

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ALÜMİNYUM OKSİT ve NİKEL NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA
BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARININ GENETİK YAPISI
ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

SAVAŞ ŞAFFAK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BÜLENT VEREP

TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. ŞENOL AKIN
DOÇ. DR. ERTUĞRUL AĞIRBAŞ
DOÇ. DR. ERTUĞRUL TERZİ
DR. ÖĞR. ÜYESİ HANDAN KARAOĞLU

RİZE-2022

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ALÜMİNYUM OKSİT ve NİKEL NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI
(*Danio rerio*) LARVALARININ GENETİK YAPISI ÜZERİNE TOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Bülent VEREP danışmanlığında **Savaş ŞAFFAK** tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/01/2022 tarihinde **SU ÜRÜNLERİ** Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şenol AKIN	
Üye	: Prof. Dr. Bülent VEREP	
Üye	: Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ	
Üye	: Dr. Öğr.Üyesi Handan KARAOĞLU	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Doktora programında yürütülmüştür. “Alüminyum oksit ve nikel nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının genetik yapısı üzerine toksik etkilerinin belirlenmesi” adlı bu araştırma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su ürünleri Fakültesi, Akuatik Toksikoloji Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı ve Su Kimyası Laboratuvarları’nda gerçekleştirilmiştir.

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmaların yürütülmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen ve göstermiş oldukları ilgiden dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Bülent VEREP ve Doç. Dr. Halis BORAN’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca, tez yazım aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle benden desteğini esirgemeyen yakın arkadaşım Aydın ÇAKIR’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, lisansüstü öğrenimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ve tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Doktora tezi R.T.E.Ü. BAP birimi tarafından 2013.103.01.4 nolu proje ile desteklenmiştir.

Savaş ŞAFFAK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Alüminyum Oksit ve Nikel Nanopartiküllerin Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvalarının Genetik Yapısı Üzerine Toksik Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 28/01/2022

Savaş ŞAFFAK

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

ALÜMİNYUM OKSİT ve NİKEL NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARININ GENETİK YAPISI ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Savaş ŞAFFAK

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Bülent VEREP

Endüstriyel nanopartiküller, alışılmamış fizikokimyasal özelliklerinden dolayı canlılarda bulunan doku, organ, hücre, hücre içi yapılar, DNA ve protein düzeylerinde potansiyel olarak olumsuz etkiler oluşturabilmektedirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, nanopartiküllerin etkilerinin kısmen mi yoksa tamamen mi iyonlaşmadan kaynaklandığı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, alüminyum oksit (Al_2O_3) ve nikel (Ni) nanopartiküllerin ve uygun konsantrasyonlarda suda çözünebilen iyonlarının larval zebra balıkları (*Danio rerio*, 72 saatlik) üzerine potansiyel toksik etkileri, stres gen (*p53*, *rad51* ve *mt2*) ekspresyonlarındaki değişimler eş zamanlı kantitatif PZR (RT-qPCR) tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, bu iki nanopartikülün oluşturabileceği genotoksik etkiler Comet Assay tekniği kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, 0-500 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda Al_2O_3 ve 0-300 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda Ni nanopartiküllere maruz bırakılan zebra balığı larvalarının % 50'sini öldüren letal konsantrasyonlar sırasıyla $130,19 \pm 5,59$ mg/L ve $122,22 \pm 6,33$ mg/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, bu iki nanopartiküle 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarında artış tespit edilmiştir. DNA hasarının Al_2O_3 nanopartikülüne maruz bırakılan larvalarda %21,82 ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılanlarda ise %26,87 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. Stres gen ekspresyon değişimlerinin ise karmaşık ve direkt olarak konsantrasyona bağlı olmadığı tespit edilmesine rağmen *rad51* ve *p53* gen ekspresyonlarında önemli bir farklılık görülmezken, *mt2* gen ekspresyonlarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak önemli artışlar tespit edilmiştir.

2022, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, DNA Hasarı, Gen Ekspresyonu, Zebra Balığı, Akut Toksisite.

ABSTRACT

DETERMINATION OF TOXIC EFFECTS OF ALUMINIUM OXIDE and NICKEL NANOPARTICLES ON GENETIC STRUCTURE OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*) LARVAE

Savaş ŞAFFAK

Recep Tayyip Erdoğan University
Institute of Graduate Studies
Department of Fisheries
Doctoral Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Bülent VEREP

Engineered nanoparticles can potentially generate adverse effects on tissue, organ, cellular, subcellular, DNA, and protein levels due to their unique physico-chemical properties. To date it is not yet completely understood, whether effects of nanoparticles are solely or partly due to dissolved ions. In the present study, it was investigated the potential toxic effects of aluminium oxide (Al_2O_3), and nickel (Ni) nanoparticles and their dissolved ions on larval (72 h post fertilization) zebrafish (*Danio rerio*) by analysing changes in expression levels of stress-related genes (*p53*, *rad51*, and *mt2*) by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Another objective was to assess genotoxicity of these two nanoparticles by Comet Assay technic. The lethal concentrations for 50% mortality (LC_{50}) in larval zebrafish exposed (96 h) to 0-500 mg/L Al_2O_3 nanoparticles and 0-300 mg/L Ni nanoparticles were 130.19 ± 5.59 mg/L and 122.22 ± 6.33 mg/L, respectively. A concentration-dependent increase in DNA strand breaks was detected in blood cells from larvae exposed (96 h) to these two nanoparticles. DNA damages were determined as %21,82 for Al_2O_3 nanoparticles and %26,87 for Ni nanoparticles exposed larvae. Induction of stress-related genes in larvae was complex and not directly related to nanoparticle concentrations, although there was no significant difference in *rad51* and *p53* gene expression changes, there was statistically significant increase in *mt2* gene expression of larvae exposed to nanoparticles relative to controls.

2022, 65 pages

Keywords: Nanoparticles, DNA Damage, Gene Expression, Zebrafish, Acute Toxicity.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Nanoteknolojinin Tarihi ve Günümüz Nanoteknoloji Endüstrisi	3
1.3. Al ₂ O ₃ ve Ni Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	5
1.4. Nanopartikül Toksikolojisi	6
1.5. Nanopartiküllerin Su Canlıları Üzerine Etkileri	7
1.6. Akut Toksikoloji Deneyleri	9
1.7. Deneylerde Kullanılan Canlıların Seçimi	10
1.8. Gen Ekspresyonu	11
1.9. DNA Hasarı (Comet Assay)	12
1.10. Önceki Çalışmalar	12
1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.2. Fizikokimyasal Analizler	19
2.3. Toksikolojik Test Canlıları	20
2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması	21
2.5. Letal ve Subletal Maruz Bırakma Deneyleri	21
2.6. Gen Ekspresyon Değişimleri	23
2.6.1. RNA İzolasyonu	23
2.6.2. Ters (Revers) Transkripsiyon	24
2.6.3. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	25
2.6.4. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması	26

2.7.	Larvalarda Hücresel DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet Assay)	27
2.8.	İstatistiksel Analizler	28
3.	BULGULAR	29
3.1.	Al ₂ O ₃ Nanopartiküller	29
3.2.	Ni Nanopartiküller	37
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	46
5.	ÖNERİLER	52
	KAYNAKLAR	54



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Üç boyutlu C ₆₀ nanopartikül (fulleren) taneciğinin görünümü	2
Şekil 2.	Nanoteknoloji konusunda önde gelen ülkeler ve bu ülkelerin nanoteknoloji için ayırdıkları fonlar	4
Şekil 3.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerin tüketici ürünlerinde ve sanayide kullanım alanları ...	5
Şekil 4.	Ni-NP'in biyoprotez olarak ve diğer sanayi ürünlerinde kullanılması.....	6
Şekil 5.	Toksikolojik testlerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (<i>Danio rerio</i>)...	11
Şekil 6.	Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları	21
Şekil 7.	Zebra balığı larvaları kullanılarak toksisite test üniteleri 3 tekrar olacak şekilde hazırlanmış	22
Şekil 8.	Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir NP karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi	23
Şekil 9	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Al ₂ O ₃ nanopartiküllerinin elde edilen görüntüsü. 100 nm'lik ölçek çubuğu kullanılmıştır.....	29
Şekil 10.	96 saatlik deney süresince su sütunundaki Al ₂ O ₃ nanopartiküllerinin (1 mg/L) boyutsal dağılımı.....	30
Şekil 11.	Sulu fazda Al ₂ O ₃ nanopartikülünün 96 saatlik maruziyet süresi boyunca test sistemi içerisindeki ölçülen konsantrasyonları (Boş kare: 20 mg/L, yıldız: 50 mg/L, kırmızı üçgen: 100 mg/L, boş daire: 175 mg/L, turuncu daire: 300 mg/L, boş üçgen: 500 mg/L)	30
Şekil 12.	Al ₂ O ₃ nanopartikülünün ICP-OES analizi yardımıyla 96 saatlik test süresi sonunda ölçülen su içerisindeki Al ³⁺ salınım düzeyleri	31
Şekil 13.	Toksikolojik testlerde AlCl ₃ ve Al ₂ O ₃ nanopartikülüne 96 saat süre ile maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları.....	32
Şekil 14.	Comet oluşumu , AlCl ₃ ve Al ₂ O ₃ nanopartikül uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücreleri. (a) Kontrol, (b) 0,1 mg/L AlCl ₃ , (c) 3 mg/L AlCl ₃ (d) H ₂ O ₂ ile pozitif kontrol, (e) 0,2 mg/L Al ₂ O ₃ -NP, (f) 6 mg/L Al ₂ O ₃ -NP .	33
Şekil 15.	96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda AlCl ₃ (üçgen) ve Al ₂ O ₃ (daire) nanopartikülüne maruz bırakılan larvalardaki DNA hasarları, P < 0.05	33
Şekil 16.	Zebra balığı larvalarının AlCl ₃ ve Al ₂ O ₃ nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen mt2 gen ekspresyon değişimleri.....	34
Şekil 17.	Zebra balığı larvalarının AlCl ₃ ve Al ₂ O ₃ nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen mt2 gen ekspresyon değişimleri.....	34
Şekil 18.	Zebra balığı larvalarının AlCl ₃ ve Al ₂ O ₃ nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen p53 gen ekspresyon değişimleri	35

Şekil 19. AlCl ₃ 'e maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki toksikolojik testlerde, 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda, farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).....	36
Şekil 20. Al ₂ O ₃ nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarında, toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda, farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri.....	36
Şekil 21. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Ni nanopartiküllerinin elde edilen görüntüsü. 100 nm'lik ölçek çubuğu kullanılmıştır	37
Şekil 22. 96 saatlik deney süresince su sütunundaki Ni nanopartiküllerinin (1 mg/L) boyutsal dağılımı.....	38
Şekil 23. Ni nanopartiküllerin 96 saatlik maruz bırakma süresince sulu fazda nanopartikül test sistemi içerisinde ölçülen konsantrasyonları (Boş kare: 20 mg/L, yıldız: 50 mg/L, sarı üçgen: 100 mg/L, boş daire: 175 mg/L, yeşil daire: 300 mg/L, boş üçgen: 500 mg/L).....	38
Şekil 24. Ni nanopartikülünün ICP-OES analizi yardımıyla ölçülen 96 saatlik test süresi sonunda su içerisindeki Ni ⁺² salınım düzeyleri	39
Şekil 25. Toksikolojik testlerde NiCl ₂ ve Ni nanopartikülüne 96 saat süre ile maruz bırakılan zebra balığı larvalarında görülen ölüm oranları.....	40
Şekil 26. Comet oluşumu, NiCl ₂ ve Ni nanopartikül uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücreleri. (a) Kontrol, (b) 1 mg/L NiCl ₂ , (c) 20 mg/L NiCl ₂ (d) H ₂ O ₂ ile pozitif kontrol, (e) 1 mg/L Ni-NP, (f) 20 mg/L Ni-NP.....	41
Şekil 27. 96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda NiCl ₂ (üçgen) ve Ni (daire) nanopartikülüne maruz kalan larvalardaki DNA hasarları, P < 0.05.....	41
Şekil 28. Zebra balığı larvalarının NiCl ₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen <i>mt2</i> gen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).....	42
Şekil 29. Zebra balığı larvalarının NiCl ₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen <i>rad51</i> gen ekspresyon değişimleri.....	42
Şekil 30. Zebra balığı larvalarının NiCl ₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen <i>p53</i> gen ekspresyon değişimleri. (P < 0,05).....	43
Şekil 31. NiCl ₂ 'e maruz kalan zebra balığı larvalarının toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).....	44
Şekil 32. Ni nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarının toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hedef genleri için zebra balığı nükleotid primer dizileri	25
---	----



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
GA	Güven Aralığı
LC ₅₀	Canlıların %50'sini Öldüren Letal Konsantrasyon
LMP	Düşük Erime Isılı Agaroz
mm	Milimetre
mt2	Metallothionein-2
nm	Nanometre
NMP	Normal Erime Isılı Agaroz
NP	Nanopartikül
p53	Tümör Baskılayıcı Protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rad51	DNA Onarım Proteini
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	Süperoksit Dismutaz
xrcc5	DNA Onarım Proteini
β -actin	Beta Aktin
μ m	Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

“Nano”; metrik sistemde metrenin milyarda biri, yunanca ve latince cüce anlamına gelmektedir. Nano boyuttaki maddeler ölçekleri bilinen başka mikro ve nano boyutundaki saf bileşenler ile kıyaslanarak ölçüleri hakkında daha detaylı bilgiye ulaşılabilmektedir. Nano boylarda maddeler doğal hallerinden çok daha değişik davranışlar sergilerler. Normal hallerinde ışığı ve elektriği iletmeyen maddelerin iletkenlikleri nano boyutta çok daha yüksektir. Normalde sert yapılı olmayan maddeler, nano ebatla incelendiğinde tam tersi özellikler sergileyerek elmadan dahi sert bir tutum gösterebilirler (Mark vd., 2007; Crane vd., 2008).

Günümüzde nanoteknoloji kullanılarak üretilen malzemelerin, diğer ürünlere göre daha dayanıklı, hassas ve hafif özellikler ile donatılmış olmasından ötürü bu teknolojiyi dünyada ilgi odağı haline getirmiştir. Nanoteknoloji vizyonu ilk olarak, fizikçi Richard Feynman’ın 1959 yılında malzemelerin ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi ile başarılabilecekler üstüne yapmış olduğu “There’s Plenty of Room at the Bottom” başlıklı ünlü konuşmasına kadar dayandırabiliriz. Richard Feynman, “2000’li yıllarda insanlar geriye dönüp baktıklarında neden 1960’lara kadar bu konu ile ilgili ciddi çalışmaların başlamadığını merak edecekler” sözleriyle nanoteknolojinin önemini açıklıyor ve nanoyapıların minyatürize edilmiş enstrümanlar ile ölçülebileceği ve yeni hedefler doğrultusunda kullanılabileceğini vurgulamıştır. Feynman’ın başlattığı nanoteknolojinin gelişimi ile ilgili bu akım, bugüne kadar olağanüstü bir bilgi birikimi ve hızla devam etmiştir. ABD’de nanoteknoji ile ilgili olarak 2000 yılında “Amerikan Ulusal Nanoteknoloji Gurubu” oluşturulmuş ve bu teknolojiye 2005 yılında sağlanan fon milyar dolar seviyelerine yaklaşmıştır. “Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri Biyomühendislik Konsorsiyumu”, 2000 yılında “Nanobilim ve Nanoteknoloji: Biyomedikal Araştırmaların Şekillendirilmesi” başlığıyla duyurmuştur. Nanoteknolojinin biyoloji ve tıptaki kullanım alanlarının iyi anlaşılması bu konsorsiyumun en önemli faydası olmuştur (TÜBİTAK, 2004). 1985 senesinde ilk olarak Amerikalı bilim insanı Richard B. Fuller tarafından 21. yüzyılın en önemli

teknolojisi olan nanoteknolojide, C₆₀ (fulleren) keşfedilmiş ve sonrasında üretilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Üç boyutlu C₆₀ nanopartikül (fulleren) taneciğinin görünümü.

Son yıllarda nanoteknolojinin de büyümesi ile, çeşitli alanlarda faydalanmak adına sentetik olarak farklı özellikler eklenen nano boyutta malzemeler imal edilmektedir. Nano ölçeğine indikçe malzemenin boyutlarında meydana gelen yeni özellikler ile, elde edilen nanomalzemeler endüstride yaygın kullanım sahası elde etmiş ve hızla üretilen malzemeler günlük yaşantımızda yerini almıştır (Handy vd., 2008). Tekstil sanayinde ve giyim ürünlerinde nanomalzemeler kullanılmaktadır. Nanomalzemeler; spor malzemeleri, inşaat malzemeleri, endüstriyel tekstiller, ziraat tekstilleri ve tıbbi tekstiller gibi teknik tekstil ürünleri kullanılarak imal edilmektedir. Öte yandan, bu malzemelerden boya endüstrisinde de yararlanılmış, genellikle binaların iç ve dış cephelerinde kullanılmak amacıyla; kendini temizleyebilme özelliği, üstün muhafaza özelliği, koku giderme özelliği, antibakteriyel ve antimikrobiyal özellikler içeren boyalar imal edilmiştir. Kozmetik endüstrisi nanopartikül teknolojisinden istifade eden bir diğer sektördür. Nemlendirici, diş macunu, tıraş losyonu, güneş kremleri, deodorant gibi nanomalzemeler kullanılarak üretilen farklı materyaller tüketicilerin kullanımına sürülmüştür. Başka bir endüstri kolu olan otomobil sanayisi de; sürtünmeye dayanıklı malzemelerin yapımı, hafif motor ve çerçeve parçalarının imal edilmesi, aşınma önleyici tabakalar üretilmesi gibi çeşitli sanayi ürünlerinde nanopartikül teknolojisinden yararlanmıştır (Scenihr, 2006).

Uluslararası düzeyde nanopartikül teknolojisinin ve nano ürünlerin önemli hale gelmesi ve kullanım düzeyinin giderek artmasıyla beraber Çevre Koruma Örgütü (EPA) başta olmak üzere bu ürünlerin Amerika ve Avrupa'da birçok kurum tarafından olumsuz etkilerinin tespit edilmesi araştırmalarına başlanmıştır (Wiesner vd., 2006).

Nanoteknoloji kullanımının giderek gelişmesi, yaygınlaşması ve büyümesi göz önüne alındığında, bu nanomalzemelerin zararlarının tespit edilmesinin, çevrenin ve toplum sağlığının muhafazasında büyük bir önemi vardır (Moore, 2006; Kroll vd., 2009).

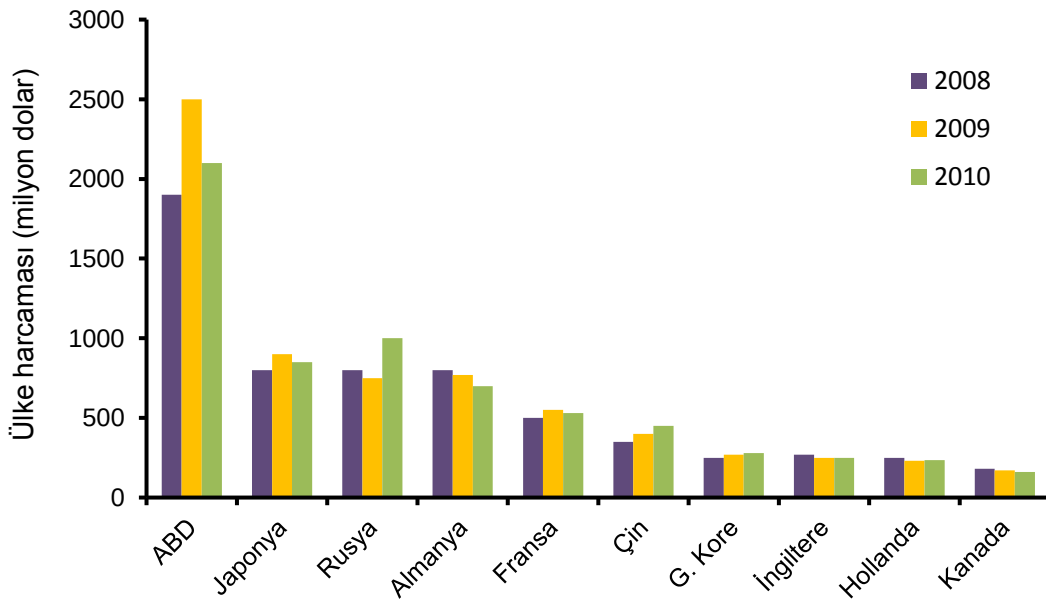
Yapılan pek çok nanopartikül toksikoloji çalışmalarında saptanan bilgiler günümüzde epey karmaşık ve problemlidir. Bunun sebebi, nanopartiküllerin kümelenme özelliklerinden dolayı ölçüm sistemlerinin ve deney elemanlarının doğru çalışmasına imkân sağlamamasıdır. Dağılım özelliklerine ve büyüklüklerine göre su ortamında nanopartiküller hem yayılma hem de var oldukları düzeneğin dibine çökme eğilimindedir (Limbach vd., 2005). Günümüzde nanopartikül deneylerinde uygulanan test metotları; doğrulama, güvenli bir risk değerlendirmesi ve standardize edilmiş bir test dizaynı oluşturma bakımından birtakım sorunlara haizdir. Bu sebeple değişik laboratuvarlar arasında yapılan deneylerde değişik sonuçlara ulaşılmaktadır. Günümüzde gerçekleştirilen deney yöntemleri büyük olasılıkla nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal niteliklerinden etkilenmektedir. Nanopartikül risk değerlendirme çalışmalarında bu sorunu aşabilmek için hücre düzeyinde toksik test yöntemlerinin elverişli duruma getirilmesi ya da farklı bir deney düzeneğinin kullanımına gereksinim duyulmaktadır (Kroll vd., 2009; Boyle vd., 2015). Sucul çevrede nanopartiküllerin zararlarını ölçebilmek amacıyla; uygun test düzeneklerinin kullanımı ve çevreye uygun maruziyet koşullarını dikkate alarak deney organizmalarına elverişli maruziyet sisteminin düzenlenmesi çok önemli bir faktördür.

