şekil 4.5, izelge 4.4). Tüm partikül çaplarında gıda matrisi ile etkileşimden sonra nanopartikül agregat çaplarının azaldığı görülmüstür. *In-situ* analizlerde de olduğu gibi serumla etkileşimden sonra partikül agregat çapları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. *Ex-situ* rneklere ait zeta potansiyel değerleri incelendiğinde değerlerin daha büyük negatif değerlere ulaştığı gözlenmiştir. Özellikle düşük nanopartikül konsantrasyonlarında gözlenen bu etki tampon ortamının (-12.7 ± 0.5 mV) iyonik yükünün partikül yüzey yknn belirlemesinden kaynaklanmıştır. *In-situ* rnekler ise aradaki bu farkın, *in-situ* ortamında bulunan serbest biyomoleküller nedeniyle olduğu dşnlmektedir. 30 nm çapındaki yüksek konsantrasyonlarda tampon etkisi görülmeye devam ederken, 100 nm ve 250 nm için partikül konsantrasyonu arttıka bu eğilim pozitif zeta potansiyel değelerine kaymıştır. Burada da partiküller arası yüzey özelliklerinin farklı olmasından kaynaklı bir sonuca ulaşılmıştır. Örneklerin çok dağımlılık indeksi değerlerine bakıldığında yine homojenliğe yakın değerler elde edilmişken, *in-situ* rneklerinden ortalama (ort 0.4) olarak daha az değişim gözlenmiştir. Bu durum da *ex-situ* rneklerin, *in-situ* rneklerinden daha homojen olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden *in-situ* olarak elde edilen çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri

Çizelge 4.3. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden *in-situ* olarak elde edilen zeta potansiyeli değerleri

	TiO ₂	Yağlı süt+TiO ₂		Yağsız süt+TiO ₂		Serum+TiO ₂			
30 nm	0.4	-5.56	± 1.57	0.55	± 5.00	-2.41	± 3.77	-5.56	± 0.58
	0.8	-3.19	± 2.70	4.30	± 5.49	-3.58	± 2.27	-4.75	± 1.06
	1.60	-8.74	± 3.50	0.12	± 6.22	-5.58	± 5.80	-4.95	± 0.99
100 nm	0.4	-14.78	± 2.11	2.10	± 5.49	-3.86	± 3.29	-4.99	± 0.48
	0.8	-10.58	± 0.99	-0.29	± 5.37	-3.45	± 3.04	-4.08	± 8.51
	1.60	-5.35	± 4.05	2.16	± 2.52	-0.55	± 4.96	-0.57	± 5.88
300 nm	0.4	-10.57	± 0.97	1.22	± 6.28	-4.68	± 1.94	-5.79	± 1.91
	0.8	-7.55	± 4.22	0.43	± 5.14	-0.70	± 4.35	-5.84	± 1.27
	1.60	-7.37	± 1.38	-2.37	± 5.14	-3.00	± 3.84	-3.73	± 0.44
Yağlı süt	1.86	± 4.16							
Yağsız süt	-5.21	± 1.58							
Serum	-6.06	± 0.92							

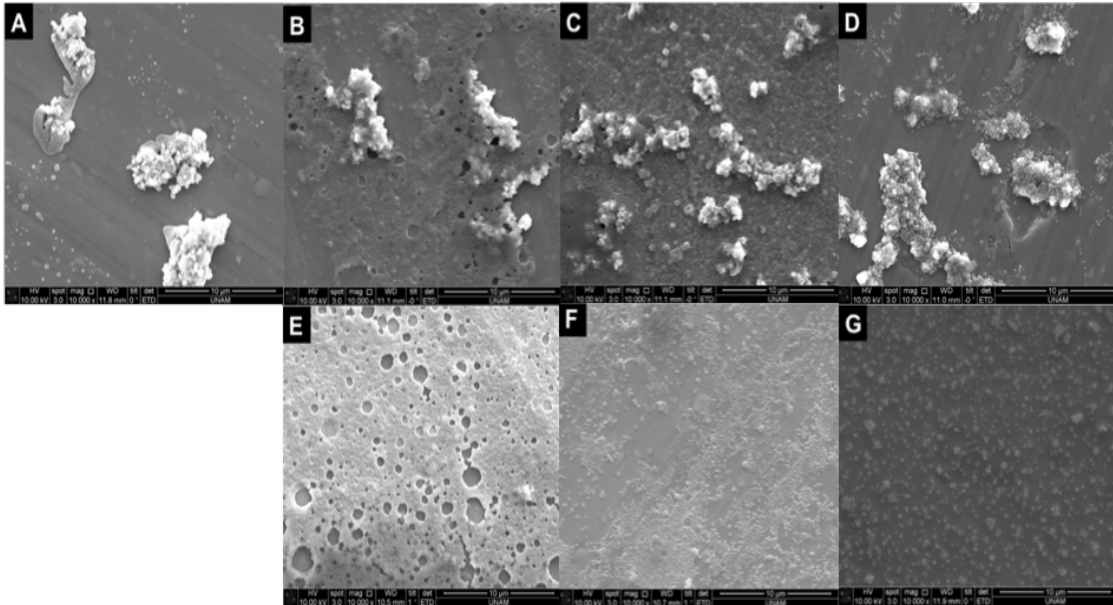


Şekil 4.5. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden *ex-situ* olarak elde edilen çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri

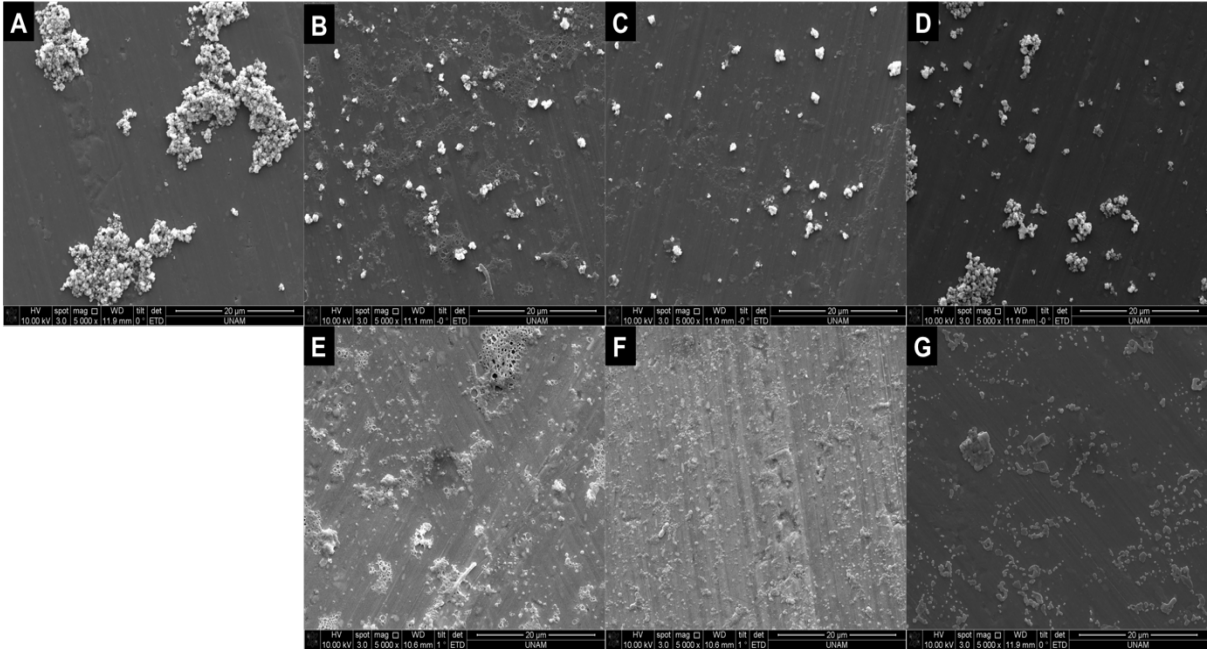
Çizelge 4.4. Yağlı süt, yağsız süt ve süt serumu ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden *ex-situ* olarak elde edilen zeta potansiyeli değerleri

	TiO ₂	Yağlı süt+TiO ₂	Yağsız süt+TiO ₂	Serum+TiO ₂
30 nm	0.4	-9.87 ± 0.90	-11.68 ± 1.43	-13.43 ± 0.95
	0.8	-6.97 ± 0.74	-9.41 ± 2.39	-11.07 ± 1.67
	1.60	-13.10 ± 1.45	-7.06 ± 5.06	-6.82 ± 3.37
100 nm	0.4	-9.79 ± 0.48	-6.20 ± 1.78	-12.63 ± 0.61
	0.8	-5.32 ± 1.04	-2.37 ± 4.12	-13.02 ± 1.61
	1.60	-6.90 ± 0.68	-3.00 ± 3.32	4.85 ± 1.90
300 nm	0.4	-10.82 ± 2.60	-11.70 ± 1.26	-13.08 ± 1.42
	0.8	-7.19 ± 1.93	-8.06 ± 3.87	-11.51 ± 3.14
	1.60	-3.60 ± 0.70	0.27 ± 7.87	-9.00 ± 2.82
Yağlı süt	-13.73 ± 1.38			
Yağsız süt	-12.12 ± 0.90			
Serum	-13.73 ± 1.38			

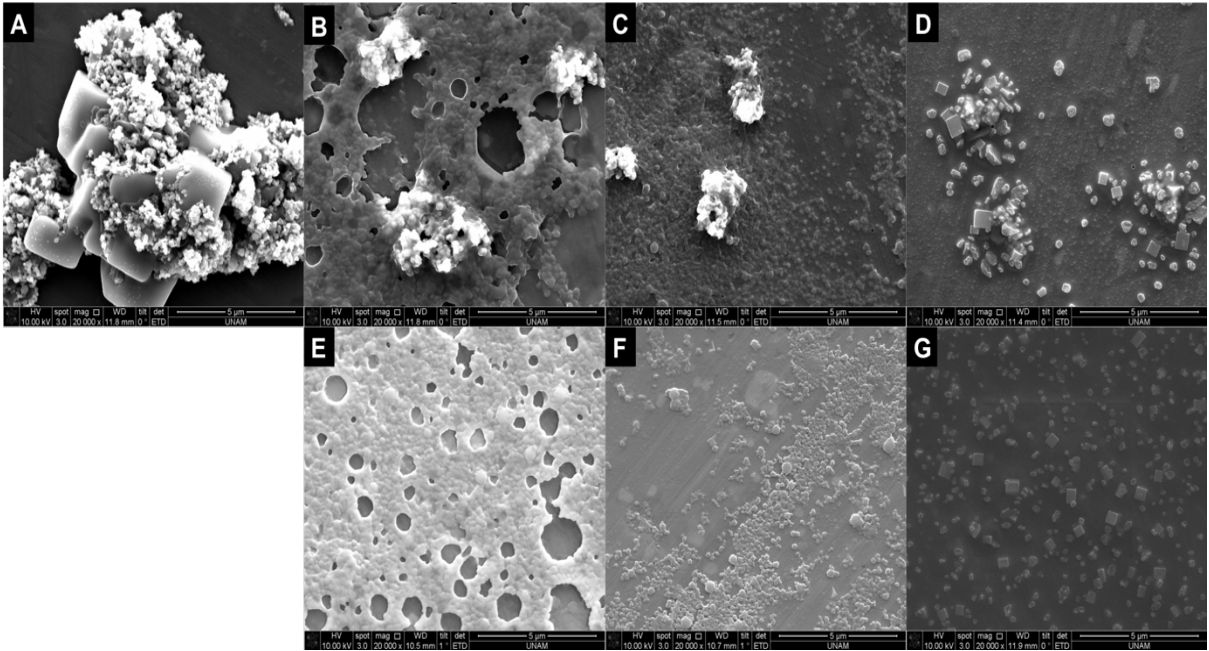
TiO₂ nanopartiküllerinin gıda matrisi içerisinde yer aldığı *in-situ* çözeltilere ait ESEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.6, 4.8, 4.10), nanopartikül agregatlarının küçüldüğü gözlenmiştir. Özellikle yağlı ve yağsız süt örneklerinde süt serumuna göre partiküllerin çözelti içerisinde daha fazla dağılmış olduğu görülmüştür. Farklı çaplardaki TiO₂ nanopartikülleri gıda matrisleri içinde benzer davranışlar sergilemektedir. *In-situ* analizlerde ortamda gıda bileşenlerinin çok yoğun olması partiküllerin izlenmesini zorlaştırdığından, *ex-situ* analiz sonuçları gıda matrisi ile etkileşen partiküllerde meydana gelen değişimi daha net olarak ortaya koymaktadır. İncelenen 3 farklı çaptaki TiO₂ nanopartikülü için de yağlı ve yağsız süt örnekleriyle etkileştikten sonra partiküllerin agregatlarının dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7 4.9, 4.11) . Bu durumun partiküllerin yüzeylerinde oluşan ve partiküller arası çekim kuvvetini azaltarak agregatlaşmayı engelleyen korona yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir [68]. Ayrıca daha yüksek büyütme değerlerinde ESEM görüntülerinde partikül yüzeyinde oluşan korona yapısı da net bir şekilde gözlenebilmektedir (Şekil 4.12).



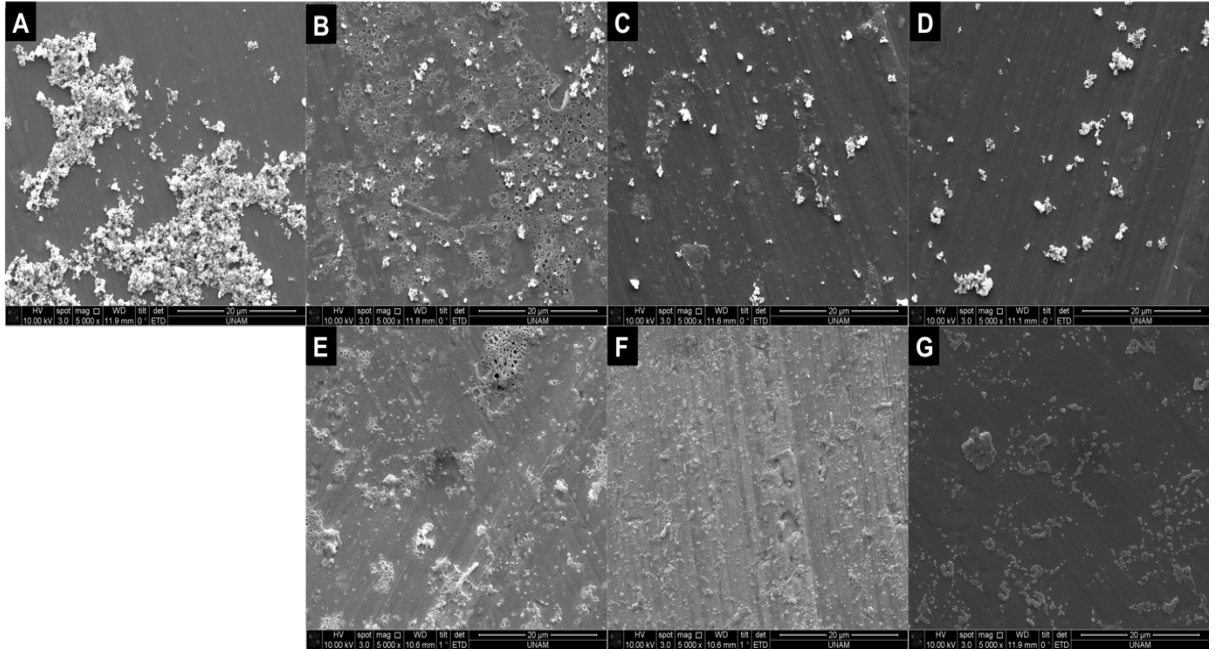
Şekil 4.6. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *in-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 10 kX büyütme)



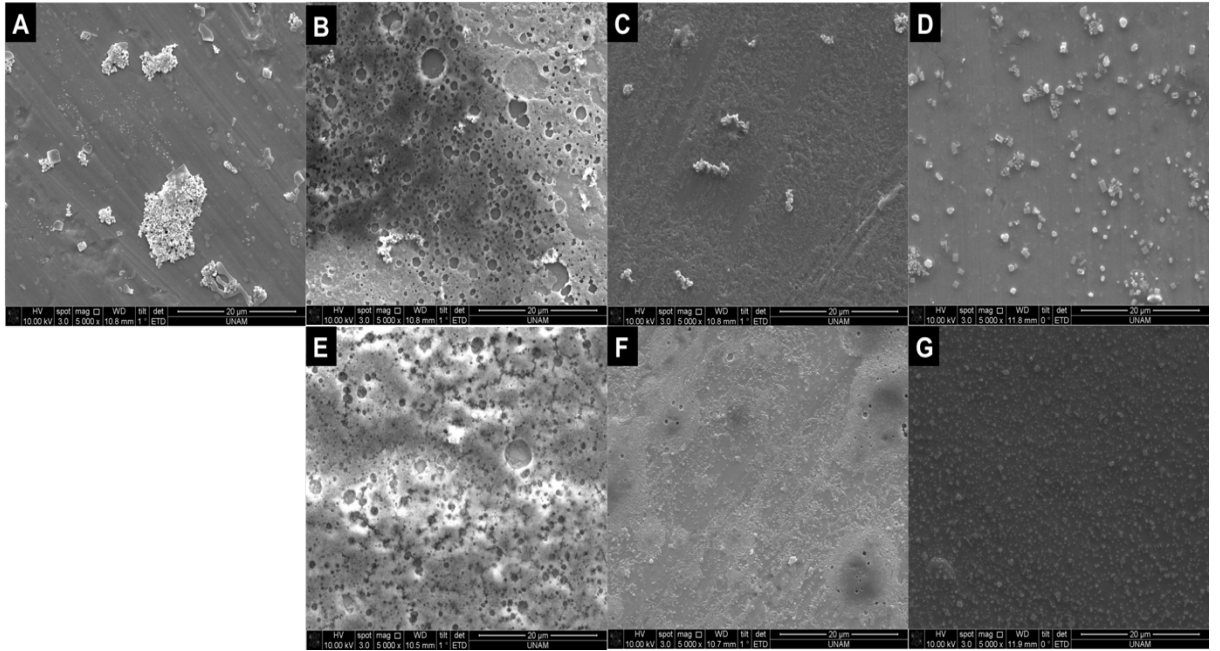
Şekil 4.7. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *ex-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)



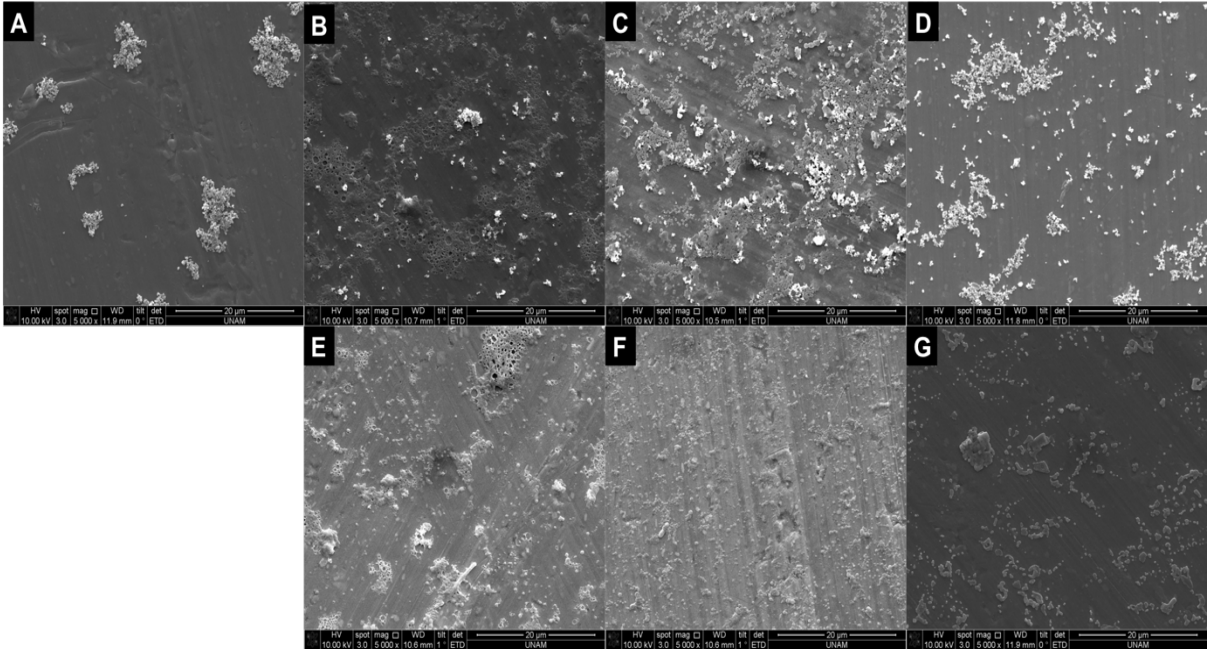
Şekil 4.8. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *in-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 20 kX büyütme)