1.2. Nanoteknolojinin Tarihi ve Günümüz Nanoteknoloji Endüstrisi

Maddeler üzerinde 100 nanometre ölçeğinden daha düşük boyutlarda elde edilen ve ticari bir hedefe yönelik olarak işleme, modelleme, düzenleme ve ölçüm gibi çalışmaları içeren bilim dalına nanoteknoloji denilmektedir. 21. yüzyılda gelişen ve önemli bir bilim dalı olarak tanımlanan nanoteknoloji, Amerikalı bilim adamı Richard Feynman'ın ilk 1959 yılında nanoyapıların temel yapılardan daha farklı nitelikler taşıdığını vurgulaması ve bilim ile uğraşan insanların dikkatini nanometrik boyutlara çekmesi ile hız kazanmıştır. 1981 yılında ilk olarak taramalı tünelleme mikroskobunun (STM), sonrasında 1985 yılında atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) buluşu, yüzeydeki moleküllerin ve atomların incelenmesine, atomik boyutta tepkimelerin

izlenmesine imkân vermiştir. Bu yüzden nanoteknoloji endüstrisi 20. yüzyılın son döneminde ivme kazanmış ve doğada olmayan yeni nanomalzemelerin atomsal düzeyde üretilmesine başlanmıştır (TÜBİTAK, 2004).

Günümüzde nanoteknolojiden; çevre, ilaç, biyoloji, kimya, fizik, uzay, elektronik ve bilgisayar gibi çeşitli endüstri alanlarında da yararlanılmaya başlanmıştır. Nano alanın ileride bilim ve mühendislik araştırmalarının esasını oluşturacağı, diğer taraftan multidisipliner çalışmaların ve eğitimin temel kademesi olarak görülmektedir. Son dönemlerde dünya ekonomisinde önde gelen ülkeler nanoteknoloji alanındaki AR-GE çalışmalarına ve bununla ilgili yatırımlara hayli yüksek miktarlarda kaynaklar ayırmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Nanoteknoloji konusunda önde gelen ülkeler ve bu ülkelerin nanoteknoloji için ayırdıkları fonlar (Boran, 2012).

Nanotoz boyutları 1-100 nm arasında değişiklik gösteren bileşikler olarak nitendirilmektedirler. Nanotoz maddeler; nitritler, sülfidler, karpitler, boritler, metaller ve metal oksitlerken metal olmayan malzemeler ise karbon, kalay, silika ve silikon karpitler olarak sıralanabilir. Nanotozların kullanım alanları ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO) nanotozları; güneş losyonu ve kozmetik, kaplamalar ve boyalar, hatta içme sularının içerisindeki kirleticilerin eliminasyonunda kullanılmaktadır. Titanyum dioksit nanotozları gözlük camlarındaki

merceklerde çizilmeyi önler ve tıbbi amaçlı kullanılan camlarda ise kendi kendini temizleme özelliğini içerir (Pritchard, 2004). Mikro alüminyum nanotozlar, patlayıcı maddelerde ve havai fişeklerde yanma özelliklerini artırmak maksatlı kullanılmaktadır. Elmas nanotozlar; zımpara, macun, ayna ve mercek gibi materyallerde istenilen yüksek parlaklığı almak için kullanılmaktadır. Ayrıca, yağlarda da elmas nanotozları yağlama özelliklerini geliştirmek maksatlı kullanılmaktadır. Boyanın dış etkenler ile aşınmasını, yıpranmasını önlemek ve koruma sağlamak amaçlı gümüş ve elmas nanotozları boyalara eklenerek kullanılmaktadır. Nanobakır, bilgisayar donanımlarında, askeri materyallerde, aşınmayı, yıpranmayı önleyici yağ katkılarında ve elektriksel malzemelerde kullanılmaktadır. Nanogümüş, antimikrobiyal özelliği ile bilinmektedir. Bu yüzden koku giderici ve bakteri oluşumunu önleyici olarak tekstil sanayinde kullanılmaktadır. Bunlardan başka, gümüş nanopartikülleri beyaz eşya sanayinde ve gıda paketlenmede de kullanıldığı bilinmektedir (Mark vd., 2007).

1.3. Al_2O_3 ve Ni Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Alüminyum oksit nanopartiküllerin kullanımı genel aşındırıcı uygulamalarında yaygındır. Bu alüminyum oksit nanopartikülleri hassas yapıların ve mücevheratların parlatılmasında da kullanılmaktadır. Silikon devre elemanlarının ve optik materyallerin parlatılması gibi uygulamalar da sıklıkla kullanılırlar. Değerli metaller için alüminyum oksit nanopartikülleri altlık yapımında yaygın olarak kullanılan metal oksitlerdir. Metal matriks kompozitlerin kullanıldığı yapısal seramiklerde de alüminyum oksit nanopartiküllerinin kullanıldığı görülmektedir (Koch, 2006). Ayrıca, plastik, boya ve seramik sanayinde de ürün kalitesini ve dayanıklılığını arttırmak için alüminyum oksit nanopartiküller yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Şekil 3).



Şekil 3. Al_2O_3 nanopartiküllerin tüketici ürünlerinde ve sanayide kullanım alanları (Koch, 2006).

Son zamanlarda nanopartiküllerin malzeme ve imalat alanında kullanılması konusunda büyük gelişmeler olmuştur. Bunlardan biri, kendini iyileştirme özelliği bulunan ve yapay deri olarak kullanılabilen nikel nanopartikül takviyeli polimerlerdir. Nikel (Ni) nanopartikül takviyeli polimer kompozitlerle üretilen yapay deriler kesilip el ile hafifçe birleştirildiği takdirde eski haline yaklaşık 30 dakika içinde kavuşabilmektedir. Yüzde yüz iyileşmenin olduğu bu malzeme için elektrik iletkenliği ve dayanımın da neredeyse eski haline %75 oranında kavuşmaktadır. Kesme işlemleri çok sayıda tekrarlanırsa bile malzeme yine kendini iyileştirme özelliğini korumaktadır. Bu özelliği sayesinde Ni nanopartiküllerin tıpta biyoprotez olarak kullanılmaya başlanması düşünülmektedir (Tee vd., 2012) (Şekil 4).



Şekil 4. Ni-NP'in biyoprotez olarak ve diğer sanayi ürünlerinde kullanılması (Tee vd., 2012).

1.4. Nanopartikül Toksikolojisi

Nanotoksikoloji; risk değerlendirmesi, güvenilirlik boyutları ve nanopartiküllerin potansiyel toksik etkilerinin tespit edilmesi maksadıyla yapılan deneysel araştırmaları anlatır. Maddelerin nano boyutta bilinmeyen bazı özelliklerinin fark edilmesiyle nanoteknoloji endüstrisi hızlı bir ilerleme kaydetmiştir ve bu özellikler nanopartiküllerin hem ekotoksikolojileri hem de potansiyel toksisiteleriyle ilgili bir takım endişelere neden olmuştur. Reaktivitelerinin artması ve değişen kuantum davranışları, endüstride üretilmiş olan nanopartikülleri oldukça fazla uygulamada kullanılabilir duruma getirmiştir, fakat bu maddeler çevrede ve canlılarda beklenmedik birtakım olumsuz

etkilere neden olabilmektedir (Handy vd., 2008). Öte yandan, nanopartiküller küçük boyutlarda olmaları nedeniyle bir bariyer meydana getirerek farklı kimyasalların hücrelerarası bağlantılarından ve hücre zarından geçip canlı hücrelerine girmelerini engellemektedirler (Lanone ve Boczkowski, 2006).

1.5. Nanopartiküllerin Su Canlıları Üzerine Etkileri

Yakın gelecekte nanopartiküller, su ortamına karışmayla dikkate alınması gerekli olan yeni çevre sorunlarına sebebiyet verebilecektir. Öncelikli olarak bilimsel olarak araştırılma ihtiyacı hissedilen konular; kolloit partiküller ve nanopartiküllerin sedimentlerle ilişkisi, küçük partiküllerin hidrodinamik davranışları, toksisitenin artmasına sebep olan ve diğer kimyasal kirleticiler ile oluşan sinerjistik etki, metallere ve lipofilik organik bileşiklere bağlanma özellikleri, canlıların vücuduna girme şekilleri, yüzey özellikleri, parçacık boyutu ve su ekosistemleri üzerine etkileridir (Moore, 2006).

Şehirsel atıksuların ve sanayi atıklarının büyük bir çoğunluğunun derelere, nehirlere, göllere ve kıyısız sulara karıştığı bilinmektedir. Bundan dolayı, sucul ortamlara nano ölçekli birçok endüstriyel ürün ve bunların yan ürünlerinin de karışması kaçınılmaz bir gerçekliktir (Daughton, 2004). Bunun yanında, çevre takip yöntemlerinin yeterli olmaması, maddelerin nano ve normal yapılarının ayrılmasında karşılaşılan güçlüklerden ötürü nanopartiküllerin miktarları ve çevredeki yayılımı ile ilgili çok fazla bilgi mevcut değildir. Günümüzde nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonlarını $\mu\text{g/L}$ seviyelerinde modelleme teknikleri ile tespit etmek mümkün kılınmıştır (Boxall vd., 2007). TiO_2 nanopartikül konsantrasyonunun İskandinav sucul ekosistemlerinde yapılan bir araştırmada 0,0007-0,0245 $\mu\text{g/L}$ aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Mueller ve Nowack, 2008; Perez vd., 2009).

Su yüzeyinin altındaki kıyısız ve denizel ortamları, balık türleri ve çok sayıda omurgasız canlılara ait pelajik yumurta ve larvaları da içine alan büyük mikroskopik canlılara sahiptir (Wurl ve Obbard, 2004). Suda yaşayan canlıların vücutlarına nanopartiküllerin giriş şekilleri; doğrudan yutarak, solungaçlardan girme, deri yolu ve koku organları ile vücudun dışı çevresinden geçme yoluyla. Omurgasız organizmalarda yutulan nanopartiküller için hepatopankreas, hücresel bağışıklık sistemi

ve bağırsak epiteli olası hedef dokulardır (Moore, 1990). Balıklarda da nanopartiküller için olası hedef organ karaciğerdir (Smedsrud vd., 1984).

Canlılarda nanopartiküller birkaç şekilde toksik etki meydana getirebilirler. Nanotoksitenin ana moleküler mekanizması, canlı vücudunda meydana gelen serbest radikaller sebebi ile hücresel oksidatif stres oluşmasıdır (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllere yüksek dozda maruz kalınması halinde, serbest radikaller; protein, lipid ve DNA'nın oksidasyonuna yol açarak biyolojik bileşenlerde tahribat oluştururlar. Hücresel inflamasyonun artması ve oluşmasında oksidatif stres önemli rol oynar (Rahman, 2000; Rahman vd., 2005; Lanone ve Boczkowski, 2006). Serbest radikaller, bazı nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ve çevresel faktörleri, fagositik hücre etkisi yabancı maddelere karşı, geçiş metallerinin varlığı, antioksidan madde miktarının yetersiz olması gibi farklı birkaç faktörden oluşabilir (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllerin ürettiği potansiyel serbest radikallerin dokularda birikim oluşturması ve yavaş temizlenmesi, dalak ve karaciğer gibi organları oksidatif stresin ana hedefi haline getirmektedir. Diğer taraftan, yüksek seviyelerde kan akışının olduğu (Böbrek vb.) organlar da nanopartiküllere maruz bırakılma durumunda olumsuz bir şekilde etkilenebilmektedir.

Canlı hücre içerisinde nanopartiküller hücresel bileşenler ile etkileşime girebilir, hücresel fonksiyonları değiştirebilir veya bozabilir hatta reaktif oksijen türleri meydana getirebilirler. Zehirlenmenin ana kaynağı hücre çekirdeği ve mitokondri ile nanopartiküllerin etkileşime girmelerinin olduğu düşünülmektedir. Bunun neticesinde de oluşan hücre döngüsünde aksama, hücresel DNA hasarı, apoptozis ve mutageneze sebep olarak zehirlenmenin ana kaynağını oluşturur (Unfried vd., 2007). Nanopartiküllerin diğer toksisite mekanizmalarının, çok hızlı bir şekilde bulundukları ortamla etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dolaşım sistemine nanopartiküller girdiklerinde kan bileşenleri ile etkileşime girerek trombozis ve hemolize neden olabilirler. Bundan başka, immün sistemiyle nanopartiküllerin etkileşimi halinde organizmalarda bağışıklık sistemindeki toksisiteyi yükselttikleri belirlenmiştir (Dobrovolskaia ve McNeil, 2007).

1.6. Akuatik Toksikoloji Deneyleri

Canlıların hücrelerinde kimyasallara bağlı olarak önemli yapı ve işlevsel değişikliklerinin belirlenmesi ve açıklanması amacı ile deneysel toksikolojik araştırmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Toksikolojik testler, yalnızca canlı organizmalar üzerindeki kimyasalların zararlı etkilerini belirlemek için değil, toksik etkilerinin görülmeyeceği bu maddelerin miktarlarını tespit etmek amacıyla da yapılmaktadır. Testlerde uzun vadeli madde maruziyetine bağlı olarak toksik etkiler araştırılacaksa; ortak özellikteki maddelerin, su hacimlerinin ve test şartlarının deneyin yapıldığı zaman periyodu içerisinde de uygulanması gerekir (Altınok vd., 2011). Diğer taraftan, testlerde beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik olarak, bir kimyasal maddenin bilinen etkiyi oluşturduğunun ve deneyin sağlıklı bir şekilde işlediğinin test edilmesi amacıyla pozitif kontrol grubuna uygulanması da gerekir (Saygı vd., 1991; CPMP, 2000).

Kullanılan test organizmaları toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak toksikolojik deneylerde bu maddelerin artan seviyelerde organizmalardaki etkileri araştırılır. Bu çalışmalarda; canlıların üremesi, gelişimi, denge bozuklukları, yüzme yetenekleri, organlarındaki aktiviteler, histolojik değişimler, biyokimyasal değişimler ve ölümler gibi değişkenler araştırılır. Deneylerdeki materyal birden fazla madde içeren kompleks bir karışım olabileceği gibi tek bir kirletici de olabilir (APHA, 1992; Laufer ve Nation, 1999). Ortak özelliklere sahip organizmalar toksikolojik deneylerde, genellikle toksik maddeye farklı miktarlarda maruz bırakılmaktadır. Ayrıca, testlerde kontrol grubu, toksik madde dışındaki değişkenlerin etkilerinin ortadan kaldırılması açısından kullanılmaktadır (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altınok, 2004).

Zehirlilik testleri; deneyin ortamına, zamanına, toksik madde eklenmesine ve amaçlarına göre ayrılmaktadır. Deney sürelerine göre akut ve kronik olmak üzere testler ikiye ayrılır. Akut toksikolojik deneylerde 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman aralıkları kullanılarak testler yapılmaktadır. Testlerde kullanılan canlıya göre deney süresi de farklılık göstermektedir. Bu zaman zarfında kullanılan canlının gelişimi ve büyümesi de göz önüne alınmalıdır. Test süresi kronik deneylerde daha uzun kullanılabilir veya bir haftayla bir ay arasında da olabilir. Farklı toksik madde miktarlarının bu test türünde

canlıların üremesi ve gelişimleri üzerine etkileri de araştırılmaktadır (FAO, 1987; Ünsal, 1998). Kirlenici ilavesine göre toksikolojik testler, statik akış sistemli, yarı statik akış sistemli ve sürekli akış sistemli olmak üzere üç şekilde sınıflandırılmaktadır. Teste tabi tutulacak canlılar, statik deneylerde uygun bir sistem içerisinde hazırlanmış deneye konur ve deney süresince herhangi bir değişiklik yapılmaz. Bu çalışmalarda metabolizma sonucunda atıkların su kalitesinde oluşturacağı olumsuzlukları gidermek amacı ile genelde 96 saatlik süre seçilmektedir. Yarı statik toksik deneylerde, belli zaman aralıkları ile deney ortamı yenilenmekte olup, toksik madde ve deneyde kullanılan canlı türüne göre bu zaman aralıkları farklılık göstermektedir. Bu yüzden, statik testlerde su kalitesindeki değişimlerin bilinmesi; metabolizma atıkları ve diğer bazı sebeplerden kaynaklanan olumsuz etkileri ortadan kaldırmış olmaktadır. Sürekli akış sistemli deneylerde ise, test ortamı devamlı yenilenir ve test süresi boyunca su kalitesinde metabolizma atıklarından kaynaklanan herhangi bir değişiklik olmaz. Bu deneyler doğal ortam koşullarını mükemmel bir şekilde temsil eden test sistemleridir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Zehirlilik testlerinde, toksik olan maddelerin zararlı etkilerini ve su kalitesini tespit etmek, atıkları ve bu atıkların deşarj edildiği alanları izlemek, insanların tükettiği su ürünlerinin sağlık açısından zararlarını tespit etmek, gıda zincirinin üstündeki canlıları korumak, toksik maddelerin canlılar üzerindeki biyolojik birikimini ve uyarıcı etkilerini gözlemlemek için yapılmaktadır. Öte yandan, canlı organizmalarda farklı toksik maddelerin etkilerini kıyaslamak ve bu toksik maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da bu deneyler yaygın bir biçimde yapılmaktadır (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

1.7. Deneylerde Kullanılan Canlının Seçimi

Toksikolojik deneyler için kullanılacak canlılar mümkünse ekosistemi temsil edebilecek yerli türler arasından seçilmelidir. Tespiti yapılacak olan bu türün ekonomik ve ekolojik öneme sahip olmasının yanında elde edilmesinin de kolay olması gerekmektedir. Türler arası ve tür içinde duyarlılık, çeşitlilik gösterdiğinden canlılar oldukça geniş bir duyarlılık aralığına sahip bir şekilde belirlenmelidir. Bu türlerin kültürlerinin yapılabilir ve laboratuvar şartlarına dayanıklılığının yüksek olması gerekir.

En az bir ay süre ile belirlenen türler laboratuvar ortamında sağlıklı koşullarda kontrol edilebilmelidir. Test canlılarının biyolojilerinin, tuzluluk, sıcaklık ve pH gibi isteklerinin deney sistemi kurulmadan önce bilinmesi gerekir. Canlının en hassas evresi, ekonomik açıdan önemi ve gıda zincirindeki düzeyi bilinmelidir. Ayrıyeten, denemelerde kullanılacak canlılar uygun boyda olması gerekmektedir (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995; Atamanalp, 2004).

Zebra balığı (*Danio rerio*) (Şekil 5) larvaları bu tez çalışmasında deney canlısı olarak seçilmiştir. Bu türün çalışmamızda seçilme sebepleri; laboratuvar koşullarına adaptasyonunun yüksek olması, birey başına haftada yaklaşık 120-150 yumurta üretebilme kapasitesine sahip olmaları, genetik yapısı, davranışlarının iyi bilinmesi, genel fizyolojisi, dış ortamda embriyonun gelişmesiyle bütün aşamalarının gözlemlenebilmesi ve değişiklik yapılabilmesi, genetik analizler için uygun olması, insan genlerinin karşılaştırılmalı haritalandırılmasında kullanılması, insan hastalık ve gelişim genleri ile benzer birçok gen bulundurması gibi özellikleridir.



Şekil 5. Toksikolojik testlerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (*Danio rerio*).

1.8. Gen Ekspresyonu

Gen ifadesi ya da gen ekspresyonu, DNA dizisi olan genlerin, işlevsel protein yapılarına dönüşmesi süreci için kullanılan bir terimdir. DNA'daki genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA) senteziyle kopyalanması (transkripsiyonu) ve kopyalanan genetik bilgilerin bir protein molekülüne çevrilmesi (translasyonu) işlemlerinin tamamı gen ifadesi ya da gen ekspresyonu olarak ifade edilir. DNA'nın farklı genlere karşılık gelen bölgelerindeki baz dizilimleri, o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit

dizisini tayin eder. DNA’da bulunan baz dizilimlerinin proteinin amino asit dizisini nasıl şifrelediği biyokimyasal ve genetik yöntemlerin beraber kullanılmasıyla ortaya konulmuştur (Yauk ve Berndt, 2007).

Gen ekspresyonunun en genel ölçme amacı kıyaslamadır. Başka hücrelerdeki genlerin mRNA seviyelerini kıyaslama, bir organdaki normal bir hücre ile tümör hücresinin karşılaştırılması, toksik maddelere maruz bırakılan veya farklı süreler ile ilaç uygulanan canlıların genlerindeki ekspresyon değişimlerinin kıyaslanması gibi maksatlarla gerçekleştirilmektedir (Suter vd., 2004).

1.9. DNA Hasarı (Comet Assay)

Günümüzde DNA hasarının ölçülmesine imkân tanıyan hassas teknikler büyük önem kazanmıştır. DNA hasarını tespit etmek ve miktarını belirlemek için tek hücreli jel elektroforezi veya diğer adıyla “Comet Assay” tekniği ile hücre seviyesinde uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik işlemdir. “Alkali Comet Assay” olarak 1988 yılında tanıtılmasından sonra farklı modifikasyonlar ile geliştirilerek çok çeşitli tiplerde DNA hasarının tespit edilmesinde kullanılır duruma gelmiştir. “Comet Assay”; genetik toksikoloji, yaşlanma, klinik ve moleküler epidemiyoloji alanlarında önemli uygulamaları olan özellikle son yıllarda her geçen gün artan apoptozis, oksidatif stres-antioksidan araştırmalarında da yer almıştır. İşlem aşamaları ise; hücre süspansiyonunun hazırlanma işlemi, mikroskop lamalarının hazırlanması, lizis işlemi, DNA süperkoil yapısının alkali ortamda açılması (alkali unwinding), elektroforez işlemi, nötralizasyon işlemi, DNA boyama ve “comet”leri görüntüleme, cometlerin sayılması ve DNA hasar tespiti gibi basamakları içermektedir (McKelvey-Martin vd., 1993).