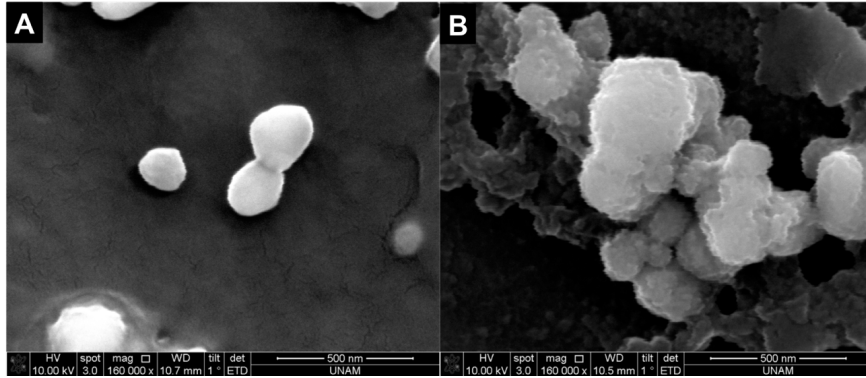
Şekil 4.9. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *ex-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)



Şekil 4.10. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *in-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)

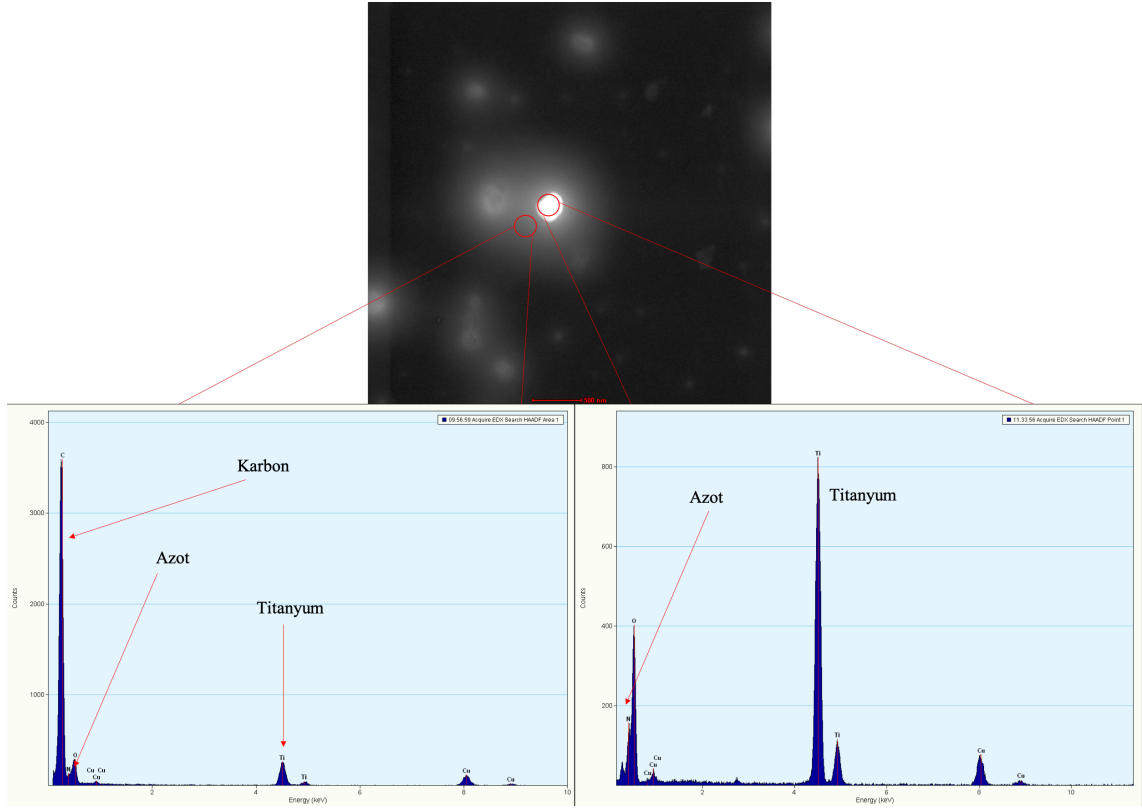


Şekil 4.11. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin *ex-situ* ESEM görüntüleri. A) Tampon içerisinde TiO₂, B) Yağlı süt- TiO₂ karışımı, C) Yağsız süt- TiO₂ karışımı, D) Süt serumu- TiO₂ karışımı, E) Yağlı süt, F) Yağsız süt, G) Süt serumu. (10 kV; 5 kX büyütme)



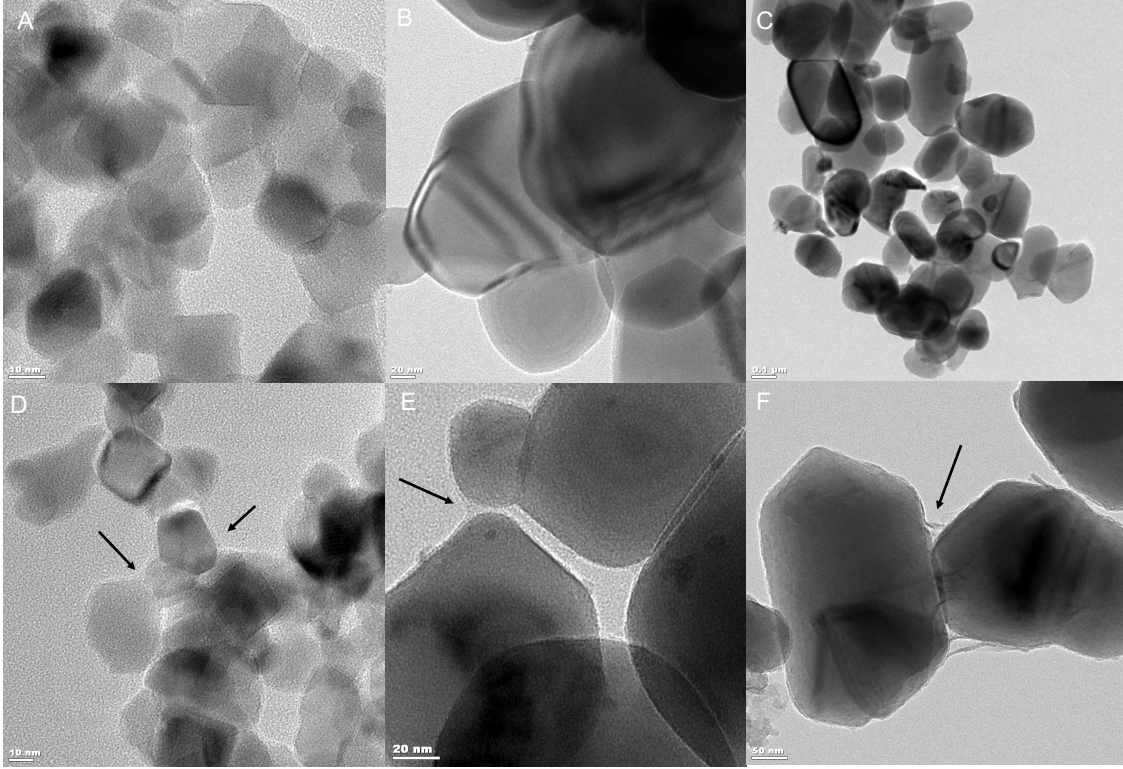
Şekil 4.12. TiO₂ nanopartikülüne ait protein korona yapısını gösteren ESEM görüntüsü. A) TiO₂ (250 nm), B) Yağsız süt- TiO₂ (250 nm). (10 kV; 160 kX büyütme)

Elde edilen STEM görüntülerinde, TiO₂ nanopartikülleri etrafında bulutsu yapı gözlenmiştir. Parlak bölgede ve bulutsu alanda EDX ölçümleri alınmış ve parlak alanda yoğun bir biçimde Ti- ve O- gözlenirken, bulutsu alanda C-, N- ve O- yoğun bir şekilde görülmesi bulutsu alanın içerisinde protein olma ihtimalini ortaya koymuştur. Bu bulgular da ESEM ölçümleri eşliğinde tartışılan korona yapısının içeriği hakkındaki yorumu destekler nitelikte olmuştur (Şekil 4.12, Ek-Şekil 1, Ek-Şekil-2).



Şekil 4.13. Yağsız süt örneği ile etkileştirilmiş 250 nm TiO_2 nanopartiküllerine ait STEM görüntüsü ve iki ayrı bölgeye ait EDX grafikleri.

TiO_2 nanopartikülünün yağsız süt ortamı ile etkileştirildikten sonra elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir. Partikül yüzeylerinde oluşan korona yapısı oklar ile gösterilmiştir. Görüntülerde tampon ortamında yüzeylerinin çıplak olduğu gözlenen nanopartiküllerin (Şekil 4.14A-4.14B-4.14C), yağsız süt ortamı ile etkileşime sokulduğunda yüzeylerinde oluşan katman görülmektedir (Şekil 4.14D-4.14E-4.14F). Böylece partiküller arası oluşan bu yeni katmanın nanopartiküllerin agregat oluşturmasını engelleyen etmen olduğu görüntülenmiştir (Hidrodinamik çap sonuçları, Çizelge 4.4-4.5 ve ESEM görüntüleri, Şekil 4.6 -4.11).



Şekil 4.14. Farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerine ait protein korona yapısını gösteren TEM görüntüsü. Tampon ortamında A) 30 nm TiO₂, B) 100 nm TiO₂, C) 250 nm TiO₂, Yağsız süt ortamında D) 30 nm TiO₂, E) 100 nm TiO₂, F) 250 nm TiO₂

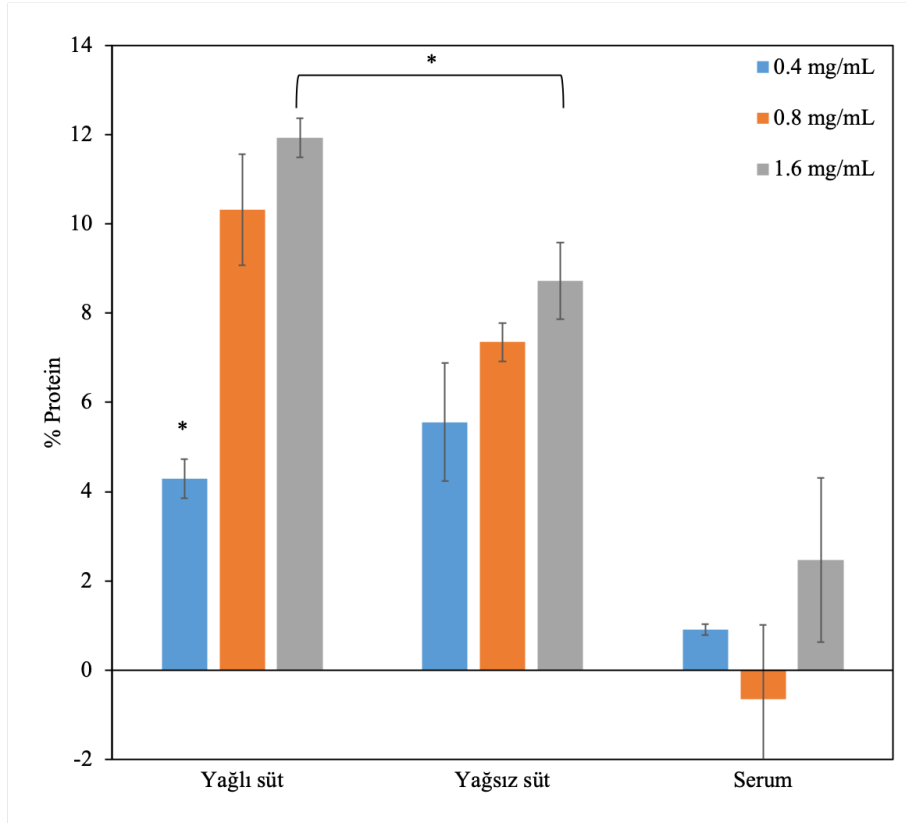
Süt serumu ile etkileştikten sonra ise partikül agregatlarının boyutlarında azalma gözlenirse de bu değişim süt örneklerindeki kadar düşük seviyededir. Bu durumun, serum ortamında diğer ortamlara göre daha düşük konsantrasyonda bulunan fakat yine de partikül yüzeyinde değişime neden olabilecek proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Süt serumunun hazırlanışı sırasında kullanılan çözeltilerin ortamın iyonik kuvvetini önemli ölçüde değiştirmesinin de normalden daha küçük partikül agregatlarının gözlenmesine yol açabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle bir sonraki aşamada farklı çap ve konsantrasyondaki nanopartiküllerin gıda matrisi ile etkileşimlerinden sonra yüzeylerindeki korona yapısında yer alan protein miktarlarının belirlenmiştir.

4.1.3. Protein Korona Analizi

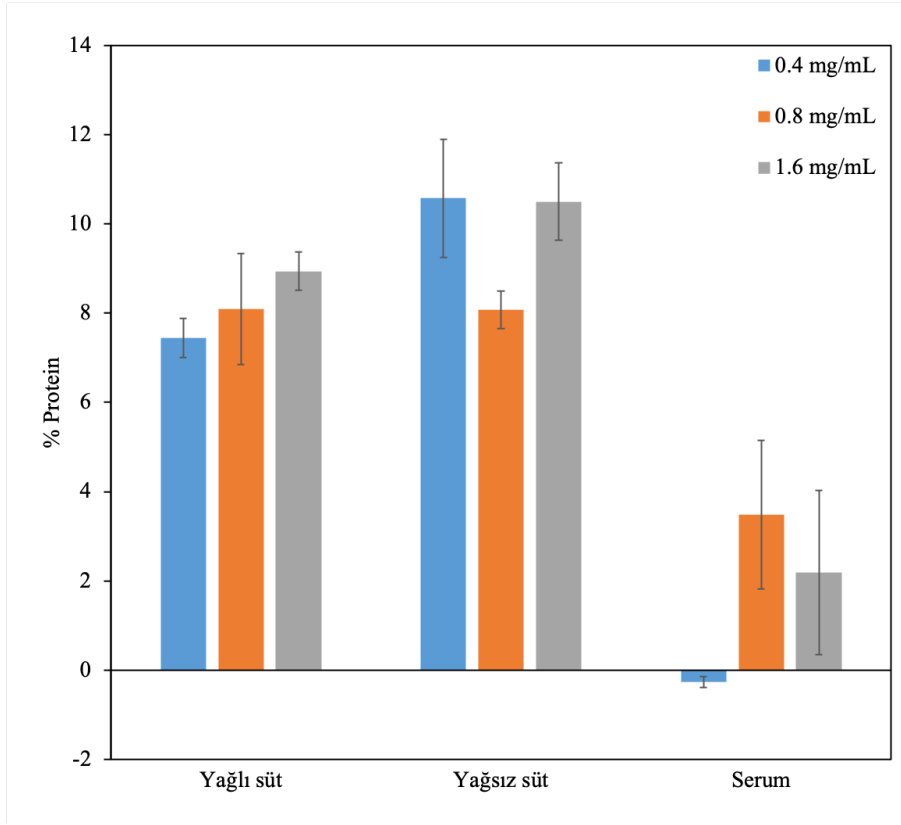
30-100-250 nm çapındaki TiO₂ nanopartiküllerinin yüzeyinde bağlanan protein miktarları, çözeltilerden nanopartiküller uzaklaştırıldıktan sonra bağlamayan proteinlerin floreskamin ajanı etkileşme ile oluşturduğu floresan sinyal ile ölçülmüştür. (Şekil 4.15-

17). Protein miktarları şekilde verilen teknik kazein çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır (Ek1-Şekil 1).

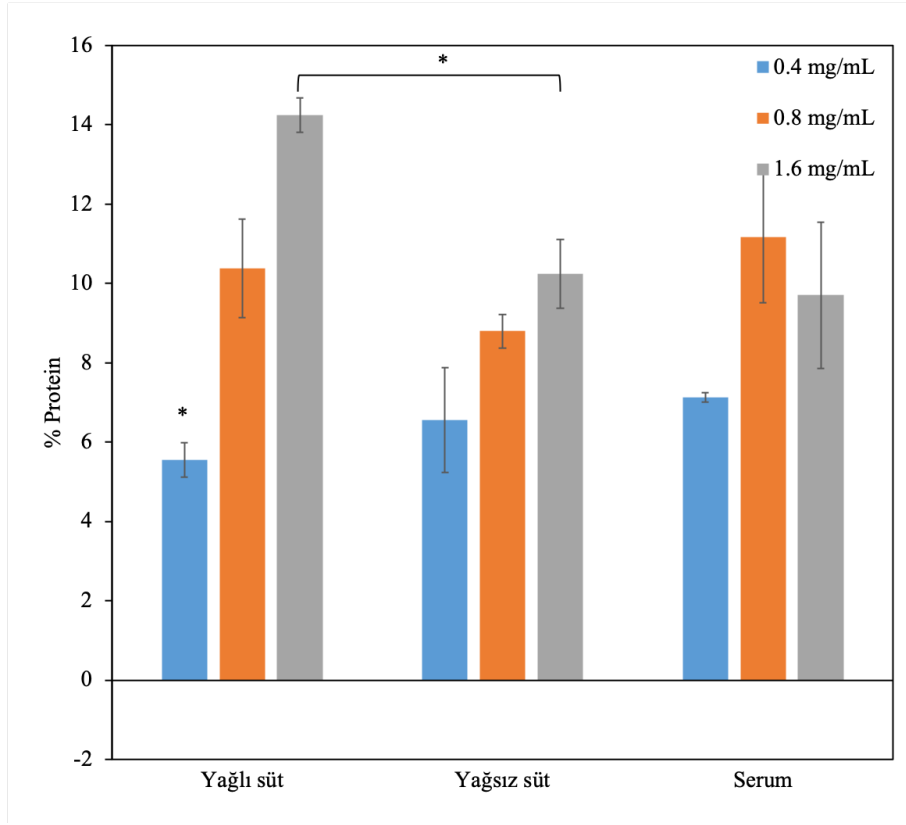
TiO₂ nanopartiküllerinin yüzeyi ile etkileşen gıda bileşeninin tespiti için yapılan protein analizinde ortalama çap değeri 30 nm olan TiO₂ nanopartikülleri yağlı ve yağsız süt ile etkileştirildiğinde konsantrasyon arttıkça bağlanan protein miktarının da arttığı görülmektedir. Süt serumunda ise istatistiksel olarak dikkate değer bir bağlanma görülmemiştir. 100 nm çapındaki nanopartiküllerin yağlı ve yağsız süt ortamında bağlanan protein miktarları istatistiksel olarak farklı değildir. Konsantrasyon değişimini de 100 nm çapındaki partiküllere bağlanan protein miktarını etkilememiştir. 30 nm ve 250 çapı için yağlı süt ortamında daha fazla protein bağlandığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, diğer çaplardan farklı olarak 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinde serum proteinlerine bağlanma oranlarında önemli bir fark görülmüş olsa da, serumdaki toplam protein konsantrasyonu göz önüne alındığında bağlanan protein miktarının bu örneklerde de oldukça az olduğu ortaya çıkmaktadır. Ek olarak, gıda matrisinde yağ bulunmasının protein bağlanması üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı görülmektedir. Beklendiği gibi nanopartikül konsantrasyonu arttıkça bağlanan protein miktarında da artış görülmektedir. Partiküllerin çap değerleri değiştikçe bağlanma oranlarında anlamlı farklılıklar görülmemesinin partiküllerin gıda matrisiyle etkileşmeden önce birbirlerine yakın agregat büyüklüklerine sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.15. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 30 nm TiO₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05

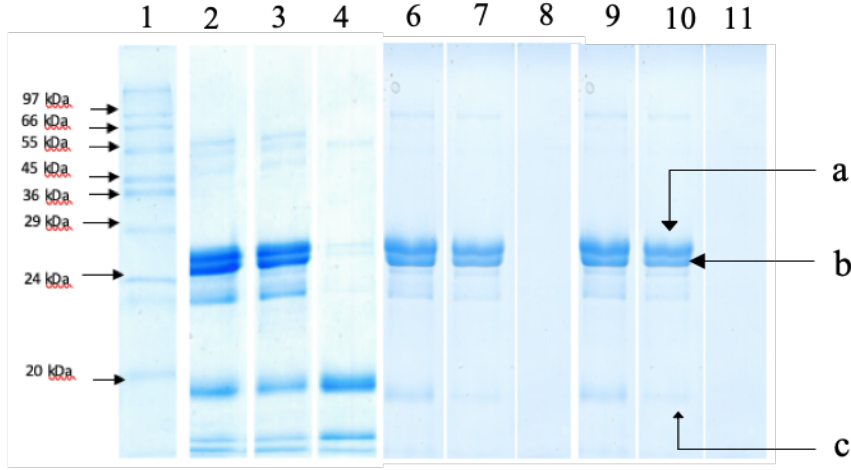


Şekil 4.16. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 100 nm TiO₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05

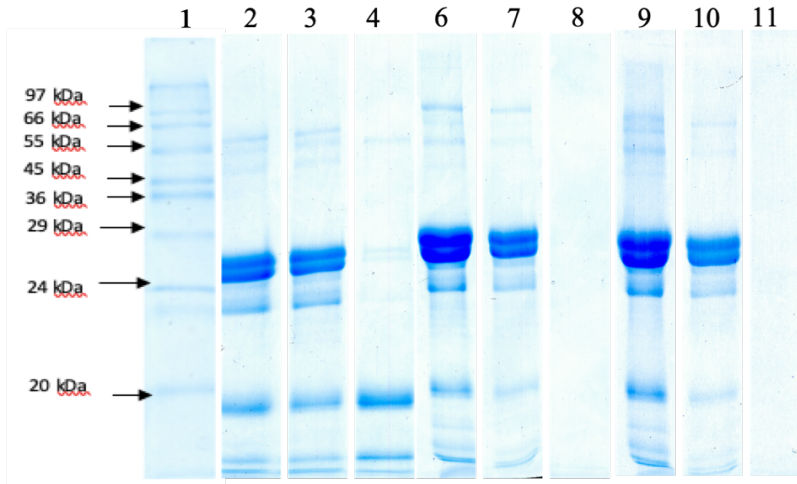


Şekil 4.17. Farklı gıda matrisleri ile etkileşen 250 nm TiO₂ nanopartiküllerine bağlanan protein oranları. *:p<0.05

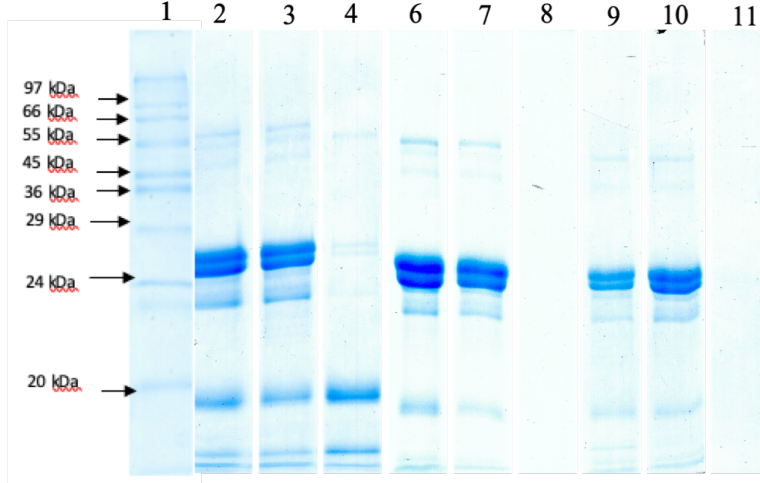
Bir sonraki aşamada, partiküllere ait korona yapısındaki proteinlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Korona yapılarına ait SDS-PAGE jel görüntüleri (Şekil 4.18-20) incelendiğinde süt örneklerinde, majör süt proteinlerinden α_s -kazein (α -C_n) ve β -kazein (β -C_n) bantları belirgin olarak görülürken, sütte daha az miktarda bulunan asal serum proteinlerden β -laktoglobulin (β -lg) ve α -laktalbumin (α -la) de belirgin bant görüntüleri vermiştir. Beklenildiği üzere, süt serumunda kazeinlere ait bant bulunmazken yine asal serum proteinler olan β -lg ve α -la bantları belirgin olarak gözükmemektedir.



Şekil 4.18. 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2:yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO₂ (1.6 mg/mL)) a: αs-Kazein, b: β-Kazein, β-laktoglobulin



Şekil 4.19. 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2:yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO₂ (1.6 mg/mL))



Şekil 4.20. 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin süt örnekleri ve serum ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler. (1: molekül ağırlığı belirteci örnek, 2:yağlı süt, 3: yağsız süt, 4: süt serumu, 6: yağlı süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 7: yağsız süt+ TiO₂ (0.4 mg/mL), 8: süt serumu+TiO₂ (0.4 mg/mL), 9: yağlı süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 10: yağsız süt+ TiO₂ (1.6 mg/mL), 11: süt serumu+TiO₂ (1.6 mg/mL))

Nanopartiküllere ait bantlar incelendiğinde, tüm çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin yağlı ve yağsız süt örneklerinin ikisi için de süt proteinleri ile etkileşime girdiği jellerdeki belirgin α -Cn ve β -Cn bantlarından anlaşılmaktadır. Ayrıca yağlı ve yağsız süt örnekleri ile etkileşime giren TiO₂ nanopartiküllerine ait bantların arasında β -lg de gözlenmiştir. İlk bakışta nanopartikülün β -lg proteini ile etkileşime girdiği düşünülse de serum ortamı ile etkileştirilen nanopartiküllerin yüzeyinde β -lg bantına rastlanmamıştır. Bu durum, süt tozları üretilirken kullanılan tekniklerin proteinleri denatüre etmiş olmasından ve denatürasyon sonucu kazein ve β -lg proteinlerinin birbiri ile etkileşime girmesinden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir [69]. Ek olarak TiO₂ nanopartikülleri için etkileşime girilen proteinlerin konsantrasyondan bağımsız olduğu görülmüştür.

4.2. Sindirim Simülasyonunun Gıda ile Etkileşmiş TiO₂ Nanopartikülleri Üzerine Etkileri

Gıda ortamındaki değişimleri tespit edilen TiO₂ nanopartiküller gıdalar ile tüketildikten sonraki değişimlerini takip etmek amacıyla sindirim analizi yapılmıştır. Bu amaçla 30-100-250 nm çapındaki TiO₂ nanopartiküller tüm gıda bileşenlerini bulundurduğu için yağlı süt ortamıyla etkileşime sokulduktan sonra sindirim simülasyonuna sokulmuştur.

Sindirim simülasyonunda ağız ortamının zeta potansiyeli -8.50 mV olarak bulunmuştur. Gıda ortamları ile etkileşen ve etkileşmeyen TiO₂ partiküllerinin tüm çap değerlerinde *ex-situ* analizlerde zeta potansiyelleri negatif olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). 30 nm TiO₂ partikül çözeltilerinde en düşük zeta potansiyeli değerleri gözlenmiştir. Ancak bu partiküllerin yüzey yük karakteristiği gıda ortamında da değişmemiştir. 100 nm ve 250 nm çaplarında ise gıda ortamına giren nanopartiküllerin yüzey yükleri ciddi miktarda azalmıştır.

Ağız ortamında hidrodinamik çap ölçümlerine bakıldığında ise SMUF ortamındaki 3 farklı çaptaki nanopartikülde de agregasyon eğilimi gözlenmiştir. Aynı nanopartiküller gıda ortamına geçtiğinde ise agregatlar küçülmüştür. Bu davranışın sindirim öncesi adımdaki nanopartikülün tampon ortamındaki nanopartikül çözeltilerinde de gözlenmesi sebebiyle ağız ortamı; SMUF içerisindeki TiO₂ nanopartikül davranışını değiştirmemiştir. Ek olarak, özellikle 30 nm örneklerine ait çok dağılımlılık indeksi sonuçlarına bakıldığında gıda matrisi içindeki partiküllerin çözelti içindeki dağılımlarının homojen olduğu düşünülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Sindirim simülasyonunun ağız ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri

Ağız (-8.50 mV)			30 nm	Pdi	100 nm	Pdi	250 nm	Pdi
TiO₂	DLS	0.4	1292.0 ±	0.626 ±	1281.0 ±	0.34 ±	1331.0 ±	0.389 ±
	(nm)	mg/mL	256.8	0.130	53.7	0.062	189.8	0.057
	Zeta (mV)		-6.6 ± 0.60		-8.16 ±		-13.5 ± 1.3	
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.4	967.4 ±	0.728 ±	638.1 ±	0.298 ±	757.9 ±	0.383 ±
	(nm)	mg/mL	63.4	0.130	68.7	0.042	82.1	0.016
	Zeta (mV)		-5.4 ± 0.8		-4.36 ±		-3.85 ± 4.63	
Yağlı süt	DLS		964.2 ±	0.480 ±				
	(nm)		172.2	0.059				
	Zeta (mV)		-6.8 ± 3.4					
TiO₂	DLS	0.8	2287.0 ±	0.260 ±	1520.0 ±	0.482 ±	1474.0 ±	0.368 ±
	(nm)	mg/mL	184.2	0.124	250.2	0.129	101.9	0.031
	Zeta (mV)		-3.5 ± 3.3		-8.94 ±		-12.2 ± 0.5	
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.8	1134.0 ±	0.650 ±	819.5 ±	0.396 ±	734.2 ±	0.308 ±
	(nm)	mg/mL	231.4	0.119	103.2	0.065	65.5	0.021
	Zeta (mV)		-5.3 ± 0.8		-0.75 ±		-1.55 ± 2.85	
Yağlı süt	DLS		967.4 ±	0.480 ±				
	(nm)		63.4	0.059				
	Zeta (mV)		-5.4 ± 0.8					
TiO₂	DLS	1.60	2472.0 ±	0.317 ±	2554.0 ±	0.272 ±	1628.0 ±	0.349 ±
	(nm)	mg/mL	586.9	0.060	398.6	0.100	123.8	0.047
	Zeta (mV)		-3.3 ± 0.5		-8.12 ±		-10.0 ± 0.7	
Yağlı süt / TiO₂	DLS	1.60	1586 ±	0.616 ±	996.2 ±	0.424 ±	943.6 ±	0.349 ±
	(nm)	mg/mL	512.5	0.140	289.2	0.072	136.4	0.072
	Zeta (mV)		-6.0 ± 2.9		-1.76 ±		1.95 ± 4.4	
Yağlı süt	DLS		967.4 ±	0.480 ±				
	(nm)		63.4	0.059				
	Zeta (mV)		-5.4 ± 0.8					

Mide ortamının zeta potansiyel değeri -0.01mV olarak bulunmuştur. Mide ortamında zeta potansiyeli ölçümleri, tampon içerisindeki nanopartikül çözeltilerinde tüm çaplar için benzer bulunmuştur (Çizelge 4.7). Gıda ile etkileşen nanopartikül örneklerinde ise yüzey potansiyel değerlerinde azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalış mide ortamı değerine ulaşmamıştır. Hidrodinamik çap ölçümlerine bakıldığında ise mide ortamında gıda ile etkileştirilmiş nanopartiküllerde agregasyon azalışı görülmüştür. Bu etki konsantrasyon arttıkça azalmıştır. 100 nm çapındaki partikül gıda ortamında en yüksek konsantrasyonda dipsersiyon yerini agregasyona bırakmıştır. Ancak konsantrasyon arttıkça tampon ortamındaki nanopartikül çözeltilerinde de agregasyon görüldüğü için bu etkinin nanopartikülün partiküller arası çekim kuvvetinin, diğer etkilere baskın olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. 3 çap için de mide ortamı çok dağılımlılık indeksi değerleri homojeniteye yakın ($0.2-0.6$) ortalama düzeyde seyretmiştir [67] (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Sindirim simülasyonunun mide ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri

Mide (-0.01 mV)			30 nm	Pdi	100 nm	Pdi	250 nm	Pdi
TiO₂	DLS	0.4	828.0 ±	0.795 ±	764.4 ±	0.329 ±	603.0 ± 18.0	0.345 ±
	(nm)	mg/mL	284.5	0.135	24.2	0.091		0.053
	Zeta		-10.1 ±		-10.3 ±		-11.6 ± 8.4	
	(mV)		0.6		0.46			
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.4	479.2 ±	0.542 ±	703.5 ±	0.516 ±	173.0 ± 47.3	0.770 ±
	(nm)	mg/mL	187.9	0.114	66.48	0.098		0.180
	Zeta		-1.3 ± 7.0		-9.93 ±		-7.1 ± 1.0	
	(mV)			0.60				
Yağlı süt	DLS		435.3 ±	0.491 ±				
	(nm)		145.1	0.040				
	Zeta		-6.9 ± 0.6					
	(mV)							
TiO₂	DLS	0.8	1404.0 ±	0.435 ±	685.0	0.294 ±	600.8 ± 33.3	0.250 ±
	(nm)	mg/mL	403.1	0.081	±23.1	0.028		0.037
	Zeta		-10.8 ±		-12.1 ±		-18.7 ± 0.9	
	(mV)		0.4		0.85			
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.8	836.1 ±	0.456 ±	769.0 ±	0.307 ±	386.5 ± 35.4	0.442 ±
	(nm)	mg/mL	150.1	0.047	21.5	0.023		0.048
	Zeta		-7.8 ± 0.7		-9.75 ±		-8.9 ± 0.8	
	(mV)			0.43				
Yağlı süt	DLS		435.3 ±	0.491 ±				
	(nm)		145.1	0.040				
	Zeta		-6.9 ± 0.6					
	(mV)							
TiO₂	DLS	1.60	2124.0 ±	0.357 ±	1394.0 ±	0.269 ±	692.4 ±	0.257 ±
	(nm)	mg/mL	280.5	0.089	341.3	0.069	108.0	0.023
	Zeta		-11.2 ±		-11.9 ±		-17.7 ± 0.4	
	(mV)		0.3		0.78			
Yağlı süt / TiO₂	DLS	1.60	2820.0 ±	0.249 ±	2718.0 ±	0.183 ±	537.8 ± 66.0	0.429 ±
	(nm)	mg/mL	1350	0.057	606.3	0.120		0.057
	Zeta		-5.2 ± 0.7		-5.08 ±		-8.6 ± 0.9	
	(mV)			0.67				
Yağlı süt	DLS		435.3 ±	0.491 ±				
	(nm)		145.1	0.040				
	Zeta		-6.9 ± 0.6					
	(mV)							

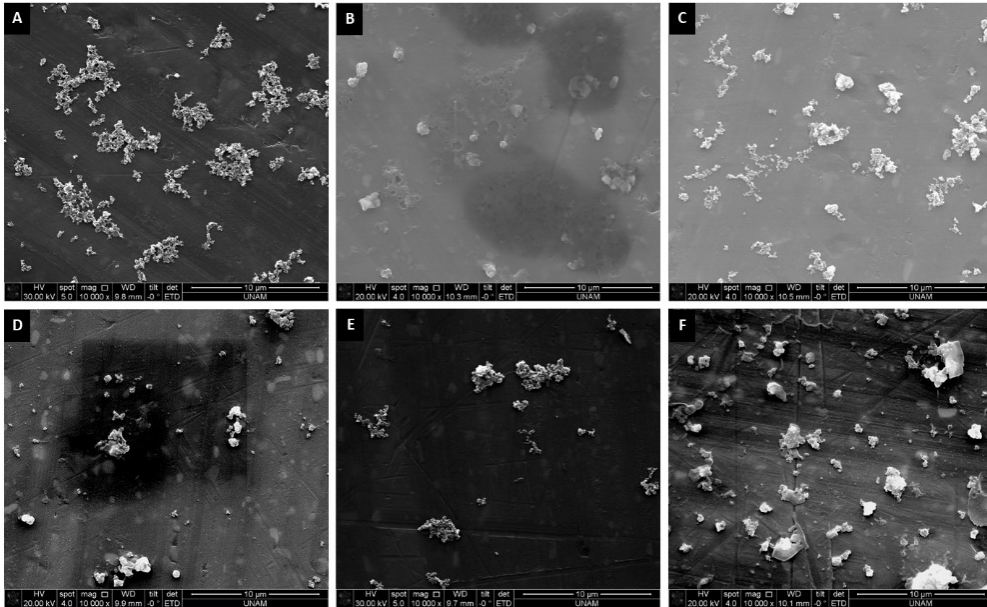
Barsak ortamının zeta potansiyeli -10.50 mV olarak bulunmuştur. Barsak ortamında nanopartiküllerin tüm çapları için zeta potansiyeli tampon ve gıda matrisi ortamlarında negatif bulunmuş ve iki ortamın potansiyel değerleri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. 30 nm TiO₂ nanopartikülünün tampon ortamında ve gıda matrisi ortamında en küçük çapa ulaştığı görülmüştür. Bu durum 100 nm için gıda ortamında nanopartikülde çap artışı olarak gözlenmiştir. 250 nm TiO₂ partikülü ise tampon içerisinde sindirim simülasyonu boyunca en küçük çaplı halini göstermese de gıda ortamı ile birleştiğinde dispersiyona yönelmiştir. 3 farklı çapta farklı davranışlar gözleniyor gibi görünse de aslında tüm partiküller gıda ortamında ağızdan barsağa doğru dispersiyon eğilimi göstermektedir. Barsak ortamında partiküllere ait çok dağılımlılık indeksi sonuçlarına bakıldığında gıda matrisi içindeki partiküllerin çözelti içindeki dağılımlarının homojen olmadığı düşünülmüştür (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Sindirim simülasyonunun barsak ortamında, yağlı süt ile etkileşen farklı çap ve konsantrasyondaki TiO₂ partiküllerinden elde edilen zeta potansiyeli, çok dağılımlılık endeksi (PDI) ve ortalama hidrodinamik çap değerleri

Barsak (-10.50 mV)			30 nm	Pdi	100 nm	Pdi	250 nm	Pdi
TiO₂	DLS	0.4	NA	1	263.5 ±	0.767 ±	387.3 ±	0.641 ±
	(nm)	mg/mL			52.8	0.256	29.7	0.144
	Zeta		-8.1 ± 1.0		-9.33 ±		-14.6 ±	
	(mV)				0.74		1.20	
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.4	395.9 ±	0.803 ±	615.4 ±	0.701 ±	385.8 ±	0.598 ±
	(nm)	mg/mL	76.2	0.085	120.6	0.145	19.2	0.161
	Zeta		-10.2 ± 0.3		-8.65 ±		-10.6 ±	
	(mV)				0.54		0.98	
Yağlı süt	DLS		218.0 ±	0.978 ±				
	(nm)		70.4	0.053				
	Zeta		-7.1 ± 1.1					
	(mV)							
TiO₂	DLS	0.8	979.0 ±	0.596 ±	632.4 ±	0.851 ±	768.5 ±	0.523 ±
	(nm)	mg/mL	94.5	0.141	117.0	0.183	91.6	0.062
	Zeta		-8.5 ± 1.8		-9.3 ± 1.30		-14.6 ±	
	(mV)					0.58		
Yağlı süt / TiO₂	DLS	0.8	443.3 ±	0.738 ±	961.8 ±	0.472 ±	545.5 ±	0.486 ±
	(nm)	mg/mL	66.7	0.074	66.7	0.114	79.6	0.053
	Zeta		-11.5 ± 1.1		-9.1 ± 0.8		-10.6 ±	
	(mV)					1.5		
Yağlı süt	DLS		218.0 ±	0.978 ±				
	(nm)		70.4	0.053				
	Zeta		-7.1 ± 1.1					
	(mV)							
TiO₂	DLS	1.60	1490 ±	0.521 ±	579.4 ±	0.699 ±	1250.0 ±	0.521 ±
	(nm)	mg/mL	403.2	0.134	89.2	0.185	290.9	0.251
	Zeta		-7.85 ± 1.4		-9.98 ±		-13.8 ±	
	(mV)				0.66		1.1	
Yağlı süt / TiO₂	DLS	1.60	479.0 ±8	0.479 ±	1219.0 ±	0.406 ±	918.7 ±	0.484 ±
	(nm)	mg/mL	7.0	0.070	240.9	0.061	57.3	0.022
	Zeta		-12.5 ± 1.7		-9.81 ± 1.4		-10.2 ±	
	(mV)					0.27		
Yağlı süt	DLS		218.0 ±	0.978 ±				
	(nm)		70.4	0.053				
	Zeta		-7.1 ± 1.1					
	(mV)							

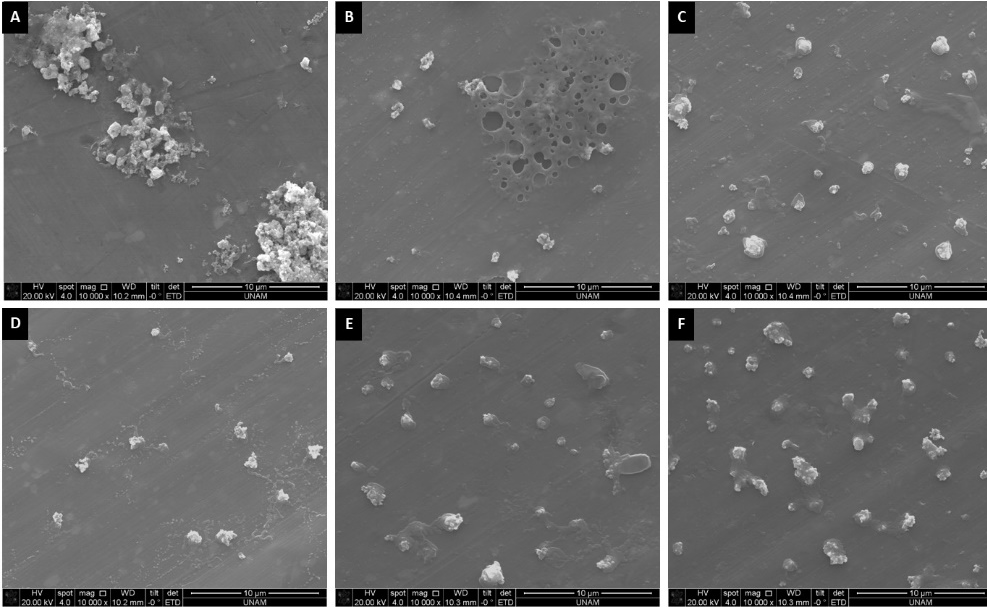
Ağız ortamında en büyük çap değerine sahip yağlı süt çözeltisi ise barsak ortamına varınca en küçük çap değerine ulaşmıştır. Bu durum sindirim simülasyonu boyunca süt ortamının protein ve yağ yapısının beklenildiği gibi değiştiğini göstermiştir.