1.10. Önceki Çalışmalar

Canlılar üzerindeki nanopartiküllerin zararlı etkilerinin değerlendirildiği toksikolojik araştırmalar çok fazla değildir. C₆₀ (Karbon 60) nanopartikülleri, fizikokimyasal özellikleri ve boyutları iyi bilinen nanopartiküller olmaları sebebiyle ilk araştırmaların birçoğunda kullanılmıştır. Bu araştırmalar neticesinde, hücresel oksidatif

strese sebep olduğu ve hücresel toksisitenin, memeli hayvanlara ait hücre kültürü ile karıştırılan fullerenlerin, yağ içerisinde oluşan çözünmeden kaynaklandığı belirlenmiştir (Colvin, 2004; Sayes vd., 2004). Yüzey alanlarındaki değişim C₆₀ nanopartiküllerin, yağlardaki alifatik gruplara ve hidroksile tutunarak çözünmelerini azaltabilir ve bu sayede zehirlilik miktarında da düşüş olabilir (Sayes vd., 2004).

Nanopartiküllerin son yıllara kadar toksik etkileri konusunda yapılmış araştırmaların birçoğu memeli hayvanlar (domuz, fare vb.) ile ilgili yapılan araştırmalardır. Hayvanlardaki solunum sistemi üzerine özellikle, metal oksit nanopartiküller, kadmiyum, TiO₂ ve karbon nanotüplerin etkilerine yönelik araştırmalar çoğunluktadır. Bu araştırmalar neticesinde, nanopartiküllerin hayvanlara intratrakeal olarak verildiğinde önemli düzeyde akciğer hasarı oluşturdıkları, fibroza ve dokularda iltihaplanmaya sebep oldukları belirlenmiştir (Takenaka vd., 2004; Handy ve Shaw, 2007). Yalnız, günümüzde üretilen nanoteknolojik ürünlerin hızlı bir şekilde büyümesi göz önüne alındığında, nanopartiküllerin letal ve subletal zehirlilik deneyleri; sucul organizmalar, balıklar, midye ve omurgasızlar gibi canlılarda da uygulanmaya başlanmıştır. Mavi midye (*Mytilus edulis*) ve deniz tarağı ile yapılan araştırmalarda bu canlıların nanopartiküllerin endositoz vasıtasıyla sindirim sistemine geçtikleri tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, denizel ortamdan toplanan midyelerin hemen hepsinin karaciğerlerinden nano ölçekteki partiküller izole edilebilmiştir (Moore vd., 1997).

Balıklar ve omurgasız canlılar ile yapılan araştırmalarda C₆₀ fullerenler mg/L seviyelerinde toksik etki gösterebilmektedir, fakat ulaşılan sonuçta LC₅₀ değerleri çözücü türü ve nanopartiküllerin hazırlanma metoduna göre farklılık gösterebilmektedir. Bu çalışmalar neticesinde, sulu fazda nanopartiküllere maruz kaldıklarında birikimin canlı organizmalarda, özellikle solungaçlar ve bağırsaklarda meydana geldiği belirlenmiştir. Alabalıklarda, hedef organ olarak nanopartiküllerin maruziyetinde karaciğer tespit edilmiş ve önemli seviyede balıkların karaciğerlerinde biyolojik ve kimyasal değişimlerin olduğu saptanmıştır (Kashiwada, 2006; Lovern vd., 2007). Balık beyninin de karbon içerikli nanopartikül zehirlilik çalışmalarında potansiyel bir hedef organ olduğu ortaya konulmuştur. Geniş ağızlı levrek (*Micropterus salmoides*) balığında uygulanan karbon 60 nanopartikülleri beyin dokusundaki lipid peroksidasyonunda artış, golyan balığında (*Pimephales promelas*) ise %42 oranında

peroksizomal lipid taşıyıcı protein olan PMP70 seviyesinde bir düşüş tespit edilmiştir (Oberdörster, 2004; Oberdörster vd., 2006). Karbon 60 ile organik bir bileşik olan tetrahidrofuran (THF) karışımına maruz kalan zebra balıkları larvalarının kontrol grubuna göre gen ekspresyonlarında düşük düzeyde bir değişim ve hayatta kalma oranlarında azalma saptanmıştır (Henry vd., 2007). Bunun yanı sıra, zebra balığı larvalarının yumurtadan çıkış oranlarında azalma ve embriyolojik gelişimlerinde de gecikme olduğu belirlenmiştir (Zhu vd., 2007).

Gökkuşığı alabalıklarının beyin dokularında TiO_2 nanopartiküllere maruz kaldıklarında herhangi bir toksik etki olmamasına rağmen, oksidatif stres kaynaklı etkiler solungaçlarında görülmüştür. Bu durum beyinde hasar oluşumunun nanopartikülün türüne bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (Federici vd., 2007). Zebra balıklarında ribozomal fonksiyonlarının gen ekspresyonlarında önemli düzeyde değişimler meydana gelirken solungaç filament genişliklerinde herhangi artış görülmemiştir (Griffitt vd., 2009). TiO_2 nanopartikülleri bazı nanopartiküllere göre daha düşük oranda toksik etki göstermektedirler. Yüksek nanopartikül konsantrasyonlarında; yavru sazan balıkları (*Cyprinus carpio*) ile yapılan denemelerde dahi ölüm olmazken solunum sisteminde konsantrasyona göre oksidatif stres ve stres oluşumunun etkisine bağlı olarak, peroksidaz, laktoperoksidaz, SOD ve katalaz enzim miktarlarında değişiklikler belirlenmiştir (Hao vd., 2009).

Zebra balıklarında yapılan 48 saatlik akut toksisite deneyi neticesinde suda kısmen çözünme özelliğine sahip olan metalik nanopartiküllerden bakır (Cu) nanopartiküllerin LC_{50} değeri 1,5 mg/L olarak tespit edilmiştir. Balıklarda başka bir metalik nanopartikül olan gümüş (Ag) nanopartiküllerin toksik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalarda, golyan balığının embriyolarında 35 ve 100 nm boylarındaki nanopartiküller için 96 saat süreyle LC_{50} değerleri sırası ile 9,4 ve 10,6 mg/L olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, larva anormalliklerinde konsantrasyona bağlı olarak artış saptanmıştır (Laban vd., 2010). Yavru gökkuşığı alabalıklarında yapılan gümüş (Ag) nanopartikülü biyobirikim çalışmalarında en fazla birikiminin karaciğerde ve solungaçlarda olduğu belirlenmiştir (Scown vd., 2010).

Zebra balığı embriyolarındaki çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin toksik etkileri üzerine yapılan bir araştırma sonucunda, yumurtadan çıkış oranlarında ve perikardiyal ödemde doz miktarına bağlı olarak önemli düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir. Öteyandan, zebra balığı embriyoları çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine maruz bırakıldığında oksidatif stres ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşması sebebiyle toksik etkiler oluştuğu tespit edilmiştir (Zhu vd., 2009).

Nikel (Ni) nanopartiküller, çeşitli ticari uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu sebeple çevreye salındıkları alanlardaki ekosistem ve canlı organizmaların gelişimleri üzerinde toksisiteye neden olabilmektedirler. Nikel nanopartiküller sanayide katalizör, mürekkep materyali ve seramik katkısı olarak kullanılmaktadırlar (Ozay vd., 2011; Bazarjani vd., 2011). Çözülebilir ve çözilemeyen nikel bileşiklerinin (NiSO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiO) sucul organizmalar üzerinde lokomotor aktivitede ve yumurtadan çıkma oranında azalma, solunum problemi ve kanserojenik etkiler gibi toksik etkiler oluşturduğu kanıtlanmıştır (Pane vd., 2003; Kienle vd., 2008). Nikel nanopartiküllerin toksik etkilerini niteliksel olarak ifade eden, gözleme dayalı birkaç toksikolojik çalışma yapılmış olmasına rağmen, canlı organizmalar üzerindeki etkileri konusundaki belirsizlik halen devam etmektedir (Karlsson vd., 2008; Kasemets vd., 2009).

Alüminyum oksitten (Al_2O_3) üretilmiş nanopartiküller endüstride önemli uygulama alanlarına sahiptirler. Bunlar; evsel, tıbbi ürünler, emici veya soğurucu maddeler, biyomateryaller ve hareket elemanları gibi sistemlerdir (Sadiq vd., 2009). Alüminyum oksit nanopartiküller; üretim, taşınım, kullanım ve imha işlemleri esnasında ekosisteme girebilmekte ve potansiyel olarak insan sağlığı için risk oluşturabilmektedir (Pakrashi vd., 2011; Arora vd., 2012). Farelere ağız yoluyla alüminyum oksit nanopartiküller uygulandığında genotoksik etkiler oluşturduğu (Balasubramanyam vd., 2009) ve bu maddelerin UMR 106 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Di Virgilio vd., 2010). Bunun yanında, önceki bazı çalışmalar alüminyum oksit nanopartiküllerin alerji (Pakrashi vd., 2013), bakteriler (Pakrashi vd., 2011; Fajardo vd., 2014), su piresi (Pakrashi vd., 2013) ve zebra balığı (Kovrižnych vd., 2013) üzerine sitotoksik etkileri konusunda yapılmış olmasına rağmen, balıkların hücre yapısı üzerine etkileri konusundaki bilgiler halen oldukça sınırlı düzeydedir.

Alüminyum oksit nanopartiküllere maruz kalan hücrelerde, oksidatif stres sonucu oluşan enflamasyon ve lipid oksidasyonu hücre ölümlerine sebebiyet vermektedir (Ju-Nam ve Lead, 2008). Nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olmaları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olan etmenlerden bir tanesidir. Bundan dolayı, nanopartikül boyutlarının küçük olması daha yüksek oranda oksidatif strese neden olabilmektedir (Gliga vd., 2014; Mittal ve Pandey, 2014).

Su canlılarında nanopartiküllerin vücuttaki dağılımı, absorpsiyonu, yerleşimi, diğer yandan boşaltım, protein miktarları ve metabolizmadaki etkileri ile ilgili yeterince araştırma bulunmamaktadır (Handy vd., 2008). Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres hakkında da araştırma yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Nanopartiküllere sulu fazda maruz kalan ve organizma vücudunda meydana gelen oksidatif stres nedeniyle, damar sertliği, solungaçlarda hasar, eser element metabolizmasında bozulma ve epitel hücrelerinde bulunan antioksidan savunma sisteminde değişimler olabilmektedir (Kashiwada, 2006; Smith vd., 2007). Bu konu hakkında yapılan araştırmalar, sucul organizmalarda nanopartiküllerin özellikle oksitleyici ajanlara karşı hassaslığı ile bilinen DNA'da hasar meydana getirdiğini ve oksidatif strese neden olduğunu göstermiştir (Linse vd., 2007).

Bazı sucul omurgasızlara, nanopartiküllerin etkileri hakkında yapılmış birkaç farklı araştırma vardır. Bunun yanında, ekotoksikoloji çalışmaları için su piresinin (*Daphnia magna*) standart bir organizma olduğu bilinmektedir ve bu su piresi (*Daphnia magna*) kullanılarak nanopartiküllerin LC₅₀ değerlerinin tespitine yönelik farklı birkaç araştırma yapılmıştır. Karbon 60 fulleren nanopartiküllere en yüksek konsantrasyonda 21 gün süre ile 5 mg/L doza kadar maruz kalan su pirelerinde %40 oranında ölüm olduğu belirlenmiştir (Oberdörster vd., 2006). Bunun yanı sıra, su bitkileri (denizel nanoplankton, bitki hücreleri), alg, bakteri ve toprak solucanı kullanılarak da nanopartikül ekotoksisite araştırmaları yapılmıştır (Lyon vd., 2006; Tong vd., 2007).

Zebra balığı (*Danio rerio*) ile birkaç balık türü üzerinde 50 nm çapa sahip Cu nanopartiküllerin toksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda balıkların solungaçlarında ve solungaç hücrelerinde Cu nanopartiküllerin hasara neden olduğu tespit edilmiştir (Song vd., 2015).

Zebra balıklarının (*Danio rerio*) embriyo ve larvalarına CuO nanopartiküllerin toksik etkisini araştırmak amacıyla 6,25 mg/L ile 50 mg/L konsantrasyon aralıklarında CuO nanopartikülleri uygulanmış ve 3 gün bekledikten sonra çeşitli moleküler, morfolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Çalışma sonunda CuO nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonlarda embriyo veya larvalarda gelişimsel anormalliklere sebep olduğu, nörotoksisite ile birlikte hepatotoksisiteye neden olduğu, süperoksit dismutaz 1 ve tümör nekrozis faktör alfa genlerinin ekspresyonunda değişikliğe yol açtığı saptanmıştır (Sun vd., 2016).

Zebra balığının embriyolojik gelişimin evrelerinde; Ag, Au, CuO ve ZnO nanopartiküllerinin yumurtadan embriyoya, koryondan vitellüs kesesine kadar birikimi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilere göre; zebra balığı yumurtasında birikimin en az CuO, en fazla Au nanopartiküllerin olduğu, embriyoda birikiminin en fazla çinko nanopartikülleri olduğu, koryonda ise sırası ile Ag, Au ve CuO nanopartiküllerinin birikiminin en fazla olduğu belirlenmiştir (Bohme vd., 2017).

Gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) 28 gün süreyle Ag nanopartikülü ve Cu nanopartikülüne maruz bırakıldığında hedef organ olan karaciğerlerinde sitotoksik etkilerin oluştuğunu ve Ag nanopartikülüne oranla Cu nanopartikülünün daha fazla dokularda hasara sebep olduğu belirlenmiştir (Ostaszewska vd., 2018).

Wang ve ark. (2019) Kirpi balığını (*Takifugu fasciatus*) Cu nanopartikülünün 20 ve 100 mg/L olan farklı konsantrasyonlarına 30 gün süre ile maruz bırakarak karaciğerinde oluşan oksidatif stresin, bağışıklığın ve hücre apoptozun cevaplarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda balığın karaciğer oksidatif stres parametrelerinde, apoptoz indeksi ve kaspaz enzim aktivitelerinde Cu nanopartikülünün etkisine paralel olarak artış tespit etmişlerdir.

1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Endüstriyel nanopartiküllere maruz kalma konusunda özellikle sucul ortamlar ve su kaynakları risk altındaki alanlardır. Sudaki nanopartiküllerin davranışları, sucul

organizmalarla vücuda alınma kapasitesi ve ortaya çıkabilecek potansiyel toksik etkileri hakkında son yıllara kadar yapılmış çalışma sayısı çok azdır. Çevremizde nanopartikül kaynaklı risklerin tespit edilebilmesi için öncelikle detaylı olarak sucul organizmalardaki etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Nanopartiküllerin suda canlılar üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için davranışları, vücuda alım mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve maruziyet yönteminin iyi anlaşılması gerekir. Diğer taraftan, su canlılarındaki nanopartiküllerin toksisite mekanizmalarını belirlemek için oksidatif stres nedeniyle oluşabilecek stres gen ekspresyonlarındaki değişimleri ve DNA hasarlarının moleküler düzeyde tespit edilmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, ticari amaçla üretilen Al_2O_3 ve Ni nanopartiküllerin homojen bir karışım ortamı sağlayan toksikolojik deney sistemi sayesinde zebra balığı larvaları kullanılarak fizikokimyasal ve genel ekotoksikolojik niteliklerinin tespit edilmesi ve moleküler genetik düzeyde toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada; Al_2O_3 ve Ni nanopartiküllerin fizikokimyasal nitelikleri, Al_2O_3 ve Ni nanopartiküllerin konsantrasyon-etki testleri aracılığıyla letal (LC_{50}) ve subletal düzeyleri, Al_2O_3 ve Ni nanopartiküllere maruziyet sonrasında zebra balığı larvalarının hücrelerinde subletal konsantrasyonlarda meydana gelebilecek DNA'daki hasarlar ve deneylerde yer alan larval zebra balıklarının real-time PZR tekniği ile stres kaynaklı genlerindeki (*mt2*, *rad51* ve *p53*) ekspresyon değişimleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada yaygın bir şekilde nanoteknoloji endüstrisinde kullanılmakta olan alüminyum oksit ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NP}$, partikül büyüklüğü: <50 nm) ve nikel (Ni-NP , partikül büyüklüğü: <100 nm) nanopartiküller toksikolojik açıdan zebra balığı larvalarında değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve nanopartiküller aracı medikaller vasıtasıyla “Nickel nanopowder, Sigma-Aldrich, Katalog no: 577995” ve “Aluminum oxide nanopowder, Sigma-Aldrich, Katalog no: 544833” ticari isimleriyle temin edilmiştir.

2.2. Fizikokimyasal Analizler

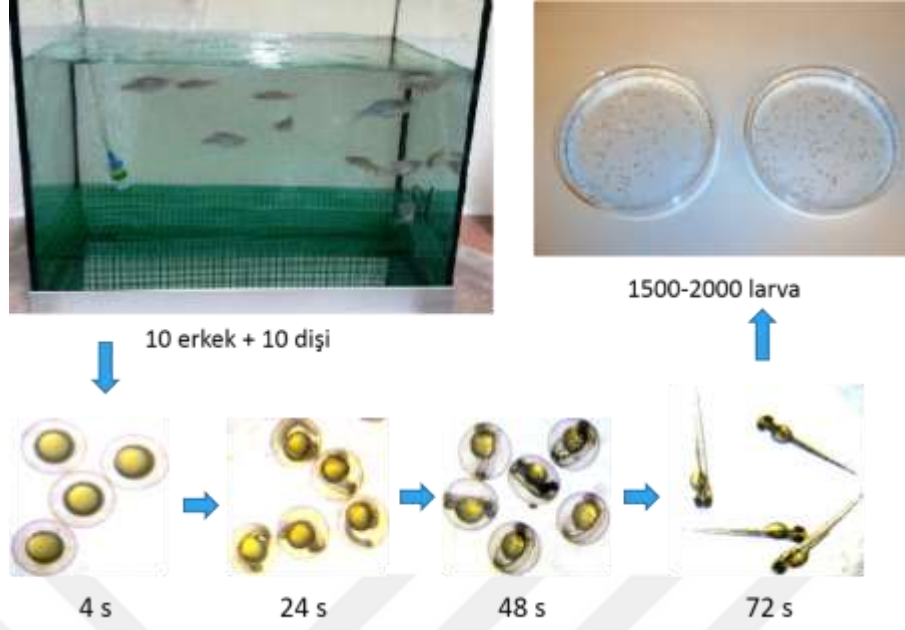
Nanopartiküllerin toksik testlerde uygulanan boyutları, kümelenme durumları ve fiziksel görünümelerini tespit etmek amacı ile Taramalı Elektron Mikroskobu (JSM-6610; Scanning Electron Microscope, SEM; JEOL Co., Japan) kullanılarak görüntülenmiştir. Bu işlem yapılırken, mikroskobun voltajı 20 kV ve yaklaşma mesafesi 12 mm olacak biçimde ayarlanmıştır. Bunun yanında, deneylerde kullanılan test çözeltileri içerisindeki iyonlaşan metal konsantrasyonlarını ve gerçek nanopartikül konsantrasyonlarını tespit etmek maksadıyla Endüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (Perkin Elmer Optima 7000 DV, ICP-OES) ile analiz yapılmıştır. Test çözeltilerinden bu maksatla farklı sürelerde ve değişik miktarlarda su numuneleri örneklenmiştir. Ölçüm işleminden önce çözelti içinde yer alan nanopartiküllerin tamamının çözünebilmesi amacıyla derişik nitrik asit (HNO_3) su örneklerine eklenmiştir. İyon konsantrasyonları deneylerdeki test suları içerisinde, hazırlanan standart çözeltilere karşı ICP-OES cihazından okunarak belirlenmiştir.

Gen ekspresyon değişimlerinin nanopartiküllerin karakteristik özellikleri ile olan ilişkilerinin tespit edilmesi amacıyla Zetasizer (Nano ZSP; Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) nanopartikül takip analizi yapılmıştır. Bu hedef doğrultusunda; su örnekleri alınmış test çözeltilerinden, görüntüleme sistemi içerisine konulmuş ve lazer

ışını aracılığıyla sıvı içerisinde geçiren nanopartiküllerin görüntülenmesi sağlanarak kümelenme miktarları, partikül konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü ölçülmüştür.

2.3. Toksikolojik Test Canlıları

Deneylerde kullanılan zebra balıkları 10-12 aylık damızlık olarak akvaryum balıkları satıcısından alınmıştır. 10 litrelik akvaryumlar içerisinde damızlık zebra balıklarının üremeleri sağlanmış, anaç balıkların yumurtaları yemeleri engellemek için akvaryumların tabanına gözenekli ızgaralar yerleştirilmiştir. Sonrasında, döllenmiş yumurtalar akvaryum tabanından sifonlanarak toplanmış ve petri plaklarına konulmuştur (Şekil 6). Gen ekspresyon ve doz-etki denemeleri için haftalık ortalama 1500-2000 civarında larva temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan sağlıklı larvalar döllenme işlemi yapıldıktan 72 saat sonra yumurtadan çıkmıştır. Damızlık balıkların toksikolojik testlerde ve laboratuvar şartlarına adaptasyonunda klor içermeyen en az 24 saat süre ile bekletilmiş şebeke suyu kullanılmıştır. Damızlık zebra balıklarına günlük olarak yapılan yemleme işleminde sabah ve akşam olmak üzere iki kez tetramin hazır yem ve bir kezde *Artemia* sp., verilmiştir. Balıklardaki fotoperiyot uygulaması 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde yapılmıştır. Test suyunun sıcaklığı, çözünmüş oksijen miktarları, pH'sı günde bir defa ölçülmüş, nitrit, nitrat, amonyak miktarları ile toplam sertlik haftada bir ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda, su sıcaklığı; $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, çözünmüş oksijen; $7,2 \pm 0,8$ mg/L, pH; $7,1 \pm 0,5$, nitrit; $<0,1$ mg/L, nitrat; <20 mg/L, toplam amonyak; $<0,02$ mg/L ve toplam sertlik; $53,06 \pm 1,3$ mg/L CaCO_3 olarak ölçülmüştür.



Şekil 6. Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları (Boran, 2012).

2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması

Al_2O_3 ve Ni nanopartiküller ve doğal (iyon) halleri olan alüminyum klorür (AlCl_3) ve nikel klorür (NiCl_2) toksikolojik olarak kıyaslama deneylerinde kullanılmak üzere çözeltilerinin hazırlanmasında saf su kullanılmıştır. İyon ve nanopartikül denemelerinde, 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlanmış, DNA hasar ve gen ekspresyon deneyleri için 5 farklı subletal (0,1-3 mg/L AlCl_3 ; 0,2-6 mg/L Al_2O_3 -NP; 1-20 mg/L NiCl_2 ; 1-20 mg/L Ni-NP), konsantrasyon-etki deneyleri için ise 6 farklı letal konsantrasyon (20, 50, 100, 175, 300 ve 500 mg/L) kullanılmıştır. Nanopartiküller 1 saat süre ile banyo tip sonikatör yardımı ile stok çözeltileri içerisindeki kümelenmenin oluşmasını önlemek için sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur.

2.5. Letal ve Subletal Maruz Bırakma Deneyleri

Deneylerde iyon haldeki maddelerin toksikolojik etkilerinin tespit edileceği, içinde 200 mL bekletilmiş şebeke suyu bulunan 400 mL'lik beherlerle çalışılmıştır (Şekil 7). Nanopartiküllerin toksikolojik deneylerdeki letal ve subletal konsantrasyonları, ayrıca homojen karışım sağlayan nanopartikül test sistemleri larvalarda oluşabilecek gen ekspresyon değişimlerini ve DNA hasarları belirlemek

amacıyla kullanılmıştır. 2 litrelik 6 adet beher bu test sistemlerinde kullanılmış ve 3 tekrar şekilde deneyler yürütülmüştür.



Şekil 7. Zebra balığı larvaları kullanılarak toksisite test üniteleri 3 tekrar olacak şekilde hazırlanmış.

Döllenme işleminden 72 saat geçtikten sonra yumurtadan çıkmış normal larvalar toksikolojik testlerde, nanopartiküllere 96 saatlik süre ile maruz bırakılmıştır. Test sistemlerinde her bir deneme için kontrol grubu oluşturulmuş ve sistemlerin her birinin içerisine 30'ar adet larva konulmuştur. Bütün sistemler içerisindeki suların karışımı aynı hızda olabilmesi için çoklu manyetik karıştırıcı yardımı ile nanopartikül deneyleri süresince karıştırılmıştır. Suyun yukarı yönde hareket etmesi için pastör pipeti (cam) yardımı ile suya hava enjekte edilerek, ortaya çıkan kabarcıklar kullanılmıştır (Şekil 8). Homojen bir şekilde su kolonunda nanopartiküllerin yayılımını sağlamak için, 1 saat banyo tip sonikatör yardımıyla sonikasyon işlemi yapılmasının ardından farklı konsantrasyonlarda deney sistemlerine eklenmiştir. Ölü larvalar plastik pastör pipeti aracılığıyla toplanıp sayılmış ve konsantrasyon-etki deneyleri sonunda LC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyon ve DNA hasar testlerinde ise, maruz bırakma sonucunda ependorf tüplerine canlılığı devam eden larvalar alınarak $-80^{\circ}C$ 'de analiz yapılana kadar saklanmıştır.



Şekil 8. Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir nanopartikül karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi.

2.6. Gen Ekspresyon Değişimleri

2.6.1. RNA İzolasyonu

Toplam RNA, bir ependorf tüpü içerisinde RNeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak zebra balığı larvaları bütün halde ve 30 adet olacak şekilde elde edilmiştir. Bu nedenle; lizis işlemi için larva bulunan tüpler içerisine RLT solüsyonu eklenmiş ve prob sonikatör yardımıyla larvalar parçalanmıştır. Oluşan lizis çözeltisi spin tüpüne (Qiashreder) konulmuş ve 13000 g'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Yeni bir mikrosantrifüj tüpüne deney tüpünün dip kısmında biriken süpernatant aktarılmış ve 1:1 oranında lizati temizlemek için %70'lik etanol ilave edilmiştir. Sonrasında, RNeasy mini tüpe deney tüpünün içinde bulunan karışım tamamen ilave edilmiş, 13000 g'de santrifüj işlemi yapılmış ve tüpün dibinde toplanan sıvı atılmıştır. Örnekler içindeki DNA'yı ayırmak amacıyla 15 dakika örnekler DNase çözeltisi içine konularak beklenmiştir. Daha sonra, mini tüp başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak RPE tamponu üzerine yıkamak amacıyla eklenmiştir. Mini tüp hızlı santrifüj işleminin ardından başka bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak RNA stok çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. Son aşamada santrifüj yapılarak mini tüpdeki RNA'nın silika jel membrandan ayrılmasıyla mikrosantrifüj tüpü içinde kalması sağlanmıştır. 30 adet larvanın bulunduğu örnekten bu işlem sonucunda saf RNA çözeltisi (30 µL) alınmıştır (Boran, 2012).

RNA'nın izole edilmesinin ardından örneklerin RNA konsantrasyonları spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000, Wilmington, DE, USA) cihazıyla analiz edilmiştir. Analiz amacıyla spektrofotometreye 2 µL örnek alınmış, RNA miktarının ≥ 100 ng/µL ve RNA kalitesi 260/280: 1,8-2,1 aralığına ayarlanmıştır. Yürütülen tüm aşamalar buz içerisinde ve serin ortamda yapılmıştır.

2.6.2. Ters (Revers) Transkripsiyon

Komplementer DNA'lar (cDNA), RNA örnekleri kullanılarak ImProm-II Revers Transkriptaz Kiti (Promega) aracılığıyla elde edilmiştir. Bu doğrultuda, spektrofotometre ile RNA miktarı belirlenen örnekler alınarak tüm örneklerin 100 ng/µL nihai konsantrasyonda nükleaz içermeyen su eklenerek seyreltilmiştir. Sonrasında 16 µL revers transkripsiyon reaksiyon karışımı ve 8 µL seyreltilmiş kalıp RNA PZR tüplerine ilave edilmiştir. PZR tüpleri içerisinde bulunan örnekler Termal Cycler (Bio-Rad, T100) cihazına konulmuş ve 90 dakika reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon koşulları; annealing (tutunma) 25°C'de 5 dakika, extension (uzama) 42°C de 1 saat, ve ters transkriptaz enziminin inaktivasyonu amacıyla 70°C'de 15 dakika olacak biçimde düzenlenmiştir. Oluşturulan tamamlayıcı DNA'lar reaksiyon işleminin bitiminin ardından analize kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Aşağıda verilen miktarlarda reaksiyon solüsyonu ters transkripsiyon işleminde yer almıştır (Henry vd., 2013)

- Nükleaz içermeyen su	6,6 µL
- 5 x Reaksiyon solüsyonu	4 µL
- MgCl ₂ (25mM)	2,4 µL
- dNTP tamponu (herbiri 10 mM)	1 µL
- Hegzanükleotid primerler	1 µL
- Ters Transkriptaz	1 µL
- Kalıp RNA	8 µL

2.6.3. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Gen ifadesi analizlerinde hedef stres genleri olarak; hücrelerde tümör proteini olarak görev yapan, kanser oluşumunu önleyici ve tümör baskılayıcı görev yapan, hücre döngüsünü düzenleyen *p53* geni, DNA onarma proteini olan, DNA'daki ikili zincir kırıklarında onarım görevi yapan *rad51* geni ve hücre içinde golgi aygıtının zarına yerleşen, metalik maddelere karşı hassas ve bağlama yeteneği olan *mt2* geni proteinlerini temsil eden gen dizileri tercih edilmiştir. Öte yandan standart gen olarak ekspresyon değişimlerini karşılaştırmalı olarak hesaplamak amacı ile, hücre iskeleti sisteminde görev yapan, hücrenin yapısında, hareketinde ve bütünlüğünde işlev gören beta aktin (*β-actin*) proteinini temsil eden gen seçilmiştir. Bio Basic firmasından her bir gen için spesifik primerlerin temini sağlanmıştır. Hedef amplikon bölgesi büyüklükleri ve nükleotid primer dizileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hedef genleri için zebra balığı nükleotid primer dizileri.

Hedef gen	Primer	Nükleotid dizisi 5' - 3'	Amplikon büyüklüğü
<i>p53</i>	Forward	TTG TCC CAT ATG AAG CAC CA	200 bp
	Reverse	TTT CCT GTC TCT GCC TGG AC	
<i>rad51</i>	Forward	ACT AGC CGT CAC CTG CCA GC	133 bp
	Reverse	ACT GCC CAC CAG ACC ATA CCG TT	
<i>mt2</i>	Forward	CTG CGA ATG TGC CAA GAC TGG AAC	243 bp
	Reverse	GCG ATG CAA AAC GCA GAC GT	
<i>β-actin</i>	Forward	ACA CAG CCA TGG ATG AGG AAA TCG	138 bp
	Reverse	TCA CTC CCT GAT GTC TGG GTC GT	

Reaksiyonda kullanılması düşünülen örnek karışım; revers ve forward primerler, “SYBR yeşil (Sigma-Aldrich SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix,)” floresan boya yardımıyla hazırlandı. Ters transkripsiyon reaksiyonundan sonra oluşan DNA’lar 3 paralel ve 1:10 oranında seyreltilmiş olarak hazırlanmıştır. Diğer taraftan standart DNA örnekleri de reaksiyon etkinliğinin kontrolü amacı ile 3 paralel olacak miktarda hazırlanmıştır. Yine 3 paralel olacak şekilde real-time PZR reaksiyonunda sırası ile içerisinde nükleaz bulunmayan su, negatif kontrol, 1/10 miktarında seyreltilen DNA örneği ve son olarak da reaksiyonda etkinliği tespit etmek amacıyla değişik miktarlarda seyreltilen standart DNA’lar konulmuştur. Elde edilen örnekler 0,2 mL hacmindeki

tüpler içerisine pipet yardımı ile alınmasının ardından real-time PZR aletine bu tüpler konulmuştur. Kantitatif PZR analizi yapmak amacıyla Real-time PZR cihazı (Qiagen, Rotor-Gene 3000) kullanılmış ve reaksiyon 2 saat 40 dakika süre ile 40 döngü şeklinde aşağıda açıklanan döngü koşullarında yapılmıştır (Henry vd., 2013).

a. Bekletme aşaması

94 °C, 2 dakika

b. Döngü aşaması

1. aşama 94°C, 15 saniye

2. aşama 55°C, floresan kapalı, 1 dakika

3. aşama 72°C, floresan açık, 1 dakika

c. Erime eğrisi aşaması

1. aşama 94°C, 15 saniye

2. aşama 60°C, 1 dakika

3. aşama 94°C, 15 saniye

d. 4 °C de bekletme

2.6.4. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması

Real-time PZR analizinde kullanılan bilgisayar programı aracılığı ile, istatistiksel olarak DNA replikasyonunda meydana gelen floresan ışıma düzeyinin önemli miktarda artış gösterdiği düzeydeki döngü miktarları “C_T, Threshold Cycle” eş zamanlı şekilde belirlenmiştir. Gen ekspresyonlarındaki değişimler eşik aşamasındaki döngü miktarları dikkate alınarak aşağıdaki hesaplamalar yardımı ile kat olarak belirtilmiştir (Reinardy vd., 2013)

C_T (Treshold cycle) : DNA’da oluşan floresan ışıma düzeyinin eşik seviyesine vardığı noktadaki döngü sayısı

$$\Delta C_T = \text{ortalama } C_T \text{ hedef gen (} mt2 \text{)} - \text{ortalama } C_T \text{ standart gen (} \beta\text{-actin)}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ örnek} - \text{ortalama } \Delta C_T \text{ kontrol}$$

$$RQ \text{ (Relative quantification)} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \text{ (gen ifadesi değişimleri)}$$

Öte yandan, reaksiyonun düzgün bir şekilde çalışıp çalışmadığının bir işareti olarak etkinliği hesaplanmıştır. Bu maksatla elde edilen değerler yardımı ile standart bir eğri oluşturulmuş ve eğrinin eğimi tespit edilerek $10^{(-1/\text{eğim})} - 1$ formülünde yerine yazılmak kaydıyla etkinlik değeri saptanmıştır. Düzgün bir şekilde reaksiyonun çalışması için etkinlik değeri 0,9 ile 1,1 (%90 - %110) arasında olmalıdır. Bu değerler dışında real-time PZR reaksiyonunun etkinliğinin hesaplanması hususunda, hatanın kaynağı belirlenerek reaksiyon yenilenmiştir.

2.7. Larvalarda Hücresel DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet Assay)

Larvalarda komet deneyi, bazı değişiklikler yapılarak aşağıda açıklanan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir (Reinardy vd., 2013). 96 saat süreyle nanopartiküllere maruz bırakılan larvalar deney süresi bitiminde bir tüpte 30 adet larva olacak şekilde 1,5 ml'lik santifirüj tüplerine alınmış ve üzerine 300 µL RLT buffer (Qiagen) eklendikten sonra hücre süspansiyonu doku homojenizatörü yardımı ile homojenize edilerek hazırlanmıştır. Sonrasında 75 µl % 0,5 LMP (düşek erime ısı) agaroz 10 µl hücre süspansiyonu ile karıştırılmıştır (LMP agaroz 37°C'de bekletilerek kullanılmıştır). İlk aşamada 200 µL %1'lik NMP (normal erime ısı) agaroz ile üzerinde hücre sayımı yapılan rodajlı lamaların yüzeyleri kaplanmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Lameller hücrelerin üzerini kaplama işlemi için kullanılmıştır. Daha sonra ikinci tabaka olarak LMP karışımından 80 µl hazırlanmış ve hücre süspansiyonu kullanılarak ikinci tabaka oluşturulmuş ve lamelle üzeri kapatılmıştır. Bu işlemden bitiminden sonra 20 dakika süre ile agarozun donması beklenmiştir. Üçüncü tabakada ise örnekler sadece 80 µL %0,5 LMP agaroz ile kaplanmış ve yine lamelle üzeri kapatılıp agarozun donması beklenmiştir. Hazırlanan slaytlar daha önce hazırlanmış ve +4°C'de bekletilen lizis solüsyonuna "(2,5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, pH 10, %10 DMSO ve %1 Triton X-100)" daldırılmış ve en az 2 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. Slaytlar yan yana elektroforeze konulmuş ve +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler 30 dakika 24 V 300 mA +4°C'de elektroforezde yürütülmüştür. Slaytlar yürütme işleminden sonra nötralize buffer ile 15 dakika boyunca yıkanmış ve Etidium Bromür ile 0,5 mg/mL konsantrasyonunda boyanmıştır. Hidrojen peroksit (H₂O₂) pozitif kontrol için kullanılmıştır. Son işlem olarak boyanmış slaytlar 400 X'de floresan

mikroskop (çıkış filtresi 515-560 nm, bariyer filtresi 590 nm) altında görüntülenmiş ve sonuçlar Comet IV bilgisayar yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

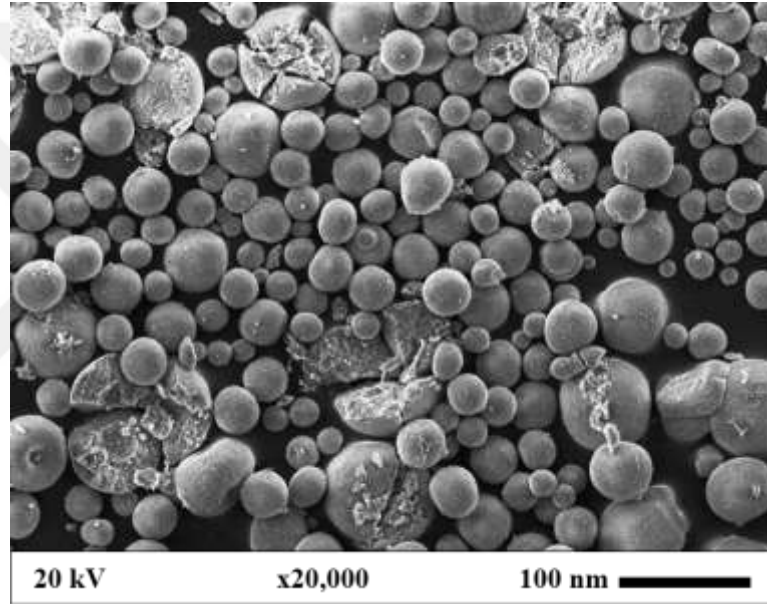
2.8. İstatistiksel Analizler

Gerçekleştirilen doz-etki testlerinin tamamı bu çalışmada bağımsız olarak 3 ayrı zamanda tekrarlanmış ve bütün veriler ortalama standart sapma olarak belirtilmiştir. SPSS 15.0 paket programıyla istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Kontrol örneklerinin ortalamaları, hedef gen ekspresyon seviyeleri ile kıyaslanarak kat değişim olarak belirtilmiştir. Farklı deney şartları altında *β-actin* gen ekspresyonları ve hedef genlerindeki önemli farklılıkları tespit etmek maksadıyla eşit değişkenler için veri değerlerine ilk olarak Levene testi, devamında ise ANOVA testi yapılmıştır. Önemli farklılıkları belirlemek için çoklu gruplar arasında Tukey testi uygulanmıştır. Probit analiz metoduyla LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

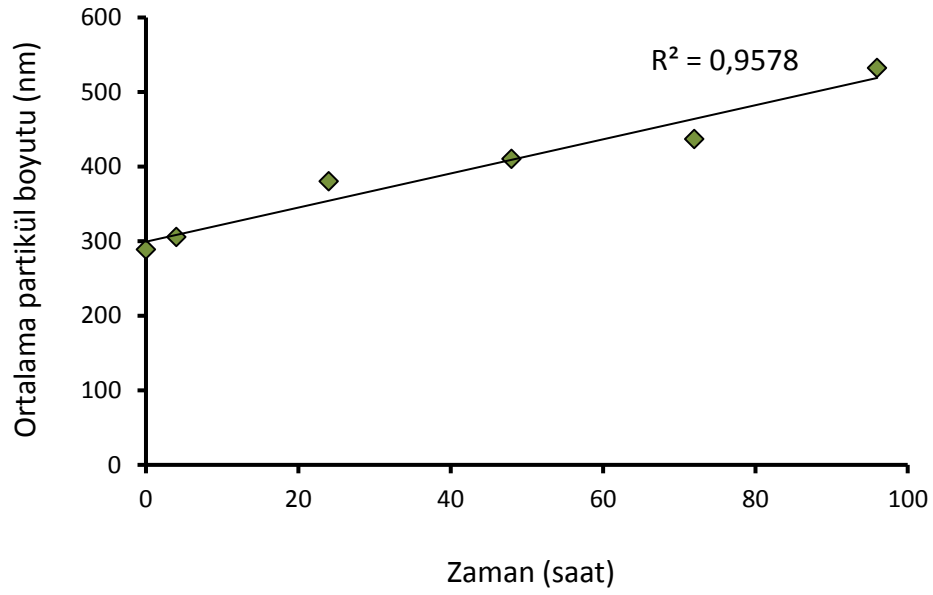
3.1. Al₂O₃ Nanopartiküller

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak Al₂O₃ nanopartiküllerin parçacık boyutlarının, fiziksel görünümünün ve kümelenme durumlarının saptanması amacıyla yapılan analiz sonucunda Al₂O₃ nanopartiküllerin farklı boyutlarda ve küresel bir şekle sahip oldukları, parça boyutlarının ise 10-80 nm arasında olduğu ve düşük seviyede kümelenme yöneliminde oldukları belirlenmiştir (Şekil 9).

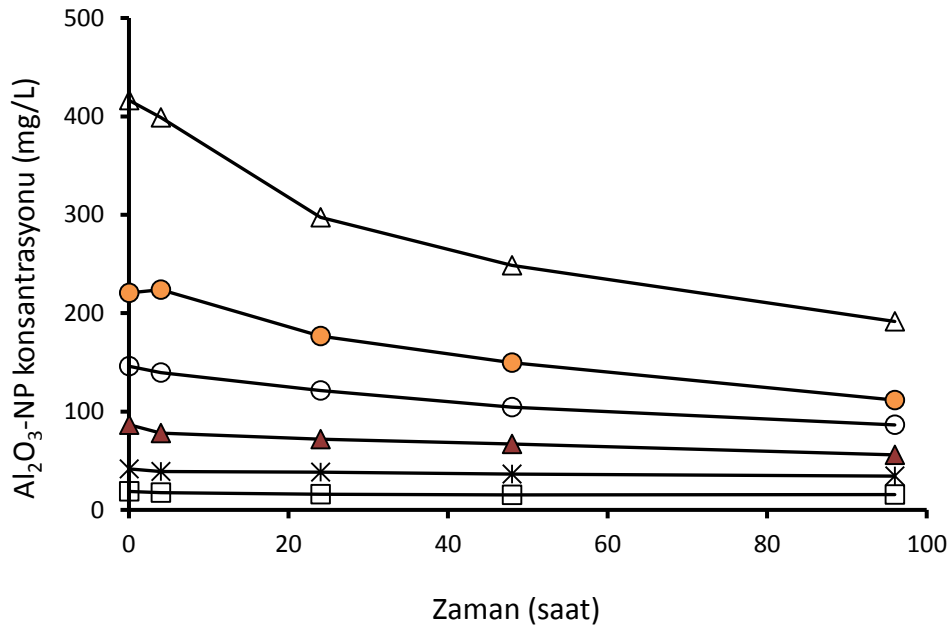


Şekil 9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Al₂O₃ nanopartiküllerinin elde edilen görüntüsü. 100 nm’lik ölçek çubuğu kullanılmıştır.

Al₂O₃ nanopartikülünün kümelenme ve tabana çökme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan nanopartikül izleme analizi ve ICP-OES analizleri sonucunda, su sütununda başlangıçta ortalama 289 nm olan parçacık boyunun 96 saat süren testin sonunda düşük düzeyde bir kümelenme nedeniyle 532 nm’ye kadar yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 10). Bunun yanında, su sütunundaki Al₂O₃ nanopartikül konsantrasyonunun ICP-OES analizi sonucunda, zamanla sedimantasyon ve kümelenmeye bağlı olarak miktarında % 36 oranında bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).



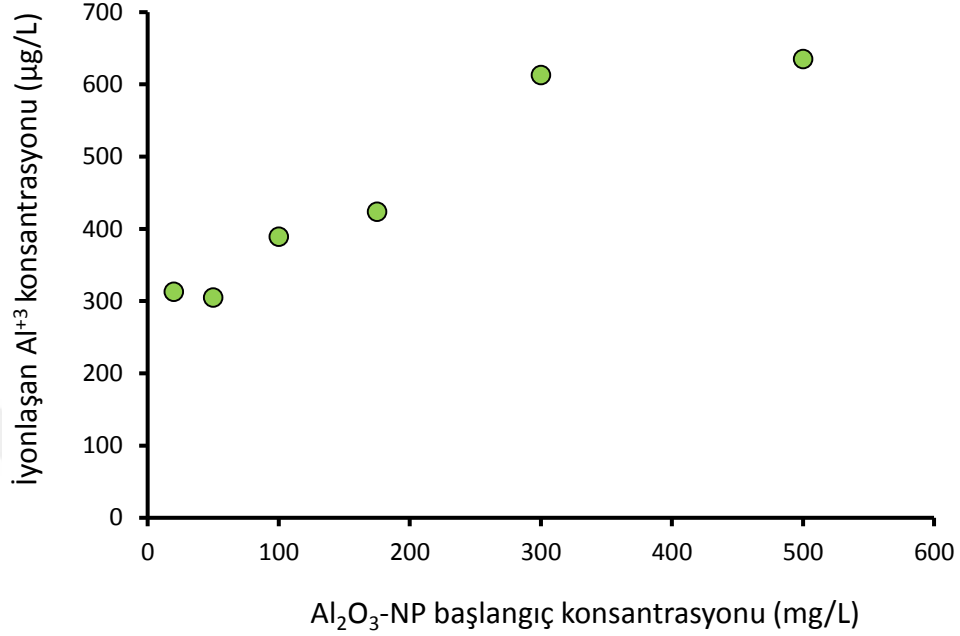
Şekil 10. 96 saatlik deney süresince su sütunundaki Al_2O_3 nanopartiküllerinin (1 mg/L) boyutsal dağılımı.



Şekil 11. Sulu fazda Al_2O_3 nanopartikülünün 96 saatlik maruziyet süresi boyunca test sistemi içerisindeki ölçülen konsantrasyonları (Boş kare: 20 mg/L, yıldız: 50 mg/L, kırmızı üçgen: 100 mg/L, boş daire: 175 mg/L, turuncu daire: 300 mg/L, boş üçgen: 500 mg/L).

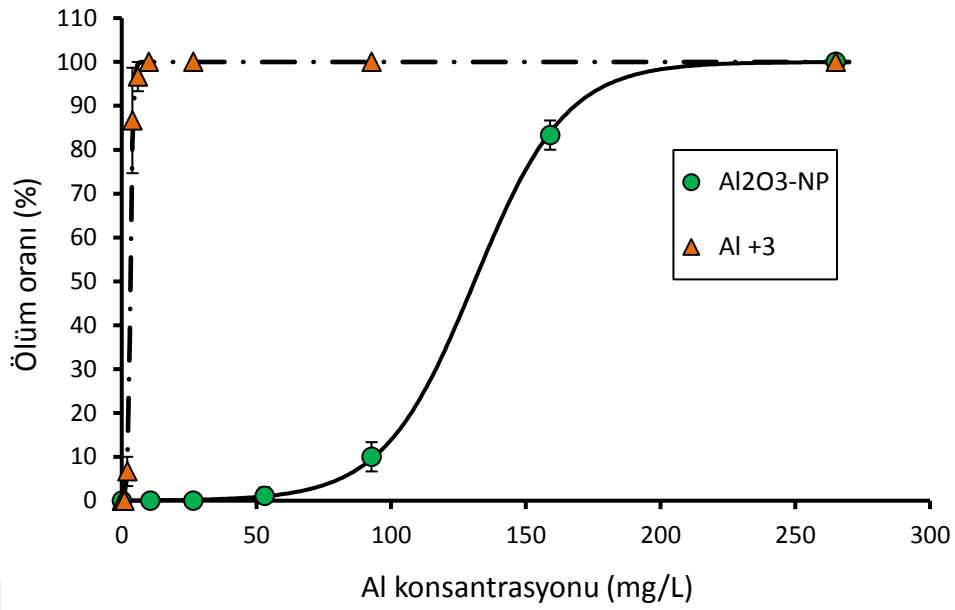
Al_2O_3 nanopartikülün su içerisindeki çözünürlüğünü (iyonlaşma) belirlemek amacıyla test ünitelerine 20, 50, 100, 175, 300 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda nanopartikül ilave edilmiş ve iyonlaşma miktarları 96 saatlik test süresi sonunda ICP-OES yardımıyla ölçülmüştür. Düşük nanopartikül konsantrasyonlarında önemli düzeyde

bir Al^{+3} salınımı görülmemesine rağmen, 300 ve 600 mg/L konsantrasyonlarda önemli düzeyde Al^{+3} salınımının meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Al_2O_3 nanopartikülünün ICP-OES analizi yardımıyla 96 saatlik test süresi sonunda ölçülen su içerisindeki Al^{+3} salınım düzeyleri.

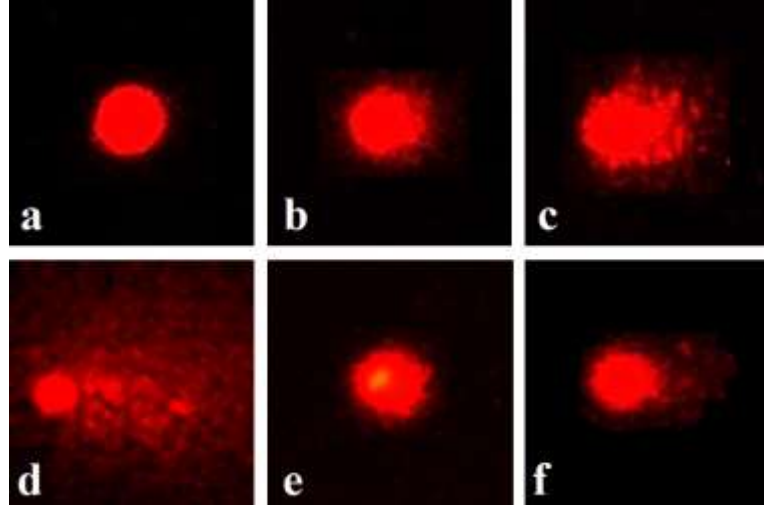
Bu çalışmada Al metalinin iyon (doğal) halinin toksisite açısından farklılık gösterip göstermediğini saptamak amacıyla, $AlCl_3$ ile Al_2O_3 nanopartiküllerinin zebra balığı larvaları içerisindeki zehirlilik seviyelerini karşılaştırılmıştır. Bu nedenle, 96 saat süre ile $AlCl_3$ ve Al_2O_3 nanopartikülünün 3 farklı zamanda yapılmış olan konsantrasyon-etki deneylerinde LC_{50} değerleri sırası ile $3,26 \pm 0,38$ mg/L (GA: 2,54 - 4,03) ve $130,19 \pm 5,59$ mg/L (GA: 118,33 - 142,97) olarak hesaplanmıştır (Şekil 13).



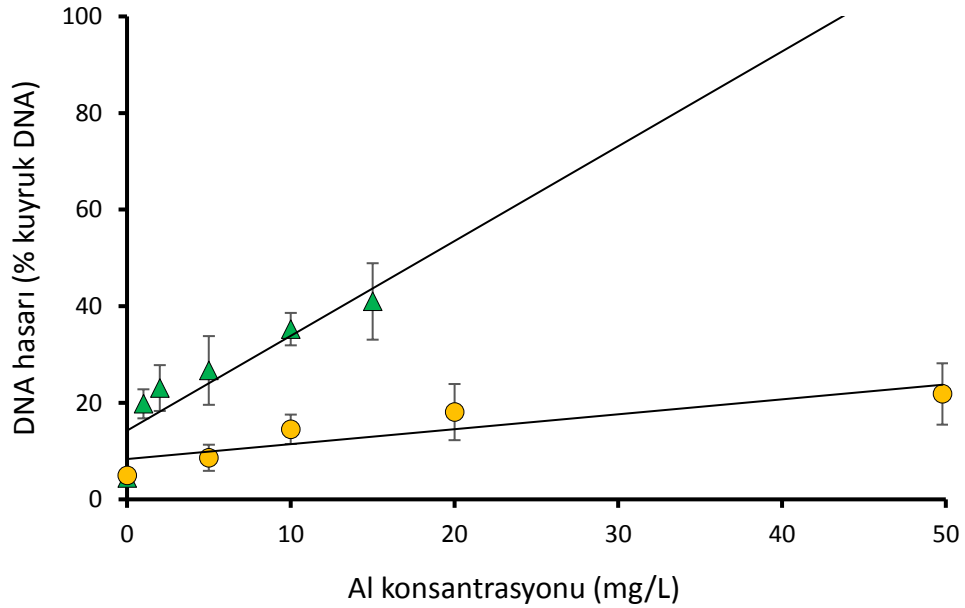
Şekil 13. Toksikolojik testlerde AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikülüne 96 saat süre ile maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları.

Zebra balığı larvalarının AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikülüne maruz bırakılan kan hücrelerinde meydana gelebilecek DNA hasarlarının tespiti için “Comet Assay” tekniği kullanılmıştır. Subletal konsantrasyonlarda AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikülüne maruz kalan larvaların DNA’larında maruz bırakıldıkları konsantrasyona bağlı olarak önemli düzeyde hasar saptanmıştır. Diğer taraftan, H_2O_2 uygulanan pozitif kontrol grubunda oluşan hasarın AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikül uygulanan larvalarda oluşan hasardan çok daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 14).

En yüksek subletal konsantrasyonlarda AlCl_3 (15 mg/L) ve Al_2O_3 (50 mg/L) nanopartikülüne maruz bırakılan larvaların ortalama DNA hasarları Comet analizi sonucunda, sırasıyla kontrol grubuna oranla % 40,9 ve % 21,8 olarak hesaplanmıştır ($P < 0,05$). En düşük konsantrasyonlarda AlCl_3 (1 mg/L) ve Al_2O_3 (5 mg/L) nanopartikülüne maruz bırakılan larvaların ortalama DNA hasarları Comet analizi sonucunda ise sırasıyla kontrol grubuna oranla % 19,8 ve % 8,6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 15).

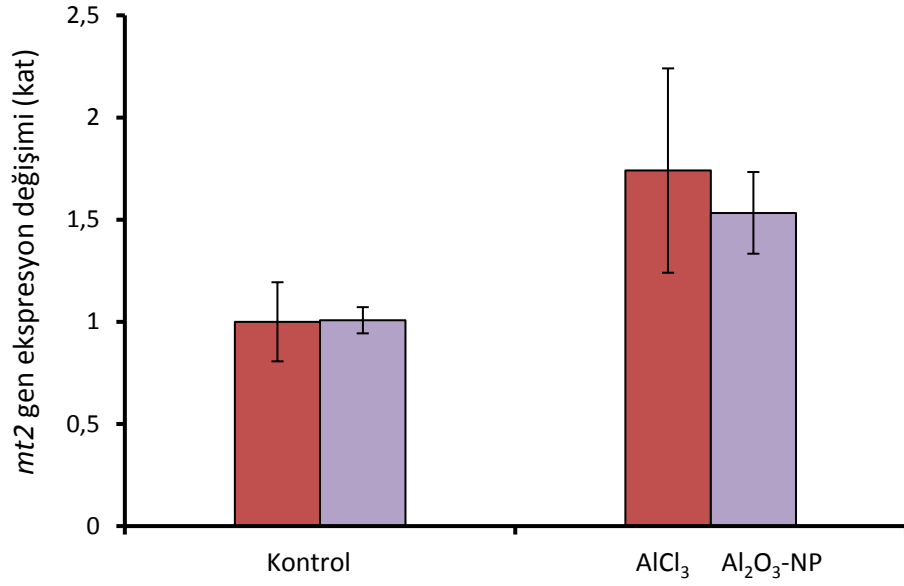


Şekil 14. Comet oluşumu, AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikülüne uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücreleri görünümü. (a) Kontrol, (b) 0,1 mg/L AlCl_3 , (c) 3 mg/L AlCl_3 (d) H_2O_2 ile pozitif kontrol, (e) 0,2 mg/L Al_2O_3 -NP, (f) 6 mg/L Al_2O_3 -NP.



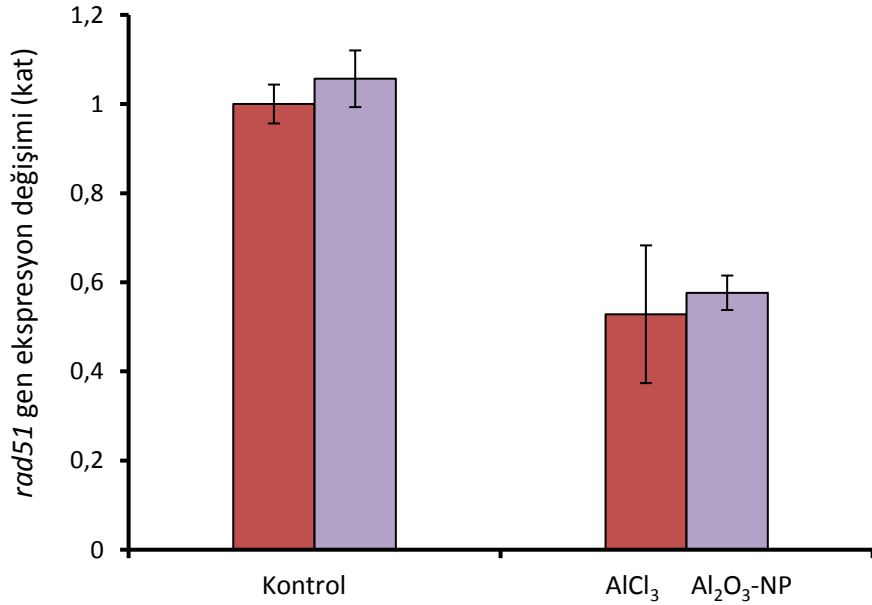
Şekil 15. 96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda AlCl_3 (üçgen) ve Al_2O_3 (daire) nanopartikülüne maruz kalan larvalardaki DNA hasarları, $P < 0.05$.

Gen ekspresyon değişimlerinin araştırıldığı deneylerde, 96 saat süreyle AlCl_3 ile Al_2O_3 nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarında *mt2* geni için sırasıyla kontrol grubuna oranla 1,7 kat ve 1,5 kat artış meydana gelmiştir. *mt2* gen ekspresyon değişimleri önemli düzeyde olmamakla birlikte, AlCl_3 'ün sebep olduğu gen ekspresyon artışının Al_2O_3 nanopartikülüne göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 16).



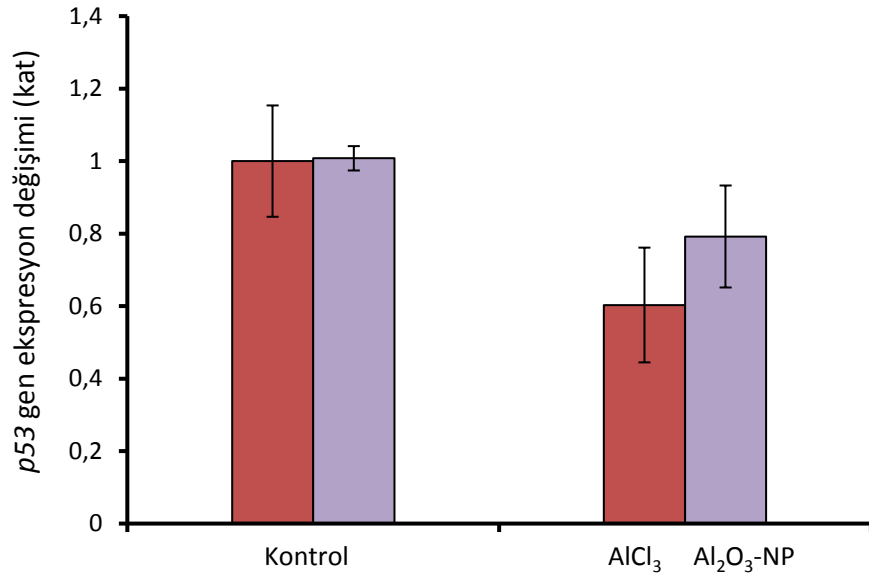
Şekil 16. Zebra balığı larvalarının AlCl₃ ve Al₂O₃ nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *mt2* gen ekspresyon değişimleri.

Kontrol grubuna oranla *rad51* geni ekspresyonunda AlCl₃ ve Al₂O₃ nanopartikül için yaklaşık olarak 2 kat azalma meydana gelmiştir. Ayrıca Al₂O₃ nanopartiküllerin neden olduğu gen ekspresyon artışının AlCl₃'e oranla *rad51* geni için önemli bir değişiklik göstermediği saptanmıştır (Şekil 17).



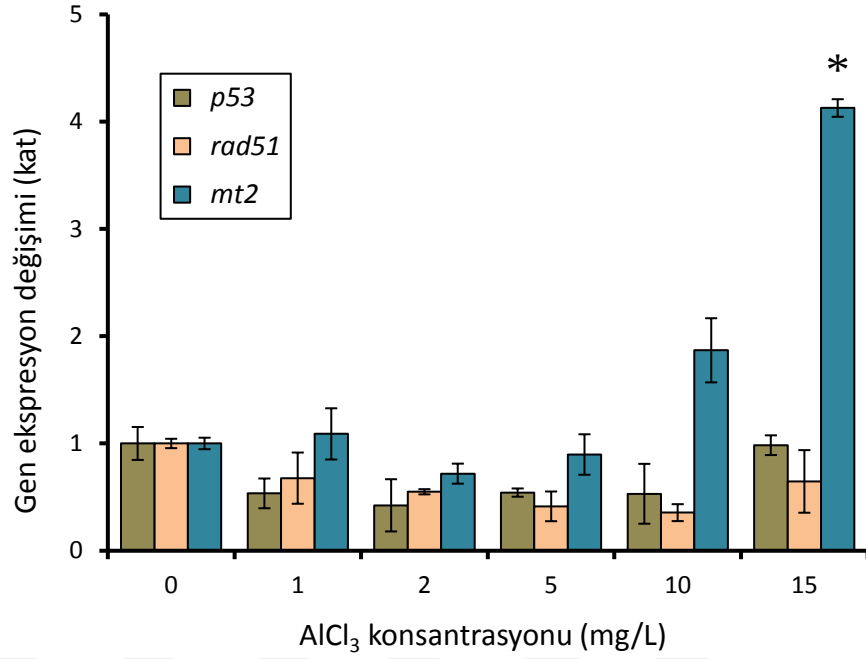
Şekil 17. Zebra balığı larvalarının AlCl₃ ve Al₂O₃ nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *rad51* gen ekspresyon değişimleri.

p53 gen ekspresyonundaysa kontrol grubuna oranla AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikül için düşük düzeyde bir azalma olmasına rağmen önemli bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca Al_2O_3 nanopartiküllerin neden olduğu gen ekspresyonundaki artışın AlCl_3 'e oranla *p53* geni için yaklaşık olarak 1,3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 18).



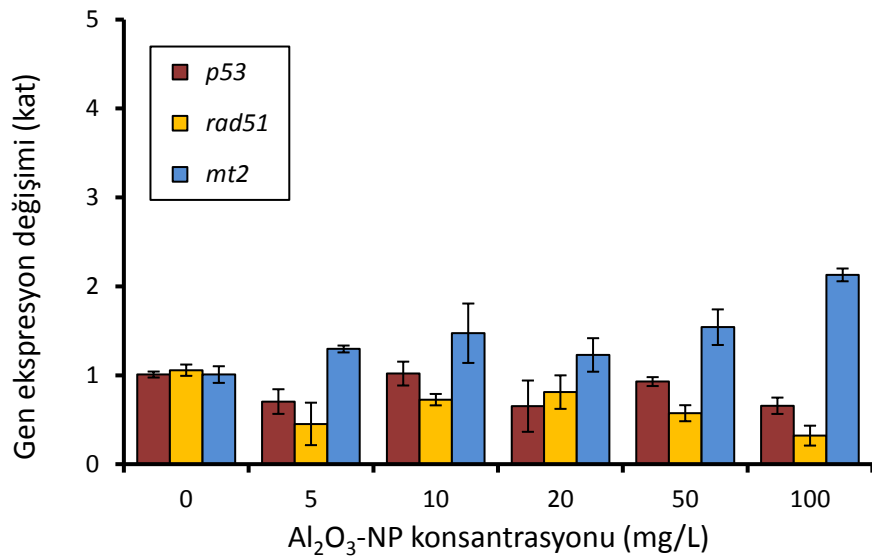
Şekil 18. Zebra balığı larvalarının AlCl_3 ve Al_2O_3 nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *p53* gen ekspresyon değişimleri.

AlCl_3 'ün farklı konsantrasyonlarda *mt2*, *p53* ve *rad51* genlerindeki ekspresyon değişimleri bakımından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda *mt2* genindeki ekspresyon değişiminde, 15 mg/L konsantrasyonda yaklaşık olarak 4 kat artışı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, *p53* ve *rad51* gen ekspresyonlarında istatistiksel açıdan önemli bir değişikliğin oluşmadığı saptanmıştır (Şekil 19).



Şekil 19. AlCl₃'e maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki toksikolojik testlerde, 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda, farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değışimleri (P < 0,05).

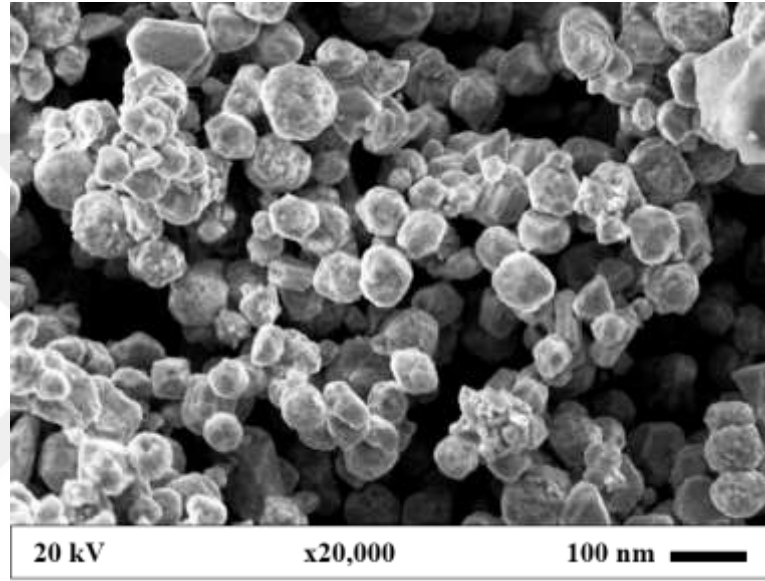
Farklı konsantrasyonlarda Al₂O₃ nanopartiküllerin *mt2*, *p53* ve *rad51* genlerindeki ekspresyon değışimleri bakımından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda her üç gen ekspresyon değışimlerinde de istatistiksel olarak önemli düzeyde bir değışiklik görülmemiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Al₂O₃ nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarında, toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda, farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değışimleri.

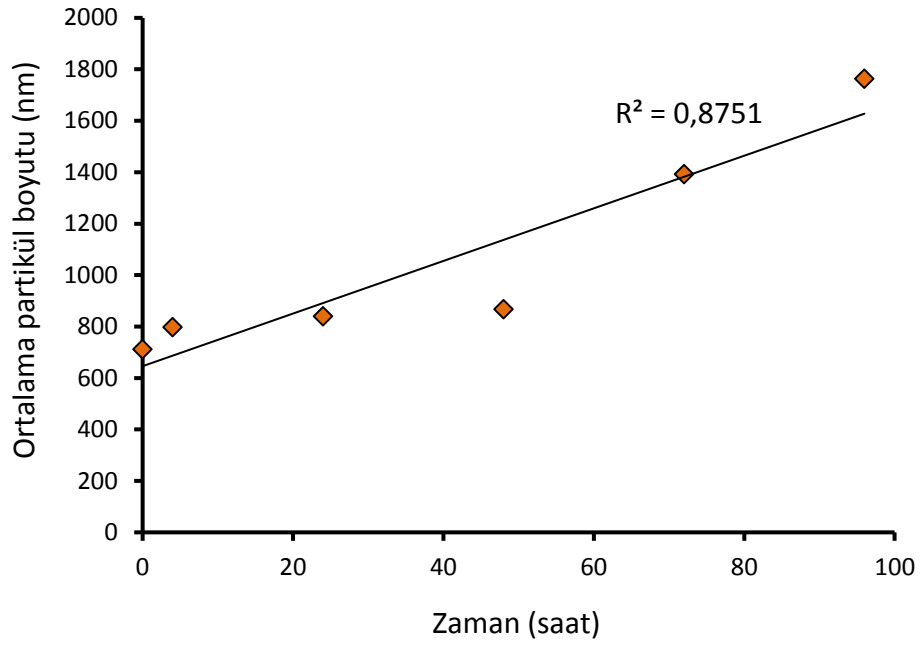
3.2. Ni Nanopartiküller

Ni nanopartiküllerin kümelenme durumlarının, parçacık boyutlarının ve fiziksel görünümünün tespiti amacıyla yapılan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi sonucunda bu nanopartiküllerin düzgün olmayan küresel bir şekle sahip oldukları, 15-100 nm arasında parçacık boyutlarının olduğu ve kümelenme eğiliminin yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21).

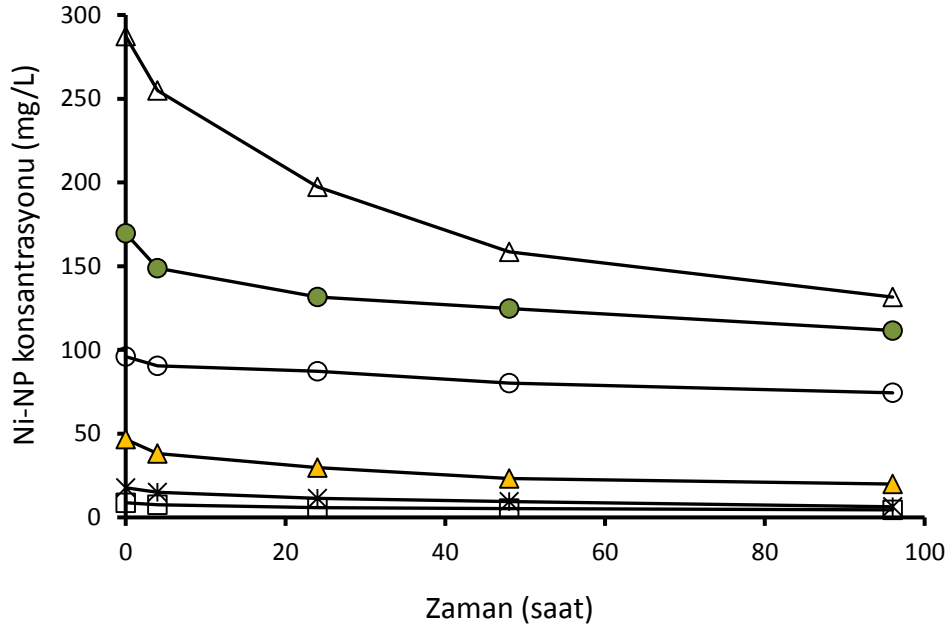


Şekil 21. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Ni nanopartiküllerinin elde edilen görüntüsü. 100 nm’lik ölçek çubuğu kullanılmıştır.

Ni nanopartiküllerin su içerisindeki fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi maksadıyla ICP-OES analizi ve nanopartikül izleme analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda, başlangıçta su sütununda ortalama 711 nm olan partikül boyutunun kümelenme nedeniyle 96 saatlik test süresi sonunda 1763 nm’ye kadar yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 22). Bunun yanında, su sütunundaki Ni nanopartikül konsantrasyonunun ICP-OES analizi sonucunda da zamana bağlı olarak sedimantasyon ve kümelenme nedeniyle miktarında % 47 oranında bir düşüş meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 23).



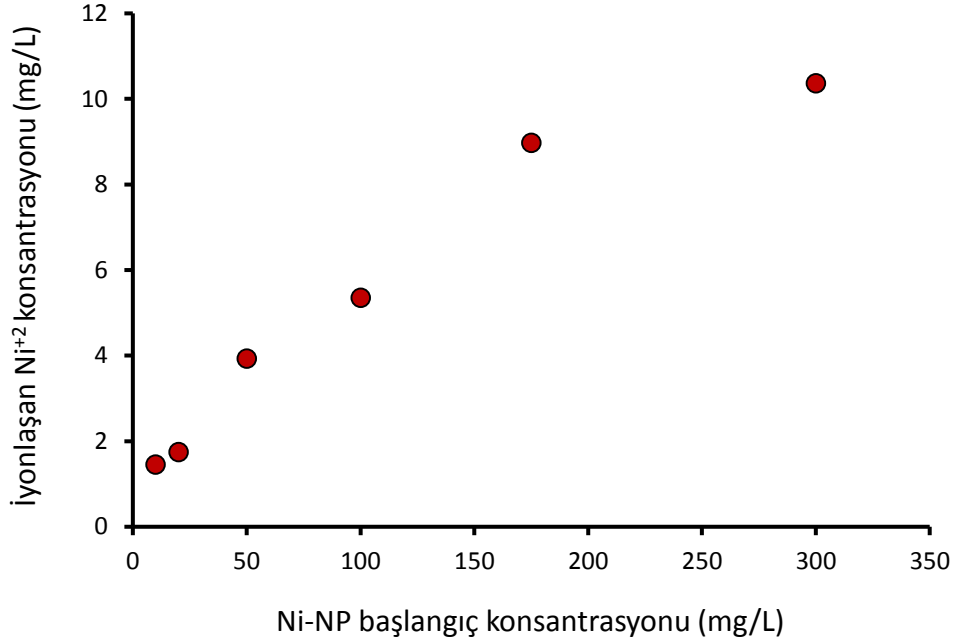
Şekil 22. 96 saatlik deney süresince su sütunundaki Ni nanopartiküllerinin (1 mg/L) boyutsal dağılımı.



Şekil 23. Ni nanopartiküllerin 96 saatlik maruz bırakma süresince sulu fazda nanopartikül test sistemi içerisinde ölçülen konsantrasyonları (Boş kare: 20 mg/L, yıldız: 50 mg/L, sarı üçgen: 100 mg/L, boş daire: 175 mg/L, yeşil daire: 300 mg/L, boş üçgen: 500 mg/L).

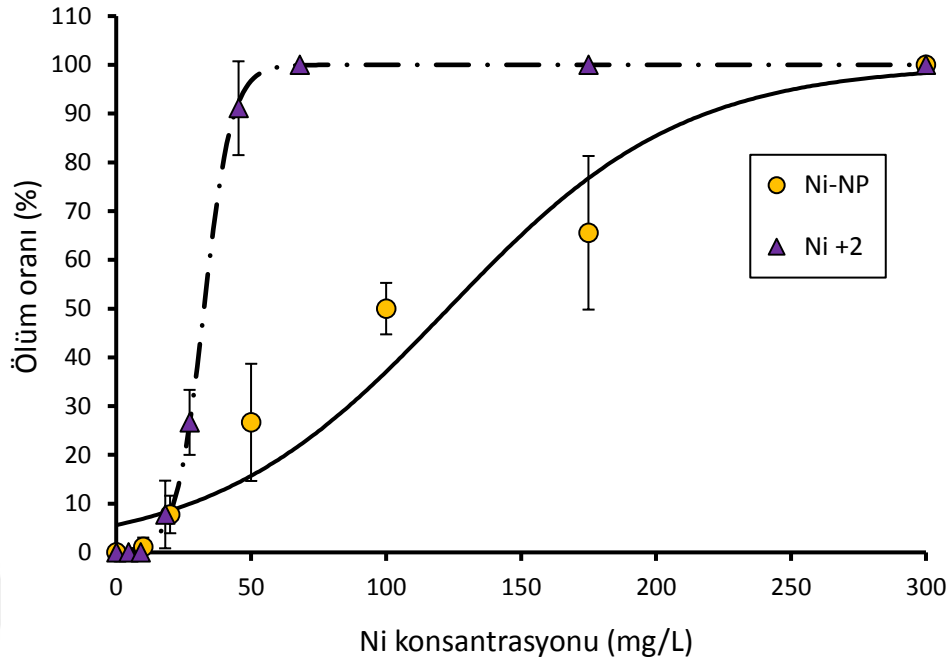
Ni nanopartikülün su içerisindeki çözünürlüğünü (iyonlaşma) belirlemek amacıyla test ünitelerine 20, 50, 100, 175, 300 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda nanopartikül ilave edilmiş ve iyonlaşma miktarları 96 saatlik test süresi sonunda ICP-OES yardımıyla

ölçülmüştür. Düşük nanopartikül konsantrasyonlarında önemli düzeyde bir Ni^{+2} salınımı görülmemesine rağmen, 50 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda önemli düzeyde iyon salınımının meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Ni nanopartikülünün ICP-OES analizi yardımıyla ölçülen 96 saatlik test süresi sonunda su içerisindeki Ni^{+2} salınım düzeyleri.

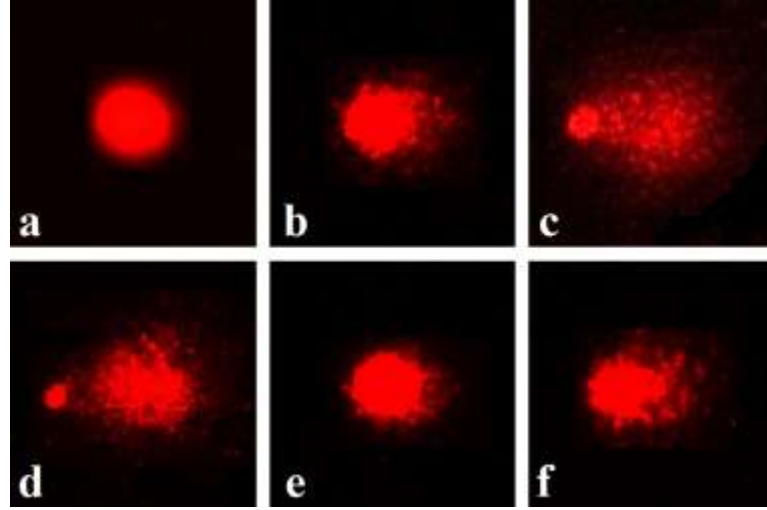
Toksisite bakımından Ni metalinin nanopartikül haliyle iyon(doğal) halinin farklılık gösterip göstermediğini tespit etmek amacıyla, bu çalışmada zebra balığı larvalarındaki NiCl_2 ile Ni nanopartikülünün zehirlilik seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, NiCl_2 ve Ni nanopartikülünün 96 saat süreyle 3 farklı zaman aralığında yapılan LC_{50} değerleri konsantrasyon-etki deneyleri sonucunda sırasıyla $32,55 \pm 2,20$ mg/L (GA: 29,53 - 36,22) ve $122,22 \pm 6,33$ mg/L (GA: 94,59 - 165,09) olarak hesaplanmıştır (Şekil 25).



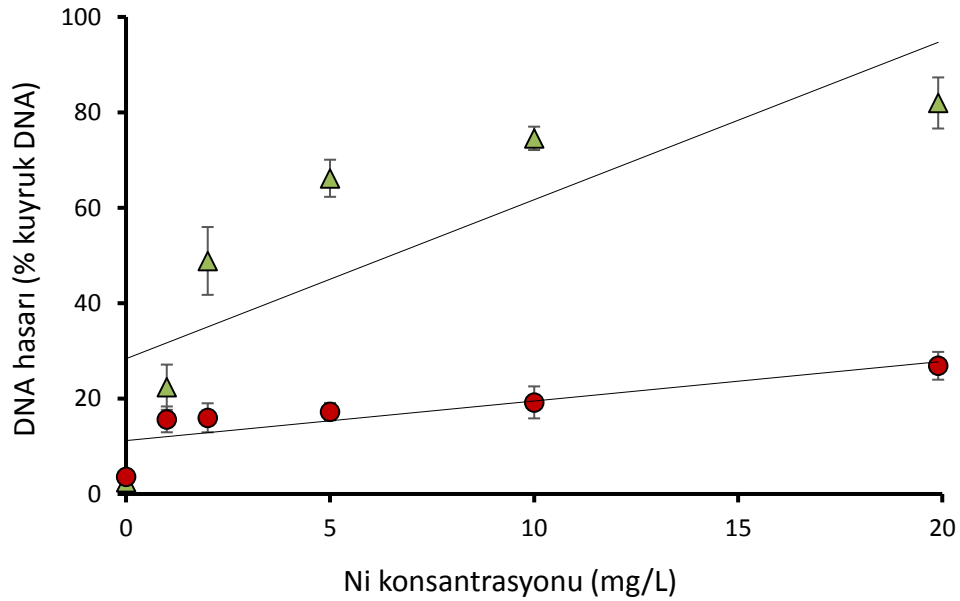
Şekil 25. Toksikolojik testlerde NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne 96 saat süre ile maruz bırakılan zebra balığı larvalarında görülen ölüm oranları.

Zebra balığı larvalarının NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan kan hücrelerinde oluşabilecek DNA hasarlarını tespit etmek amacıyla yapılan Comet analizi sonucunda, subletal konsantrasyonlarda NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne maruz kalan larvaların DNA'larında maruz bırakılan konsantrasyonuna bağlı olarak önemli düzeylerde hasar tespit edilmiştir. Diğer taraftan, H₂O₂ uygulanan pozitif kontrol grubunda oluşan hasarın NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne uygulanan larvalarda meydana gelen hasardan daha yüksek seviyede olduğu saptanmıştır (Şekil 26).

En yüksek subletal konsantrasyonlarda NiCl₂ (20 mg/L) ve Ni nanopartikülüne (20 mg/L) maruz bırakılan larvaların ortalama DNA hasarları Comet analizi sonucunda, sırasıyla kontrol grubuna oranla % 81,9 ve % 26,9 olarak hesaplanmıştır ($P < 0,05$). En düşük konsantrasyonlarda NiCl₂ (1 mg/L) ve Ni nanopartikülüne (1 mg/L) maruz bırakılan larvaların ortalama DNA hasarları Comet analizi sonucunda ise sırasıyla kontrol grubuna oranla % 22,4 ve % 15,6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 27).

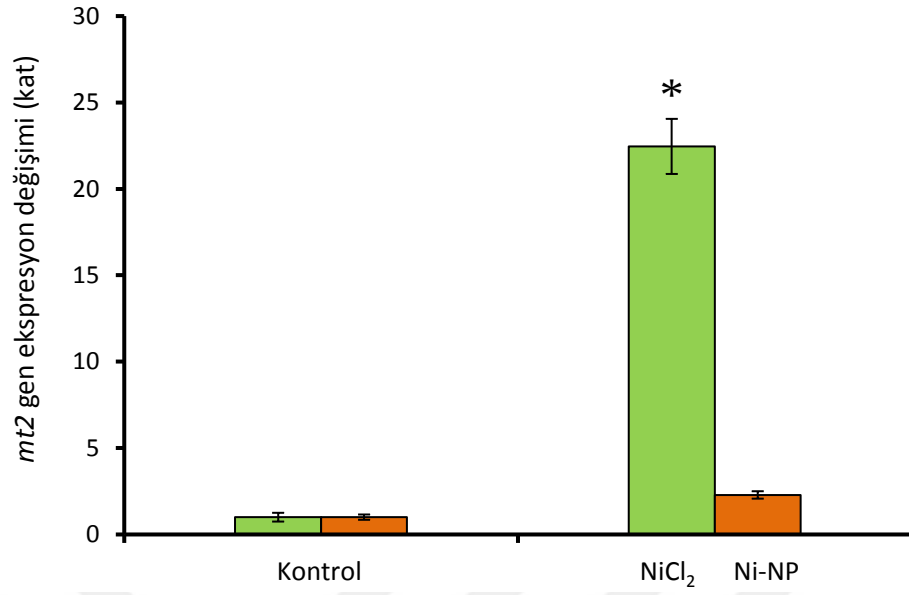


Şekil 26. Comet oluşumu, NiCl_2 ve Ni nanopartikülüne uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücreleri görünümü. (a) Kontrol, (b) 1 mg/L NiCl_2 , (c) 20 mg/L NiCl_2 (d) H_2O_2 ile pozitif kontrol, (e) 1 mg/L Ni-NP, (f) 20 mg/L Ni-NP.



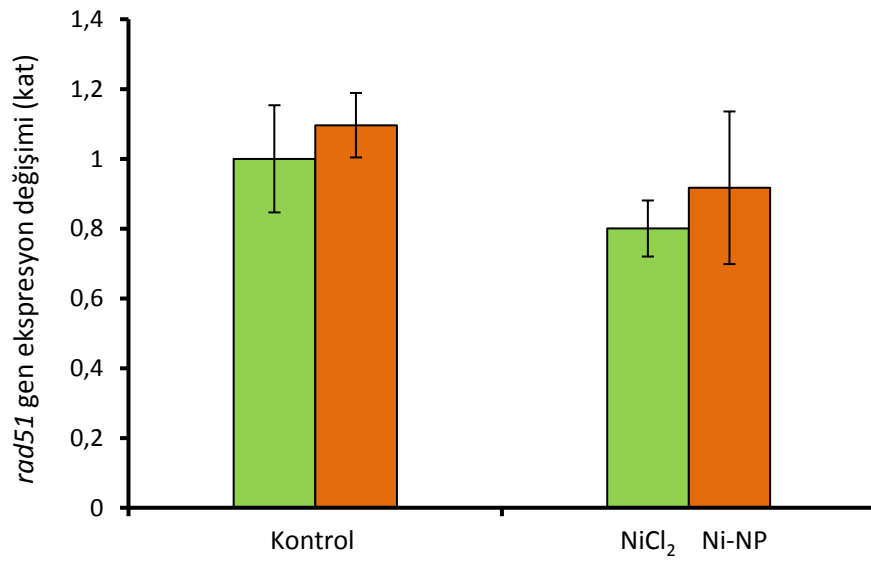
Şekil 27. 96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda NiCl_2 (üçgen) ve Ni (daire) nanopartikülüne maruz kalan larvalardaki DNA hasarları, $P < 0.05$.

Gen ekspresyon değişimleri açısından NiCl_2 ile Ni nanopartikülü karşılaştırıldığı deneme sonuçlarında, *mt2* geni için her iki maddeye de 96 saat süre ile maruz bırakılan zebra balığı larvalarında sırasıyla kontrol grubuna oranla 22 kat ve 2 kat artış olmuştur. Ayrıca *mt2* geni için NiCl_2 'ün neden olduğu gen ekspresyonundaki artışın Ni nanopartikülüne oranla neredeyse 11 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 28).



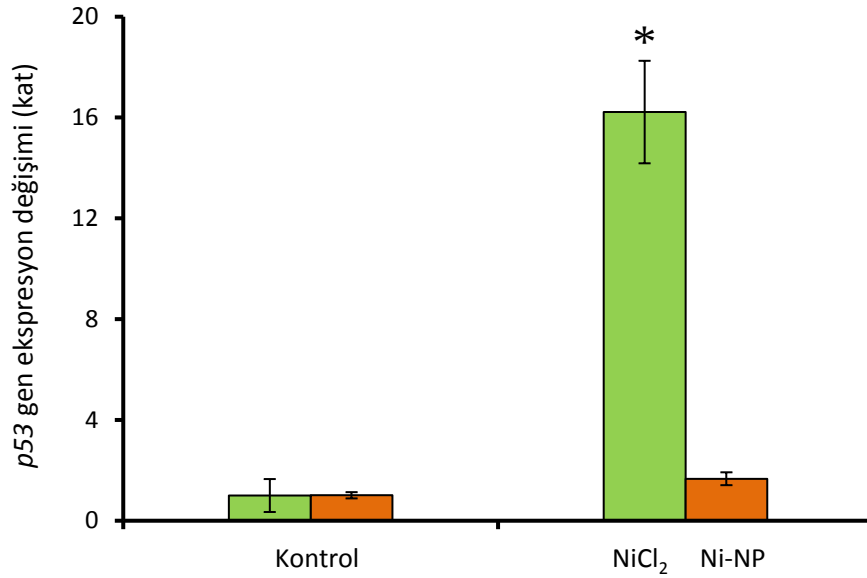
Şekil 28. Zebra balığı larvalarının NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *mt2* gen ekspresyon değişimleri ($P < 0,05$).

Kontrol grubuna oranla *rad51* gen ekspresyonunda düşük düzeyde bir azalma olmasına rağmen, istatistiksel olarak önemli seviyede bir değişim gözlemlenmemiştir. Ayrıca, Ni nanopartiküllerin sebep olduğu gen ekspresyon değişimiyle NiCl₂'nin sebep olduğu gen ekspresyon değişimi arasında da önemli seviyede bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 29).



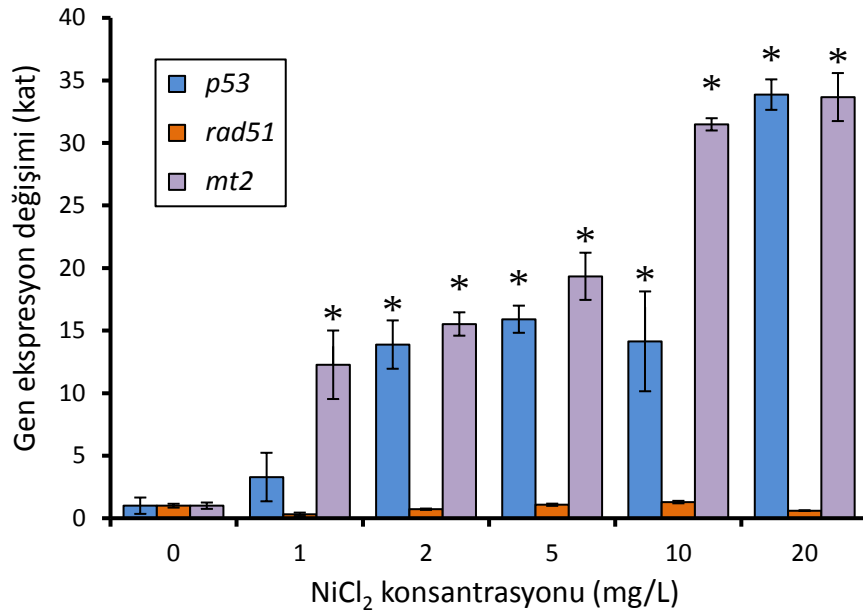
Şekil 29. Zebra balığı larvalarının NiCl₂ ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *rad51* gen ekspresyon değişimleri.

p53 geni ekspresyonunda ise zebra balığı larvalarında 96 saat süreyle NiCl_2 ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan kontrol grubuna oranla 16 kat ve 1,7 kat artış olmuştur. Ayrıca NiCl_2 'ün sebep olduğu gen ekspresyon artışının *p53* geni için Ni nanopartikülüne oranla neredeyse 9,5 kat fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 30).



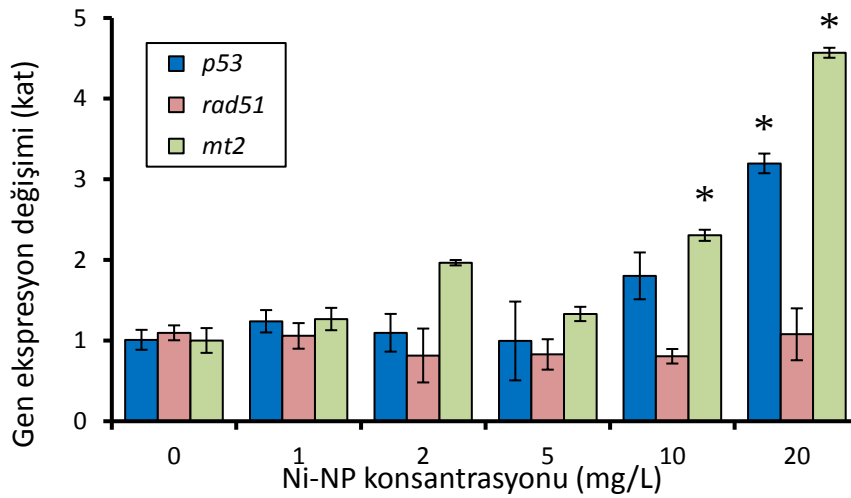
Şekil 30. Zebra balığı larvalarının NiCl_2 ve Ni nanopartikülüne maruz bırakılan toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda görülen *p53* gen ekspresyon değişimleri. ($P < 0,05$).

Farklı konsantrasyonlarda NiCl_2 'ün *p53*, *rad51* ve *mt2* genlerindeki ekspresyon değişimleri bakımından kıyaslandığında araştırma neticesinde, *p53* ve *mt2* genlerindeki ekspresyon değişimlerinde konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel anlamda önemli derecede artışlar görülmüştür. Ekspresyon artışlarının *p53* geninde 2 mg/L ve üzeri *mt2* geninde ise 1 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda önemli düzeyde oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, gen ekspresyonlarında *rad51* geninde önemli bir değişikliğin oluşmadığı görülmüştür (Şekil 31).



Şekil 31. NiCl₂'e maruz kalan zebra balığı larvalarının toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).

Farklı konsantrasyonlarda Ni nanopartiküllerin *p53*, *rad51* ve *mt2* genlerindeki ekspresyon değişimleri bakımından kıyaslandığında araştırma neticesinde *mt2* ve *p53* genlerindeki ekspresyon değişimlerinde, kontrol grubuna oranla fazla konsantrasyonlarda istatistiksel anlamda önemli derecede artış olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, gen ekspresyonlarındaki *rad51* geni kontrol grubuna oranla önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 32).



Şekil 32. Ni nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarının toksikolojik testlerde 96 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda farklı üç gende meydana gelen ekspresyon değişimleri (P < 0,05).

Özellikle metalik nanopartiküller su içerisinde kısmen iyonlaşmaları nedeniyle sucul organizmalarda toksik etkilere ve bunun neticesinde de ölümlere sebep olabilmektedir. Bu araştırmada kullanılan Al_2O_3 ve Ni nanopartiküller, zebra balığı larvalarında; besin kesesinde şişme ya da büzülme, renkte kararırma, notokord eğriliğı, perikardiyal bölgede kan toplanması (hiperemiya), yüzme kesesinde deformasyon, kuyrukta erime ve karın bölgesinde nanopartikül birikimi gibi etkiler oluşturmakta ve ileri aşamalarda da ölümlerine neden olabilmektedir.



4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Nanopartiküller bilinen maddelere göre daha çok kararsız niteliklere sahiptir. Bu özellikler konusunda yeterince bilgiye sahip olunmaması toksisite testlerinde beklenmeyen sonuçlara yol açmaktadır. Bu sebeple, günümüzde yapılan toksikolojik test yöntemleri nanopartiküllerin karakteristik özelliklerini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaksızın, nanopartikül toksisite belirlenme araştırmalarında kullanıma elverişli olmamaktadır (Schulze vd., 2008). Nano boyutta maddelerin doğal haldeki maddelerden oldukça farklı nitelikler göstermesi, toksisite denemelerinde kullanılmakta olan elemanlar ve malzemelerle etkileşim göstermelerine sebep olmaktadır, bundan dolayı nanopartikül toksisite tespit araştırmalarında uygun bir kontrol sistemi oluşturulmalı ve farklı maruz bırakma yöntemleri kullanılmalıdır.

Yapılan nanotoksikolojik çalışmalarda nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerine göre zehirlilik düzeylerinin tespiti için bir deney düzeneğinin kurulmasını kısıtlamaktadır. Nano maddelerin toksiklik seviyelerini saptamak amacıyla kullanılmakta olan deney düzenekleri, nanopartiküllerin spesifik niteliklerinin etkilemeyeceği bir tarzda tasarlanmalıdır (Nel vd., 2006). Öte yandan, son yıllarda yapılan nanopartikül risklerini belirleme araştırmalarında, kullanılmakta olan deney düzeneklerinin standart olmaması nedeniyle, bulunan çıktılar açısından çeşitli araştırma sonuçlarında önemli derecede farklı sonuçlar saptandığı görülmektedir (Lilienblum vd., 2008). Bu çalışmamızda, farklı laboratuarlarda yapılan çalışma sonuçları arasındaki tekrarlanabilirlik problemini ortadan kaldıracak ve sucul ortamda nanopartiküller için yapılması düşünülen zehirlilik testlerini standartlaştıracak bir nanotoksisite deney prosedürü yürütülmüştür. Doğrulama deneyleri ve yaptığımız deneyler sonucunda, bu deney düzeneğinin genel bir zehirlilik test prosedür standardı sağladığı ve nanopartiküllerin spesifik özelliklerinden etkilenmediği saptanmıştır.

Nanopartiküller, günümüzde yaygın bir şekilde ve pek çok alanda kullanılmakla birlikte, bu maddelerin standardize test protokolleri ve risk değerlendirmesi çalışmalarında uluslararası ve ulusal anlaşmalar veya iş birliği gerekli seviyede mevcut değildir. Nano maddelerin sayıları, ağırlıkları, yüzeylerinin alanı ve başka ölçümlerine nispeten konsantrasyon terimi hala standart hale getirilememiştir. Bundan dolayı, nano

maddelerin karşılaştırılması, bunun yanında veri değerlendirmelerinin nesnelliği son yıllarda da hala problem oluşturan bir unsurdur (Scenihr, 2007). Yapmış olduğumuz araştırmada, dizayn edilen ve türdeş bir karışma ortamı oluşturan nanopartikül deney düzenekleri (Boran vd., 2012), aynı zamanda nanopartiküllerin spesifik özelliklerinden kaynaklanan test problemlerine çözüm sağlayacak ve nanopartiküllerin risklerinin belirlenmesi amacıyla da bir standardize sistem oluşturacaktır.

Tüm nanopartiküller çok küçük boyutlara ($<0.1 \mu\text{m}$) sahip olduğu için kolayca çevre kirliliğine yol açabilir aynı zamanda diğer organizmalar ve insanlar için risk oluşturabilirler (Griffitt vd., 2007; Lanone vd., 2009). Bundan dolayı, nanopartiküller içerisinde hangi partiküllerin çevreye en fazla zarar verdiğinin belirlenmesi ve olası toksikolojik etkilerinin tespit edilmesi giderek artan bir öneme sahiptir. Bu çalışmamızda, Al_2O_3 ve Ni nanopartiküllerinin zebra balığı larvalarındaki etkileri incelenmiş ve biyomarkır genler (*p53*, *rad51* ve *mt2*) kullanılarak toksisite mekanizmasındaki işleyişin daha iyi anlaşılabilmesi için iyon haldeki Al ve Ni' in toksik etkileri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, bu maddelerden kaynaklı DNA zincir kırıklarının olup olmadığı "Comet Assay" tekniği kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır.

Kullanılan nanopartiküllerin toksikolojik testlerde su içerisinde dağılması sebebiyle, yüzey gerilimi ve kümelenme durumu gibi fizikokimyasal özelliklerinin de değişikliğe uğradığı bilinmektedir (Maynard, 2002; Powers vd., 2006; Vielkind vd., 2013). Bundan dolayı, nanotoksikoloji araştırmalarında ve çevresel uygulamalarda doğru şekilde karakterizasyon için nanopartikül dağılımı oldukça önemlidir. Vielkind vd. (2013) Sucul ortamdaki ZnO nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini (hidrodinamik boyut, kümelenme derecesi ve yüzey gerilimi) tespit etmeye çalışmışlar ve çalışmanın sonunda partikül boyutu azaldıkça partikül yüzey alanının çarpıcı şekilde arttığını belirlemişlerdir. Benzer bir şekilde, yaptığımız araştırmalarda da su sütunundaki nanopartikül konsantrasyonlarında 96 saatlik deney süresi boyunca azalma görülürken kümelenme miktarı ve partikül çapında artış meydana geldiği saptanmıştır.

Sanayide yaygın şekilde kullanılan nanopartiküller, çevresel etkileri bakımından belirsizliklere sebep olmaktadır. Özellikle su içerisinde metal nanopartiküllerin kısmen çözünebilme yeteneğine sahip olmaları sebebiyle, metallerden üretilmiş kirlетici özelliği

olan nanopartiküllerin biyomarkır gen ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirilerek balıklarda toksik etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır (Klaine vd., 2008). Yapmış olduğumuz bu çalışmada deneylerde kullanılan maddelerin konsantrasyona bağlı olarak, hedef genlerin (*mt2*, *p53* ve *rad51*) mRNA düzeylerinde değişimlere sebep olduğu belirlenmiştir. Bu genler kendi fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra, çevre kaynaklı nanopartikül kirliliğinin izlenebilmesi için de potansiyel biyomarkırlar olarak görev yapmaktadırlar. Bu nedenle, iyon haldeki maddeler ile nanopartikül haldeki maddelerin zebra balığı larvalarında toksisitelerini kıyasladığımız çalışmalarda iyon haldeki maddelerin nanopartiküllere oranla daha fazla toksik olduğu tespit edilmiştir. Varolan çalışmalar ve düzenlemeler suda çözünebilen iyon haldeki metaller için, metalik nanopartiküller ile ilişkili güvenilirlik kaygısını ortadan kaldıracak uygunlukta değildir. Ayrıca, zebra balığı embriyo-larva sistemi, biyomarkır gen ekspresyon varyasyonları yardımıyla toksik etkilerin tespiti için epey faydalı bir yöntemdir. Bundan dolayı yaptığımız bu çalışma, entegre edilmiş nanotoksikolojik denemeleri aydınlatabilecek niteliktedir.

Bilindiği gibi, larvalar tarafından sucul çevrede var olan metalik maddelerin vücut sistemine dahil etmesi, metallerin solungaç dokularından geçmesi ve bağırsaklar tarafından emilme aracılığıyla meydana gelmektedir (Minghetti vd., 2010). Hücrelerin içindeki önemli bir sistem değişken metal konsantrasyonlarını kontrol eden metallothioneinlerdir (*mts*). Bu proteinler gerekli olduğunda iyon haldeki metalleri serbest bırakma ya da bağlama görevi görürler (Maret, 2009). Metallothionein proteinleri, bakır ve çinko benzeri temel eser elementler veya gümüş ve kadmiyum gibi toksik metaller vasıtasıyla indüklenirler (Kimura ve Itoh, 2008). *mt* genleri canlılarda dört farklı izoforma sahiptir. *mt1* ve *mt2* gen dizileri bunlardan ikisi olup sinir dışı dokular içerisinde ağır metallere tutunarak onların toksiklik etkilerini giderir, diğer taraftan çinko ve bakır düzeylerini ayarlar ve oksidatif hasar oluşumunu engellerler (Cho vd., 2009). Yaptığımız bu araştırmada, larval zebra balıklarında kullanılan metaller *mt2* geninin ifadesinde değişikliklere sebebiyet vermiştir. İyon haldeki metallerin ve nanopartiküllerin neden olduğu gen ekspresyon artışının *mt2* gen ekspresyon artışından daha fazla olduğu belirlenmiştir. *mt2* gen ekspresyonunun yüksek seviyede artışının olması aynı zamanda metal birikiminin larvaların dokularında da yüksek düzeyde olduğunu belirtmektedir. Yapılan diğer bir araştırmada zebra balığı

embriyoları kullanılarak, hem Zn^{+2} hem de ZnO nanopartikül maruziyetlerinin ardından tüm miktarlarda *mt2* gen ifadelerinde ileri seviyede bir yükseliş saptanmıştır. Bunun yanında bu araştırmada, sitokinlere ait transkriptlerde ve oksidatif stres bağlantılı genlerde de (Cu/Zn SOD) de önemli seviyede değişimler belirlenmiştir (Brun vd., 2014).

Alüminyum oksit (Al_2O_3) nanopartiküller sanayide önemli uygulama alanlarına sahiptirler. Evsel, tıbbi ürünler, emici veya soğurucu maddeler, biyomateryaller ve hareket elemanları gibi sistemlerde kullanılmaktadırlar (Sadiq vd., 2009). Al_2O_3 nanopartiküller, üretim, taşınım, kullanım ve imha işlemleri esnasında ekosisteme girebilmekte ve potansiyel olarak insan sağlığı için risk oluşturabilmektedir (Pakrashi vd., 2011; Arora vd., 2012). Farelere ağız yoluyla alüminyum oksit nanopartiküller uygulandığında genotoksik etkiler oluşturduğu (Balasubramanyam vd., 2009) ve bu maddelerin UMR 106 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Di Virgilio vd., 2010). Bunun yanında, önceki bazı çalışmalar alüminyum oksit nanopartiküllerin algler (Pakrashi vd., 2013), bakteriler (Pakrashi vd., 2011; Fajardo vd., 2014), su piresi (Pakrashi vd., 2013) ve zebra balığı (Kovrižnych vd., 2013) üzerine hücresel düzeyde etkileri konusunda yapılmış olmasına rağmen, balıkların hücre yapısı üzerine etkileri konusundaki bilgiler halen oldukça sınırlı düzeydedir. Alüminyum oksit nanopartiküllere maruz kalan hücrelerde, oksidatif stres sonucu oluşan enflamasyon ve lipid oksidasyonu hücre ölümlerine sebebiyet vermektedir (Ju-Nam ve Lead, 2008). Nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olmaları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olan etmenlerden bir tanesidir. Bu yüzden, nanopartikül boyutlarının küçük olması daha yüksek oranda oksidatif strese neden olabilmektedir (Gliga vd., 2014; Mittal ve Pandey, 2014). Aynı şekilde, yaptığımız çalışmada da Al_2O_3 nanopartiküllerin zebra balığı larvalarında önemli düzeyde DNA hasarına ve gen yapısında değişikliklere neden olabileceği belirlenmiştir. Bu yapılan çalışmada maruz bırakılan maddelere bağlı olarak bazı grafiklerde kontrol grubuna göre stres gen seviyeleri daha az olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeni canlıdaki erken savunma mekanizmasına bağlı olarak stres genlerindeki değişimin kontrol grubuna göre daha az olması şeklinde belirlenmiştir.

Bazı nikel bileşiklerinin (NiSO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiO) sucul organizmalar üzerinde lokomotor aktivitede ve yumurtadan çıkma oranında azalma, solunum problemi ve kanserojenik etkiler gibi toksik etkiler oluşturabileceği tespit edilmiştir (Pane vd., 2003; Kienle vd., 2008). Nikel nanopartiküllerin toksik etkilerini niteliksel olarak ifade eden, gözleme dayalı birkaç toksikolojik çalışma yapılmış olmasına rağmen canlı organizmalar üzerindeki etkileri konusundaki belirsizlik halen devam etmektedir (Karlsson vd., 2008; Kasemets vd., 2009). Bu sebeple yapmış olduğumuz bu araştırma, Ni nanopartiküllerin özellikle balıkların gen yapısı ve DNA üzerine etkileri konusunda detaylı aydınlatıcı bilgi sunması nedeniyle literatürdeki eksikliği gidermesi açısından önem arz etmektedir.

Yaptığımız çalışmada kullanılan genlerin işlevleri ve seçim kriterleri şu şekildedir: *β -actin*; sitoskeletal sistemde görev alır, hücre hareketi, yapı ve bütünlüğünden sorumludur, gen ekspresyon deneylerinde referans gen olarak kullanılır. *mt2*; metallothionein-2 proteini, çeşitli metalleri bağlayan yüksek oranda sistein kalıntısı içeriğine sahiptir. Bu proteinler hem ağır metaller hem de glukokortikoidler tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir. *rad51*; DNA onarım proteinidir. DNA'nın çift zincir kırıklarının onarımında görev alır. *p53*; hücrel tümör proteinidir. Hücre döngüsünü düzenler, tümör baskılayıcı ve kanser oluşumunu önleyici görev yapar.

β -actin genindeki ekspresyon seviyelerinde hiçbir zaman farklılık gözlenmemesi, hedef genlerin normalizasyonu amacıyla (*mt2*, *p53* ve *rad51*) standart gen olarak tercih edilmesine imkan sağlamaktadır. Casadei vd. (2011) Kantitatif PZR'nda normalizasyon için 8 adet farklı zebra balığı standart genlerini inceledikleri bir çalışmada en kullanışlı genin hangisi olduğunu tespit etmeye çalışmışlardır. Araştırmada elde edilen sonuçlarda, larvaların farklı gelişim kademelerinde en fazla ifade edilen genin *β -actin* olduğunu ve ekspresyonun en sabit ve en yüksek seviyede olduğunu saptamışlardır.

Bilim insanları günümüzde nano boyutlu tüketici ürünlerinin geliştirilmesinin bilime, teknolojiye ve sağlık alanlarına yararlı olacağı hususunda hemfikirdirler, ancak onların çevreye, canlı organizmalara ve hassas ekosistemlere, hatta sucul çevreye salınımı insanlarda zararlı etkilere yol açmaktadır (Guzman vd., 2006; Barrena vd., 2009). Devletler, bağımsız bir çevre konusunda bilim topluluğu ve endüstriler arasında

etkili bir işbirliğinin geliştirilmesi, çevresel zararların belirlenmesini ve önlenmesini sağlayacak, uygun ekotoksikolojik çalışmaların geliştirilmesini kolaylaştıracaktır. Günümüzde su ortamındaki nanopartiküllerin davranışları, potansiyel toksik etkileri ve organizmalar tarafından vücuda alınma mekanizması konusunda halen çok daha az bilgi mevcuttur. Yaptığımız bu çalışma, çevremizde nano maddelerin meydana getirdiği risklerin belirlenmesine olanak sağlayacak ve ileride yürütülmesi planlanan araştırmalara öncülük edecektir.



5. ÖNERİLER

Son zamanlarda nanoteknoloji; sağlık sektöründe, ekonomik kalkınmada ve üretimde teknolojinin geliştirilmesinde önemli role sahiptir. Bu faktörler göz önüne alındığında nano maddelerin üretimi, geliştirilmesi, taşınması, kullanımı ve daha sonra yapılan yok etme işlemleri sırasında değişik ekosistemlerle ilişkisi kaçınılmaz olmaktadır. Dolayısıyla ekosistemin sağlığı üzerine nanomalzemelerin sebep olabileceği tüm sorunlar dikkate alınmalıdır. Günümüzde nano maddelerin çevreye olan etki seviyelerinin çok az düzeylerde olduğunun öngörülmesinin yanında bu alanda yapılan araştırmalar bir hayli kısıtlıdır. Bu sebeple yeni görüntüleme, ölçme ve izleme yöntemlerinin geliştirilmesiyle ve çevresel toksikoloji çalışmaları vasıtasıyla çevredeki düzeylerinin zarar oluşturacak seviyede bulunup bulunmadığı tespit edilmelidir.

Nano maddelerin doğal çevrede takip edecekleri yolların belirlenmesinde ve etkilerinin tespit edilmesinde sedimentasyon ve küme oluşturma niteliklerinin aydınlatılması gerekmektedir. Nanopartiküllerin yapılması düşünülen olan tüm araştırmalarda askıda kalan çözeltilerinin doğal çevrelerde oluşturacakları kümelenmenin ve kararlılığın başka organik maddeler üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yüzeydeki su örneklerinden faydalanılmalıdır. Bunun yanında, kümelenmeden sonra partiküllerin nano ölçeklerini muhafaza edip etmedikleri ve küme oluşturan partiküllerin sediment tabakasına inip burda yaşamını sürdüren canlılar ile etkileşime girmeleri gibi konuların daha detaylı bir şekilde değerlendirilmesi gerekir. Nanopartiküllerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında maruziyet süreleri artırılarak yapılacak testlerde organizmaların gelecekte gösterecekleri davranış değişikliklerinin araştırılması sonucunda da dikkate değer veriler elde edilebilir. Ekotoksikolojik çalışmalar, av-avcı ilişkisinde bulunan canlılar ile yapılacak uzun süreli deneyler aracılığıyla geniş sürelerde nano maddelerin besin piramitinde meydana getireceği problemlerin ve izleyeceği yolların araştırılmasına ışık tutabilecektir.

Uluslararası kurumların gerçekleştirdiği pek çok toplantı ve sempozyumlar sayesinde nano maddelerin ekosistemler üzerindeki etkileri tartışılmaktadır. Nano maddelerin çevre üzerine toksik etkileri hususuna ise ülkemizde yeterli dikkat

gösterilmemektedir. Ülkemizde nanotoksikoloji konusuna gereken önemin gösterilmesi ve bu konu üzerindeki çalışmalara hız verilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Altinok, I., 2004.** Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating *Flavobacterium columnare* infection of goldfish. *Aquaculture*, 239, 47-56. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.035
- Altinok, I., Capkin, E. and Boran, H., 2011.** Influence of bioassay volume, water column height, and octanol-water partition coefficient on the toxicity of pesticides to rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 596-600. DOI: 10.1007/s00128-011-0281-4
- APHA/AWWA/WEF, 1992.** Standart Metods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1, 167 p.
- Arnold, H., Pluta, H.J. and Braunbeck, T., 1996.** Cytological alterations in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to low concentrations of waterborne endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 39-52. DOI: 10.3354/dao025039
- Arora, S., Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M., 2012.** Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258: 151–165. DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010
- Atamanalp, M., 2004.** Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum, 8 s.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Hussain, S.M. and Grover, P., 2009.** In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, 24, 245-251. DOI: 10.1093/mutage/gep003
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sanchez, A. and Puentes, V., 2009.** Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75, 850-857. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078
- Bazarjani, M.S., Kleebe, H.J., Müller, M.M., Fasel, C., Yazdi, M.B., Gurlo, A. and Riedel, R., 2011.** Nanoporous silicon oxycarbonitride ceramics derived from polysilazanes in situ modified with nickel nanoparticles chemistry of materials, 23, 4112-4123. DOI: 10.1021/cm200589n
- Bladen, C.L., Navarre, S., Dynan, W.S. and Kozlowski, D.J., 2007.** Expression of the Ku70 subunit (XRCC6) and protection from low dose ionizing radiation during zebrafish embryogenesis. *Neuroscience Letters*, 422, 97-102. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.05.045
- Bohme, S., Baccaro, M., Schmidt, M., Potthoff, A., Stark, H.J., Reemtsma, T., Kuhnel, D., 2017.** Metal uptake and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo: differences between nanoparticles and metal ions. *Environmental Science-Nano* 4, 1005-1015. DOI: 10.1039/C6EN00440G

- Boran, H., 2012.** Nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine olan etkilerinin gen ekspresyon yöntemiyle belirlenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilim Enstitüsü, Trabzon, 65s
- Boran, H., Boyle, D., Handy, R.D., Altinok, I. and Henry, T.B., 2012.** Development of a test chamber to enable homogenous aqueous phase dispersions of nanoparticles for testing nanoparticle toxicity in fish. 6th SETAC World Congress 2012, SETAC Europa 22nd Annual Meeting, Berlin, 20-24 May.
- Boxall, A.B.A., Chaundhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B. and Watts, C., 2007.** Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Report by the Central Science Laboratory (CSL) York for the Department of the Environment and Rural Affairs (DEFRA), UK, 89 p.
- Boyle, D., Boran, H., Atfield, A.J. and Henry, T.B., 2015.** Use of an exposure chamber to maintain aqueous phase nanoparticle dispersions for improved toxicity testing in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 583-588. DOI: 10.1002/etc.2840
- Brun, N.R., Lenz, M., Wehrli, B. and Fent, K., 2014.** Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. *Science of the Total Environment*, 476-477, 657-666. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.053
- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P. and Frabetti, F., 2011.** Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis. *Gene Expression Patterns*, 11, 271-276. DOI: 10.1016/j.gep.2011.01.003
- Cho, Y.S., Lee, S.Y., Kim, K-Y. and Nam, Y.K., 2009.** Two metallothionein genes from mud loach *Misgurnus mizolepis* (Teleostei; Cypriniformes): Gene structure, genomic organization, and mRNA expression analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 153, 317-326. DOI: 10.1016/j.cbpb.2009.04.002
- Colvin, V.L., 2004.** Sustainability for Nanotechnology. *The Scientist*, 18, 26-27.
- CPMP, 2000.** The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity, CPMW/SWP/1042/99, 1-9.
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J. and Owen, R., 2008.** Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 421-437. DOI: 10.1007/s10646-008-0215-z
- Daughton, C.G., 2004.** Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24, 711-732. DOI: 10.1016/j.eiar.2004.06.003

- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M. and de Mele, M.F.L., 2010.** Response of UMR 106 cells exposed to titanium oxide and aluminum oxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 80-86. DOI: 10.1002/jbm.a.32339
- Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E., 2007.** Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469-478. DOI: 10.1038/nnano.2007.223
- EPA, 1993.** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C., EPA/600/4-90/027F.
- Fajardo, C., Sacca, M.L., Costa, G., Nande, M. and Martin, M., 2014.** Impact of Ag and Al₂O₃ nanoparticles on soil organisms: In vitro and soil experiments. *Science of the Total Environment*, 473-474: 254-261. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.043
- FAO, 1987.** Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shotterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247, Roma, 81 p.
- Federici, G., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007.** Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 415-430. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B. and Karlsson, H.L., 2014.** Size dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11, 11. DOI: 10.1186/1743-8977-11-11
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. and Clesceri, L.S., 1985.** Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition, 541 p.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D. and Barber, D.S., 2009.** Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Science*, 107, 404-415. DOI: 10.1093/toxsci/kfn256
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D. and Barber, D.S., 2007.** Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 41, 8178-8186. DOI: 10.1021/es071235e
- Guzman, K.A., Taylor, M.R. and Banfield, J.F., 2006.** Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding. *Environmental Science & Technology*, 40, 1401-1407. DOI: 10.1021/es0515708
- Handy, R.D. and Shaw, B.J., 2007.** Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of

nanotechnology. Health, Risk & Society, 9, 125-144. DOI: 10.1080/13698570701306807

- Handy, R.D., Owen, R. and Valsami-Jones, E., 2008.** The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17, 315-325. DOI: 10.1007/s10646-008-0206-0
- Hao, L., Wang, Z. and Xing, B., 2009.** Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1459-1466. DOI:10.1016/S1001-0742(08)62440-7
- Henry, T.B., Menn, F.M., Fleming, J.T., Wilgus, J., Compton, R.N. and Sayler, G.S., 2007.** Attributing effects of aqueous C₆₀ nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1059-1065. DOI: 10.1289/ehp.9757
- Henry, T.B., Wileman, S.J., Boran, H., and Sutton, P., 2013.** Association of Hg²⁺ with Aqueous (C₆₀)_n Aggregates Facilitates Increased Bioavailability of Hg²⁺ in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology*. 47(17):9997-10004
- Ju-Nam, Y. and Lead, J.R., 2008.** Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400, 396-314. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.042
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Möller, L., 2008.** Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1726-1732. DOI: 10.1021/tx800064j
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.C. and Kahru, A., 2009.** Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23, 1116-1122. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.05.015
- Kashiwada, S., 2006.** Distribution of nanoparticles in the see-trough medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 114, 1697-1702. DOI: 10.1289/ehp.9209
- Kienle, C., Köhler, H.R., Filser, J. and Gerhardt, A., 2008.** Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. *Environmental Pollution*, 152, 612620. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.069
- Kimura, T. and Itoh, N., 2008.** Function of metallothionein in gene expression and signal transduction: Newly found protective role of metallothionein. *Journal of Health Science*, 54, 251-260.

- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., Mclaughlin, M.J. and Lead, J.R., 2008.** Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1825-1851. DOI: 10.1897/08-090.1
- Klauning, J.E., 2000.** Pesticide Toxicology, Evaluating Safety and Risk, Purdue Pesticide Programs, Purdue University Cooperative Extension Service, PPP-40, Indiana University School of Medicine.
- Koch, C.C., 2006.** Nano-structured materials processing, Properties, and Potential applications, William Andrew Publishing. ISBN: 9780815515340, p. 784.
- Kovřížnych, J.A., Sotníková, R., Zeljenková, D., Rollerová, E., Šzabová, E. and Wimmerová, S., 2013.** Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages – comparative study. *Interdisciplinary Toxicology*, 6, 67-73. DOI: 10.2478/intox-2013-0012.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. and Schneckeburger, J., 2009.** Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 370-377. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.08.009
- Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W. and Sepulveda, M.S., 2010.** The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, 19, 185-195. DOI: 10.1007/s10646-009-0404-4
- Lanone, S. and Boczkowski, J., 2006.** Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: Molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 6, 651-663. DOI: 10.2174/156652406778195026
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. and Hoet, P., 2009.** Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 14, 1-12. DOI: 10.1186/1743-8977-6-14
- Laufer, B. and Nation, P.A., 1999.** Vocabulary-size test of controlled productive ability. *Language Testing*, 16, 36-55.
- Leblond, V.S., Bisson, M. and Hontela, A., 2001.** Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*O. mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *General and Comparative Endocrinology*, 121, 1, 48-56. DOI: 10.1006/gcen.2000.7556
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H. and Wollin, K.M., 2008.** Alternative methods to safety studies in experimental animals: Role in the risk assessment of chemicals under the new european chemicals legislation (REACH). *Archives of Toxicology*, 82, 211-236. DOI: 10.1007/s00204-008-0279-9

- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. and Stark, W.J., 2005.** Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology*, 39, 9370-9376. DOI: 10.1021/es051043o
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W.F., Lynch, I. and Lindman, S., 2007.** Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8691-8696. DOI: 10.1073/pnas.0701250104
- Loomis, T.A., 1978.** *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R. and Klaper, R., 2007.** Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium oxide, nano-C-60, and C(60)HxC(70)Hx). *Environmental Science & Technology*, 41, 4465-4470. DOI: 10.1021/es062146p
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C. and Alvarez, P.J.J., 2006.** Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size, *Environmental Science & Technology*, 40, 14, 4360-4366. DOI: 10.1021/es0603655
- Ma, H., Williams, P.L. and Diamond, S.A., 2013.** Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*, 172, 76-85. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.08.011
- Maret, W., 2009.** Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals*, 22, 149-157. DOI: 10.1007/s10534-008-9186-z
- Mark, R., Wiesner, P.E. and Bottero, J., 2007.** *Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials*. Inc. McGraw-Hill, 231-331.
- Maynard, A.D., 2002.** Experimental determination of ultrafine TiO₂ de-agglomeration in surrogate pulmonary surfactant - preliminary results. *Annals of Occupational Hygiene*, 46, 197-202. DOI: 10.1093/annhyg/mef630
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P. and Collins, A., 1993.** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288, 47-63. DOI: 10.1016/0027-5107(93)90207-V
- Minghetti, M., Leaver, M.J. and George, S.G., 2010.** Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream *Sparus aurata*. *Aquatic Toxicology*, 97, 23-33. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.11.017

- Mittal, S. and Pandey, A.K., 2014.** Cerium Oxide Nanoparticles Induced Toxicity in Human Lung Cells: Role of ROS Mediated DNA Damage and Apoptosis. BioMed Research International, 2014.
- Moore, M.N., 1990.** Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. Histochemical Journal, 22, 187-191. DOI: 10.1007/BF02386003
- Moore, M.N., 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. Environmental International, 32, 967-976. DOI: 10.1016/j.envint.2006.06.014
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Soverchia, C., Haigh, S.D. and Hales, S.G., 1997.** Uptake of anon-caloric, edible sucrose polyester oil by marine mussels and their Influence on uptake and effects on anthracene. Aquatic Toxicology, 39, 307-320. DOI: 10.1016/S0166-445X(97)00028-3
- Mueller, N.C. and Nowack, B., 2008.** Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. Environmental Science & Technology, 42, 4447-4453. DOI: 10.1021/es7029637
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N., 2006.** Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311, 622-627. DOI: 10.1126/science.1114397
- Ng, K.W., Khoo, S.P.K., Heng, B.C., Setyawati, M.I., Tan, E.C., Zhao, X.X., Xiong, S.J., Fang, W.R., Leong, D.T. and Loo, J.S.C., 2011.** The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. Biomaterials 32, 8218-8225. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.036
- Nowak, B., 1992.** Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. Aquatic Toxicology, 23, 65-83. DOI: 10.1016/0166-445X(92)90012-C
- Oberdörster, E., 2004.** Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. Environmental Health Perspectives, 112, 1058-1062. DOI: 10.1289/ehp.7021
- Oberdörster, E., Zhu, S.Q., Blickley, T.M., Clellan-Green, P. and Haasch, M.L., 2006.** Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms. Carbon, 44, 1112-1120. DOI: 10.1016/j.carbon.2005.11.008
- Ostaszewska T., Śliwiński J., Kamaszewski M., Sysa P. ve Chojnacki M., 2018.** “Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes”, Environmental Science and Pollution, Research, vol. 25, pp. 908–915. DOI:10.1007/s11356-017-0494-0
- Ozay, O., Aktas, N., Inger, E. and Sahiner, N., 2011.** Hydrogel assisted nickel nanoparticle synthesis and their use in hydrogen production from sodium boron

- hydride. International Journal of Hydrogen Energy, 36, 1998-2006. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.11.045
- Pakrashi, S., Dalai, S., Prathna, T.C., Trivedi, S., Myneni, R., Raichur, A.M., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A., 2013.** Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations. Aquatic Toxicology, 132-133, 34- 45. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.01.018
- Pakrashi, S., Dalai, S., Sabat, D., Singh, S., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A., 2011.** Cytotoxicity of Al₂O₃ nanoparticles at low exposure levels to a freshwater bacterial isolate. Chemical Research in Toxicology, 24, 1899-1904. DOI: 10.1021/tx200244g
- Pane, E.F., Richards, J.G. and Wood, C.M., 2003.** Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. Aquatic Toxicology, 63, 65-82. DOI: 10.1016/S0166-445X(02)00131-5
- Perez, S., Farre, M. and Barcelo, D., 2009.** Analysis, behaviour and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28, 820-832. DOI: 10.1016/j.trac.2009.04.001
- Powers, K.W., Brown S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M. and Roberts, S.M., 2006.** Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. Toxicological Sciences, 90, 296-303. DOI: 10.1093/toxsci/kfj099
- Pritchard, D.K., 2004.** Literature review explosion hazards associated with nanopowders, HSL/2004/12, 22 p.
- Rahman, I., 2000.** Regulation of nuclear factor- κ B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in alveolar epithelial cells. Biochemical Pharmacology, 60, 1041-1049. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00392-0
- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M. and Forman, H.J., 2005.** Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. Antioxidants & Redox Signaling, 7, 42-59. DOI: 10.1089/ars.2005.7.42
- Rand, G.M., 1995.** Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition, ISBN 1-56032-090-7, 1148 p.
- Reinardy HC, Dharamshi J, Jha AN, Henry TB (2013)** Changes in expression profiles of genes associated with DNA repair following induction of DNA damage in larval zebrafish *Danio rerio*. Mutagenesis 28: 601–608
- Sadiq, I., Chowdhury, B., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A., 2009.** Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles.

Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 5, 282-286. DOI: 10.1016/j.nano.2009.01.002

Sayes, C.M., Fortner, L.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M. and Ausman, K.D., 2004. The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. *Nanoletters*, 4, 1881-1887. DOI: 10.1021/nl0489586

Saygi, S., Deniz, G., Kutsal, O. and Vural, N., 1991. Chronic effect of cadmium on kidney, liver, testes and fertility of male rats. *Biological Trace Element Research*, 31, 209-214.

SCENIHR, 2006. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate C - Public Health and Risk Assessment C7 - Risk Assessment: The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies, 71 p.

SCENIHR, 2007. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, European Commission, Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials, 87 p.

Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.M., Schäfer, U.F., Becker, K., Schnekenburger, J., Schulze Isfort, C., Landsiedel, R. and Wohleben, W., 2008. Not ready to use-overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-61. DOI: 10.1080/17435390802018378

Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., van Aerle, R. and Tyler, C.R., 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 115, 521-534. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076

Smedsrud, T., Dannevig, B.H., Tolleshaug, H. and Berg, T., 1984. Endocytosis of a mannoseterminated glycoprotein and formaldehyde-treated human serum albumin in liver and kidney cells from fish (*Salmo alpinus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 8, 579-588. DOI: 10.1016/0145-305X(84)90090-9

Smith, C.J., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82, 94-109. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.02.003

Song, L., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., Galloway, T.S., Tyler, C.R., 2015. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere*, 139, 181-189. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.021

- Sun, Y., Zhang, G., He, Z.Z., Wang, Y.J., Cui, J.L., Li, Y.H., 2016.** Effects of copper oxide nanoparticles on developing zebrafish embryos and larvae. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 905-918. DOI: 10.2147/IJN.S100350
- Suter, L., Babiss, L.E. and Wheeldon, E.B., 2004.** Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chemistry & Biology*, 11, 161-171. DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.02.003
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Schulz, H., Ziesenis, A., Schramel, P. and Heyder, J., 2004.** Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhalation Toxicology*, 16, 83-92. DOI: 10.1080/08958370490443141
- Tee, B.C.K., Wang, C., Allen, R. and Bao, Z., 2012.** An electrically and mechanically self-healing composite with pressure- and flexion-sensitive properties for electronic skin applications. *Nature Nanotechnology*, 7, 825-832. DOI: 10.1038/nnano.2012.192
- Tong, Z., Bischoff, M., Nies, L., Applegate, B. and Turco, R.F., 2007.** Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environmental Science & Technology*, 41, 2985-2991. DOI: 10.1021/es061953I
- TÜBİTAK, 2004.** Nanoteknoloji Strateji Grubu, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi, Ankara, Türkiye, 26 s.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. and Schins, R.P.F., 2007.** Cellular response to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1, 52-71. DOI: 10.1080/00222930701314932
- Ünsal, M., 1998.** Kirlilik Deneyleri-Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No:11, 168 s.
- Vielkind, M., Kampen, I. and Kwade, A., 2013.** Zinc oxide nanoparticles in bacterial growth medium: Optimized dispersion and growth inhibition of *Pseudomonas putida*. *Advances in Nanoparticles*, 2, 287-293. DOI: 10.4236/anp.2013.24039
- Wang T., Wen X., Hu Y., Zhang X., Wang D. ve Yin S., 2019.** “Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*”, *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 84, pp. 648–655. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.10.053
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. and Biswas, P., 2006.** Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40, 4336-4345. DOI: 10.1021/es062726m
- Wurl, O. and Obbard, J.P., 2004.** A Review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): A unique habitat for marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1016-1030. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2004.03.016

- Yauk, C.L. and Berndt, M.L., 2007.** Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 380-394. DOI: 10.1002/em.20290
- Zhu, L.S., Dong, X.L., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Su, J. and Yu, C.W., 2011.** DNA damage and effects on glutathione-S transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 26, 480-488. DOI: 10.1002/tox.20575
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. and Chen, Y., 2009.** The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20, 19, 195103. DOI: 10.1088/0957-4484
- Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., Duan, Z., Chen, W. and Alvarez, P.J.J., 2007.** Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 976-979. DOI: 10.1897/06-583.1