Sindirim simülasyonu sonrası ESEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.21-23), tampon ortamındaki TiO_2 nanopartiküllerinin ağız ortamında agregasyon durumlarının devam ettiği ve bu durumun partiküllerin tampon içerisindeki karakteristiği olduğu anlaşılmıştır. Yağlı süt etkileşimi sonucunda ise tüm çaplardaki partiküllerde agregat çapı küçülmüştür. Bu duruma ağız ortamının özelliklerinin değil partiküllerin proteinlerle kurduğu bağın neden olduğu düşünülmektedir. Gıda matrisinin partikül üzerinde benzer etki gösterdiği bir önceki başlıkta gösterilmiştir. Mide ortamında ağız ortamına göre agregasyon azalmıştır, ağız yağlı süt- TiO_2 ortamına benzer olarak yağlı süt ile etkileşime giren nanopartiküllerin agregat çapı mide ortamında daha küçüktür. Barsak ortamında TiO_2 ve yağlı süt- TiO_2 örneklerinin agregat çaplarının diğer simülasyon ortamlarından daha küçük olduğu görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, ağız ortamının TiO_2 nanopartiküllerinin tampon ortamındaki davranışı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Mide ve barsak ortamlarında ortam bileşenleri ile birlikte pH değerinin ve iyon türlerindeki değişimin TiO_2 partikülünün zeta potansiyelini de etkileyerek dispersiyonu arttırdığı düşünülmektedir [70].

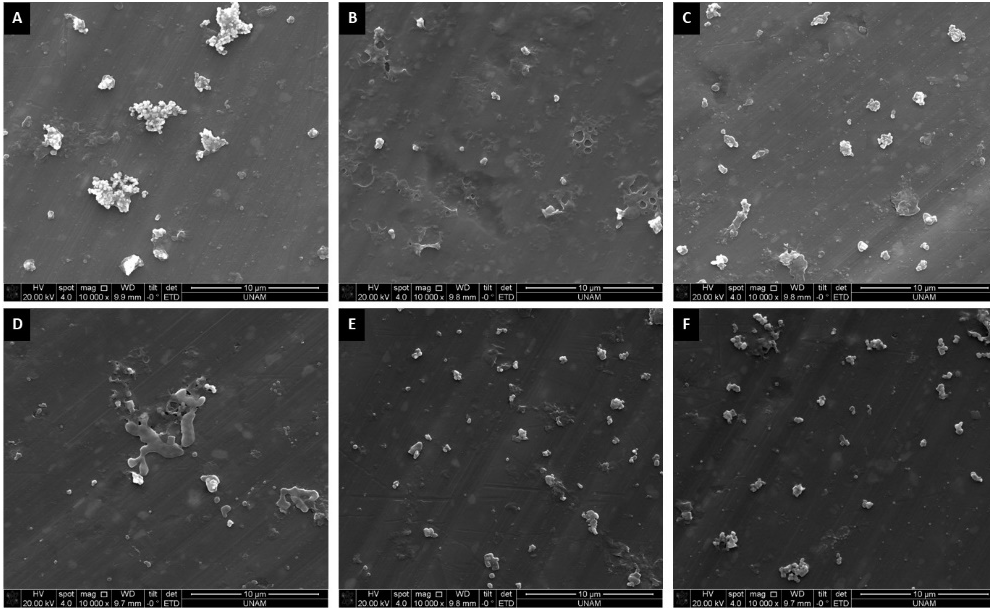


Şekil 4.21. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO_2 partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO_2 , B) Ağız ortamında yağlı

süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂.

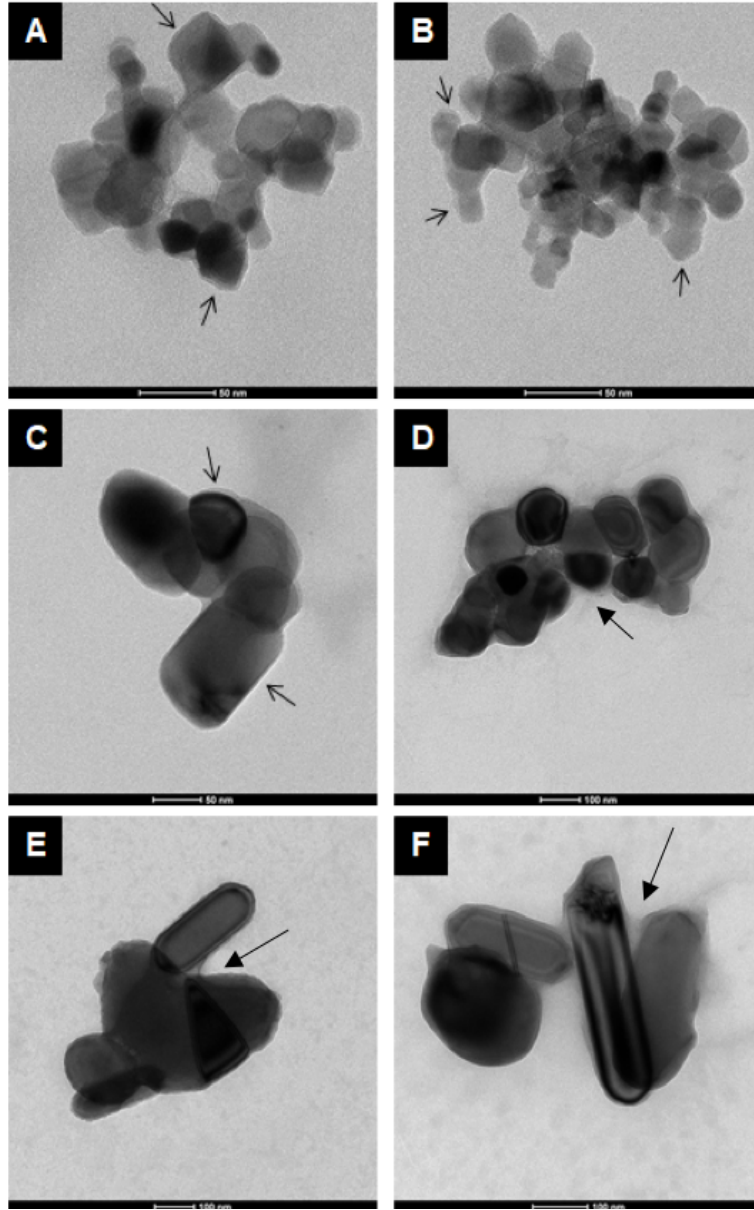


Şekil 4.22. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO₂, B) Ağız ortamında yağlı süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂.



Şekil 4.23. Gıda matrisi ile etkileşen 30 nm TiO₂ partikülünün sindirim ortamlarından alınan örneklerinin ESEM görüntüleri. A) Ağız ortamında TiO₂, B) Ağız ortamında yağlı süt- TiO₂, C) Mide ortamında TiO₂, D) Mide ortamında yağlı süt- TiO₂, E) Barsak ortamında TiO₂, F) Barsak ortamında yağlı süt- TiO₂.

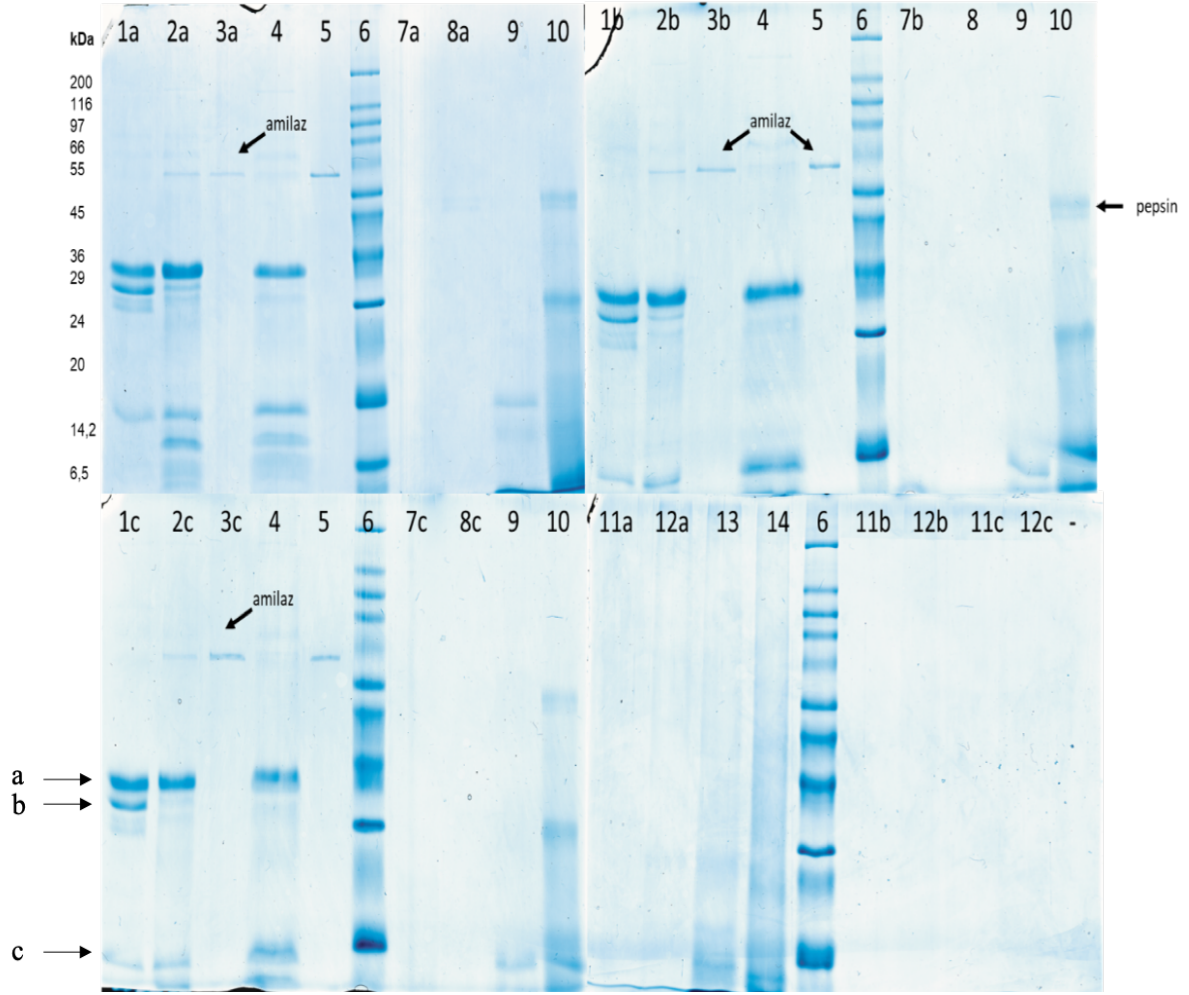
Sindirim simülasyonunun son aşaması olan barsak ortamından alınan örneklere ait TEM görüntüleri (Şekil 4.24) incelendiğinde tüm çaplara ait partiküller üzerinde hem tampon hem de gıda ortamında korona yapısı (ok) gözlenmiştir. Bu durum nanopartiküllerin sindirim ortamında bulunan diğer moleküller (enzimler ve sığır serum albumini) ile etkileşime girmesinden kaynaklanmıştır. Gıda ortamında bulunan partiküllerin üzerinde farklı olarak daha kalın bir korona tabakası görüntülenmiştir.



Şekil 4.24. Tampon ve gıda ortamındaki TiO₂ nanopartiküllerinin simüle barsak ortamından alınan örneklerinin TEM görüntüleri. A) 25 nm TiO₂, B) Yağlı süt + 25 nm TiO₂, C) 100 nm TiO₂, D) Yağlı süt + 100 nm TiO₂, E) 250 nm TiO₂, F) Yağlı süt + 250 nm TiO₂

SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak üzere seçilen nanopartiküllerin yağlı süt, ağız, mide ve barsak ortamlarına ait elektroforetogramlar Şekil 4.25’de verilmiştir. TiO₂ nanopartiküllerinin sindirim sistemi simülasyonunun ilk aşaması olan ağız ortamından geçirilmesi ile elde edilen pelletlere ait jel görüntüleri incelendiğinde, majör süt proteinlerinden α_s -kazein (α -Cn) bantları belirgin olarak görülürken ve β -kazein (β -Cn) bantları daha silik bir bant vermiştir. Süt ile etkileştirilmiş nanopartiküller ve süt

eklenmemiş nanopartiküllerin ağız ortamı ile etkileşiminde ise ortamda bulunan amilaz enzimine ait bantlar açıkça görülmektedir. Bu noktada TiO₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Sindirimin ikinci aşaması olan mide ortamında ise süt ile inkübe edilen nanopartikül örneklerinde pepsin bandı gözlenmemiştir. Ayrıca tüm çaplarda mide ortamında kazein bantlarının tamamen kaybolduğu ve herhangi bir banda rastlanmadığı görülmektedir. Sindirim simülasyonun son aşaması olan barsak ortamında ise bütün nanopartiküller için protein korona yapısına ait herhangi bir banda rastlanmamıştır. ESEM görüntülerinde de gözlenen bu durumun sindirim sürecinde olan enzim aktiviteleri sonucunda korona yapısındaki proteinlerin daha küçük yapılara hidrolize olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



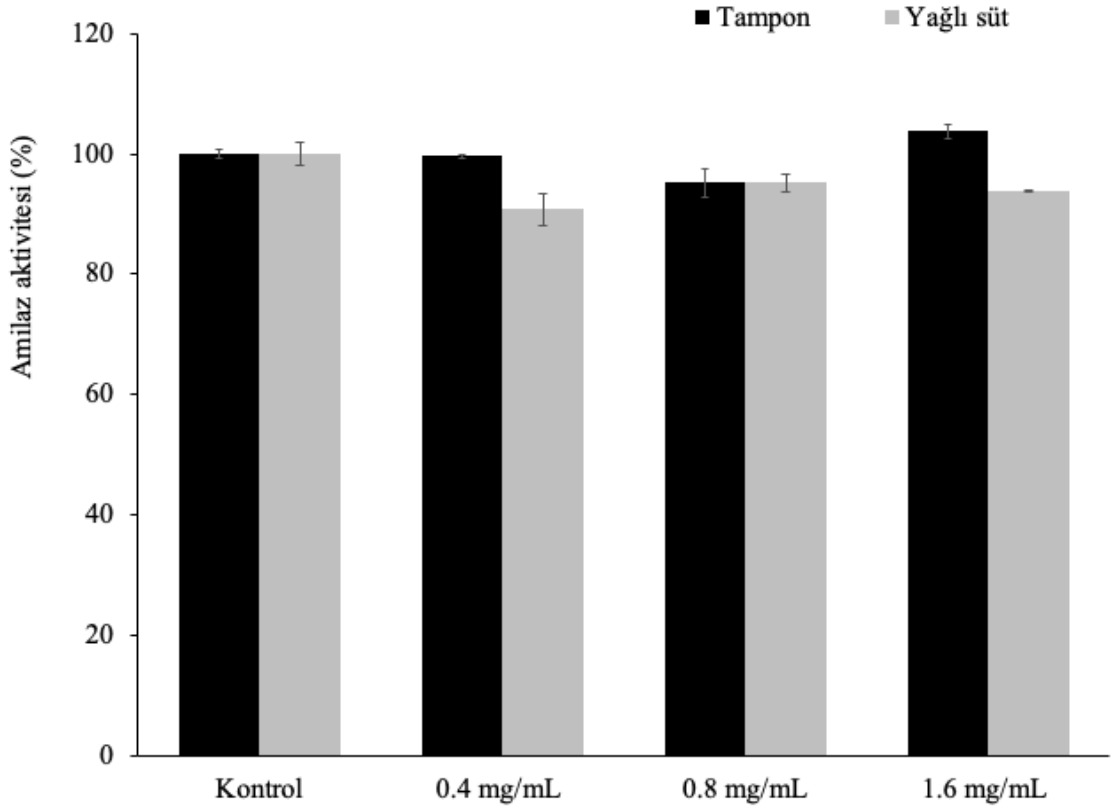
Şekil 4.25. Farklı çaplardaki TiO_2 nanopartiküllerinin süt örnekleri ve sindirim sisteminden geçirilmesi sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforetogramlarına ait görüntüler (a: 30 nm, b:100 nm ve c:300nm TiO_2 nanopartikülünü temsil etmektedir. 1: TiO_2 +yağlı süt, 2: TiO_2 +yağlı süt+ağız, 3: TiO_2 +ağız, 4: ağız+yağlı süt (in situ), 5: ağız 6: marker, 7: TiO_2 +yağlı süt+mide, 8: TiO_2 +mide, 9: yağlı süt+ mide (in situ), 10: mide, 11: TiO_2 +yağlı süt+barsak, 12: TiO_2 +barsak, 13: yağlı süt+ barsak (in situ),14: barsak) a: α -Kazein, b: β -Kazein, β -laktoglobulin

4.2.1. Nanopartiküllerin Sindirim Enzimleri Aktivitesi Üzerine Etkileri

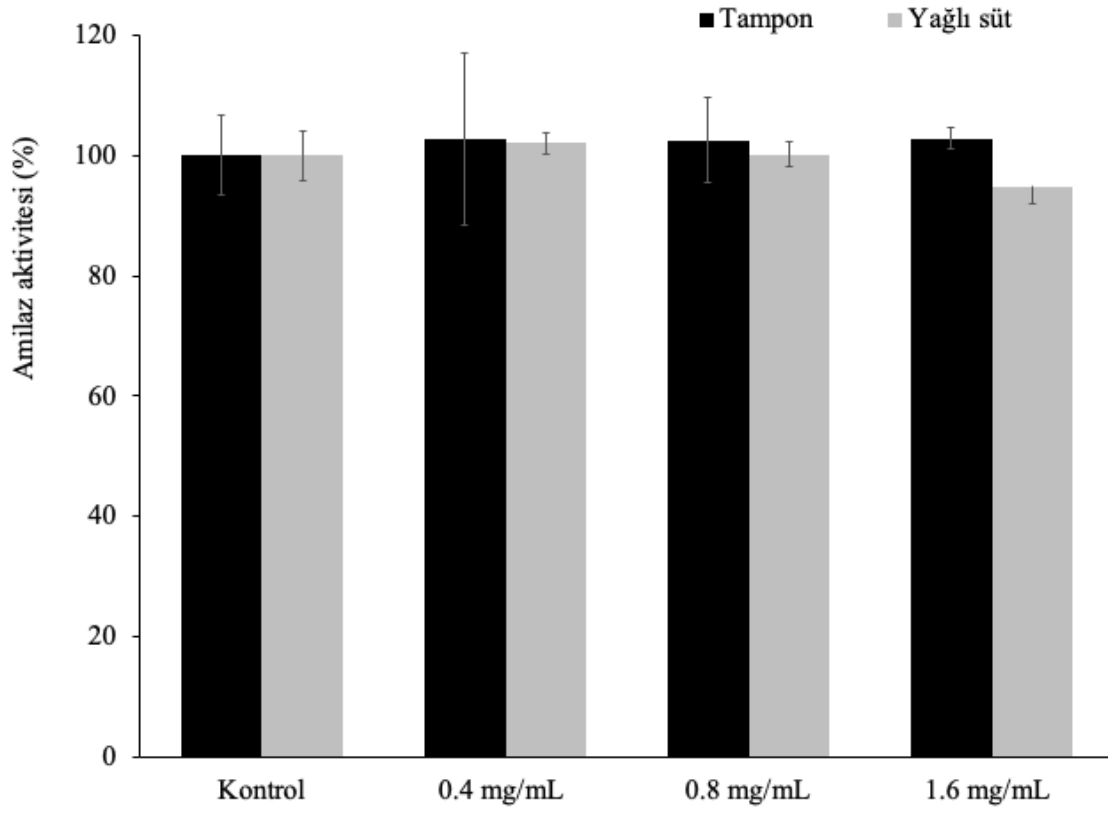
Tez kapsamında sindirim boyunca geçirdiği değişimler gözlenen TiO_2 nanopartiküllerin, sindirim boyunca orada bulunan bileşenlerle (enzimler, proteinler) etkileşime girdiği tespit edildikten sonra nanopartiküllerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla amilaz, lipaz ve pepsin enzimleri seçilerek 30-100-250 nm çapındaki TiO_2

nanopartiküller ile etkileşime sokulduktan sonra enzimlerin aktivitesi ölçülmüştür. Nanaopartikül çözeltileri tampon ve yağlı süt ortamında hazırlanmıştır.

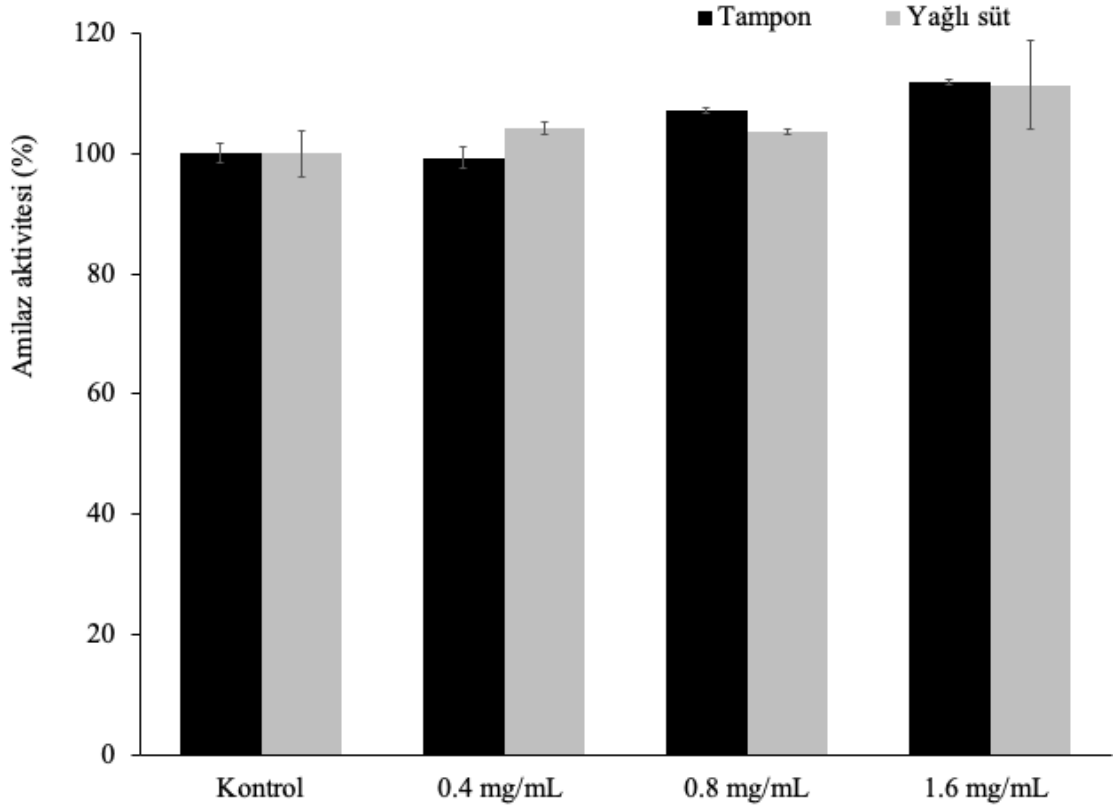
Bu doğrultuda **amilaz** enziminin aktivitesindeki değişimler incelendiğinde (Şekil 4.26-28), TiO₂ nanopartiküllerinin enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. TiO₂ nanopartikülleri için bütün çap ve konsantrasyon değerlerinde benzer sonuç alınmış olup, gıda matrisi ile etkileşen partiküllerde de durum değişmemiştir. Fakat SDS-PAGE sonuçlarında partiküllerin amilaz enzimi ile etkileşime girdiği düşünülmüştü. Bu durumda nanopartikül korona yapısı ile amilaz enziminin etkileşime girdiği fakat bu etkileşimin enzimi aktivitesini etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda TiO₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi ile etkileştiğini ama enzim aktivitesini azaltmadığını göstermiştir. Bu noktada, elde edilen bulgunun literatürle uyumlu olduğu gözlemiştir [71, 72].



Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlarda 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.



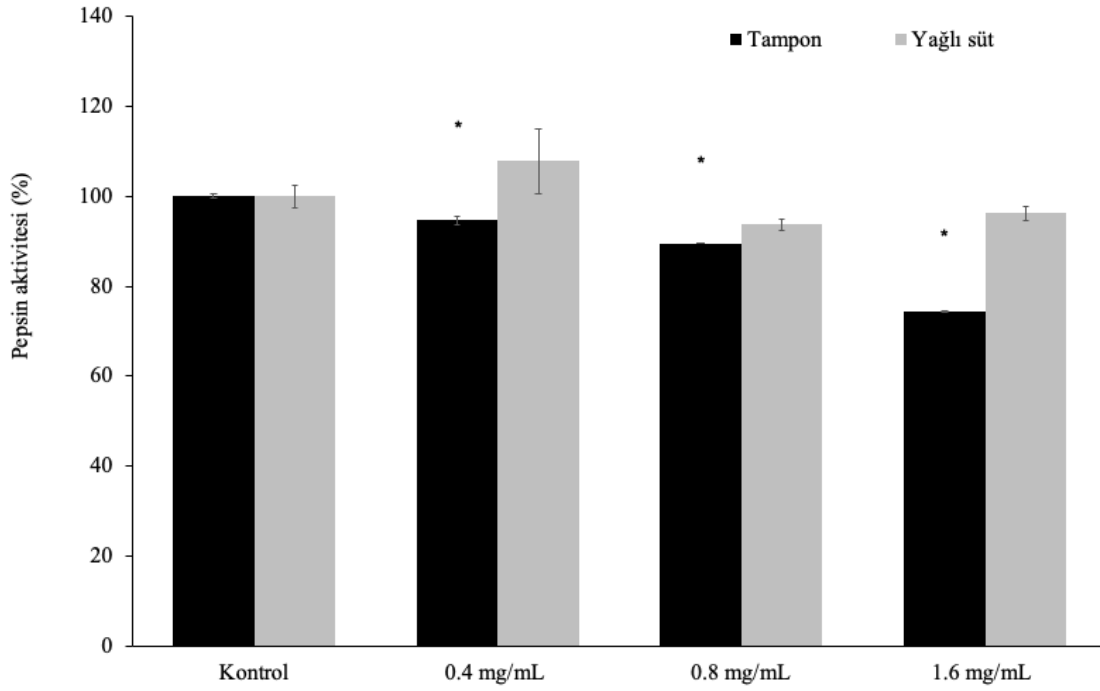
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.



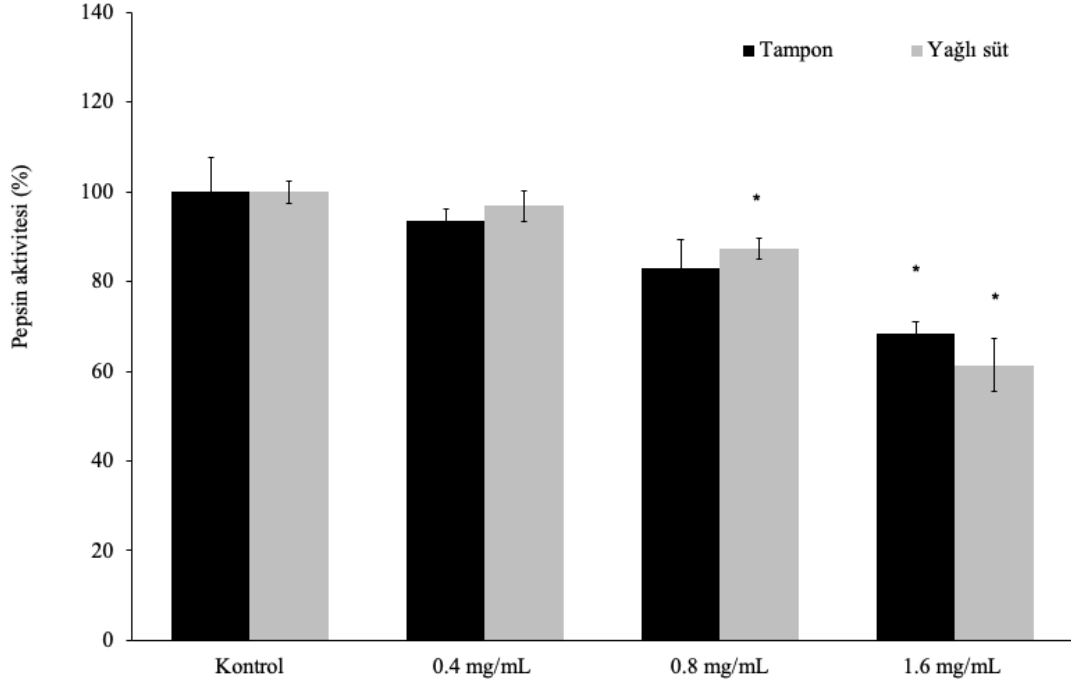
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin amilaz enzimi aktivitesine etkisi.

TiO₂ nanopartiküllerinin varlığında **pepsin** enziminin aktivitesinde artan partikül konsantrasyonu ile orantılı olarak azalış gözlenmiştir (Şekil 4.29-31). TiO₂ nanopartikül konsantrasyonunun 1.6 mg/mL olduğu örneklerde pepsin aktivitesi 30 nm partikül varlığında %75'e, 100 nm partikül varlığında %69'a ve 250 nm partikül varlığında %76'ya gerilemiştir. Ancak 30 nm ve 250 nm çapındaki partiküller gıda matrisi ile etkileştikten sonra pepsin aktivitesi üzerindeki etkilerini kaybetmişlerdir. Gıda matrisi ile etkileşen partiküllerin sahip oldukları protein korona yapılarının partiküllerin pepsin ile interaksyonunu engellediği düşünülmektedir. Ek olarak pepsinin nanopartikül ile olan etkileşimin ortamda gıda bileşenleri olduğunda azalmasının bir diğer nedeninin, enzimin nanopartikül ile etkileşmek yerine diğer molekülleri seçmesi olabileceği de düşünülmüştür. Literatürde yarışmalı inhibisyon olarak da bilinen bu durum geri dönüşümlü enzim inhibisyonunun bir türüdür. Buna göre enzim aktivitesini ortamdaki aktivite azaltıcı -inhibitör- ve substratların konsantrasyonu belirlemektedir[73]. Bu durumda elde edilen bulgunun, ortamda TiO₂ nanopartikülleri varken inhibisyon ve

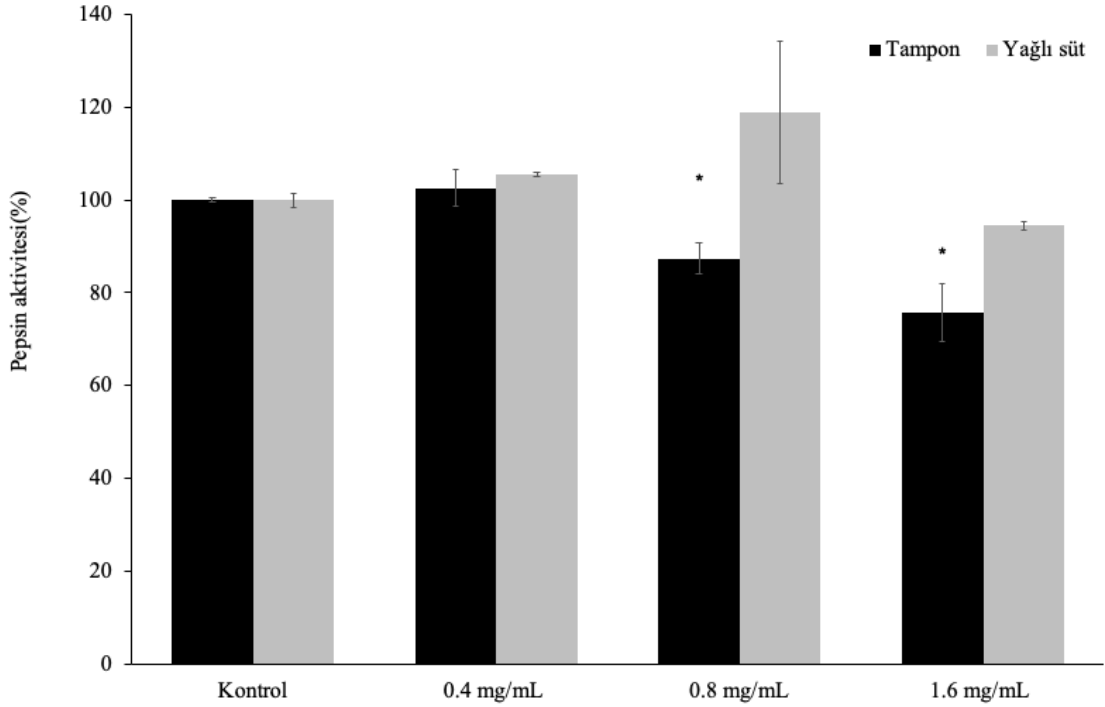
ortamda gıda bileşenleri (tercih edilen substrat) varken yeniden aktivasyon görülmesi açısından yarışmalı inhibisyon davranışını takip ettiği düşünülmektedir. Bu durumun ispatlanması için enzim kinetiği analizleri yapılması gerekmektedir.



Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05

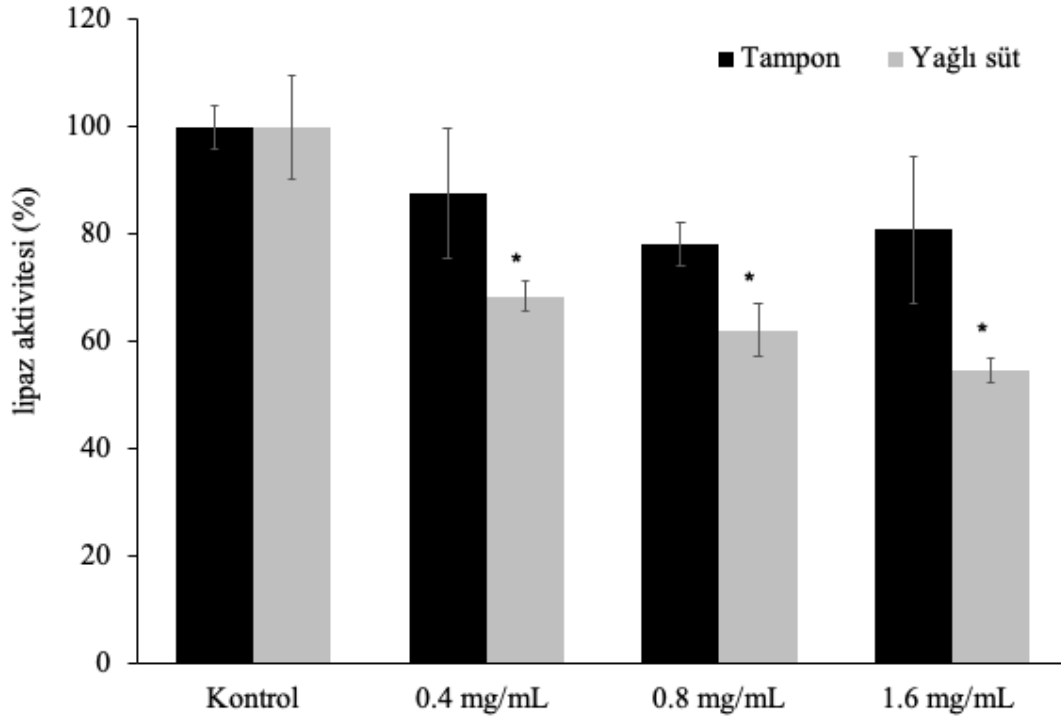


Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05

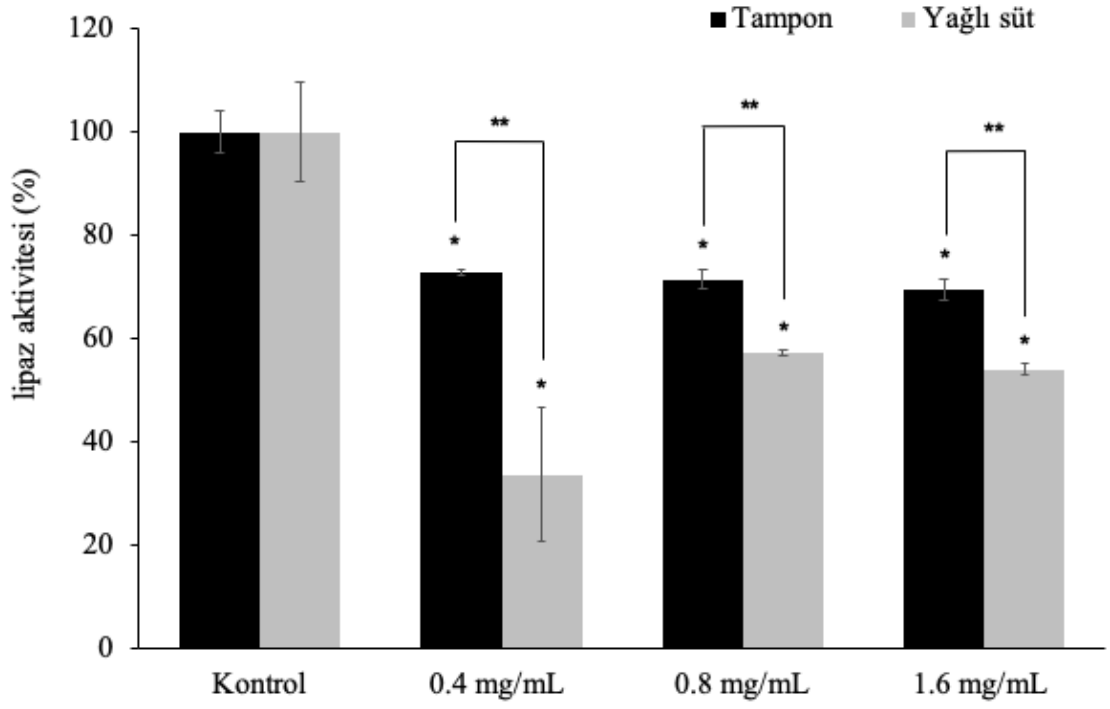


Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin pepsin enzimi aktivitesine etkisi. *: p<0.05

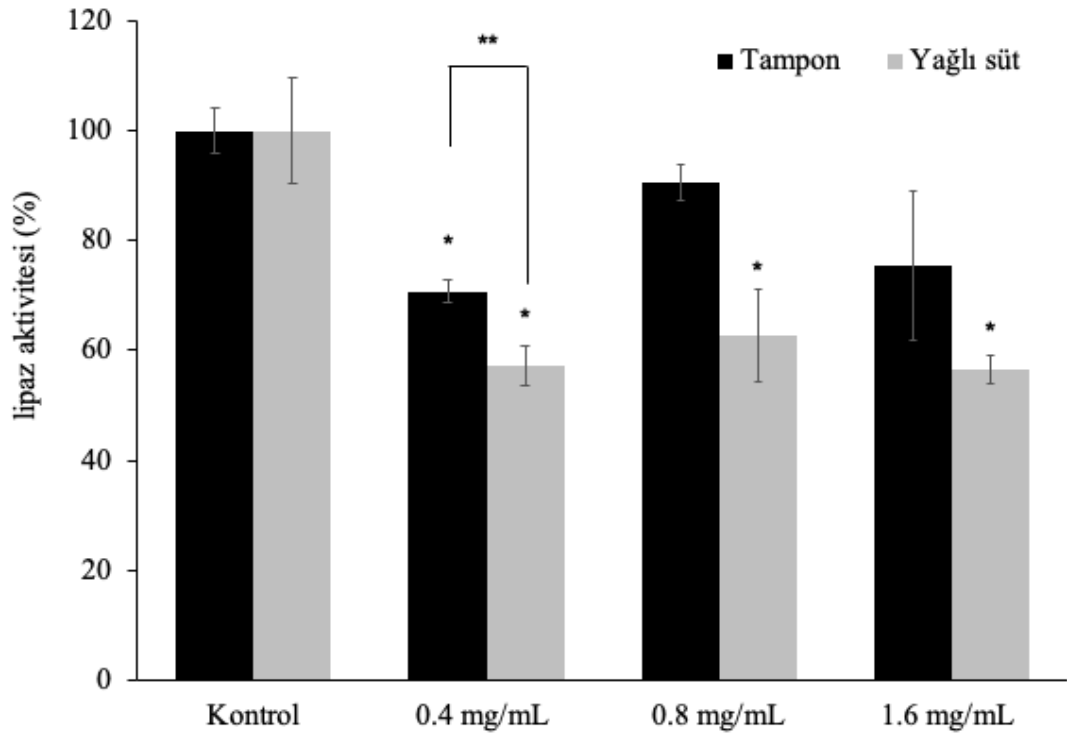
Üç farklı sindirim enzimi içerisinde nanopartiküllerin etkisi en çok **lipaz** aktivitesi üzerinde görülmüştür (Şekil 4.32-34). Hem TiO₂ nanopartiküllerinin konsantrasyonları arttıkça lipaz aktivitesinde azalış meydana gelmiştir. Diğer sindirim enzimlerinden farklı olarak gıda matrisi ile etkileştikten sonra da partiküller lipaz aktivitesi üzerindeki etkilerini sürdürmeye devam etmişlerdir. Bu sonuç partiküllerin lipaz ile etkileşim mekanizmalarının diğer enzimlerden farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bulgu literatürde kimi zaman lipaz enziminin TiO₂ nanopartiküllerinin yüzeyine absorbe olmasıyla, kimi zaman da lipidlerin (substrat) TiO₂ nanopartiküller ile etkileşime girmesiyle açıklanmıştır [74]. Ancak sindirim sonrası SDS-PAGE bantları incelendiğinde barsak ortamında nanopartikül üzerinde lipaz enzimi gözlenmemiştir. Ayrıca literatürde TiO₂ nanopartikülleri ile lipidlerin özkütle farkları nedeniyle sindirim ortamında, çok kısa süre etkileşimde bulduklarından bahsedilmektedir [74]. Bu sebeplerle sindirim ortamında lipaz inhibisyonu olası olmasa da sindirim dışındaki ortamda elde edilen bu bulgu, ileri çalışmaların yapılmasını tetikleyen bir sonuç olmuştur.



Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05



Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05;**p<0.01



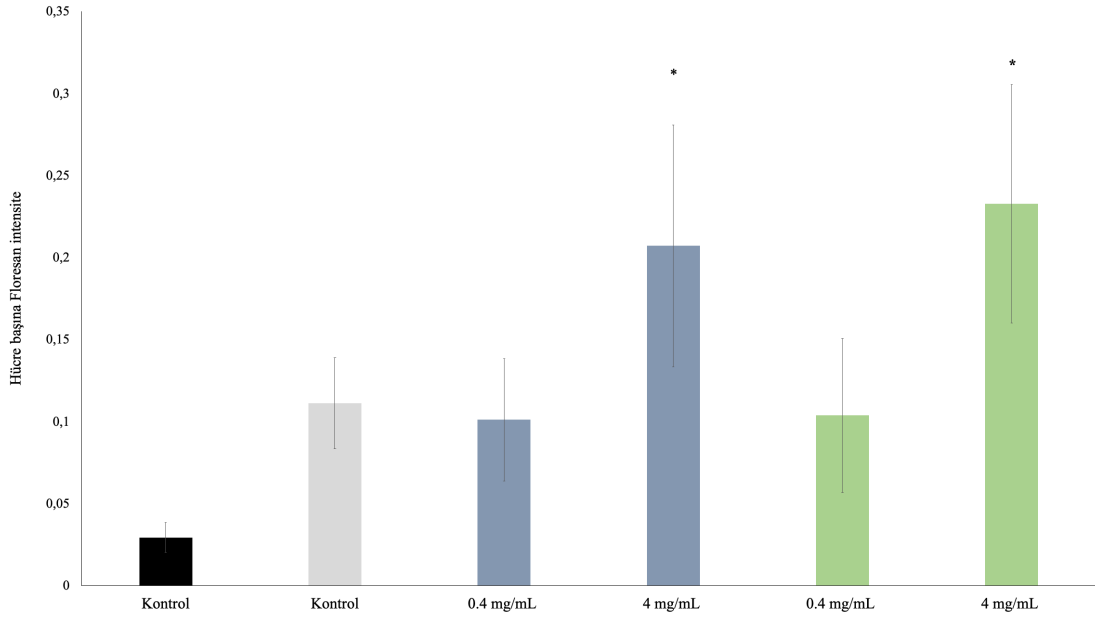
Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin lipaz enzimi aktivitesine etkisi. *:p<0.05;**p<0.01

4.3. Gıda ile Etkileşmiş TiO₂ Nanopartiküllerinin Sitotoksik Etkileri

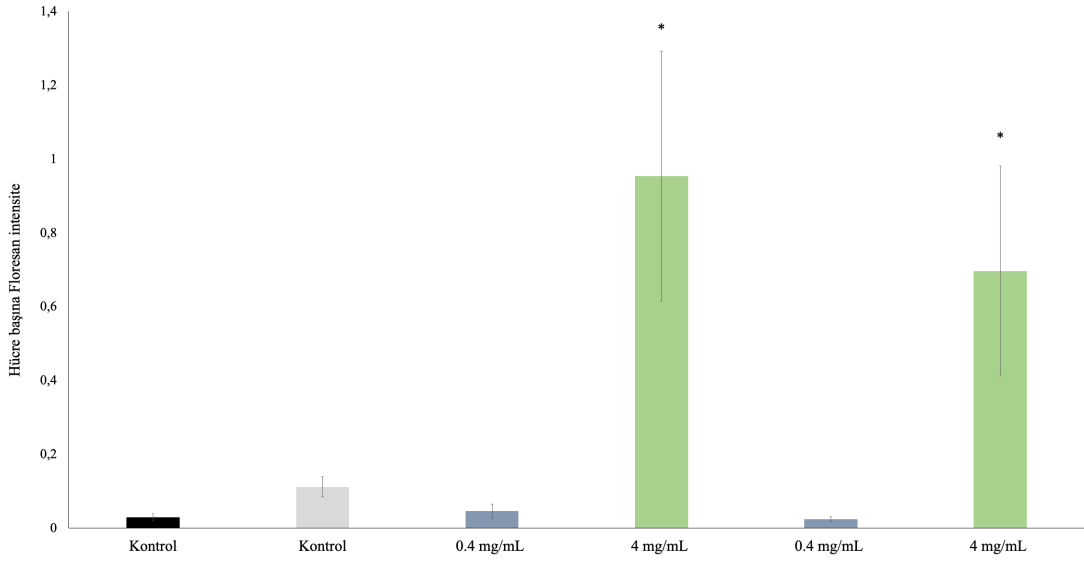
4.3.1 Hücre bazlı stres etkisi ölçümü

Farklı çaplarda ve konsantrasyonlardaki sindirim sonrası TiO₂ nanopartiküllerinin davranışı tanımlandıktan sonra hücre bazdaki etkileri ölçülmüştür. Düşük (0.4 mg/mL) ve yüksek (4 mg/mL) konsantrasyonlu TiO₂ nanopartikül çözeltilerinin, strese yeşil floresan protein üreterek cevap verecek şekilde yeniden dizayn edilmiş *E. coli* hücresi üzerine etkilerine bakılmıştır. Hücre Saltepe ve ark.(2019) tarafından ısı şoku mekanizmasını temel alarak dizayn edilmiştir. Bu mekanizmaya göre hücre herhangi bir stres faktörüne özellikle ROS, DNA zararı, osmotik stres ve nanomalzeme stresine karşı protein bazlı cevap vermektedir. Araştırma grubu hücreyi stres etkisine karşı floresan protein üretmek üzerine geliştirmiştir [61]. Analizin bu aşamasında 30-100 ve 250 nm çapındaki TiO₂ nanopartikülleri bu hücreler ile etkileşime sokulduktan sonra hücre sinyalleri akış sitometre cihazı ile ölçülmüştür. Cihaz prensibine göre akışta geçen ve yansıyan floresan ışınlar birbirinden ayrılarak nanopartiküllerin yaptığı girişim engellenmiştir. Kontrol grupları grafiklerde tampon ortamı ile etkileşime sokulan hücre (siyah) ve yağlı sütle etkileşime sokulan hücre (gri) olarak belirlenmiştir.

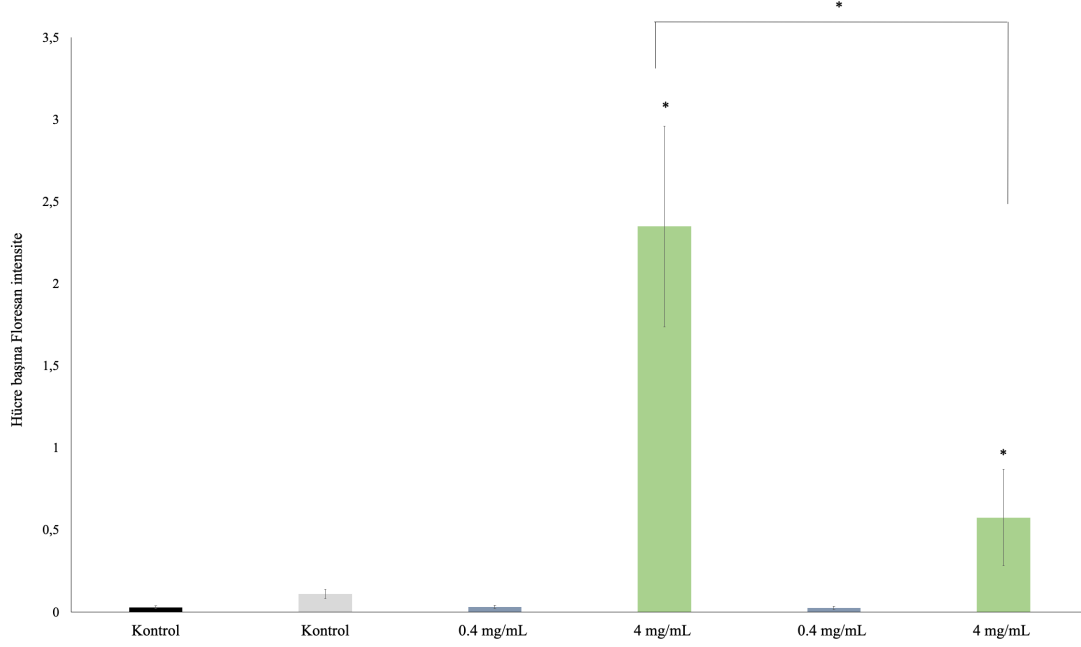
Bu analizde en belirgin sonuç, stres etkisinin doza bağlı olarak arttığı olmuştur (Şekil 4.35-37). Nanopartiküllerin hücrelerde yarattığı en büyük stres etkisi yüksek nanopartikül konsantrasyonlarında gözlenmiştir. 30 nm çapındaki nanopartiküllerin SMUF içindeki stres etkisi istatistiksel olarak farklı çıkmasa da, korona oluşumundan sonra stres etkisinin kontrol hücresine kıyasla arttığı görülmüştür. 100 nm çapındaki nanopartiküllerin stres etkisi ise SMUF veya süt ortamı fark etmeksizin yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir. SMUF ortamında gözlenen stres etkisinin, korona oluşumundan sonra istatistik olarak değişmediği hesaplanmıştır. 250 nm çapı için yine en büyük stres etkisi yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiş olup, bu etki nanopartiküller korona oluşturduktan sonra azalmıştır. Yeşil floresan protein üreten bakterinin kullanıldığı bu aşamada nanopartiküllerin çapa bağlı oluşturduğu stres etkisi, barsak epitel hücrelerindeki etkiye göre farklılık göstermiştir. Barsak epitelinde en belirgin etki 30 nm çapındaki TiO₂ nanopartikül çözeltilerinde gözlenmişken, *E.coli* hücresinde 250 nm çapındaki nanopartikül çözeltilerinde ölçülmüştür.



Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin floresan *E.coli* üzerindeki stres etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt



Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin floresan *E.coli* üzerindeki stres etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt

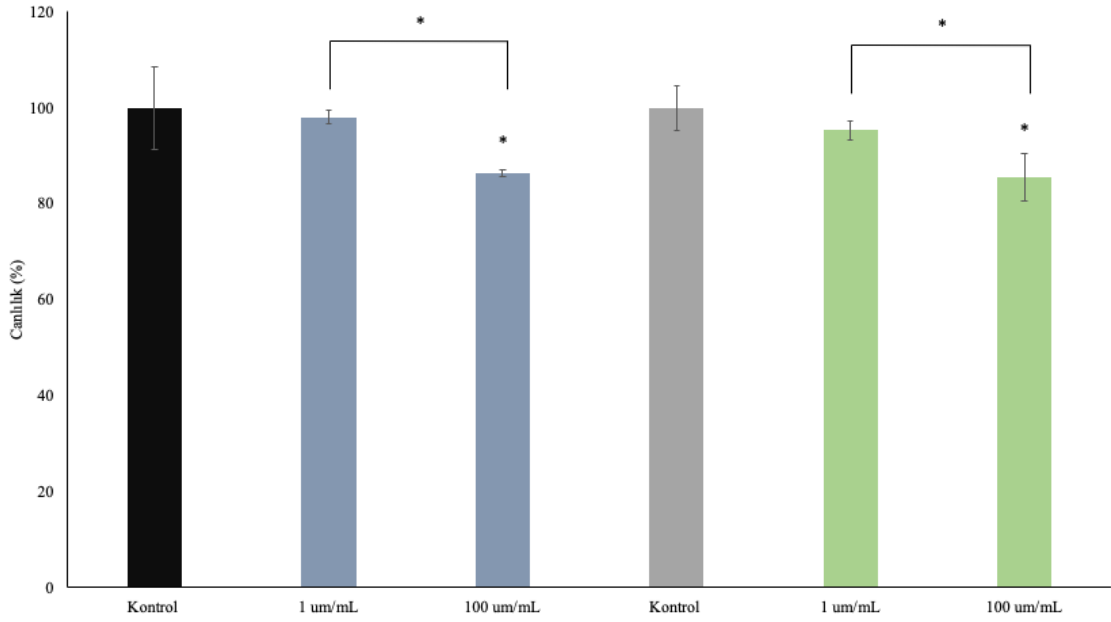


Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin floresan *E.coli* üzerindeki stres etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt

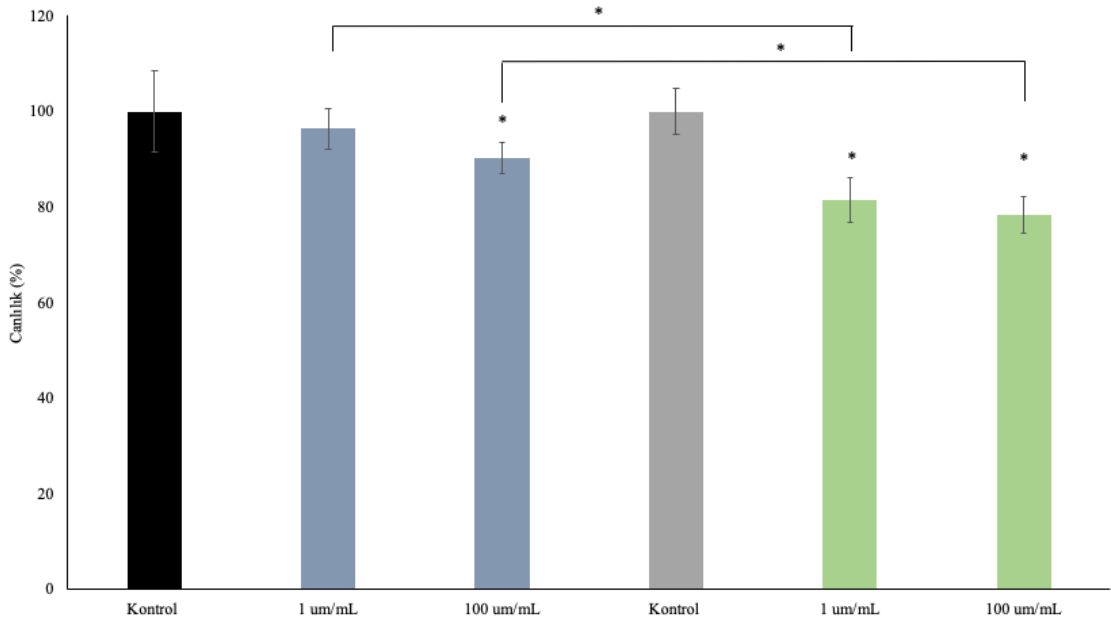
4.3.2. Barsak epitel hücresi analizleri

Barsak epiteli, Caco-2 hücreleri ile yapılan analizlerde sindirim sonrası TiO₂ nanopartiküllerinin çapının ve konsantrasyonunun, hücrelerin canlılığına etkileri ile reaktif oksijen türleri üretim durumu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 30 nm çapı için sindirim öncesi yağlı süt ortamı ile etkileştirilmemiş (SMUF) nanopartiküllerin düşük (1µm/mL) ve yüksek (100 µm/mL) konsantrasyonunda canlılığa istatistik olarak önemli bir etkisinin olmadığı elde edilmiştir (Şekil 4.38-40). Fakat yağlı süt ile etkileşim sonrası 30 nm çapındaki yüksek konsantrasyondaki nanopartiküllerde canlılığın azaldığı gözlenmiştir. 100 nm çapındaki nanopartiküller için yağlı süt ortamında hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda yağlı süt ortamındaki nanopartiküllerde SMUF ortamına göre canlılığa olumsuz bir etki gözlenmiştir. 250 nm çapındaki nanopartiküllerin sindirim sonrası canlılığa etkisi incelendiğinde ise 100 nm çapındaki davranışa benzer bir etki görülmüştür. SMUF ortamında canlılığa bir etkisi olmadığı ölçülen 250 nm çapındaki nanopartiküllerin gıda ortamında ise canlılığa olumsuz etkisi düşük konsantrasyonda gözlenmiştir. Bu aşama sonunda özellikle yüksek konsantrasyonlardaki 30, 100 ve 250 nm çapındaki nanopartikül korona yapılarının, barsak epitel hücrelerinin canlılığına belirgin bir olumsuz etkilerinin olduğu bulunmuştur. Bu bulgulara göre nanopartiküller

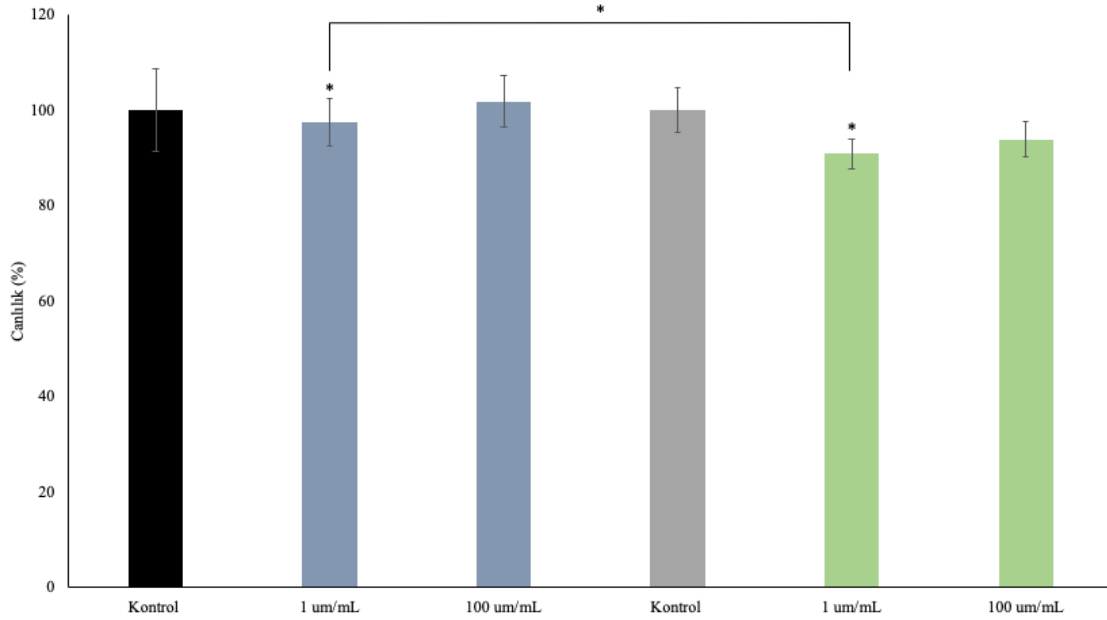
ile gıda proteinleri arasındaki bağın nanopartiküllerin memeli hücresi ile etkileşimi artırdığı sonucuna ulaşılmaktadır. Literatürde nanopartikül- protein korona ile toksisite arasındaki ilişkinin hücre geçisi mekanizması ve protein türüne bağlı olduğunu açıklanmıştır [75].



Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt



Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt

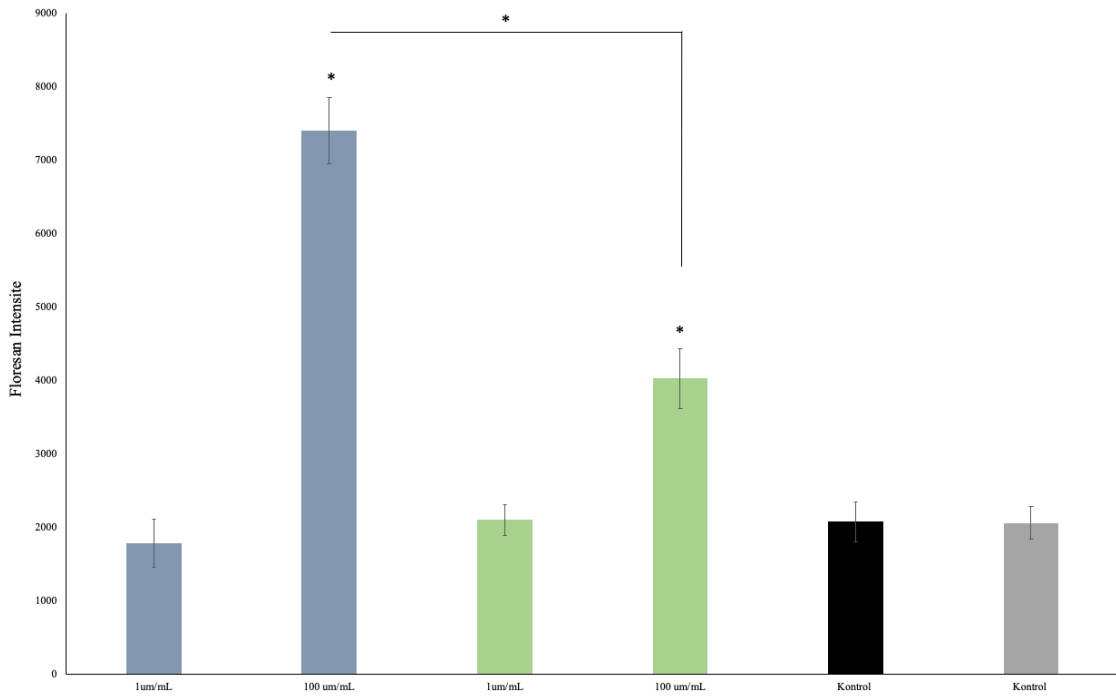


Şekil 4.40. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt

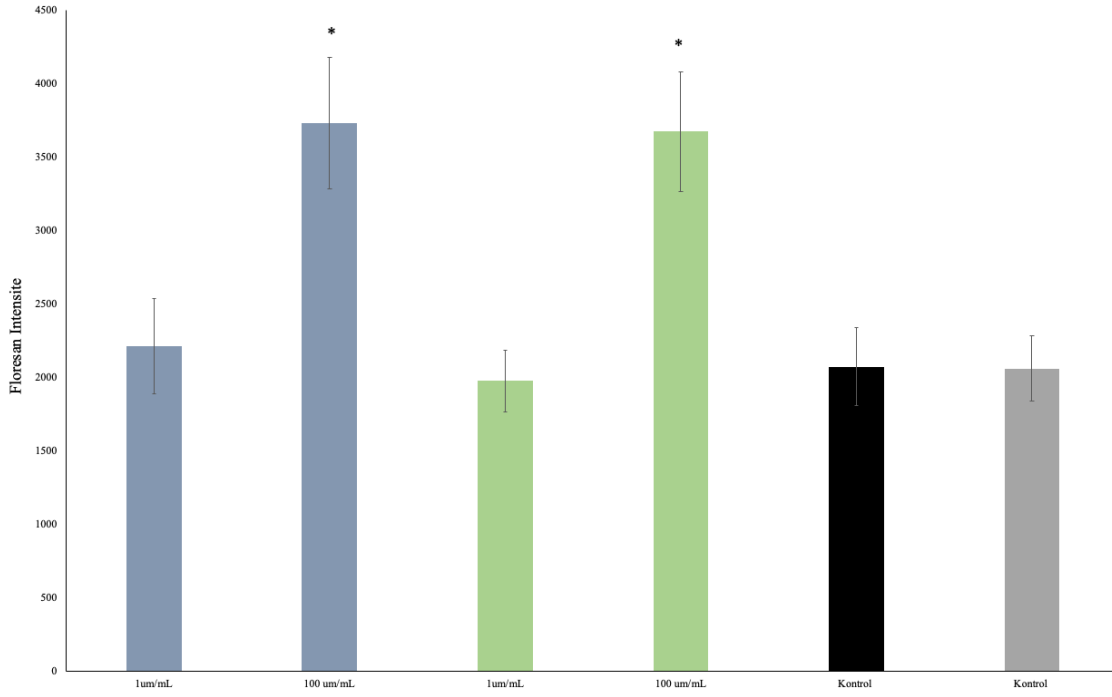
Reaktif oksijen türleri analizleri sonuçlarına bakıldığında ise SMUF ortamındaki düşük konsantrasyonlardaki TiO₂ nanopartikül çözeltilerinin, bu türlerin üretimine neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında aynı çözeltilerin yüksek konsantrasyonlarda önemli miktarlarda reaktif oksijen türü üretimine neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.40-42). Bu sonuçlar, SMUF ortamındaki nanopartiküllerin doza bağlı bir oksidatif stres etkisi olduğunu göstermiştir. Yağlı süt ortamıyla etkileşmiş sindirim sonrası nanopartiküllerde ise reaktif oksijen üretiminin, SMUF ortamındaki nanopartiküllere göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bu analizdeki en önemli sonuçlardan biridir. Nanopartiküller gıda ortamında ROS üretimine neden olsa da bu miktar tampon ortamı göre azdır. Bu sonuç canlılık aşamasında elde edilen protein korona yapısının canlılığı azaltması sonucuna zıt bir sonuçtur. Fakat elde edilen bu sonuç nanopartiküllerin yüzeyinde gıda ortamında oluşan korona yapısının memeli hücreleri ile etkileşimini etkilediğini göstermiştir. Literatürde korona yapısının hücrelerin ROS ve benzeri serbest radikal üretimini engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [76]. Buna göre nanopartikül yüzeylerinde bulunan gıda proteinlerinin (çoğunlukla kazein) barsak epitel hücrelerinin canlılığını azaltırken ROS üretimini azalttığı sonucuna varılmıştır.

Nanopartiküllerin çaplara göre oksidatif stres etkisi incelendiğinde ise SMUF ortamındaki 30 nm çaplı nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonda önemli miktarda

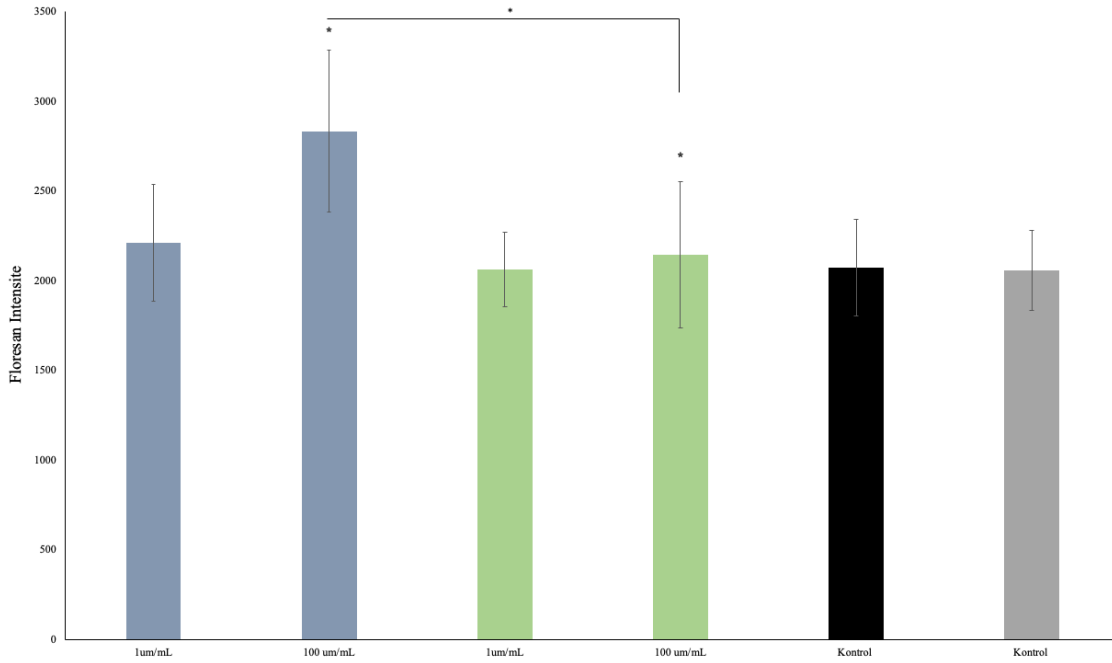
reaktif oksijen türleri üretimine neden olduğu gözlemiştir. Bu etki nanopartikülün yağlı süt ortamında bulunduğu durumda ise azalmıştır. 100 nm çapındaki nanopartiküller incelendiğinde ise hem SMUF hem de yağlı süt ortamındaki yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stres başlatıcı etki düşük konsantrasyonlara göre artmıştır. 250 nm çapında ise diğer çaplara benzer bir davranış gözlenmiştir. Bu üç çap arasındaki en fazla etkinin 30 nm çapına ait nanopartiküllerde görüldüğü gözlenmiştir. Bu durumun nanopartiküllerin agregat çaplarının önceki bölümlerde benzer bir aralıkta dağıldığı gözlenirse de yüzey alanının 100 ve 250 nm çapındaki nanopartiküllere göre fazla olmasından kaynakladığı düşünülmektedir [77]. Ayrıca sindirim sonrası hidrodinamik çap değerlerine bakıldığında (Çizelge 4.8) artan konsantrasyona rağmen 30 nm çapındaki nanopartiküllerin gıda ortamında agregasyona diğer çaplarla karşılaştığında daha az eğilimli olduğu görülmüştür. Bu durumun da 30 nm çapındaki nanopartikülün oksidatif stres oluşturma etkisini üzerinde etki olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.41. Farklı konsantrasyonlardaki 30 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt



Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlardaki 100 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Mavi: Tampon, Yeşil: Yağlı Süt



Şekil 4.43. Farklı konsantrasyonlardaki 250 nm TiO₂ nanopartiküllerinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi. Nanopartikül konsantrasyonu Mavi: 1µm/mL, Turuncu: 100µm/mL; Siyah: Tampon, Gri: Yağlı süt.

TiO₂ nanopartiküllerinin bakteri ve memeli hücresi gibi farklı hücre türleri üstündeki zararlı etkilerinin incelendiği bu aşamada etkiler birbirinden farklı çıkmıştır. Bu farklılığın nedeni ise hücrelerin membran yüzeyinin farklı olmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda bakteri ve memeli hücrelerinin, hücre içine alım mekanizmalarının farklı olduğu bulunmuştur [78, 79]. Nanopartiküllerin hücre içine alım mekanizmalarının ise bakteri hücre yüzeyinde biriktikten sonra hücre içine salınım olarak gerçekleştiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır [80, 81]. Ayrıca çalışmada kullanılan 30 ve 250 nm çapındaki nanopartiküllerin kristal formları sırasıyla anataz ve rutildir. Anataz ve rutil kristal formlarının hücreler ile etkileşimde farklı yollar izlediği ve birbirinden farklı derecelerde hücresel zarara neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple söz konusu nanopartiküllerin stres etkilerinin farklı olmasının bir diğer nedeni de bu durum olduğu düşünülmektedir [82]. Tez kapsamında bu aşamada elde edilen bu bulgunun farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin, barsak epiteli hücresi ile bakteri hücresi üzerinde farklı toksik mekanizmalarının olabileceği gösteren önemli bir bilgi olduğunu düşünülmektedir.

5. YORUM

Tez çalışmasında, son dönemlerde bilimsel çalışmalarca sağlık açısından tehlikeli olarak tanımlanmış, TiO₂ nanopartikülünün gerçek bir gıda ortamındaki değişimini incelemek amaçlanmıştır. Bu kapsamda nanopartiküller gerçek bir gıda ortamı olarak seçilen yağlı ve yağsız rekonstitüye süt ile etkileştirilmiştir. Daha sonra nanopartiküllerin yüzeyindeki değişimler nitel ve nicel analizlerle tespit edilmiştir. Yağlı ve yağsız süt ortamı ile etkileştirilen TiO₂ nanopartikülleri sindirim simülasyonuna tabi tutulup, nanopartiküllerin bu süreçte geçirdiği değişimler takip edilmiştir. En son olarak da sindirim sonrası TiO₂ nanopartiküllerinin sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında sindirim öncesi 0.4, 0.8 ve 1.6 mg/mL konsantrasyonlarında; 30, 100 ve 250 nm çapındaki TiO₂ nanopartiküllerinin karakterizasyon analizleri sonucunda, tampon ortamında kristal çaplarından daha büyük agregasyon grupları gösteren nanopartiküllerin yağlı ve yağsız süt ortamında bu çaplarında azalma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yağlı süt ortamındaki yağ bileşenlerinin bu davranışa önemli bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Ek olarak süt serumundaki TiO₂ nanopartiküllerinin davranışının incelenmesi sonucunda nanopartiküllerin büyük ölçüde süt ortamındaki proteinler ile etkileştiği düşünülmüştür. Daha sonraki aşamada yapılan nicel ve nitel protein analizleri de bu düşünceyi doğrulayan bir aşama olmuştur. Bir nanopartikülün gerçek bir gıda ortamında davranışının incelenmesi açısından tez çalışması bir ilk olma özelliğini göstermektedir.

Sindirim sonrası yapılan analizler ile içerisinde TiO₂ nanopartiküllerini içeren bir gıda tüketildiğinde hem nanopartikülün davranışını ve bu davranışın sağlığa etkilerini yansıtabilecek sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar kapsamında sindirim simülasyonu kullanılarak farklı çap ve konsantrasyonlardaki TiO₂ nanopartiküllerinin ağız, mide ve barsak ortamlarındaki çapları, yüzey yükleri ve yüzeylerindeki korona yapıları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Sindirim sürecinin nanopartiküllerin agregatlaşması üzerinde engelleyici bir etkisi olduğu ve bu etkinin nanopartiküller gıda ortamındayken arttığı görülmüştür. Sindirim sonrası TEM görüntülerinde tampon ortamında da nanopartiküllerin yüzeyinde yeni ve gıda ortamındakine göre daha ince korona yapısına rastlanmıştır (Şekil 4.25). Nanopartiküllerin tampon ortamındaki sindirim öncesi agregatların çapı sindirim sonrasında küçülmüştür. Bu durumda yeni korona yapısı etkili olduğu ve bu yeni korona yapısının sindirim ortamında bulunan enzim ve proteinlerden

oluştugu düşünölmüştür. Bu aşamada nanopartikullerin tampon ve gıda ortamındaki sindirim enzimleri üstüne etkileri araştırılmıştır. Yapılan enzim aktivitesi analizlerine göre TiO₂ nanopartikülleri ile amilaz, pepsin ve lipaz enzimleri farklı türlerde etkileşimler gerçekleştirdiği düşünölmektedir. Bu bölümde elde edilen bulgulara göre amilaz enzimi ile bağ kurup enzim aktivitesini değiştirmeyen nanopartiküller, pepsin enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesini gıda ortamında kaybetmiştir. Son bölümde ise TiO₂ nanopartikülleri lipaz enzimleri arasındaki etkileşim gıda ortamında da devam etmiş olup diğer enzimlere göre en belirgin inhibitör davranışı olarak tespit edilmiştir. Bu 3 enzim arasında farklı etkileşim türlerinin gözlenmesi ile nanopartiküllerin farklı yapıdaki proteinler ile kurduğu etkileşimlerin mekanizmasının farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Daha önceki bölümlerde de açıklandığı üzere nanopartiküllerin çapı farklı olsa da agregasyon büyüklükleri birbirine yakın olduğundan 25, 100 ve 250 nm çaplarının enzimlerle etkileşimler üzerinde belirgin bir etkilerinin olmadığı gözlenmiştir.

Son asama olarak tez kapsamında incelenen canlılık, oksidatif stres ve bakteriyel stres sonuçları ortak değerlendirildiğinde, farklı ortamlardaki TiO₂ nanopartiküllerinin hücreler üzerinde farklı toksik mekanizmalarının olduğu gözlenmiştir. Örneğin 30 nm çapındaki TiO₂ nanopartiküllerinin hücrelere öldürücü etkisi korona yapısı ile artarken, aynı hücrelere reaktif oksijen üretimi korona yapısı ile azalmıştır. Sindirim sonrası nanopartiküllerin tampon ortamında ve gıda ortamında farklı korona yapıları oluşturduğu göz önünde bulundurulduğunda bu durumun sonucu etkilediği görölmüştür. Bakteriyel stres sonuçlarına bakıldığında ise hücreler üstünde en fazla stres yaratan çapın 250 nm olduğu ve bu etki korona yapısından sonra azalmıştır. Hücrelerin strese uğramaları ve ölümleri arasında biyokimyasal bir iletişim mekanizması mevcuttur. Örneğin; reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde oksidatif bir stres oluşturması ve bunun hücre ölümüne yol açması oldukça karmaşık reaksiyonları barındırmaktadır [83]. Bu sebeple nanopartiküllerin hücresele toksisitesinden bahsedilirken genel bir sonuçtan söz etmek yerine toksisiteyi barındıran alt başlıklarla ifade edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada farklı çaplardaki TiO₂ nanopartiküllerinin farklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Hem farklı membran yapılarına sahip hem de farklı türlere ait hücrelerdeki (memeli ve bakteri hücreleri) sitotoksik etkilerin birbirinden farklı bulunmasıyla literatüre katkı sağlanmıştır. Ayrıca aynı hücre üstünde canlılık ve reaktif oksijen türleri üretimi gibi farklı toksik etkilerin incelenmesi ile nanopartikülün toksisitesi hakkında kapsamlı bilgi edinilmiştir. Sindirim sonrası nanopartiküllerde gözlenen iki

temel değişim önceki sonuç bölümlerinde tartışılmıştı: süt ve tampon ortamı arasındaki agregasyon durumu ve korona yapısı farkı. Yapılan çalışmalarda nanopartiküller üzerindeki korona veya protein yapılarının hücreler ile girilen etkileşimi değiştirdiği bulunmuştur [84]. Ayrıca yapılan çalışmalarla nanopartiküllerin çapının ve agregasyon durumunun da yüzey alanını değiştirmesine bağlı nanopartikül reaktivitesini etkilemesi açısından nanopartikül toksisitesi açısından önemli bulunmuştur [77, 85]. Bu durumda yapılan tez çalışması ile yağlı süt ortamı ile etkileşmiş nanopartiküllerin, sindirimden sonra agregat gruplarının dağılması ile yüzey alanlarının değişmesine ek olarak korona yapısında gözlenen farklılıkların, nanopartiküllerin barsak epiteli ve bakteri hücreleri üzerindeki toksisiteleri için belirleyici olduğu düşünölmektedir. Bu sebeplerin altında yatan mekanizmalar için detaylı korona yapısı analizi gibi ileri araştırmalar gerekmektedir.

Tez kapsamında farklı çaplardaki ve konsantrasyonlardaki TiO₂ nanopartikülünün tüketimden önce gıdaya eklemesinden başlayarak tüketim sonrası sindirim ve sindirim sonrası süreçlerinde geçirdiği değişiklikler gözlenmiştir. Çalışma sonucunda nanopartiküllerin davranışlarının gıda ortamında konulunca korona yapısı oluşturarak değiştirdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca korona yapısının tüketildikten sonra da sindirim boyunca değişerek, nanopartiküllerin memeli ve bakteri hücreleri ile etkileşimini ve dolayısı ile toksik etkilerini de değiştirdiği bulguları elde edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında 30 nm çapındaki sindirim sonrası korona yapısına sahip TiO₂ nanopartikülünün memeli hücresi üstüne öldürücü etkisi olduğu gözlenmiştir. Aynı ortamdaki 250 nm çapındaki TiO₂ nanopartikülünün ise bakteri hücresine en fazla stresi yarattığı gözlenmiştir. Bu duruma göre nanopartiküllerinin yüzey karakteristiğinin ve korona yapısının yanında çapının da toksisitelerinin tanımlanmasında oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. Alınan son kararlara göre ise TiO₂ nanopartikülü Avrupa bölgesinde yasaklansa da dünyanın büyük bir bölümünde ikamesi mümkün olmadığı için sadece konsantrasyon sınırı getirilerek kullanılmaya devam etmektedir. Fakat tez çalışmasında da gösterildiği üzere TiO₂ nanopartikülünün zararının tanımlanmasında konsantrasyonu yeterli değildir. Tez kapsamında elde edilen bulgulara göre nanopartikülün kullanılmaya devam edilmesi durumunda, regölasyon limitlerinin çap ve yüzey karakteristiği gibi bilgileri de içermesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Ü. Uygun, Gıda Katkı Maddeleri, in: İ. Saldamlı (Ed.) Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları,, Ankara, Türkiye, 2005.
- [2] REGULATION (EC) No 1333/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, Official Journal of the European Union, 2008, pp. p. 16–33
- [3] S. Boutillier, S. Fourmentin, B. Laperche, History of titanium dioxide regulation as a food additive: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 20 (2022) 1017-1033.
- [4] H. Saraç, Gıda katkı maddelerinin (benzoik asit, sodyum nitrat, allura red, tartrazin, sunset yellow) *Caenorhabditis elegans* üzerindeki etkilerinin belirlenmesi 2019.
- [5] A.L. Branen, R.J. Haggerty, *Introduction to Food Additives*, 2 ed., Marcel Dekker, Inc., United States of America, 2002.
- [6] B. Atlı, Gıda boyaları, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ, 2010.
- [7] R. Sarıkaya, K. Solak, Benzoik Asitin *Drosophila melanogaster* de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması, *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23 (2003).
- [8] S. Yılmaz, F. Ünal, D. Yüzbaşıoğlu, M. Celik, DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro, *Toxicology and Industrial Health*, 30 (2014) 926-937.
- [9] I. Pollock, J. Warner, Effect of artificial food colours on childhood behaviour, *Archives of disease in childhood*, 65 (1990) 74-77.
- [10] Z.E. Çalışır, D. Çalışkan, Food additives and effects on the human health, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 32 (2003) 193-206.
- [11] R.P. Feynman, There's Plenty of Room at the Bottom, *Engineering and Science*, 23 (1960) 22-36.
- [12] Q. Chaudhry, R. Watkins, L. Castle, *Nanotechnologies in food: What, why and how?*, (2017).

- [13] K.C. Majhi, M. Yadav, Synthesis of inorganic nanomaterials using carbohydrates, *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Elsevier 2021, pp. 109-135.
- [14] N. Sozer, J.L. Kokini, Nanotechnology and its applications in the food sector, *Trends in biotechnology*, 27 (2009) 82-89.
- [15] D.M. Bowman, Q. Chaudhry, A. Gergely, Nano- and Micro-Scale Vehicles for Effective Delivery of Bioactive Ingredients in Functional Foods, Wiley-Blackwell, London, 2015.
- [16] T. Gasti, S. Dixit, V.D. Hiremani, R.B. Chougale, S.P. Masti, S.K. Vootla, B.S. Mudigoudra, Chitosan/pullulan based films incorporated with clove essential oil loaded chitosan-ZnO hybrid nanoparticles for active food packaging, *Carbohydrate Polymers*, 277 (2022) 118866.
- [17] Y.D. Livney, Nanostructured delivery systems in food: Latest developments and potential future directions, *Current Opinion in Food Science*, 3 (2015) 125-135.
- [18] D.J. McClements, Reduced-fat foods: the complex science of developing diet-based strategies for tackling overweight and obesity, *Advances in Nutrition*, 6 (2015) 338S-352S.
- [19] D.J. McClements, H. Xiao, Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles, *npj Science of Food*, 1 (2017) 1-13.
- [20] D.J. McClements, H. Xiao, P. Demokritou, Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles, *Advances in Colloid and Interface Science*, 246 (2017) 165-180.
- [21] G.H. Shin, J.T. Kim, H.J. Park, Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods, *Trends in food science & technology*, 46 (2015) 144-157.
- [22] M. Yao, D.J. McClements, H. Xiao, Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems, *Current opinion in food science*, 2 (2015) 14-19.
- [23] N. Meghani, S. Dave, A. Kumar, Introduction to Nanofood, in: U. Hebbar, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. Kumar Mishra (Eds.) *Nano-food Engineering: Volume One*, Springer International Publishing, Cham, 2020, pp. 1-23.

- [24] V. Sodano, Nano-food regulatory issues in the European union, AIP conference proceedings, AIP Publishing LLC, 2018, pp. 020018.
- [25] E. Parliament, t.C.o.t.E. Union, Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives, Off J Eur Union, 354 (2008) 16-33.
- [26] E. Parliament, t.C.o.t.E. Union, Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001, Off. J. Eur. Union, 327 (2015) 1-22.
- [27] E. Parliament, Council, Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004, Off. J. Eur. Union, 50 (2011) 18-63.
- [28] A.N. Başaran, TOXICOLOGY, Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2020.
- [29] M. Van der Zande, R. Vandebriel, M. Groot, E. Kramer, Z. Rivera, K. Rasmussen, J. Ossenkoppele, P. Tromp, E. Gremmer, R. Peters, Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. Part, (2014).
- [30] A.F. Hubbs, R.R. Mercer, S.A. Benkovic, J. Harkema, K. Sriram, D. Schwegler-Berry, M.P. Goravanahally, T.R. Nurkiewicz, V. Castranova, L.M. Sargent, Nanotoxicology—A pathologist's perspective, Toxicologic pathology, 39 (2011) 301-324.
- [31] A. Zhang, K. Meng, Y. Liu, Y. Pan, W. Qu, D. Chen, S. Xie, Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers in vivo and their influences, Advances in Colloid and Interface Science, 284 (2020) 102261.

- [32] W.H. de Jong, A.G. Oomen, L. Tran, Q. Chaudhry, D.E. Lefebvre, Engineered Nanoparticles and Food: Exposure, Toxicokinetics, Hazards and Risks, *Nanotechnologies in Food* 2017, pp. 200-227.
- [33] J.F. Hillyer, R.M. Albrecht, Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles, *Journal of pharmaceutical sciences*, 90 (2001) 1927-1936.
- [34] V.K. Sharma, Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment—a review, *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44 (2009) 1485-1495.
- [35] M. Dorier, E. Brun, G. Veronesi, F. Barreau, K. Pernet-Gallay, C. Desvergne, T. Rabilloud, C. Carapito, N. Herlin-Boime, M. Carrière, Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells, *Nanoscale*, 7 (2015) 7352-7360.
- [36] Z. Zheng, B. Huang, J. Lu, Qin, Z. X., X., Y. Dai, Hierarchical TiO₂ microspheres: synergetic effect of {001} and {101} facets for enhanced photocatalytic activity, *Chemistry—A European Journal*, 17 (2011) 15032-15038.
- [37] Y. Wang, L. Yuan, C. Yao, L. Ding, C. Li, J. Fang, K. Sui, Y. Liu, M. Wu, A combined toxicity study of zinc oxide nanoparticles and vitamin C in food additives, *Nanoscale*, 6 (2014) 15333-15342.
- [38] X.-J. Du, J.-L. Wang, S. Iqbal, H.-J. Li, Z.-T. Cao, Y.-C. Wang, J.-Z. Du, J. Wang, The effect of surface charge on oral absorption of polymeric nanoparticles, *Biomaterials Science*, 6 (2018) 642-650.
- [39] A. Abdal Dayem, M.K. Hossain, S.B. Lee, K. Kim, S.K. Saha, G.-M. Yang, H.Y. Choi, S.-G. Cho, The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 120.
- [40] T. Lima, K. Bernfur, M. Vilanova, T. Cedervall, Understanding the lipid and protein corona formation on different sized polymeric nanoparticles, *Scientific reports*, 10 (2020) 1-9.
- [41] R. García-Álvarez, M. Vallet-Regí, Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance, *Nanomaterials*, 11 (2021) 888.

- [42] E. Brun, C. Sicard–Roselli, Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction?, *Cancer nanotechnology*, 5 (2014) 1-13.
- [43] C. Corbo, R. Molinaro, A. Parodi, N.E. Toledano Furman, F. Salvatore, E. Tasciotti, The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery, *Nanomedicine*, 11 (2016) 81-100.
- [44] D.T. Jayaram, S. Runa, M.L. Kemp, C.K. Payne, Nanoparticle-induced oxidation of corona proteins initiates an oxidative stress response in cells, *Nanoscale*, 9 (2017) 7595-7601.
- [45] M.-R. Choi, K.J. Stanton-Maxey, J.K. Stanley, C.S. Levin, R. Bardhan, D. Akin, S. Badve, J. Sturgis, J.P. Robinson, R. Bashir, A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors, *Nano letters*, 7 (2007) 3759-3765.
- [46] H. Ma, A. Brennan, S.A. Diamond, Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (2012) 2099-2107.
- [47] R.L. Auten, J.M. Davis, Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details, *Pediatric research*, 66 (2009) 121-127.
- [48] T.D. Belder, Titanium Dioxide Banned as a Food Additive in the EU, 2022.
- [49] Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices, 2022.
- [50] G.J. Martin, R. Williams, D. Dunstan, Comparison of casein micelles in raw and reconstituted skim milk, *Journal of Dairy Science*, 90 (2007) 4543-4551.
- [51] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow, *Journal of colloid and interface science*, 261 (2003) 402-410.
- [52] H. Ijadpanah-Saravy, M. Safari, A. Khodadadi-Darban, A. Rezaei, Synthesis of titanium dioxide nanoparticles for photocatalytic degradation of cyanide in wastewater, *Analytical Letters*, 47 (2014) 1772-1782.
- [53] T.S. Enstitüsü, İnek Sütü - Çiğ 2002.

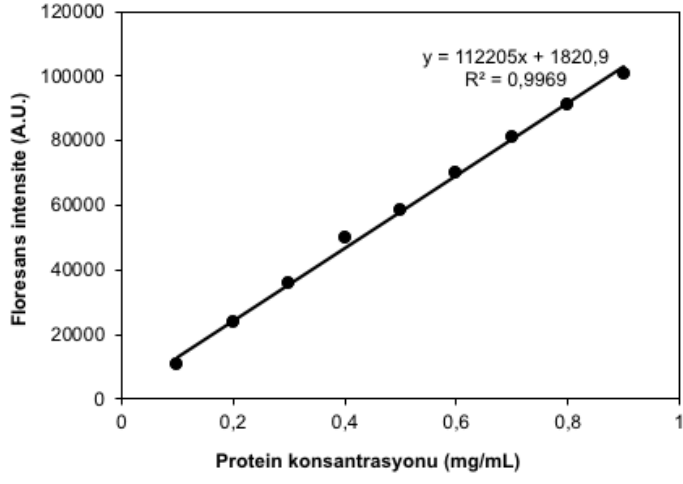
- [54] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- [55] T.S. Enstitüsü, Süt - Yağ içeriği tayini - Asit-bütürometrik (Gerber yöntemi), 2022.
- [56] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *nature*, 227 (1970) 680-685.
- [57] I.S. Sohal, Y.K. Cho, K.S. O'Fallon, P. Gaines, P. Demokritou, D. Bello, Dissolution behavior and biodegradability of ingested engineered nanomaterials in the gastrointestinal environment, *ACS nano*, 12 (2018) 8115-8128.
- [58] M. Minekus, M. Alming, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus, *Food & function*, 5 (2014) 1113-1124.
- [59] Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang, A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities, *Anal Biochem*, 351 (2006) 146-148.
- [60] M.L. Anson, The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin, *The Journal of general physiology*, 22 (1938) 79.
- [61] B. Saltepe, E.U. Bozkurt, N. Hacısmanoğlu, U.O.z.r.S.a. Şeker, Genetic circuits to detect nanomaterial triggered toxicity through engineered heat shock response mechanism, *ACS Synthetic Biology*, 8 (2019) 2404-2417.
- [62] X. Mao, T.H. Nguyen, M. Lin, A. Mustapha, Engineered Nanoparticles as Potential Food Contaminants and Their Toxicity to Caco-2 Cells, *Journal of food science*, 81 (2016) T2107-T2113.
- [63] H. Kim, X. Xue, Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate staining, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (2020) e60682.
- [64] K. Thamaphat, P. Limsuwan, B. Ngotawornchai, Phase characterization of TiO₂ powder by XRD and TEM, *Agriculture and Natural Resources*, 42 (2008) 357-361.
- [65] Commission Directive 2006/33/EC of 20 March 2006 amending Directive 95/45/EC as regards sunset yellow FCF (E 110) and titanium dioxide (E 171) (Text with EEA relevance), *Official Journal of the European Union*, 2006.

- [66] C. Cano-Sarmiento, D. Téllez-Medina, R. Viveros-Contreras, M. Cornejo-Mazón, C. Figueroa-Hernández, E. García-Armenta, L. Alamilla-Beltrán, H. García, G. Gutiérrez-López, Zeta potential of food matrices, *Food Engineering Reviews*, 10 (2018) 113-138.
- [67] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S.M. Ansar, A. Paredes, T. Ingle, Characterization of nanomaterials: Tools and challenges, *Nanomaterials for food applications*, (2019) 313-353.
- [68] M.H. Nia, M. Rezaei-Tavirani, A.R. Nikoofar, H. Masoumi, R. Nasr, H. Hasanzadeh, M. Jadidi, M. Shadnush, Stabilizing and dispersing methods of TiO₂ nanoparticles in biological studies, *Archives of Advances in Biosciences*, 6 (2015) 96-105.
- [69] H. Singh, A. Ye, Controlling milk protein interactions to enhance the reconstitution properties of whole milk powders—a minireview, *Dairy science & technology*, 90 (2010) 123-136.
- [70] L. Mahlalela, J. Ngila, L. Dlamini, Characterization and stability of TiO₂ nanoparticles in industrial dye stuff effluent, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38 (2017) 584-593.
- [71] R. Ahmad, A. Mishra, M. Sardar, Simultaneous immobilization and refolding of heat treated enzymes on TiO₂ nanoparticles, *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6 (2014) 1264-1268.
- [72] R. Ahmad, M. Sardar, Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix, *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4 (2015) 1.
- [73] A. Blanco, G. Blanco, Chapter 8 - Enzymes, in: A. Blanco, G. Blanco (Eds.) *Medical Biochemistry*, Academic Press 2017, pp. 153-175.
- [74] Q. Li, T. Li, C. Liu, G. DeLoid, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, R. Zhang, H. Xiao, D.J. McClements, Potential impact of inorganic nanoparticles on macronutrient digestion: titanium dioxide nanoparticles slightly reduce lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions, *Nanotoxicology*, 11 (2017) 1087-1101.
- [75] O. Kose, M. Stalet, L. Leclerc, V. Forest, Influence of the physicochemical features of TiO₂ nanoparticles on the formation of a protein corona and impact on cytotoxicity, *RSC advances*, 10 (2020) 43950-43959.

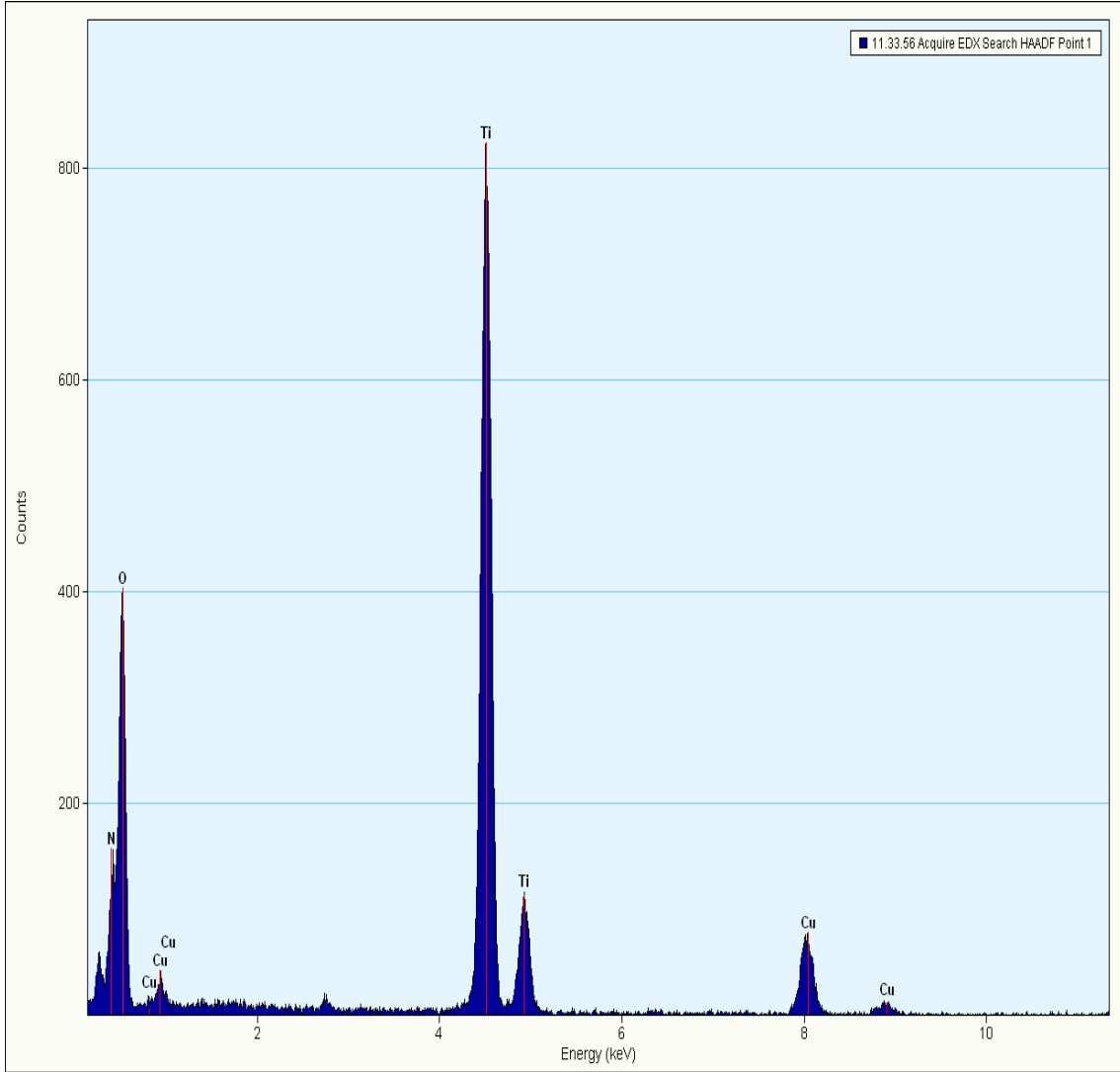
- [76] R. Cai, C. Chen, The crown and the scepter: roles of the protein corona in nanomedicine, *Advanced Materials*, 31 (2019) 1805740.
- [77] M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, J. Zheng, J.D. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, B.W. Neun, J.B. Hall, S.E. McNeil, Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5 (2009) 106-117.
- [78] A. Käkinen, A. Kahru, H. Nurmsoo, A.-L. Kubo, O.M. Bondarenko, Solubility-driven toxicity of CuO nanoparticles to Caco-2 cells and *Escherichia coli*: Effect of sonication energy and test environment, *Toxicology in Vitro*, 36 (2016) 172-179.
- [79] O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru, Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review, *Archives of toxicology*, 87 (2013) 1181-1200.
- [80] J.S. McQuillan, H. Groenaga Infante, E. Stokes, A.M. Shaw, Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12, *Nanotoxicology*, 6 (2012) 857-866.
- [81] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16 (2005) 2346.
- [82] Q. Yu, H. Wang, Q. Peng, Y. Li, Z. Liu, M. Li, Different toxicity of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles on macrophages: involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids, *Journal of hazardous materials*, 335 (2017) 125-134.
- [83] T. Kang, R. Guan, X. Chen, Y. Song, H. Jiang, J. Zhao, In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells, *Nanoscale research letters*, 8 (2013) 1-8.
- [84] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano letters*, 6 (2006) 662-668.
- [85] A. Albanese, W.C. Chan, Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity, *ACS nano*, 5 (2011) 5478-5489.

EKLER

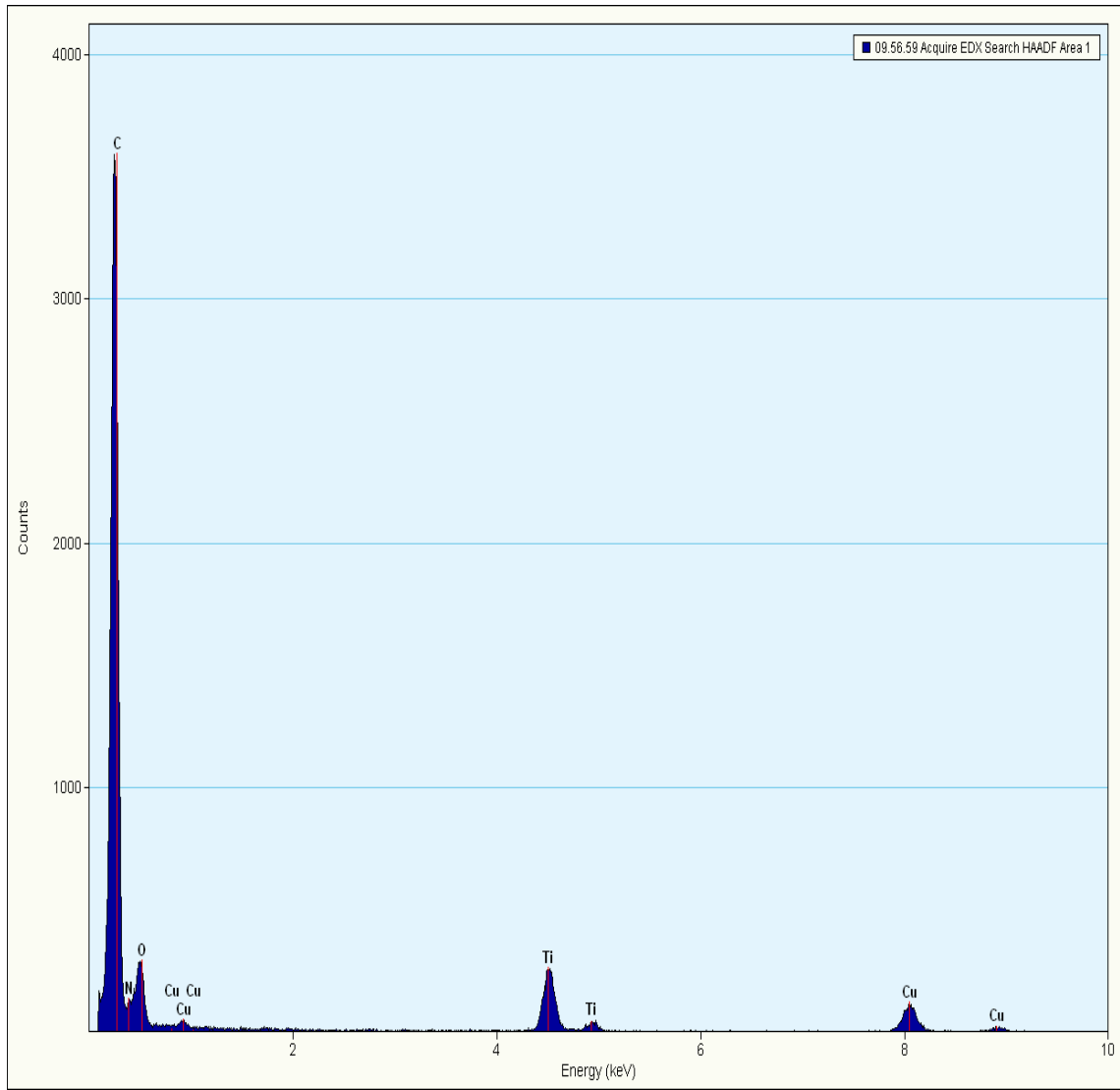
EK 1 - Grafikler



EK1-Şekil 1. Teknik kazein çözeltisi kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisi



Ek 1-Şekil 2. TiO₂ yüzeyinden alınan EDX spektrumu



Ek 1-Şekil 3. TiO₂ korona üzerinden alınan EDX spektrumu

EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar

Ersöz, N., Çanga, E. M., Yildirim-Elikoglu, S., Öz, H., & Dudak, F. C. (2022). Effect of real food matrix on the behavior and toxicity of TiO₂ nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(10), 1-12.

EK 3- Tezden Türetilmiş Bildiriler

Characterization the behavior of TiO₂ nanoparticle in complex food matrix -ACS
Sonbahar 2021

EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu