



**KEMİK ÇİMENTOSUNUN (POLİMETİL METHAKRİLAT) SUCUL
CANLILARDA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Selçuk BOZKIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Selçuk BOZKIR

09/09/2021

KEMİK ÇİMENTOSUNUN (POLİMETİLMETAKRİLAT) SUCUL CANLILARDA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Selçuk BOZKIR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2021

ÖZET

Polimetilmetakrilat (PMMA), kemik çimentosu, protez taban malzemesi olarak yaygın olarak kullanılan, toz polimer ve sıvı monomerin karıştırılmasıyla kıvamlaşan, ekzotermik bir reaksiyonla yaklaşık 60-80° sıcaklığa ulaşır sertleşen bir biyomateryaldir. Bu malzeme aslında implantların kemiğe sabitlenmesi için geliştirilmiştir. Ayrıca osteomiyelit tedavisinde yüksek konsantrasyonda lokal antibiyotik sağlamak için de kullanılmaktadır. PMMA bir termoplastik polimer olup, protez malzeme kullanıma ek olarak çok çeşitli alanlarda kendine yer bulan, dünyada en çok üretimi gerçekleştirilen malzemeler arasında yer almaktadır. Bu açıdan, PMMA aslında bir plastik olarak çevre kirleticiler arasındadır ve çevre kirleticilere son yıllarda verilen önem git gide artmaktadır. Bu çalışmanın amacı, PMMA'nın sucul toksikoloji açısından çevresel etkisini belirlemektir. DNA/RNA oksidatif hasarını değerlendirerek insanlar üzerindeki olası olumsuz etkilerini öngörmektir. Zebra balığı deney grupları (*Danio rerio*) 6, 24, 96 saat ve bir hafta boyunca planlanan zaman aralıklarında PMMA'ya 1, 10 ve 50 mg/L dozlarında olarak maruz bırakılmıştır. DNA/RNA oksidatif hasarını 8-hidroksi-2'deoksiguanozin (ng/g doku) olarak değerlendirmek için, zebra balığı DNA izolasyonu için homojenize ve hidrolize edilmiştir ve hasar LC-MS modifiye yöntemi ile ölçülmüştür. DNA hasarı, 24 saatlik grupların düşük dozlarına maruz bırakılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır, ancak 96 saatlik ve 1 haftalık grupların yüksek dozlarında kontrol gruplarına kıyasla bir fark gözlenmemiştir. Solungaç dokularında epitel hiperplazisi saptanmıştır. 96 saat ve bir hafta boyunca 10 mg/L ve 50 mg/L dozlara maruz kalan gruplarda epitel hiperplazisi'nin artışı gözlemlenmiştir. Ayrıca, karaciğer dokularında da aynı konsantrasyon ve sürelerde histolojik olarak hidropik dejenerasyonlar gözlenmiştir. Histolojik hasar 50 mg/L PMMA maruz kalan grupta daha şiddetli olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, sonuçlarımız maruz kalma süresi ve dozu ile ilgili değişiklikleri temsil etmektedir. Zebra balıklarında akut genotoksik etkinin doku hasarına neden olduğu tespit edildiği için, çevre kirliliği ve sağlık sorunları arasında ilişki olduğu ileri sürülmektedir.

Bilim Kodu : 90308
Anahtar Kelimeler : PMMA, zebrabalığı (*Danio rerio*), oksidatif hasar, DNA hasarı
Sayfa Adedi : 62
Danışman : Prof. Dr. Aysel ÇAĞLAN GÜNAL
İkinci Danışman : Doç. Dr. Veysel ERCAN DİNÇEL

DETERMINATION OF THE EFFECT OF BONE CEMENT
(POLYMETHYLMETACRILATE) ON AQUATIC ANIMALS

(M. Sc. Thesis)

Selçuk BOZKIR

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

September 2021

ABSTRACT

Polymethylmethacrylate (PMMA), bone cement, is widely used as a prosthetic base material, known as bone cement, is a biomaterial that is thickened by mixing the powdered polymer and liquid monomer, reaching a temperature of about 60–80° and hardening with an exothermic reaction. Bone cement was originally developed for the fixation of implants to the bone, it is also used to provide a high concentration of antibiotics locally in the treatment of osteomyelitis. Basically, PMMA is a thermoplastic polymer, and it is among the most produced plastic materials in the world, which finds its place in a wide variety of areas in addition to the use of prosthetic materials. In this direction, PMMA is actually among the environmental pollutants as a plastic and the importance given to environmental pollutants has been increasing in recent years. The aim of the present study was to determine the environmental effect of PMMA on aquatic toxicology and the possible negative effects on humans by evaluating DNA/RNA oxidative damage. Experimental groups of zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to PMMA as 1, 10 and 50 mg/L for the planned time intervals as 6, 24, 96 hours and one week. To evaluate the DNA/RNA oxidative damage as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (ng/g tissue), whole body zebra fish was homogenized for DNA isolation, hydrolyzed and damage was measured by LC-MS modified method. DNA damage was statistically significantly increased at low doses of 24 h exposed groups, however no difference was observed for high doses of 96 hours and 1 week groups compared to controls. The gill tissues revealed epithelial hyperplasia and lifting after exposed to 10 and 50 mg/L for 96 h and one week, hydropic degenerations were observed in the liver tissues histologically in same concentrations and durations. The histological damages were more severe at 50 mg/L PMMA exposed group. In conclusion, our results represent alterations related with the duration of exposure and dose. Since it has been determined that acute genotoxic effect causes tissue damage in zebrafish, it is suggested that there is a relationship between environmental pollution and health problems.

ScienceCode : 90308
KeyWords : PMMA, zebrafish (*Danio rerio*), oxidative damage, DNA damage
PageNumber : 62
Supervisor : Prof. Dr. Aysel ÇAĞLAN GÜNAL
Co-Supervisor : Assoc. Prof. Veysel ERCAN DİNÇEL

TEŞEKKÜR

Hem yüksek lisans eğitimim sırasında hem de tez çalışmamın her aşamasında, beni kıymetli fikirleriyle yönlendiren ve her zorlu süreçte beni motive eden ve destekleyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Aysel ÇAĞLAN GÜNAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni destekleyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim annem ve babama, bu süreçte beni yüreklendiren ve her daim destekleyen eşim ve oğluma teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Plastik Malzemeler.....	5
2.1.1. Plastik nedir?	5
2.1.2. Dünyada plastik üretimi	6
2.1.3. Türkiye’de plastik üretimi.....	11
2.2. Plastik Atıklar.....	12
2.3. Mikroplastikler	15
2.4. Kemik Çimentosu.....	18
2.4.1. Kemik çimentosu nedir?	18
2.4.2. Kemik çimentosu bileşimi.....	19
2.4.3. PMMA polimerleşme reaksiyonu	21
2.5. Çevre Kirletici olarak PMMA.....	25
2.6. Model Organizmalar	26
2.6.1. Genomik model organizma zebra balığı (Danio rerio)	27
3. MATERYAL METOT.....	29
3.1. Materyal	29

	Sayfa
3.1.1. Araştırma yeri.....	29
3.1.2. Laboratuvar şartları	29
3.1.3. Akvaryum ve suyun özellikleri	29
3.1.4. Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve kitler	30
3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Subletal toksisite deneyleri	32
3.2.2. Deney hayvanlarının hazırlanması	32
3.3. Biyokimyasal Analizler.....	33
3.3.1. DNA ekstraksiyonu.....	33
3.3.2. DNA hidrolizi	34
3.3.3. 8OHdG analizi	34
3.4. Histopatolojik Analiz	38
3.4.1. Doku takibi.....	38
3.4.2. Doku bloklama/Parafin gömme	38
3.4.3. Kesit alma.....	40
3.4.4. Dokuları lama alma	40
3.4.5. Deparafinizasyon.....	41
3.4.6. Hematoksilen-eosin (HE) boyama	41
4. BULGULAR	43
4.1. DNA Nanodrop Ölçüm Sonuçları	43
4.2. 8OHdG Analiz Sonuçları	44
4.3. Histopatoloji Sonuçlar (PMMA).....	45
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57

ÖZGEÇMİŞ	61
----------------	----



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Termoplastik ve termoset malzemeler.....	5
Çizelge 2.2. Kemik çimentosunun içeriği.....	20
Çizelge 2.3. MMA monomerinin fiziksel özellikleri.....	20
Çizelge 3.1. Agilent 6420 LCMS/MS özellikleri	35
Çizelge 3.2. LCMS/MS cihaz parametreleri özellikleri.....	35
Çizelge 3.3. LCMS/MS cihaz parametreleri özellikleri devamı.....	36
Çizelge 3.4. Kapalı sistem doku takip cihazında doku takip uygulaması Formalin, %10	38
Çizelge 3.5. Deparfinizasyon uygulaması	41
Çizelge 3.6. Doku preparatlarının HE boyama–kapatma/montaj uygulama aşamaları .	41
Çizelge 4.1. DNA nanodrop ölçüm sonuçları.....	43
Çizelge 4.2. 8-OHdG (ng/g doku) değerleri	44
Çizelge 4.3. 1 mg/L PMMA’ya maruz kalan zebra balıklarının çeşitli dokularında görülen histopatolojik bulgular	45

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. 2019 yılı plastik üretimin bölgelere göre dağılımı	7
Şekil 2.2. Çin’de gerçekleşen plastik üretiminin yıllar içerisindeki değişimi	8
Şekil 2.3. 2019 yılında Avrupa ülkelerindeki plastik ihtiyacı	9
Şekil 2.4. 2019 yılında Avrupa’da tüketilen plastiklerin kullanım oranları	10
Şekil 2.5. 2019 yılında tüketilen plastik çeşitlerinin sektörel kullanım oranları	10
Şekil 2.6. 2019 yılında Türkiye’de tüketilen plastik çeşitlerinin sektörel kullanım miktarları	11
Şekil 2.7. Türkiye’nin plastik atık ithalatının yıllar içerisinde değişimi.....	12
Şekil 2.8. PMMA polimerinin ve MMA monomerinin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.9. Fenil serbest radikalının DMPT ve BPO reaksiyonu sonucu açığa çıkması .	22
Şekil 2.10. MMA polimerleşme reaksiyonunun başlama aşaması	23
Şekil 2.11. MMA polimerleşme reaksiyonunun ilerleme aşaması	24
Şekil 2.12 MMA polimerleşme reaksiyonunun sonlanma aşaması	25
Şekil 2.13 Ergin zebra balığının gelişim süreci	28
Şekil 3.1. Zebra balıklarının temini ve adaptasyonu.....	29
Şekil 3.2. Zebra balıklarının deneye hazırlık aşaması	32
Şekil 3.3. DNA ekstraksiyonu	34
Şekil 3.4. Kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 3.5. Pik değerleri.....	37
Şekil 3.6. Pik değerleri.....	37
Şekil 3.7. Doku gömme cihazı.....	39
Şekil 3.8. Rotary mikrotom (Leica RM 2255).....	40
Şekil 4.1. Nanodrop DNA ölçüm grafiği örneği.....	43
Şekil 4.2. 8-OHdG (ng/g doku) değerlerinin değişimine ait bar grafik	44
Şekil 4.3. 96 saat 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) solungaç dokusunda epitel hiperplazisi (mavi ok).	46

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. Bir hafta boyunca 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) solungaç dokusunda epitel kaldırma (mavi ok) ve kanama (kırmızı ok).....	46
Şekil 4.5. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) solungaç dokusunda epitelyal kaldırma (mavi ok), hiperplazi (sarı ok) ve kanama (kırmızı ok).	47
Şekil 4.6. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) solungaç dokusunda telanjiektazi (ok).....	47
Şekil 4.7. 96 saat boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) karaciğer dokusunda kanama (mavi ok) ve hidropik dejenerasyon (kırmızı ok).....	48
Şekil 4.8. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) karaciğer dokusunda kanama (mavi ok) ve hidropik dejenerasyon (kırmızı ok).....	48
Şekil 4.9. 96 saat 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) karaciğer dokusunda (ok) kanama.....	49
Şekil 4.10. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) böbrek dokusunda (ok) tübül dejenerasyonu.	49
Şekil 4.11. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) böbrek dokusunda (ok) kanama.	50
Şekil 4.12. 96 saat 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (<i>D. rerio</i>) beyin dokusunda (ok) hiperemi.	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

μ	Mikron
$\mu\text{g/L}$	Litrede mikrogram
μL	Mikrolitre
ng	Nanogram
$\mu\text{g/L}$	Litrede pikogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
8-OHG	8-hidroksiguanin
8-oxo-dGTP	8-okso-7,8-dihidrideoksiguanozin trifosfat
8-oxoG	7,8 dihidro-8 okso guanin
BPA	Bisfenol A
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EPS	Genişletilmiş Polistiren
HCl	Hidroklorik asit
MP	Mikroplastik
NP	Nanilfenol
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PA	Poliamidler
PAEs	Fatalik asit esterler
PBDE	Polibromlu difenil eter
PC	Polikarbonat
PE	Polietilen
PET	Polietilen Tereftalat
PMMA	Poli metil metakrilat
PP	Polipropilen
PS	Polistiren

Kısaltmalar	Açıklamalar
PSU	Poliarilsülfon
PUR	Poliüretan
PVC	Polivinil klorür
USA	Amerika Birleşik Devletleri
WWF	Dünya Doğayı Koruma Vakfı



1. GİRİŞ

Denizler genel itibariyle 2,9 milyar insanın protein gereksiniminin yaklaşık olarak %20'sini karşılayan deniz canlılarını barındırmaktadır. Ayrıca, atmosfer ile okyanus arasındaki etkileşim sonucu yaşamın temelini oluşturan iklim olayları meydana gelmektedir. Bu nedenle, son yıllarda hızlı artış gösteren dünya nüfusunun hayatını devam ettirmesi denizlerin ve okyanusların varlıklarını sürdürmesine bağlıdır [1].

Okyanuslar yerkürenin %71'ini kaplarken, giderek artan asit oranı ve ısınma sonucu deniz seviyelerinin yükselmesi yaşam dengesini bozmakta ve yaşam alanlarının değişmesine neden olmaktadır. Bilim insanları son yüz yıl içerisinde küresel deniz seviyesinin 20 cm kadar yükseldiğini belirlerken, bu yüzyılın sonuna kadar yaklaşık olarak 80 cm gibi bir artışla, toplam deniz seviyesi yükselmesinin bir metreye ulaşacağını tahmin etmektedirler [1].

Ayrıca, aşırı avlanmaya bağlı olarak küresel deniz yaşamı azami %90 oranında tüketilmekte ve biyolojik çeşitlilik git gide azalmaktadır [1].

Son yıllarda sıklıkla gündeme gelen ve yine insanların neden olduğu bir diğer sorunsal dünya sularımızı çöplük haline getirmemizdir. Bu durumun neticesi olarak, sucul ekosistem aşırı stres altına girerek zarar görmektedir. Sera gazları, gübre ve gübre şerbetleri, plastik atıklar, yağ sızıntıları, kimyasallar gibi denizler ve okyanuslara ait olmayan birçok kirlilik unsuruyla zararın boyutları giderek artmaktadır [1].

Karadaki faaliyetler sonucu üretilen atıklar doğrudan veya dolaylı yollarla deniz ve okyanuslara ulaşarak dünya sularının kirlenmesine neden olmaktadır. Karadaki bu faaliyetler deniz kirliliğinin birincil sorumlusu olarak gösterilmektedir. Açığa çıkan atıkların doğrudan ve dolaylı taşıma yollarına örnek olarak akarsular, yer altı suları, yağmurlar ve derin deniz madenciliği verilebilir. Kirlilik kaynaklarının deniz ekosisteminde yıllar içerisindeki dramatik artışına ek olarak, iklim değişikliği sonucu deniz ve okyanuslardaki asit oranı artması ve deniz sıcaklığı yükselmesi ve aşırı avlanma diğer stres kaynakları olarak gözükmektedir. Tüm bu nedenler, deniz ekosistemi üzerinde ciddi baskı oluşturmaktadır. Atıkların üretim yollarına, taşınma biçimlerine baktığımızda, deniz ve okyanuslardaki kirlilik kaynakları aşağıdaki ana başlıklar altında toplanabilir;

1) Nitrat ve fosfat türevi atıklar yoğun hayvan besiciliği ve tarımsal faaliyetler sonucu açığa çıkar ve yer altı sularıyla okyanus ve denizlere taşındığı bölgelerde oksijensiz ölü bölgeler meydana getirir [2].

2) Kimyasal ve ağır metal atıklar, endüstriyel atık sular ve gazlar, madencilik faaliyetleri ve fosil yakıtlar sonucu açığa çıkar, birçoğu deniz canlılarının bünyesinde birikerek besin zinciri yoluyla bir üst basamağa aktarılır [2].

3) Radyoaktivite, denizlerde savaş sonucu bırakılan mühimmatlar, gürültü ve ses kirliliği ile petrol çıkarılırken açığa çıkan atıklarda diğer kirlilik türleridir [2].

4) Son yıllardaysa, plastik atıklar ve özellikle de mikro plastikler en büyük kirlilik kaynağıdır [2].

Dünya okyanuslarında insan faaliyetleri sonucunda oluşan sayısız oksijensiz bölge meydana gelmiştir. Bu bölgelerden bazıları, Meksika Körfezinde, Arap Yarımadasında, Peru kıyısı açıklarında ve Namibia karasularının tropik bölgelerinde yer almaktadır. Örneğin, Meksika Körfezinde 20 bin kilometrekare büyüklüğündeki ölüm bölgesi, ABD'nin Büyük Göller bölgesinde soya ve mısır ekim alanlarında yani "Corn Belt" mısır kuşağındaki tarımsal ve hayvansal faaliyetler sonucu meydana gelmiştir. Bu kuşaktaki yüksek tarım biçimi sonucu açığa çıkan nitrat ve fosfat türevli atık ürünler yer altı sularını kirletmektedir. Bu sular Mississippi-Missouri nehriyle beraber Meksika Körfezine dökülmektedir. Bunun sonucu olarak yaşamın var olmadığı oksijensiz ölü bir bölge meydana gelmiştir [3].

Diğer kirleticiler de nitrat ve fosfat türevi atıklar gibi canlıların hayatlarını kaybetmesine, deniz ve okyanusların kirlenmesine ve sonuç olarak birbirini tetikleyen faaliyetlerle beraber dünyanın ekolojik dengesinin bozulmasına neden olan etmenlerin ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır.

Bu etmenlerin son yıllarda gündemde olan en günceli plastiklerdir. Dünya üzerinde yılda 300 milyon ton plastik üretimi gerçekleşirken, bunun yaklaşık %2'sine karşılık gelen 8 milyon ton plastik, atık olarak denizlere ulaşmaktadır. Bu büyük miktardaki atığın sadece %1'lik kısmı deniz yüzeyine çıkarken, %0,5'i okyanus akıntılarının meydana getirdiği

girdaplarda toplanmaktadır. Geri kalan kısmının ise ne olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu açığa çıkarılmış ve adına mikroplastik denilmiştir.[4].

Mikroplastiklerin oluşumu incelediğinde birçok fiziksel ve çevresel etkenin oluşum süreci içerisinde yer aldığı görülmüştür. Plastik üreticileri ve/veya özellikle tek kullanımlık plastiklerin yoğun olarak tüketiminin artmasıyla beraber, insan faaliyetleri sonucu denizlere/okyanuslara ulaşan plastik atıklar, degradasyon, hidroliz ve mikrobiyolojik aktivite sonucu mikroplastiklere dönüşür. Yapılan çalışmalarla, sucuk organizmaların mikroplastiklere maruz kalmasıyla ağız ya da solungaç yoluyla bu maddeleri sindirim sistemine aldıkları tespit edilmiştir. Yutulma veya soluma yoluyla vücuda alınan mikroplastiklerin dolaşım sistemine katıldığı ve sucuk canlılarda lethal etkilerine ek olarak göç ve hareket kabiliyeti bozulmasına, vücut ağırlığının azalmasına, açlık hissi kaybına ve sindirimde azalma gibi sublethal etkilere neden olabileceği de gözlemlenmiştir [5].

Bu nedenle, canlılar üzerine etkileri konusunda sınırlı bilgi bulunan mikroplastikler son yıllarda güncel bir konu haline almıştır. Mikroplastiklerin tanımlanması, etkileri ve giderilmesi konusunda birçok çalışma yürütölmektedir. Bu çalışma ile, kendisi de bir plastik olan ve kemik çimentosu olarak insan vücudunda kullanılan Polimetilmetakrilat (PMMA) polimerinden elde edilen mikroplastiklerin çevresel etki açısından sucuk toksikolojisinin değerlendirilmesi ve mikroplastiklere ilişkin toksikolojik verilere katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Plastik Malzemeler

2.1.1. Plastik nedir?

Plastikler, petrol ve petrol türevli yan ürünlerin yani hidrokarbonların kullanılmasıyla elde edilen aslında fosil kökenli uzun karbon zincirlerine sahip polimerik malzemelerin bir türünün genel adıdır. Bir başka deyişle, monomerler kimyasal reaksiyon dizisi ile birbirine bağlanarak polimerlere dönüşür yani plastikler elde edilir. Plastikler, özelliklerine göre termoset ve termoplastik olarak iki grup altında toplanır. Termoplastikler ısı verilince yumuşar ve soğutulunca tekrar sertleşir ve bu işlem sırasında özelliklerini korur, termosetlerse ısı verilip şekillendirildikten sonra tekrar eski özelliklerini kazanamaz, kimyasal olarak yapıları ısınma sırasında değişir ve uzun karbon zincirleri üç boyutlu bağ olarak yeniden organize olurlar [1].

Çizelge 2.1. Termoplastik ve termoset malzemeler

Termoplastik Malzemeler	Termoset Malzemeler
Polietilen (PE), Polipropilen (PP)	Epoksi reçineler, Vinil ester
Polivinil klorür (PVC), Polietilen Tereftalat (PET), Poli metil metakrilat (PMMA)	Silikon, Melamin reçinesi, Doymamış polyester
Poliamidler (PA), Polikarbonat (PC)	Fenolik reçineler, Akrilik reçineler
Genişletilmiş polistiren (EPS), Polistiren (PS)	Poliüretan (PUR), Üre- formaldeyhde
Floropolimerler, Poliarilsülfon (PSU), ABS	

Polimerik malzemeler sahip olduğu özelliklere ek olarak ucuz olmaları, modifiye edilebilme kapasiteleri, başka malzemelerle çeşitli oranlarda karıştırılarak kullanılması gibi ek faydaları nedeniyle, günümüzde çok yaygın şekilde birçok imalat sektörü tarafından tercih edilirler. Plastikler, ahşap, kâğıt, metal, cam, pamuk, yün, ipek ve kauçuk gibi doğal yollardan el edilebilen birçok maddenin yerine alarak, insanlar tarafından hayatlarının vazgeçilmez bir parçası olarak görülmektedirler. En yaygın olarak kullanılan plastik malzemeler Polietilen (PE) ve Polipropilen (PP)'dir. Bu ve benzeri polimerik malzemelerden üretilen plastikler, ambalaj, yapı malzemeleri, otomobil parçaları, elektronik aletler, ev eşyaları, ısı yalıtımı ve

giysilerde ve birçok sektörde yani günlük hayatımızda yeri olan birçok eşyada kullanılmaktadır [1].

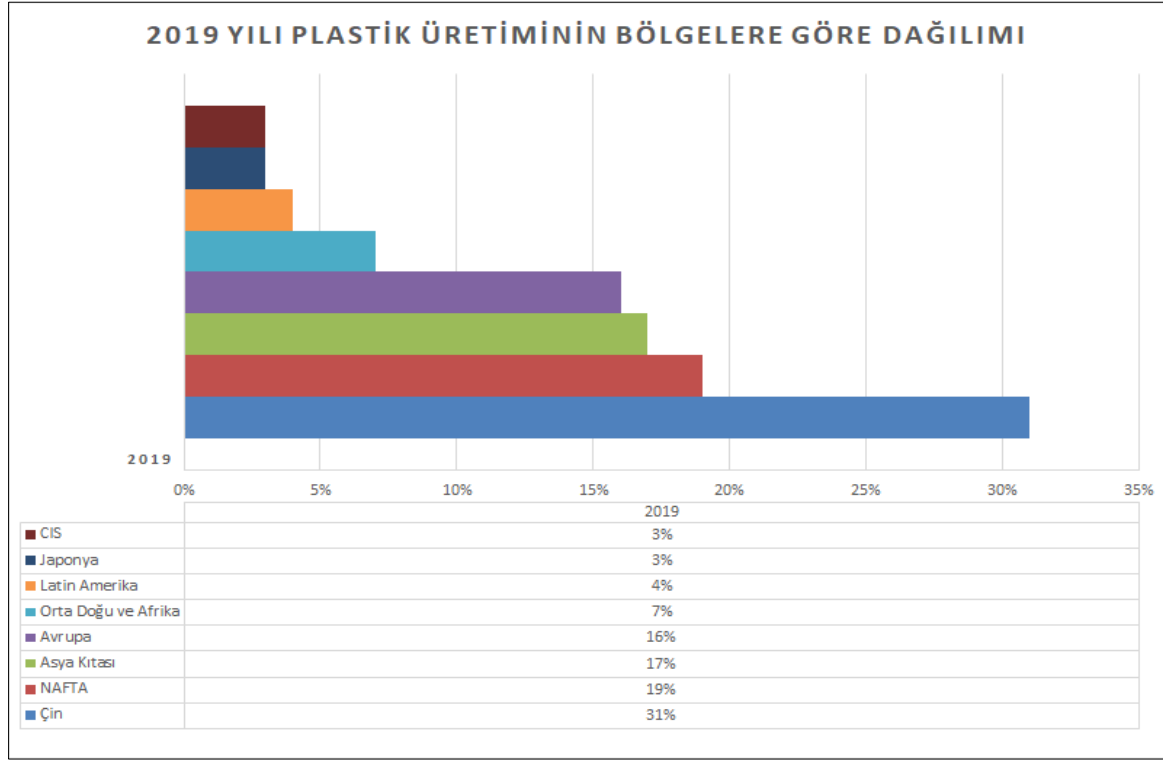
2.1.2. Dünyada plastik üretimi

Sanayi devrimiyle beraber ilk olarak üretilen ancak ticari olarak başarısız olan plastik yarı sentetiktir. 1868 yılında İngiliz Kimyacı Alexander Parkes tarafından, pamuk artıklarından elde edilen bu malzeme selüloz kökenlidir. Başarısız olan bu malzeme daha sonraki yıllarda, ABD’li matbaacı John Wesley Hyatt tarafından geliştirilmiş ve gözlük çerçeveleri, taraklar, bilardo topları, bıçak ve fotoğraf filmi gibi birçok ürünün yapımında kullanılmıştır [1].

Plastik üretimi ve sanayileşmesi aslında 1900’lü yılların başında Leo Hendrik Baekeland tarafından, ilk sentetik plastiğin üretilmesiyle Amerika Birleşik Devletleri’nde (U.S.) başlamıştır. Baekeland tamamen sentetik olarak uçucu kimyasalları kullanarak çok sert ve koyu renkli bir plastik olan bakaliti keşfetmiştir. Ürettiği bu malzeme, yanmayan, erimeyen, bilinen hiçbir çözücüyle çözünmeyen ve sertleştikten sonra değişmeyen bir malzemedir. 1922 yılına gelindiğinde, Herman Staudinger plastiklerin aslında küçük moleküller bir araya gelip organize olmasıyla oluşan dev moleküller veya polimerler olduğunu ortaya koymuştur. Her bir monomer kovalent bağ ile birbirine bağlanarak zincir şeklindeki dev makro molekülleri meydana getirdiğini keşfetmiştir. Benzer monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan makro moleküllere polimer ve yine benzer monomerlerin birbirlerine zincir şekilde bağlanması da polimerizasyon reaksiyonu olarak adlandırılmıştır. Polimerizasyon işlemi ile sanayi hızla gelişmiş ve 1927’de Selüloz Asetat ve Polivinil Klorür (PVC), 1928’de Polimetilmetakrilat (PMMA), 1929’de üre-formaldehit reçineleri üretilmiştir. Devam eden yıllarda, 1932 yılında Polietilen (PE) 1934 yılında naylon, Poliakrilonitril, Stiren-akrilonitril ve Polivinil Asetat, 1937’de Poliüretan, 1939 yılında teflon üretilmiştir [1].

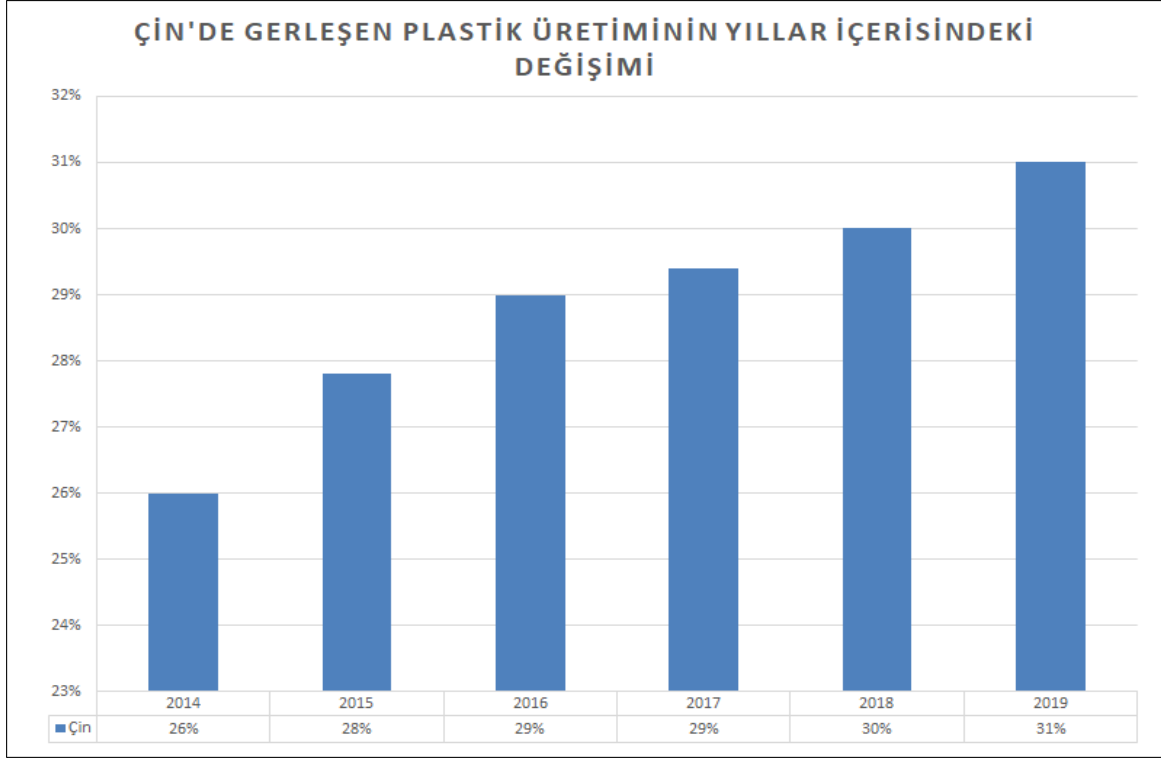
1868 yılında ilk defa üretilen, 1950’li yıllarda 1,5 milyon ton olarak gerçekleşen plastik üretimi 2019 yılı itibarıyla dünya genelinde 368 milyon tona ulaşmıştır. Günümüzde, plastik sanayi dünyada büyük bir pazara sahip olur hale gelmiştir. Başlıca üretici ve tüketicileri arasında Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Güneydoğu Asya ülkeleri yer almaktadır. Gerçekleşen üretimin bölgelere göre dağılımına bakıldığında (Şekil 2.1.), en büyük üreticinin Çin Halk Cumhuriyeti olduğu görülmektedir. Bu ülkeyi, %19’luk üretim payıyla NAFTA ülkeleri, %17 ile Çin Halk Cumhuriyeti dışında kalan Asya Kıtası ülkeleri ve

%16'lık üretim payıyla Avrupa ülkeleri takip etmektedir. Bir başka deyişle, dünyada üretilen plastiğin yaklaşık %90'ını Amerika, Çin, Kanada, Almanya gibi ülkelerin içerisinde yer aldığı sanayisi gelişmiş ülkeler üretmektedir [2].



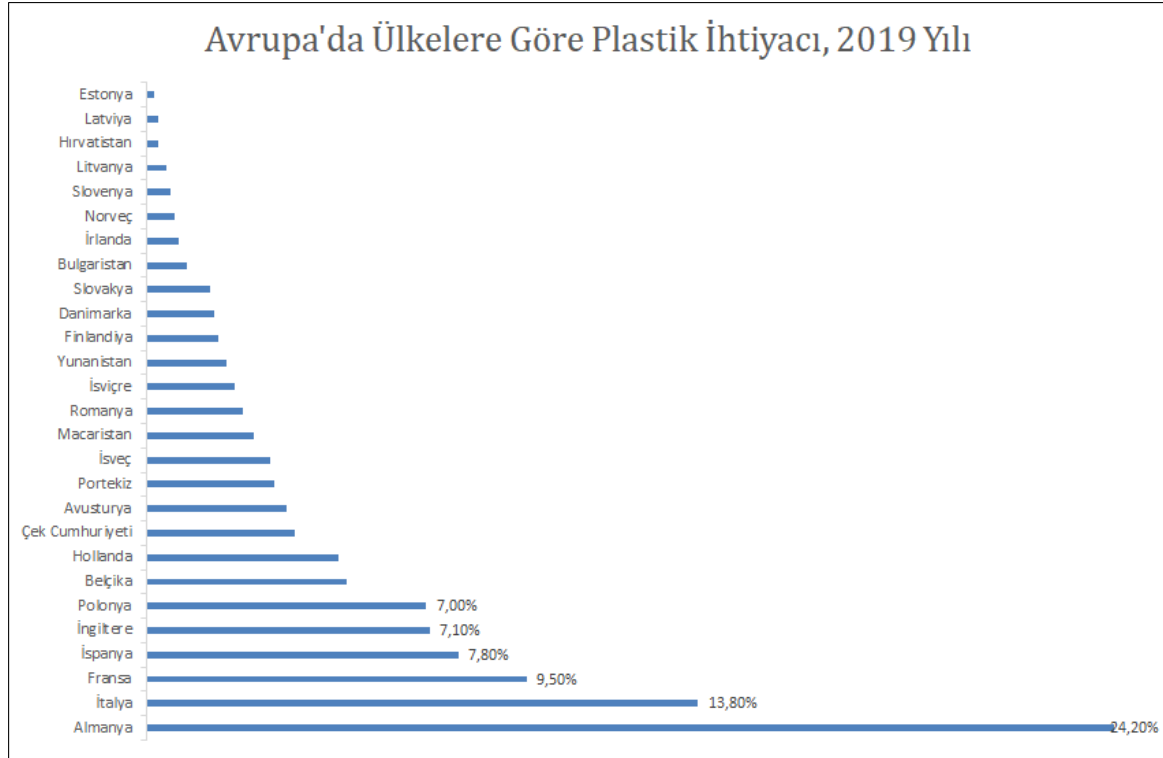
Şekil 2.1. 2019 yılı plastik üretimin bölgelere göre dağılımı [2]

Dünya genelinde plastik üretiminde en çok pay sahibi olan ülke Çin Halk Cumhuriyetidir. Çin Halk Cumhuriyeti her yıl minimum %1 oranında plastik üretimini artırmaktadır. 2015 yılında üretimdeki payı %26 olan bu ülke, 2019 yılına gelindiğinde payını %31'e yükseltmiştir [2].



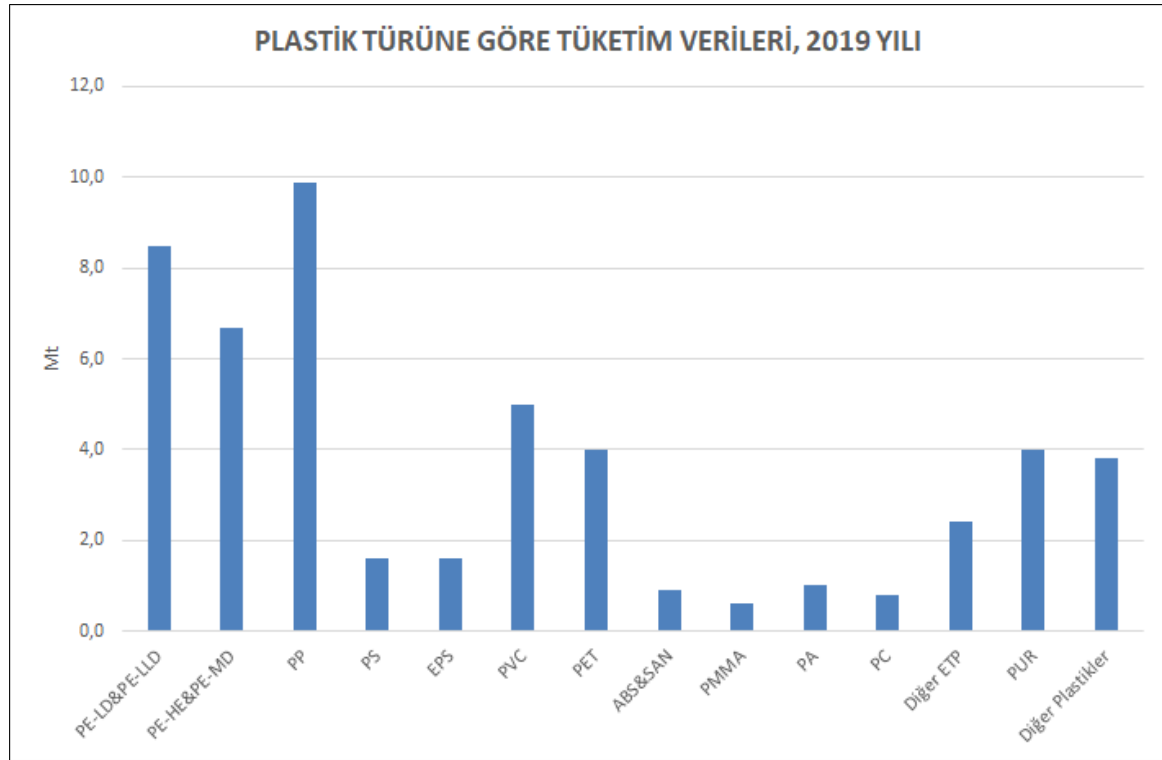
Şekil 2.2. Çin’de gerçekleşen plastik üretiminin yıllar içerisindeki değişimi [2]

Avrupa ülkelerindeki duruma baktığımızda, plastik üreticisi açısından Almaya, İtalya, Fransa ve İspanya başta gelmektedir. 2019 yılı içerisinde, 57,9 milyon ton üretim gerçekleştiren Avrupa ülkeleri 50,7 milyon ton plastik tüketimi gerçekleştirmiştir. Tüketilen bu plastik malzemenin, %39,6’sı paketlemede, %20,4’ü inşaat sektöründe, %9,6’sı otomobil üretiminde, %6,2’si elektrik ve elektronik ürünlerde, %4,1’i ev eşyaları ve spor giyimde, %3,4’ü tarımda ve geri kalan %16,7’si çeşitli üretim sektörlerinde tüketilmiştir [3].

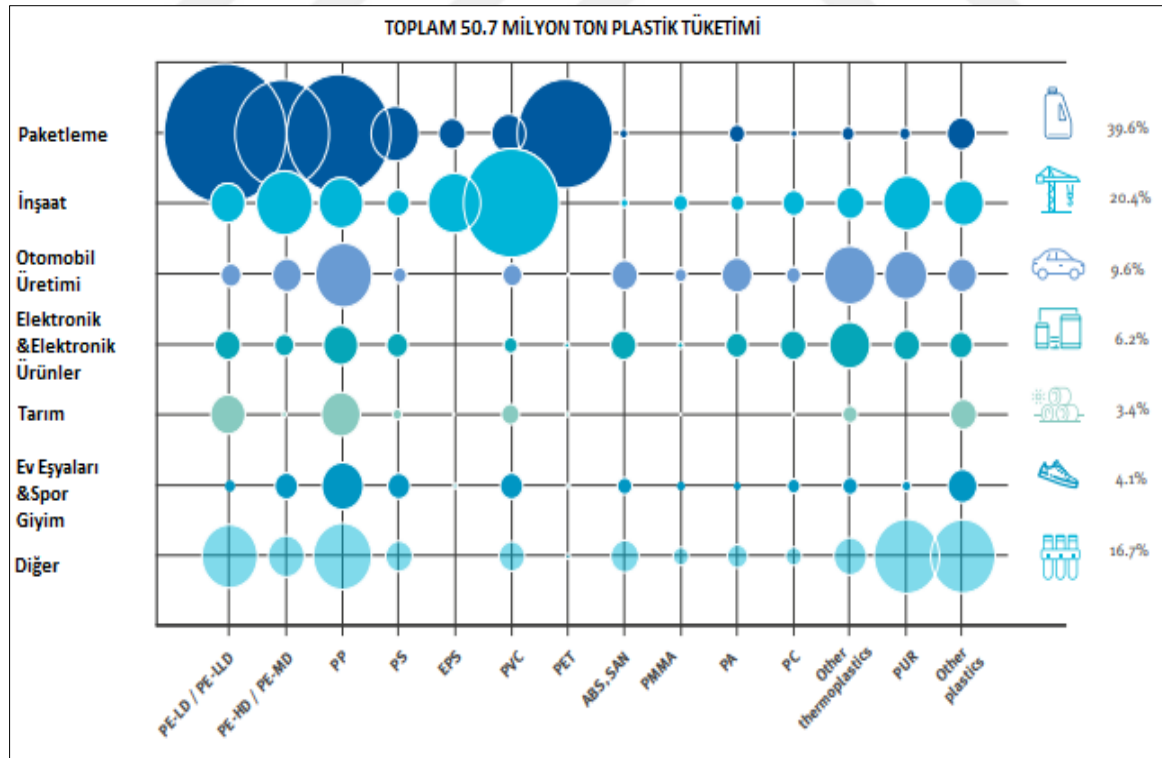


Şekil 2.3. 2019 yılında Avrupa ülkelerindeki plastik ihtiyacı [3]

Plastik malzemeler tüketiciye sunmuş olduğu özelliklere göre sektörel olarak kullanım göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında, poliolefin türü yani polietilen (PE) ve polipropilen (PP) gibi plastik malzemeler daha çok paketlenme sanayi tarafından tercih edilirken, inşaat sektöründe polivinilklorür (PVC) malzemesi, PP ve PE'nin yerini almaktadır. Bunun dışında, iyi bir yalıtım malzeme olan poliüretan (PU) hem otomotiv üretim hem de inşaat sektöründe tercih edilen bir plastik türüdür. Polistiren (PS) malzemesinin yıllık tüketimi 1,5 milyon ton seviyelerinde, yine polistirenin bir türü olan EPS (expandable Polistiren) plastik malzemesinin yıllık tüketimi 1,6 milyon ton seviyelerindedir. Aralarında polimetilmetakrilat (PMMA) polimerinde olduğu yaklaşık 3,5 milyon ton plastik malzemeyse, optik fiber, kontak lens, implant, membran, koruyucu kıyafet, havacılık endüstrisi, kablo kaplama gibi sektörlerde kullanılmıştır. Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te detaylı olarak plastik malzemelerin 2019 yılı kullanım miktarları ve sektörel dağılımları verilmiştir [3].



Şekil 2.4. 2019 yılında Avrupa’da tüketilen plastiklerin kullanım oranları [3]

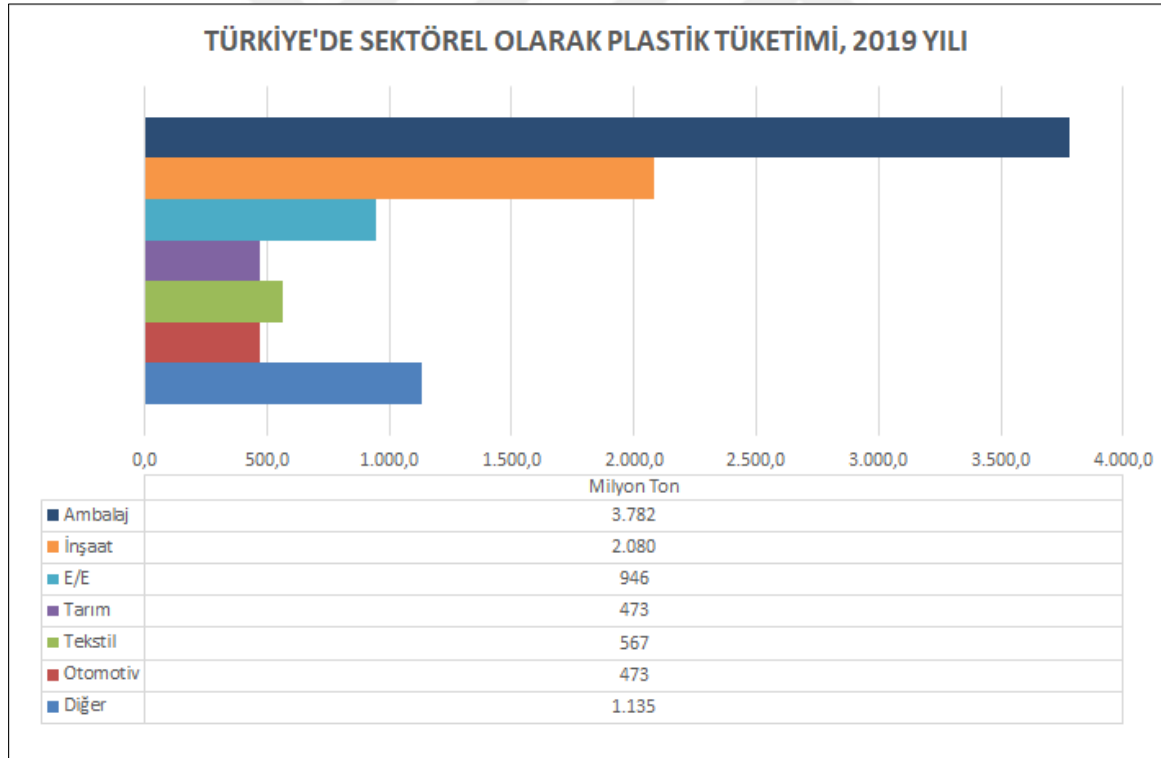


Şekil 2.5. 2019 yılında tüketilen plastik çeşitlerinin sektörel kullanım oranları [3]

2.1.3. Türkiye’de plastik üretimi

Plastik üretiminin geçmişi ülkemizde 1960’lı yıllara kadar uzanmaktadır. Sanayileşme ve büyüme açısından özellikle 80’li ve 90’lı yıllarda atılım gösteren bu sektör, 2000’li yıllara geldiğinde ciddi bir mesafe kaydetmiştir. Plastik üretimi son 5 yıl içerisinde düzenli olarak artarak 2019 yılında 9,46 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Şekil 2.6.). Bu miktar 2019 yılında dünyada üretilen plastik miktarının yaklaşık olarak %2,57’sine karşılık gelmektedir [1,4].

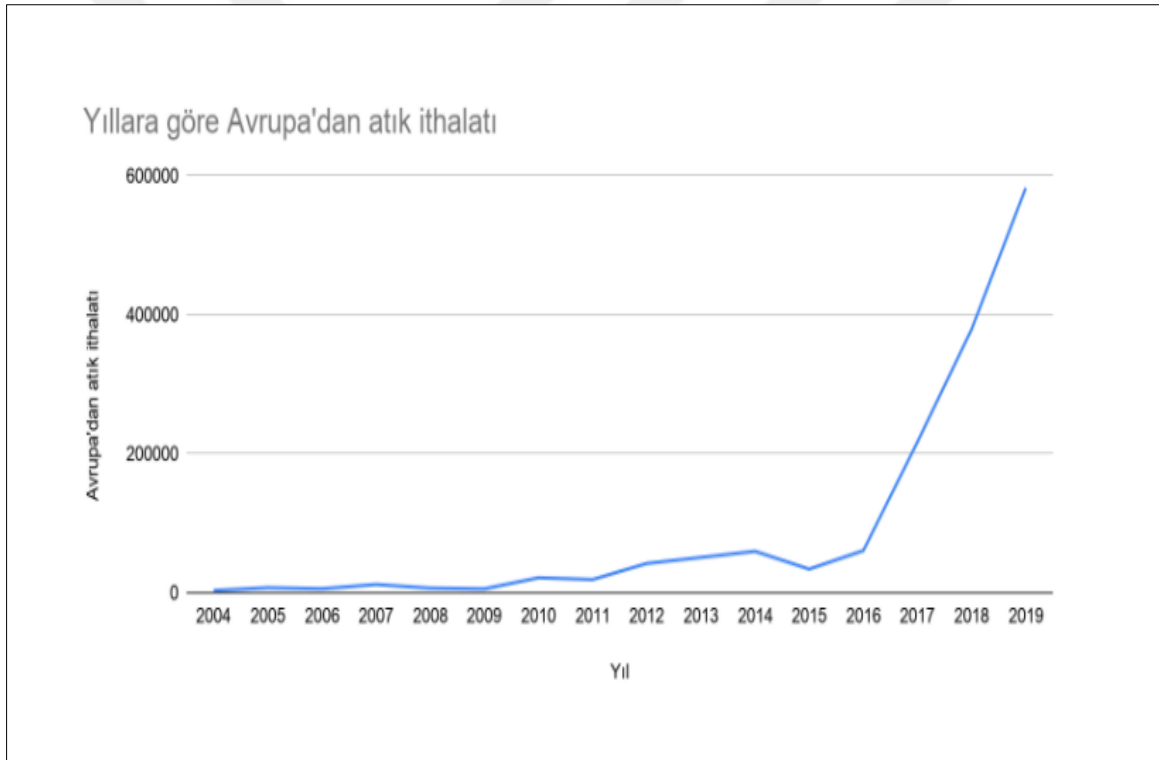
Türkiye’de üretilen plastik malzemelerin, sektörel olarak tüketim verilerine baktığımızda, dünyada olduğu gibi en çok tüketim 3,782 milyon ton ile ambalaj sanayinde gerçekleşmiştir. Bu sektörü sırasıyla, 2,080 milyon ton ile inşaat sektörü, 946 bin ton ile elektrik elektronik sektörü ve 567 milyon ton tüketimle tarım sektörü takip etmektedir [4].



Şekil 2.6. 2019 yılında Türkiye’de tüketilen plastik çeşitlerinin sektörel kullanım miktarları [4]

Ülkemizde özellikle son yıllarda plastik atıkları kullanarak yapılan üretimde ciddi bir artış meydana gelmiştir. Bu artışın en önemli nedenleri arasında, 1992 yılından bu yana dünyadaki plastik atıkların yaklaşık %45’ni alan Çin Halk Cumhuriyeti’nin 2018 yılında

aldığı karar doğrultusunda artık plastik atıkların ithalatını yasaklamasıdır. Eurostat verilerine göre 2019 yılında Türkiye'nin Avrupa ülkelerinden ithal ettiği atığın toplam miktarı 14 milyon ton iken bu miktarın 582 bin tonu plastik atıktır. 2004-2019 yılları arasında yapılan plastik atık ithalatı verilerine baktığımızda, ithalatın 173 kat arttığı görülmektedir. Türkiye'ye günde yaklaşık olarak 213 kamyon plastik atık getirilmektedir. Bu miktar yaklaşık olarak ayda 48.500 ton atığın ülkemize getirildiği anlamını taşımaktadır. 2016 yılı başında aylık ithal edilen plastik atık miktarı, 4.000 ton, 2018 yılındaysa aylık 33.000 ton olarak gerçekleşmiştir. Çin'in plastik atık ithalatını yasaklayan karar ile, ülkemize gelen plastik atık miktarında ciddi bir artış meydana gelmiştir. Şekil 2.7.'de Türkiye'nin plastik atık ithalatının yıllar içerisinde değişimi görülebilir [5, 6].



Şekil 2.7. Türkiye'nin plastik atık ithalatının yıllar içerisinde değişimi [5]

2.2. Plastik Atıklar

Plastik küresel olarak insan yaşamının bir parçası haline alarak, temel ihtiyaç olarak görülen bir konuma erişmiştir. 1950'li yıllarda 2 milyon ton olan üretim, 2015 yılına gelindiğinde 322 milyon tona ulaşmıştır. Bu, geçen 65 yıl içerisinde toplamda 8,3 milyar ton plastik üretilmesi anlamı taşımaktadır. Plastik kalıplanabilir olması, ucuz, hafif ve dayanıklı olması nedeniyle çok kullanışlı bir malzemedir ve %40'lık tüketim oranıyla paketlenme en önemli

kullanım sektörüdür. Paketleme açısından bakıldığında, plastik şirketlere çekici görünen ve çekici hissettiren paketler tasarlamasına imkân vererek şirketlerin etkili bir şekilde pazarlama yapmalarına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, plastik ambalaj, yiyecek, içecek ve tütün ürünlerinde yalnızca bir kez kullanılır ve küresel anlamda kıyı çöplüğünün %61'inin oluşmasına katkı sağlar [7].

Giderek ve sürekli artan insan faaliyetlerinin neden olduğu kirlilik kıyı ve deniz alanlarını giderek baskı altında bırakmaktadır. Pestisitler, kalıcı organik kirleticiler (POPs), hidrokarbonlar, ağır metaller, plastikler ve mikroplastikler gibi kirleticiler deniz ekosisteminde geri dönüşü olmayan hasarlara sebep olmaktadır. Kıyı alanlarının yüksek dinamik doğası, bitişik denizlerin oşinografik özellikleri ile tatlı su ortamlarının, haliçlerin ve lagünlerin fizikokimyasal özelliklerini oluşturur. Bu nedenle, kıyı ve deniz ortamlarının kirlenmesi ekotoksikoloji ve çevre yönetimindeki en karmaşık ve güncel konulardan biridir. Deniz çöprü, esas olarak atık yönetimi uygulamalarındaki eksiklikler nedeniyle karadaki faaliyetler kaynaklı olarak ortaya çıkmış, biyolojik ve ekolojik etkilerinin neden olduğu sonuçlar giderek artmış ve küresel sorunu halini almıştır [8].

Plastikler deniz çöpünün yaklaşık olarak %80 ila %85'ini oluşturur [5]. Plastik üretimi son 70 yıl içerisinde, 1,5 milyon tondan 369 milyon ton seviyelerine ulaşırken, üretimdeki bu artışa paralel olarak, şehir atıklarının en hızlı büyüyen bölümü halini almıştır [2, 5]. Yapılan çalışmalar, bu artışın yıllar içerisinde hız kesmeden devam edeceği, üretim trendleri ve tüketici kullanım davranışları incelendiğinde görülmektedir. Üretimdeki olağan üstü artışa rağmen, üretilen plastik malzemelerin yalnızca %5'i geri kazanılmıştır ve geri kazanılmayan plastiklerse denizlerde atık olarak birikmiştir [8].

Plastik atıklar, plastiklerin kullanım miktarının artması ve geri kazanımları konusunda yaşanan aksaklıklar nedeniyle, gezegenimizdeki tüm ekosistemler için ana kirletici unsur halini almış ve ayrıca giderek küçülebilen yapısı nedeniyle yaban hayata ve insan sağlığı üzerine potansiyel etkileri endişe yaratmaya başlamıştır. Ayrıca, plastik kullanımı giderek artarken, katı atık yönetim sistemiyle küresel olarak üretimdeki bu artışa tepki verilememiştir. Bunun sonucu olarak, plastik ambalajlar ve tek kullanımlık plastik ürünler, kullanımından hemen sonra atık akışına dahil olarak, dünya çapında üretilen toplam 6,3 milyar ton plastik atığa eklenerek katkı vermeye devam etmektedir. 2010 yılında Dünya Bankasının atık yönetimi verileri kullanılarak yapılan bir çalışmada, karada üretilen plastik

atıkların yaklaşık olarak 4,8 ila 12,7 milyon tonunun deniz çöprü olarak okyanuslara verildiği tahmin edilmiştir. Bu çalışma sonrasında, dünya genelinde yıllık olarak 8 milyon ton plastik çöprün denizlere verildiği kabulü yapılmıştır [7, 9].

Birleşmiş Milletler Çevre Programı raporuna göre, açık denizlerde kilometre de 13 bin plastik çöp bulunmaktadır ve bu denizlerdeki akıntılar nedeniyle dünyanın her noktasına çöplerin doğal yollarla taşınması gerçekleşmektedir. Plastik atıklar sahip oldukları özellikler nedeniyle, örneğin ultraviyole ışın dayanımlarının yüksek olması ve bakteriler tarafından sindirilememeleri, yüzyıllar boyunca bozulmadan denizlerde kalmaya devam edebilmektedir. Denizlerde sıklıkla rastlanan plastik atıklardan, misina 600 yılda, plastik şişe ve çocuk bezi 450 yılda, ayakkabı tabanları 50-80 yılda, naylondan imal edilmiş kumaşlar 30-40 yılda ve plastik poşetler 10-20 yıl boyunca varlıkları sürdürüp, doğal yollarla bozulmamaktadır [10].

Dünya Doğayı Koruma Vakfı (WWF) tarafından 2019 yılında yayınlanan rapora göre, gezegenimizde bugüne kadar üretilen plastiklerin %75'i halihazırda atığa dönüşmüş durumdadır. Bu atık miktarının yarısı 2000 yılından sonra üretilen plastiklerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, denizlerdeki plastik atıkların %80'inin karadaki kaynaklardan geldiği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, dünya genelinde kişi başı üretim miktarı 53 kg'dır. Bu miktar plastik malzemeyi üretmek için atmosfere yaklaşık olarak 2 milyon ton CO₂ gazı salınmıştır [11].

Bir plastik şişenin meydana getirmek için kendi hacminin 1/4'ünün aldığı kadar fosil kökenli hammadde kullanılması gerekir. Bu hammadde şişeyi üretmek için kullanılacak olan plastik palet malzemelere dönüştürülür. Isıtma, şekillendirme, sterilizasyon ve kapak kapatma işlemleri sırasında, bir adet plastik şişeyi üretmek için kendi hacminin üç katı kadar su kullanılması gerekir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansına (EPA) göre, üretilen plastik şişelerin kabaca %10-%27'si geri dönüştürülürken, geri kalanı 500 yıllık bir bozunum sürecine dahil olmaları için karasal alanlara bırakılmaktadır. Geri dönüştürülebilen plastik atığın çok küçük bir kısmı yeniden işlenerek çeşitli amaçlarla kullanılırken, geri dönüştürülemeyen plastik atıkların büyük çoğunluğu deniz ve okyanuslara karışmaktadır [12].

2.3. Mikroplastikler

Karasal ve sucul ekosistemler, plastik atıklardan ciddi anlamda etkilenecek, toprak ve suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak değişmesine sebep olmaktadır. Bu değişimler neticesinde ortaya çıkan ekolojik sorunlarla beraber, canlıların hayatlarını sürdürmeleri de giderek zorlaşmaktadır. Plastik atıkların çevreye yayılımları ve ekolojik etkileri araştırıldığında, dünyanın en derin noktası olan Mariana Çukuru ve yaşamın olmadığı ıssız adamlarda dahi, mikroplastik izlerine rastlanmış ve çevresel etkileri gözlenmiştir. Mikroplastik (MP) çapı 5 mm'den küçük olan plastik parçaların genel adı olarak tanımlanabilir. Plastik parçalar literatürde beş farklı kategori altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla, plastik parçacığın çapı eğer 1nm-1mm arasındaysa nanoplastik, 1mm-5mm arasındaysa mikroplastik, 5mm-20mm arasındaysa mezoplastik, 20mm-100mm arasındaysa makroplastik ve son olarak 100mm'den büyükse megaplastik olarak adlandırılırlar. Mikroplastiklerse, büyüklüklerine göre, küçük mikroplastikler çapı 1mm'den küçük olanlar, büyük mikroplastikler çapı 2-5mm arasında olanlar olarak iki grup altında incelenir. Bunun yanı sıra, mikroplastiklerin sadece boyutsal olarak değil, aynı zamanda üretiminde kullanılan hammaddelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri de göz önünde bulundurularak tanımlanması yapılmıştır. Bu tanıma göre, "Mikroplastikler, suda çözünmeyen, birincil ve ikincil üretim kaynaklı, 1nm-5mm arasında değişen çaplara sahip, düzenli ve düzensiz şekilli olan herhangi bir sentetik katı parçacık veya polimerik matrislerdir". Çapları ne olursa olsun, şüphesiz ki bu plastik atıkların en ciddi etkileri sucul ekosistem üzerine olmuştur ve olmaktadır. Suyu göre yoğunlukları düşük olduğundan, su yüzeyine ve yüzeğe yakın olarak biriken bu atıklar, suların rengini bulandırmakta ve ışığın derinlere ulaşımını etkilemektedir. Bunun sonucu olarak da su kalite parametreleri etkilenebilmektedir. Su kalite parametreleri plastiklerin bu etkilerine ek olarak, plastik parçaların zaman içerisinde kimyasal ve fiziksel etkenler sonucunda bozulması sonucunda, toksik ve kimyasal maddelerin suya geçmesine sonucunda da değişmektedir. Bu etkilere paralel olarak, yapılan bazı araştırmalar da nano-plastik ve mikroplastiklerin soluma ve yutulma yoluyla canlı vücuduna girmesi sonucunda, bağışıklık sisteminin tepki vererek, toksit etkenlere neden olduğu görülmüştür [13].

Sürekli olarak artan plastik ihtiyacının kaçınılmaz bir sonu olarak, plastik atıklarda ciddi bir artış meydana gelmiştir. Bu birincil atığın abiyotik faktörlerden olan UV ve deniz dalgalarının etkileri altında parçalanmasıyla beraber ikincil plastik atık kaynakları ortaya çıkmaktadır.. Okyanuslardaki hem birincil hem de ikincil kaynaklı plastik atıkların toplam

miktarının 5 trilyondan daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, plastik maddelere üretim aşamasında farklı özellikler kazandırmak amacıyla çeşitli kimyasallarda katılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, mikroplastiklerin aslında çok karmaşık yapıları mevcuttur [14].

Son yıllarda yapılan birçok araştırmada, genel anlamda plastik atıklar ve özellikle de mikroplastikler, deniz ve tatlı su sistemlerindeki tortularda, topraklarda, su kolonlarında ve yüzey katmanlarında başka bir deyişle ekosistemi oluşturan tüm birimlerde tespit edilmiştir. Plastik ürünlerin ve boyaların aşınması, yanlış yönetilen ya da yönetilemeyen plastik atıkların parçalanması, atılan veya kaybolan balıkçılık ekipmanları ve tekstil ürünlerinde kullanılan mikroplastik lifleri deniz ve okyanus ekosistemindeki plastik atık kaynaklarındandır. Deniz ekosistemi temelli yapılan çalışmalarda, balıkların, kuşların ve omurgasızların makro ve mikro ölçekteki bu plastik atıkları yuttukları da görülmüştür. Ayrıca, yine bu çalışmalarla, 800'den fazla türün deniz çöpünden etkilendiği tespit edilmiştir. Bununla paralel olarak, insanlar tarafından tüketilen kabuklu deniz canlılarıyla, balıklarda ve musluk suyu, şişelenmiş su, şeker, tuz ve balda da mikroplastik olduğu tespit edilmiştir [15].

Nehir ağzı sistemleri ve endüstrileşmiş sahil bölgeleri, bu ortamlara atılan ve işlendikten sonra bırakılan deniz çöplerinin %70'ten fazlasını barındırmaktadır. Bozulma dirençlerine bağlı olmakla birlikte, mikroplastikler (çapı 5mm'den küçük) ve nano-plastikler (çapı 100 nm'den küçük) fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bozulma etkenlerine bağlı olarak açığa çıkmaktadır. Günümüzde etkisini artırarak devam eden bu kirlilik türü, artık kutup bölgeleri dahil etkisini de giderek daha da fazla göstermektedir. Bu kirliletiçi türünün yayılma hızına paralel olarak, bozulma ve parçalanmayla beraber mikro ve nanoplastiklerin yapısını oluşturan, monomer ve dimerler ile boyar maddeler ve plastikleştirici kimyasallar da sucul ortama verilir. Nanilfenol (NP), bisfenol A (BPA), polibromlu difenil eter (PBDE) ve fatalik asit esterler (PAEs) gibi zararları ispatlanmış kimyasal bileşikler bu tür maddelere örnek olarak gösterilebilir. Bu parçacıkların çevreye fiziksel ve kimyasal olarak etkilemelerine ek olarak, sahip oldukları başka bir özellikleri daha vardır. Mikroplastik ve nano-plastik parçacıklar yüksek yüzey alanları ve hidrofobik yapıları sayesinde, mikropları ve ağır metal ve sucul ve karasal ortam için zararlı olan organik maddeleri absorbe ederek yapılarında konsantre etmektedirler [16].

Deniz ve okyanus biyoçeşitliliği açısından çok büyük bir tehlike oluşturan mikroplastikler, son on beş yıl içerisinde ortaya atılan bir kavram olup, çevreyi kirletici maddeler arasında yerini almıştır. Mikroplastiklerin kimyasal yapısı, polimer yapısı ve diğer kimyasal çözücülere olan ilgisine göre farklı toksisite kademelerine ve farklı toksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, Polistiren (PS), Polivinilklorür (PVC), Polietilenterafالات (PET) ve Polietilen (PE) malzemelerinin mikro-plastik parçacıkları kullanılarak tatlı su istiridyeleriyle bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucuna göre, PS ve PVC mikroplastiklerine maruz kalan tatlı su istiridyeleri, PET ve PE mikroplastiklerine maruz kalan tatlı su istiridyelerine göre çok daha fazla histolojik anormallik göstermiştir. Buna ek olarak, sucul ortamdaki kimyasal kirleticilerin eğer ortamda mikroplastik parçacıklarda varsa, nasıl davrandığı ve etkilerinin neler olduğuna dair çeşitli canlılarla çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırma sonuçlarına göre, Japon pirinç balığı, Zebra balığı ve Avrupa Levrek balığının, mikroplastikler ve kimyasal kirleticilerin bir arada bulunması durumunda daha şiddetli olarak toksit etkiye maruz kaldığı tespit edilmiştir. Başka bir deyişle, mikroplastik parçacıklar kimyasal kirleticilere, kendi kimyasal yapısına bağlı olarak ilgi göstermekte ve bu maddeleri absorbe ederek bünyesine katmaktadır. Hem kendi toksik etkisi hem de absorbe ettiği kimyasal çözünün zararlı etkisi nedeniyle toksik bir kokteyl ortaya çıkmaktadır. Buda zararlı etkinin canlıda daha şiddetli görülmesi olarak karşımıza çıkmaktadır [17].

Polistiren (PS) ve Polimetilmetakrilat (PMMA) polimerleri kullanılarak üretilen plastik malzemeler günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu iki polimerin neden olduğu zararlı etkilerin araştırılması amacıyla da çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. PS ve PMMA polimerleri kullanılarak çeşitli çaplarda mikro-plastik parçacıklar hazırlanmış ve bu parçacıkların zararlı etkilerini görmek amacıyla embriyonal evrenin başındaki deniz kestaneleri çeşitli çaplardaki bu mikroplastiklere maruz bırakılmıştır. PS mikroplastiklerinin çapları 10 µm, 80 µm ve 230 µm olarak belirlenirken, PMMA mikroplastiklerinin çapları 10 µm ve 50 µm'dir. Çapları ne olursa olsun, mikroplastik maruziyeti sonucu deniz kestanelerinde sitogenetik anormalliklerde ciddi bir artış meydana gelmiştir. Ayrıca, bu canlıdan elde edilen sperm süspansiyonlarının dölleme kapasitesi ve kalitesi üzerine, mikroplastik maruziyetini takiben yürütülen çalışma göstermiştir ki spermlerin kalitesi olumsuz yönde etkilenmekte ve dölleme başarıları ciddi oranda azalmaktadır. Ayrıca, bu spermlerle döllen ve gelişen deniz kestanesi yavrularında önemli hasarlar ve anomaliler meydana geldiği görülmüştür [16]. Başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş

olup, 1-230 µm aralığında çapa sahip PS ve PMMA mikroplastiklerine maruz bırakılan deniz kestanesi spermalarının döllenme başarılarının ciddi oranda azaldığı ve döllenme başarılı olsa dahi, yavruların kalitesinin kötü yönde etkilendiği görülmüştür. Ayrıca, yine bu çalışmayla, PMMA mikroplastiklerinin deniz kestanesi larvalarını yuttuğu, PS mikroplastiklerininse bu özelliği taşımadığı görülmüştür [18].

Bu çalışma ile ilgili bir bağlantı/geçiş paragrafı (2-3 cümle)

2.4. Kemik Çimentosu

2.4.1. Kemik çimentosu nedir?

Akrilik asit ilk olarak 1843 yılında, Redtenbacher tarafından akrolein maddesinin gümüş nitratlı sulu ortamda oksidasyonu ile elde edilmiştir. 1865 yılında metakrilik asit akrilik asitten sentezlenmiştir. Takip eden yıllarda, metakrilik asit ve metanol kimyasallarının reaksiyonu sonucunda metilmetakrilat üretilmiştir.

1930’lu yıllarda Otto Röhm “Polymerisationsprodukte der Akrylsäure” adlı teziyle yani metakrilatların polimerleşmesi yöntemi hakkındaki teziyle kemik çimentosunun hazırlanması için gerekli olan temel maddeyi ortaya çıkarmıştır. Polymetilmetakrilat (PMMA) polimerinin laboratuvar koşullarında sentezlenmesi, yeni polimerlerin hızlı bir şekilde gelişiminin de önü açılmıştır. Bu süreç, adı Plexiglas olan şeffaf polimerin 1933 yılında metilmetakrilat monomeri kullanılarak üretilmesi ve ticari bir ürün olarak piyasa da yerini almasıyla sonuçlanmıştır. Bu nedenle bu kimyasalın, yani metilmetakrilat (MMA) monomerinin ve polymetilmetakrilat (PMMA) polimerinin, fiziksel ve kimyasal olarak özelliklerini tanımlayan ve kemik çimentosu olarak kullanılmasının önünü açan bilim insanı Otto Rohm’dür [19].

Kulzer firması 1936 yılında, PMMA tozu, sıvı metilmetakrilat ve ısı ile aktive olan başlatıcı kimyasalının karışımıyla ürettiği hamur için patent almıştır. Takip eden ilk on yıl içerisinde de yine Kulzer ve Degussa firmaları soğuk kürlenme yöntemiyle bir çimento geliştirmiştir. Üretilen bu çimento iskelet sisteminde meydana gelmiş çeşitli hasarların tamirinde kullanılmıştır. 1950’li yılların sonundaysa, Sir John Charnley kalça protezi ameliyatında, kendi kendine kürlen çimentoyu kullanarak yeni bir çağın önünü açmıştır [15]. Ayrıca,

Charney PMMA'dan üretilen kemik çimentosunun ilik boşluğunu çok kolay şekilde doldurabildiğini tespit etmiş ve kemik morfolojisiyle çok kolay şekilde karışım oluşturduğunun ilk olarak farkına varmış bilim insanıdır. Kendisinin öncü olduğu bu yeni yöntem halen günümüzde en çok kullanılan tekniklerden bir tanesidir. 1960 yıllarında sonunda da kemik çimentosu karışımının içerisine ayrıca antibiyotik eklenmiştir [20, 21].

Amerika Gıda ve İlaç Dairesi 1970 yılında aldığı karar doğrultusunda, kemik çimentosunun kalça ve diz protezi sabitleme ameliyatlarında kullanıma onay vermiştir. Bu tarihten itibaren, kemik çimentosunun kullanımı yaygınlaşmıştır [21].

2.4.2. Kemik çimentosu bileşimi

Kemik çimentosu denince ilk olarak Polymetilmetakrilat (PMMA) ile üretilmiş olanı akla gelmektedir. Bu kemik çimentosu 60 yıldan uzun bir süredir ortopedi alanında kullanılmaktadır. Öncelikle diş hekimliği alanında kullanılan bu madde, 1960'lı yıllarda kalça protezinde de yerini almaya başlanmıştır. Günümüzdeki kemik çimentosu, ilk yıllarındaki kompozisyonundan farklı olarak antibiyotikte içermektedir. Ayrıca, 1960'lı yıllarındaki ana yapısından çok farklılık göstermemekle birlikte, içerisine çeşitli üretim yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte farklı oran ve kombinasyonlarda çimento bileşenleri de eklenmiştir [22].

Kemik çimentosu hazırlanırken, temel iki bileşen olan sıvı monomer ve toz halindeki polimer toz/sıvı oranı 2:1 olacak şekilde karıştırılır. PMMA polimeri metilmetakrilat monomerinden üretilir. Metilmetakrilat (MMA) kaynama noktası 100 oC olan, berrak, renksiz, keskin kokuya sahip, yanıcı ve insan cildi için hafif tahriş edici bir maddedir. Su içerisinde çok az miktarda çözünür. Bazı kemik çimentoları, metakrilik asitin başka bir türevidir olan, daha keskin kokusu ve daha yüksek kaynama sıcaklığına sahip butil metakrilat monomeri de içerebilmektedir. Ticari olarak satılan çoğu kemik çimentosu başlatıcı (initiator) olarak benzil peroksit (BPO), aktivatör olarak dimetil-para-toluidin (DMpT) içerir. Ayrıca, kemik çimentosunun karışımının sıvı kısmının zaman içerisinde kendi kendine reaksiyon vererek polimerleşme yapmaması ve yeteri kadar bir raf ömrüne sahip olması için stabilizör olarak hidrokinon (HQ) eklenmektedir [20].

Kemik çimentosunun içeriğini oluşturan sıvı ve toz kısımları Çizelge 2.2’de verilmiştir [21,23].

Çizelge 2.2. Kemik çimentosunun içeriği

Toz Kısım	Sıvı Kısım
PMMA	MMA
BPO	DMPT
Ba ₂ SO ₄ veya ZrO ₂	HQ
Antibiyotik	

Kemik çimentosunun ana maddesi olan metilmetakrilat monomerinin fiziksel özellikleri Çizelge 2.3’de verilmiştir.

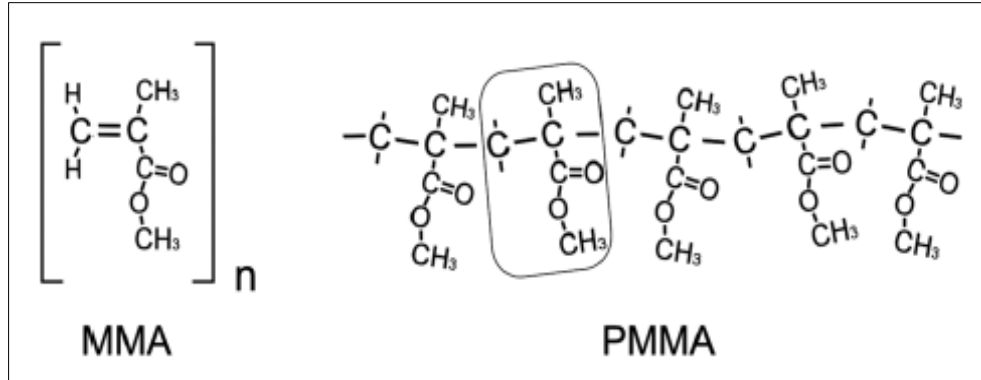
Çizelge 2.3. MMA monomerinin fiziksel özellikleri

Kaynama Noktası, °C	100,6
Erime Noktası, °C	-48
Özgül Ağırlık	0.940
Parlama Noktası, °C	8
Özgül Isı, J/gr/°C	2,05
Polimerleşme Isısı, kJ/mol	53,97

Metilmetakrilat (Şekil 2.8) çoğu organik çözücü ile çok kolay şekilde homojen bir çözelti oluşturabilir. Gliserin ve Etilen Glikol çözücülerinde ise kısmen çözünmektedir. Bu monomer, metilmetakrilat kullanılarak üretilmiş çoğu polimeri kolayca çözebilmektedir. Ancak, eğer polimer yüksek miktarda çapraz bağlantı içeriyorsa veya oldukça yüksek seviyede polimerleşme sonucu üretilmişse, metilmetakrilat monomerin de çözünmeyecektir [24].

Kemik çimentosunun bir başka bileşeni de Polymetilmetakrilat polimeridir. PMMA (Şekil 2.8), görece kırılğan ve en sert termoplastik polimerlerden biridir. Radikal polimerleşme yöntemi üretiminde kullanılan metottur. Günümüzde, Plexiglass, Degalan, Arkema ve Acrylite olarak bilinen en önemli ticari polimer ürünlerden bir tanesidir. Bu polimer, şekillendirmede açısından sunduğu çok yönlülük, sahip olduğu mükemmel seviyedeki

berraklık, ışık ve ısıya maruz kaldığındaki renk kararlılığı gibi birçok yararlı özelliğe sahiptir. Ayrıca orta derece ki yumuşama sıcaklığı ve cam benzeri sentetik bir plastik oluşuyla, mükemmel bir kombinasyon ortaya çıkarmaktadır. Başka bir özelliği ise, inorganik olarak üretilen cama kıyasla çizilmeye karşı ve aşınmaya karşı daha az dayanıklı olmasına rağmen, modifiye edilerek bu özellikleri ciddi oranda iyileştirilebilir [25].

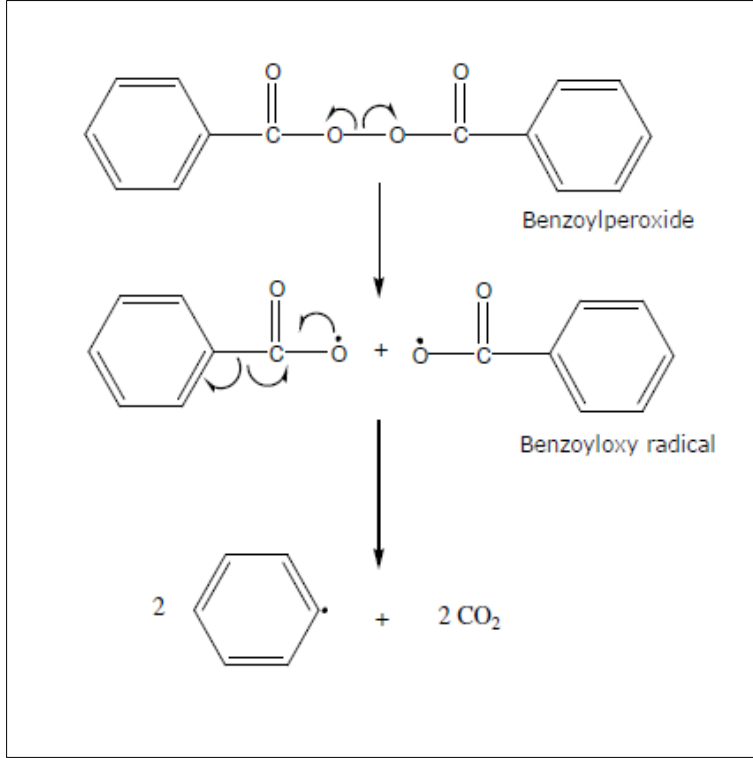


Şekil 2.8. PMMA polimerinin ve MMA monomerinin kimyasal yapısı

2.4.3. PMMA polimerleşme reaksiyonu

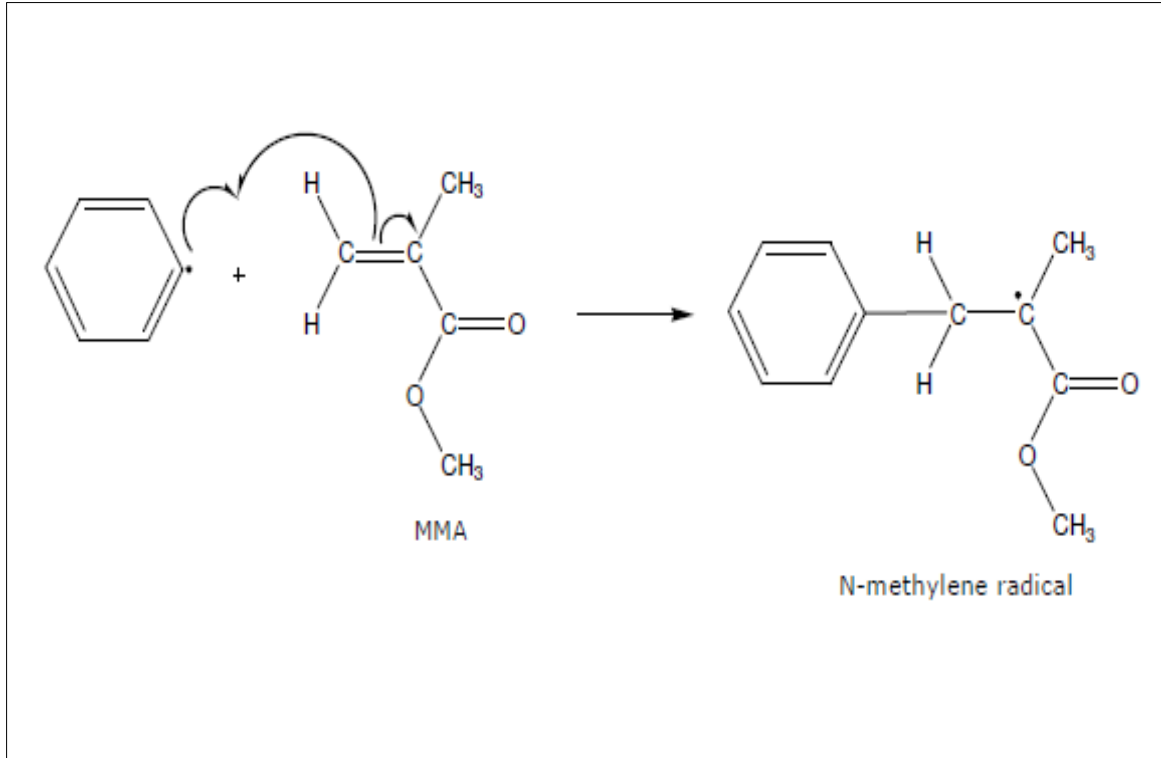
Ticari olarak farklı kompozisyonlarda ürünler olsa dahi, kemik çimentosu hazırlamada kullanılacak olan sıvı kısmın çoğunluğunu MMA monomeri ve toz kısmın çoğunluğunu da ön-polimer olan PMMA polimeri oluşturmaktadır. Polimerleşme reaksiyonunu başlatmak için genel olarak bir aktivatöre ihtiyaç duyulur. İlk olarak Toz kısımda yer alan, benzil peroksit (BPO) ile sıvı kısımda yer alan dimetil-para-toluidin (DMpT) reaksiyona girer. BPO ve DMPT bileşenlerinin reaksiyonu sonucu açığa çıkan fenil serbest radikali MMA monomerinin polimerleşme reaksiyonunu başlatır (Şekil 2.9.) [20,27].

Benzil peroksit zayıf O – O tekli bağından ayrılarak birbirinin benzeri iki parçacık oluşturur. Ayrılma sonucu oluşan Benzoyil Oksil parçacıkları, başlatıcı parçacıdır. Yapısında eşleşmemiş elektron bulanan moleküller serbest radikal olarak adlandırılır [28].



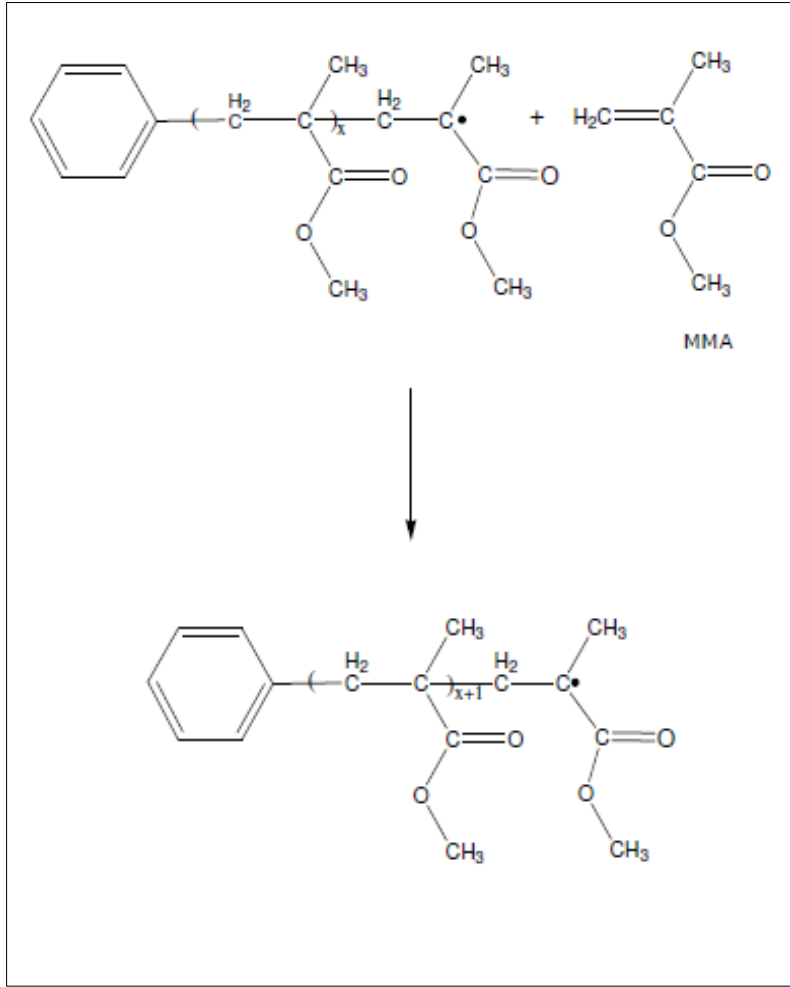
Şekil 2.9. Fenil serbest radikalının DMPT ve BPO reaksiyonu sonucu açığa çıkması [28]

Benzil serbest radikali, oldukça kararsız yapıdadır ve başka bir elektronla eşlemesi gerekir. Yapısında, karbon- karbon çift bağı bulunan MMA monomeri, serbest radikaller tarafından kolaylıkla saldırıya uğrayabilir. Benzil radikalının, MMA molekülünün çift bağı ile elektron değişimi sonucunda, yapısında yine bir eşleşmemiş elektron bulunan bir molekül meydana gelir. Bu reaksiyon, sürekli olarak molekül zincirinin uzamasıyla devam eder. Sonuç olarak, serbest radikalın oluşması ve monomer ile reaksiyonu ile devam eden tüm bu prosesin adına polimerleşmenin başlangıç (initiation) aşaması denir [28].



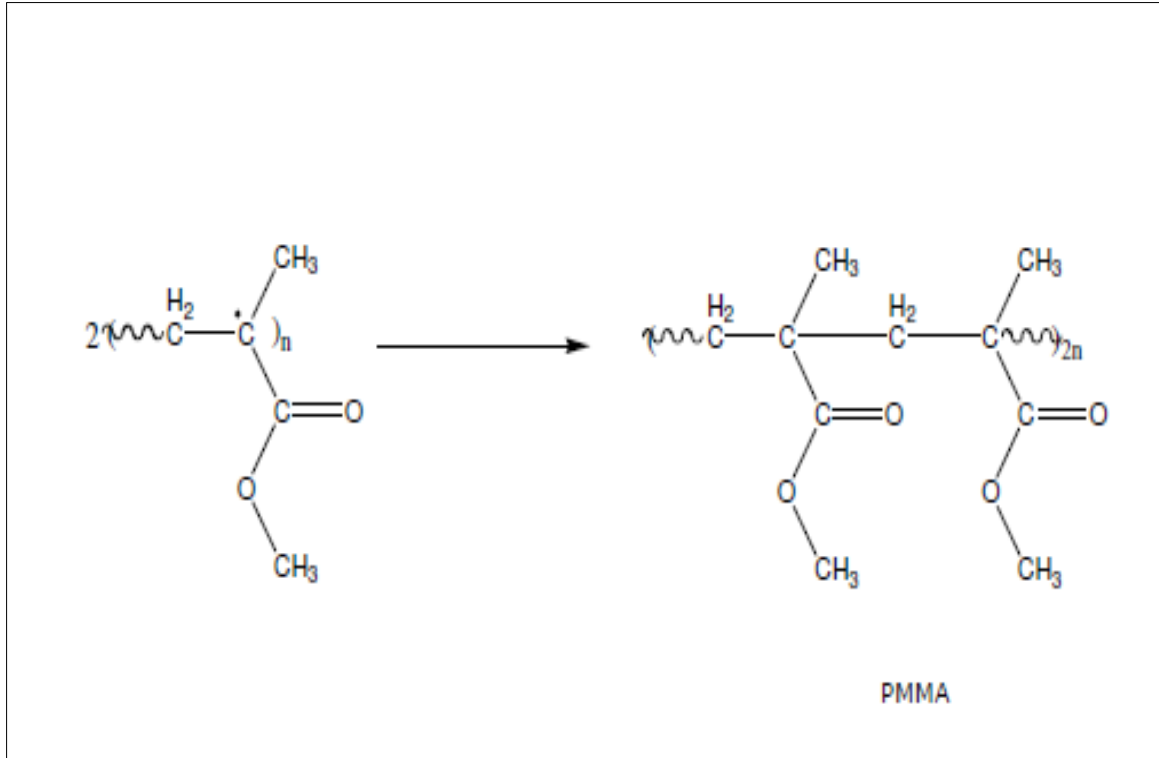
Şekil 2.10. MMA polimerleşme reaksiyonunun başlama aşaması [28]

Benzil radikali ile metilmetakrilat monomeri arasındaki reaksiyon sonucu açığa çıkan yeni radikal (Figüre 1.3), başka bir MMA molekülü ile reaksiyona vermeye devam eder. Bu reaksiyon her defa yeni bir radikalın oluşmasıyla devam edecektir. Yeni moleküllerin reaksiyon zincirine eklenerek zincirin uzamasıyla devam eden tüm bu prosesin adı polimerleşme reaksiyonunun ilerleme (propagation) aşaması olarak adlandırılır [28].



Şekil 2.11. MMA polimerleşme reaksiyonunun ilerleme aşaması [28]

Polimerleşmenin ilerleme (propagation) aşamasında da görüldüğü üzere, oluşan her radikal başka bir molekülle birleşerek yeni bir elektron çifti oluşturma eğilimindedir. Bu nedenle, serbest radikal molekülleri birleşerek yeni bir serbest radikal oluşturabileceği gibi, kararlı bir elektron çifti de oluşturabilir. İkinci seçeneğin gerçekleşmesi, reaksiyonun sonlanması (termination) aşaması olarak adlandırılır. Yapısında eşleşmemiş serbest elektron bulunan moleküller birleşerek yeni ve kararlı polimer zincirlerini bu şekilde oluşturur. Reaksiyonun sonlanma aşaması (termination) polimerleşme reaksiyonun üçüncü ve son aşamasıdır (Şekil 2.12) [28].



Şekil 2.12 MMA polimerleşme reaksiyonunun sonlanma aşaması [28]

2.5. Çevre Kirleticisi olarak PMMA

Sanayide akrilik veya akrilik cam olarak bilinen PMMA UV rezistansı ve şeffaflığı nedeniyle cama alternatif olan bir termoplastik malzemedir. Yaygın olarak bu polimer Perspex, Plexiglas ve Altuglas olarak bilinir. Ayrıca, medikal ve diş protezi alanlarında göstermiş olduğu performanstan dolayı yaygın bir şekilde tercih edilmektedir [29].

PMMA polimeri metilmetakrilat (MMA) monomeri kullanılarak üretilmektedir. 2019 ve 2020 yıllarına ait dünya genelinde MMA üretimi yaklaşık olarak 3,9 milyon tondur. Geçen yıllardaki üretimdeki artış hızı göz önüne alındığında, 2028 yılına kadar 5,7 milyon ton MMA üretileceği öngörülmektedir. Benzer şekilde, 2017 yılında 2 milyon ton üretilen PMMA polimeri 2019 yılına gelindiğinde 2,6 milyon ton üretim hacmine ulaşmıştır. PMMA için üretim miktarının 2025 yılına kadar, üretiminde aynı hızda artış gerçekleşmesi durumunda yıllık 4 milyon tona ulaşması beklenmektedir [29].

Dünya genelinde üretilen PMMA polimerinin yaklaşık %10'luk bir kısmı, yani yaklaşık olarak üç yüz milyon tonu Avrupa'da üretilmektedir. Üretilen bu miktarın yaklaşık olarak %10'u yani sadece 30000 tonu geri dönüştürülebilmektedir. PMMA polimerinin geri

dönüşüm miktarı, geri dönüştürme tekniğinin zorluğundan dolayı, diğer termoplastik malzemelere göre çok daha azdır [29].

Bu açıdan baktığımızda, Avrupa gibi sanayide ve bilimde çok ileri olan bir kıta dahi PMMA'nın geri dönüşümü konusunda ciddi bir başarı elde edememiştir. Bu nedenle, üretilen PMMA'nın çok büyük bir kısmının atık olarak çevreye verildiği söyleyebiliriz.

2.6. Model Organizmalar

Model organizmalar üç ana başlık altında toplanır. Bunlar sırasıyla [29];

- 1) Genetik Model Organizmalar
- 2) Deneysel Model Organizmalar
- 3) Genomik Model Organizmalar'dır.

Model organizmanın seçiminin de insan genomuna biyolojik ve genetik olarak benzerlik göz önünde bulundurulur. Bu benzerlik insan genomik dizilimine göre ilgili bulguların yorumlanmasına katkı sağlar. Genom haritası çıkarılmış model organizmalar, gen düzeninin ve insan genetik hastalıklarının biyolojik ve fizyolojik olarak gelişim mekanizmalarının anlaşılmasına olarak sağlar. Buna ek olarak, model organizma seçiminde jenerasyon arası sürenin kısa olması ve embriyonik gelişimin kolay izlenmesi diğer önemli faktörle arasında gösterilebilir [30].

Prokaryotlar, protistalar, funguslar, bitki ve hayvanlar model organizmalar arasında yer almaktadır. Bunlara ek olarak bazı sucul organizmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır [30].

Saccharomyces cerevisiae (Fungus), *Drosophila melanogaster* (Sirke sineği) ve *Caenorhabditis elegans* (Nematod) türleri genetik model organizma olarak en çok tercih edilen organizmalardır. *Gallus gallus* (Tavuk) ve *Xenopus laevis* (Kurbağa) türleri deneysel model organizma örnekleriyken, *Danio rerio* (Zebra balığı), *Fugu rubripes* (Şişen balık) ve *Oryzias latipes* (Medaka) türleri genom kalitelerinin uygunluğu nedeniyle genomik model organizma örnekleri olarak gösterilir [29].

Model organizma seçimi yapılacak çalışma göz önünde bulundurularak çeşitli kriterlere dikkat edilmelidir. Bu kriterlere örnek olarak aşağıdaki maddeler verilebilir [30];

- 1) Yüksek insan genomu homolojisi
- 2) Kısa jenerasyon süresi
- 3) Embriyo sürecinin izlenebilirlik açısından kolay olması
- 4) Embriyo sürecine müdahale edilebilme şansının olması
- 5) Kültüre alınma sürecinin kolay olması
- 6) Deney aşamasında manipülasyonlara uygunluk
- 7) Genetik analizlere elverişli olması
- 8) Etik sorunlara yol açmamaları

2.6.1. Genomik model organizma zebra balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı (*Danio rerio*), omurgalıların gelişimi, ilaç araştırmaları için küçük molekül taraması, hastalık modellemesi ve işlevsel sinirbilimi gibi modern biyomedikal araştırmaların birçoğunda kullanılmakta ve güçlü bir model organizma olarak kabul edilmektedir. Genetik çalışmalar, omurgalıların genetik fonksiyonları, normal gelişimin temel mekanizmaları ve her türlü insan hastalığı hakkında bilgi verir. Gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli bir omurgalı modelidir ve zebra balığı ile çalışmanın pek çok avantajı vardır.

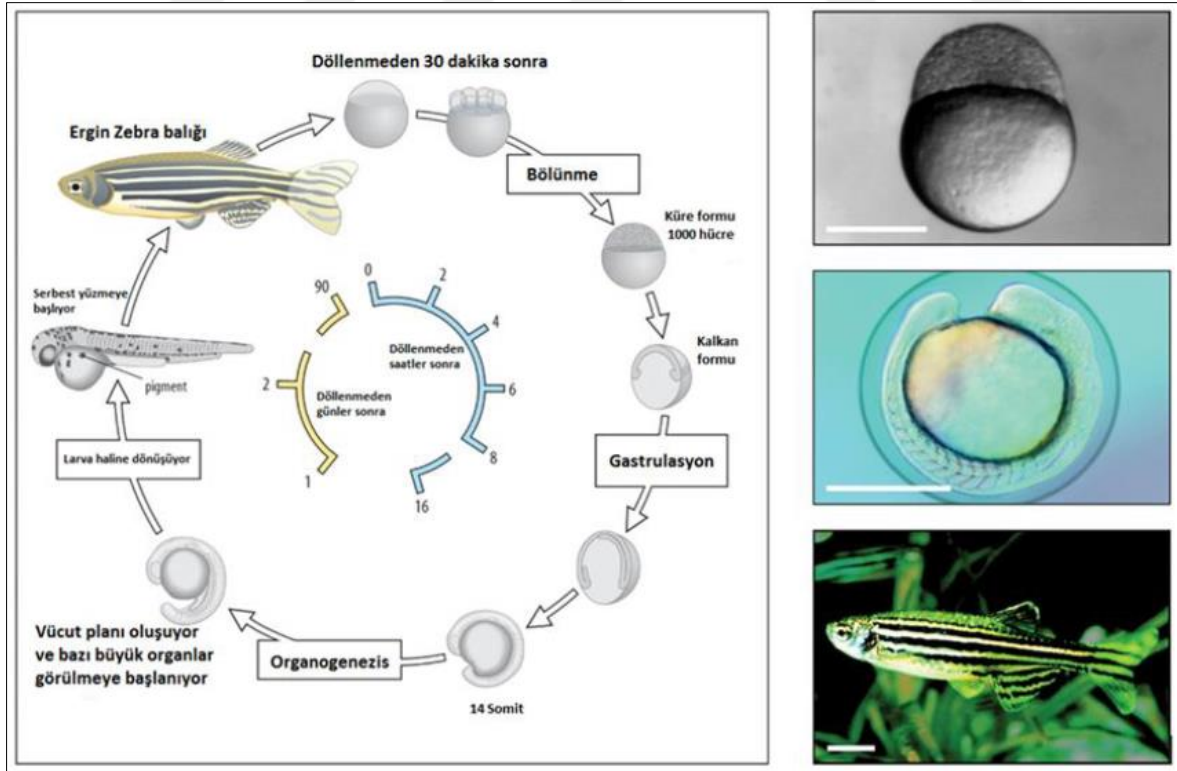
Güney Asya, Kuzey Hindistan, Pakistan, Btuhan ve Nepal gibi ülkelerin nehirleri zebra balığının en çok bulunduğu yerler arasındadır. Zebra balığı tropik bir tatlı su balığı türüdür. Kemikli balıkların (*Teleostei*) Actinopterygii sınıfında, Cyprinidae familyasına ait bir türdür [30].

Zebra balığı 1930'lu yıllardan buyana tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ve üzerinde çeşitli deneylerde yapılan popüler omurgalı bir modeldir. Örnek olarak, insan ve zebra balığı kalpleri incelendiğinde, birçok ortak özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Her iki kalpte, oksijenli kanı kalp odacıklarından geçirerek kapakçıklar vasıtasıyla vücuda pompalar.

Miyosit adı verilen kalp hücreleri kanın ritmik ve düzenli olarak akması için hem insan hem de zebra balığı kalbinde yer almaktadır [31].

Zebra balığının genomunda insana ait birçok hastalık ve gelişim geninin benzeri olduğu bilinmektedir. Ayrıca, genomik model olarak en çok kullanılan organizmalar arasında Zebra balığı yer almasında, yetiştirme şartlarının kolay olması, jenerasyon aralığının kısa oluşu ve kısa genom büyüklüğü gibi başka nedenlerde vardır [31].

Zebra balığının embriyonik gelişim süreci incelendiğinde genetik kontrolün sağlanabilmesi açısından en uygun türlerden biridir. 24 saat içerisinde tamamlanan Embriyogenez sürecini, beş gün içerisinde tamamlanan organ gelişimi takip eder. Buda, deney sırasında kullanılan maddelerinin takip edilmesini kolaylaştıran bir etkidir. Buna ek olarak, koryon ve embriyonun şeffaf olması, ilk larval sürecinin dışarıdan kolayca izlenmesine imkân verir. Diğer türlere nazaran başka üstün özellikleri arasında haftada ortalama 200 yumurta üretebilir. Ayrıca, deneysel manipülasyonlardan Mikroenjeksiyon ve hücre transplantasyonuna dayanıklılık gösterir [30, 31].



Şekil 2.13 Ergin zebra balığının gelişim süreci [30]

3. MATERİYAL METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada belli konsantrasyonlarda ve farklı maruziyet sürelerinde Polymetilmetakrilat (PMMA)' a maruz bırakılmış balıklarda farklı grupların histopatolojik değişimlerini ve DNA hasarının göstergesi olan 8-OHdG düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yani DNA / RNA oksidatif hasarını değerlendirerek PMMA'nın sucul toksikoloji üzerindeki çevresel etkisini ve insanlar üzerindeki olası olumsuz etkilerini belirlemektir.

3.1.1. Araştırma yeri

Deneyler Mart- Ekim 2020 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Laboratuvar şartları

Balıkların bulunduğu ortam 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanıp fotoperiyot kurularak balıkların yaşamını devam ettirebilmesi için uygun koşullar sağlanmıştır.

3.1.3. Akvaryum ve suyun özellikleri

Belli hacimli akvaryumlara, deneylerden önce, içinde yaklaşık 10 L dinlendirilmiş ve havalandırılmış kaynak suyu konulup; akvaryumlar, hava motorları yardımıyla sürekli havalandırılmış ve termostatlı ısıtıcılarla su sıcaklığı $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmaya çalışılmıştır.



Şekil 3.1. Zebra balıklarının temini ve adaptasyonu

Deney ortamına adaptasyonunun sağlanması için deney başlamadan 15 gün önce stok akvaryumuna alınan 200 adet zebra balığı 10x20x35 boyutlarındaki 6 adet deney akvaryumlarına yerleştirilmiştir. Balıkların boy ve ağırlıkları hassas terazi vasıtasıyla tartılarak, çalışmada 3-4,5 cm boylarındaki balıklar kullanılmıştır. Adaptasyon süresi esnasında balıklar günde vücut ağırlıklarının %2'si oranında uygun yemle beslenmiştir. Akvaryumlar sürekli havalandırılmış ve düzenli beslenme sağlanmıştır. Yem ve metabolizma atıklarının uzaklaştırılması için günlük sifonlamaları yapılmıştır. Deneye başlamadan önce bir adet balık ölmüştür.

3.1.4. Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve kitler

Cihazlar

- Otomatik doku takip cihazı (Ototeknikon)
- Doku bloklama cihazı (Leica EG1160)
- Rotary mikrotom (Leica RM2255)
- Su banyosu (Leica HI1210)
- Etüv (Nüve N500)
- Vorteks (Biosan)

Kimyasallar

- 10'luk tamponlu formol (Merck)
- Sıvı nitrojen (Merck)
- % 70, 80, 90, 95'lik ve absölü etanol (Merck)
- Ksilen (Merck)
- Parafin (Leica)
- Hematoksilen (Merck)
- % 10'luk asit alkol 36
- HCl (Hidroklorik asit) (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Eozin (Merck)
- DNA İzolasyon

Sarf malzemeler

- 10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik otomatik mikropipet (Socorex)
- Cam tüp, Piset
- Balon joje, Mezür, Erlen Mayer
- Ependorf tüp
- Akvaryum
- Pens, bistüri
- Buz kalıbı, Kurşun kalem
- Temiz gazlı bez veya havlu kâğıt
- Filtre kâğıdı
- Parafin (Leica)
- Doku takip kaseti
- Doku bloklama kaseti
- Base mould
- Pens
- Bıçak ya da bistüri
- Etiket
- Temiz gazlı bez veya havlu kâğıt
- Rodajlı lam
- Lam, Lamel
- Disposable mikrotom bıçağı (Feather N35HR)
- Sulu boya fırçası
- Lam taşıma sepeti

3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı

Çalışmada ön deneyler ile belirlenen subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan kemik çimentosu kullanıldı, içeriği; %86 PMMA ve benzoil peroksit, %25 gentamisin içeren baryum sülfatdır. İlk stok çözelti, 50 mL dimetil sülfoksit (DMSO) 5 g kemik çimentosu ve 2 g ila 5 ml DMSO eklenerek stok çözelti 2 ilave edilerek hazırlandı. 10 L'lik akvaryumlara 1, 10, 50 mg/L olarak dozlar belirlenmiş ve çözücü olarak DMSO kullanılmıştır.

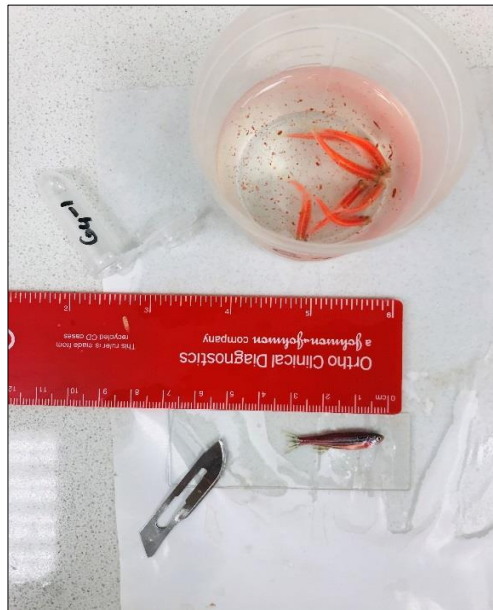
3.2. Metot

3.2.1. Subletal toksisite deneyleri

Ekotoksikolojik çalışmalarda standart tür olarak kullanılan Zebra balıkları üzerine polimethylmetakrilatın akut toksisitesine ilişkin farklı konsantrasyon aralıkları denenerek ön çalışmalar yapıp, deney için uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Öncelikle LC50 değerleri hesaplanmış ve daha sonra akut toksisite testleri verilerinin ışığında subletal konsantrasyonlar belirlenmiştir. Etken madde uygulamasını takip eden ilk 6 saat (17.03.2020), 24 saat (18.03.2020) ve 96 saat (21.03.2020) sonunda ve bir hafta sonra (28.03.2020) planlanan deneyler için belirlenen sayıda örnekler alınarak gerekli işlemler yapılmıştır.

3.2.2. Deney hayvanlarının hazırlanması

Her seçilen doz için 4 farklı zamanda (6, 24, 96. saatlerde ve 1 hafta sonra) örnekleme yapıldı. Her zaman aralığı için 10 deney ve tüm deneyler için 30 balıktan oluşan tek kontrol grubu kullanılmıştır. Üç farklı doz, dört farklı zaman ve çift kontrol örnekleme yapılması ile toplam 200 adet balık içeren akvaryumlarda deney ve kontrol grupları oluşturulmuştur. Deneye başlamadan önce bir adet balık ölmüştür.



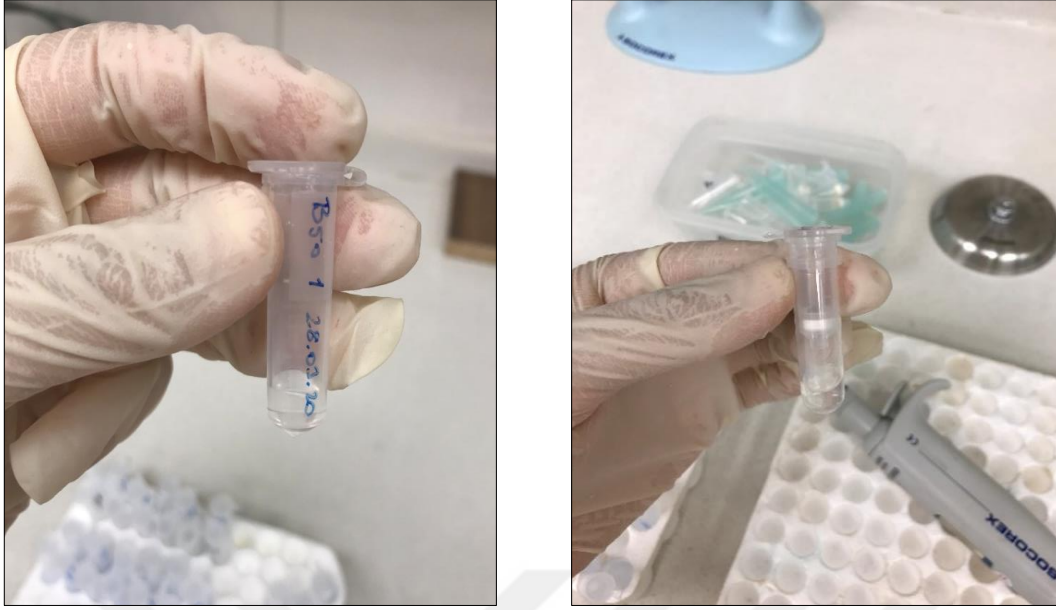
Şekil 3.2. Zebra balıklarının deneye hazırlık aşaması

Deneye başlandıktan ilk 6 saat sonra; A Grubu (PMA) için; üçer adet histopatoloji A1(x3), A10(x3), A50(x3), beşer adet biyokimya A1(x5), A10(x5), A50(x5) ve B Grubu için (PMA+G) üçer adet histopatoloji B1(x3), B10(x3), B50(x3) ve beşer adet biyokimya için B1(x5), B10(x5), B50(x5), kontrol ve DMSO grubundan ise birer adet balık alınıp baş ve kuyrukları kesilerek -20 dereceye kaldırıldı. Bu işlem 24, 96 saat sonunda ve 1 hafta sonraki sürelerde tekrar edildi ve toplamda ilk üç gruptan 52'şer balık, bir hafta sonra ise kalan 43 balıktan 29 adeti -20 °C'ye, 14 adeti ise histopatoloji için kasetlere alınarak formaldehit çözeltisi içinde daha sonra çalışılmak üzere saklandı. Kalan diğer balıklar bir hafta sonra deney sonrası balıkların boyları ölçülmüş ve ağırlıkları hassas terazi vasıtasıyla tartıldı. Toplam da biyokimya ve histopatoloji için 199 balık kullanıldı.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. DNA ekstraksiyonu

Balıklar boyuna ortadan ikiye kesilerek tüm vücut ependorf tüplere alındı. Daha sonra üzerine 180 µl parçalama (digestion) çözeltisi eklenerek bir gece bekletildi. Ertesi gün 20 µl Proteinaz K ilave edilerek vortekslendi. Örnekler vorteksten sonra 56 °C de termomikser ile örneğin durumuna göre 1-2 saat inkübe edilip, tekrar vortekslendi. 20 µl Rnaz A solüsyonu eklenip vortekslendirildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 200 µl doku yıkıcı (Lysis) çözeltisi eklenip homojen karışım elde edene kadar 15 saniye vortekslendi. Üzerine 400 µl %50'lik etanol eklenip vortekslendi. Kit içerisinde bulunan filtreli tüplere yaklaşık 600 µl kadar alınıp 1 dakika 6000xg'de santrifüj edildi. Daha sonra tüpün dip kısmına biriken solüsyon atıldı. Yıkama solüsyonlarını hazırlamak için kit içerisinde bulunan iki ayrı yıkama solüsyonu şişelerine ayrı ayrı 30 mL %96'lık etanol eklenerek şişe üzerine gerekli işaretleme yapıldı. Daha sonra 500 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) I eklenerek 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilip, dip kısımdaki sıvı döküldü. Tekrar ependorf üzerine 500 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) II ilave edilerek 3 dakika 12000xg'de santrifüj edilip alt kısımdaki sıvı tüple birlikte atılıp yeni tüp kullanıldı. 200 µl Elution Buffer eklenip 1 dakika 8000xg'de santrifüj edildi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak üst kısımdaki filtreli tüpler atılıp altta biriken pelet yeni ependorf tüplere alınarak gerekli etiketleme yapıldı. Kolon tüpler atılarak alttaki ependorf tüplerde toplanan DNA miktarları nanodropta (spektrofotometre gibi) ölçülmüştür.



Şekil 3.3. DNA kstraksiyonu

3.3.2. DNA hidrolizi

50 μ L elüsyon solüsyonu içindeki DNA örnekleri 3 dakika 95° C'deki ısıtıcı blokta bekletilip buz üzerinde soğutularak tek sarmallı DNA'lar elde edilmiştir. DNA örneklerinin üzerine 100 μ L 2 mmol/L DFAM, 100 μ L 20 mmol/L asetat solüsyonu (pH=5) eklenmiş ve çözelti DNA içeriği için 260 nm de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Sonrasında 20 ile 500 μ g DNA, 20 mmol/L asetat tamponu (pH=5) eklenmiş ve 65 °C'de 10 dakika hazırlanan 4 μ L-3,3 mg/mL nükleaz P1 süspansiyonu ile inkübe edilerek, nükleotidlere hidrolize edilmiştir. 20 μ L, 1 mol/L Tris-HCL tamponu (pH=8.5) karışıma eklenmiş, 4 μ L, 1 U/L alkale fosfataz, 37°C derecede, 1 saat inkübe edilerek, nükleosidlere hidrolize edildi. 20 μ L, 3 mol asetat tamponu (pH=5) hidrolizata eklenerek, 20 μ L, 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde) solüsyonu ile devam edilmiştir. Karışım, 0,22 μ m millipore filtre ünitesinden filtre edilmiş, (ependorf tüplerin içindeki filtreler) 4 °C'de, 20 dakika 10000xg' de santrifüj edildikten sonra örnekler 8-OHdG analizi için hazır hale getirildi.

3.3.3. 8OHdG analizi

8OHdG ölçümü Agilent 6420 LC-MS/MS cihazı kullanılarak elektrospray iyonizasyon (ESI) metodu ve pozitif iyon modu ile gerçekleştirildi. Çalışmada ACE C18 (50 mm x 4.6 mm x 5 μ m) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 40 °C' ye ayarlandı. Mobil faz olarak solvent A distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat+ %0,01 Formik Asit çözeltisi, solvent

B olarak metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi kullanıldı. Çalışmada izokratik metod kullanıldı. %70 A fazı %30 B fazı olacak şekilde düzenlendi. Akış 0.4 mL/dk olacak şekilde kullanıldı. 8OHdG ana kütle/yük (m/z) değeri 284.1, bundan elde edilen Q3 m/z değerleri ise 167.9, 150.9, 139.8 ve 116,7 olarak bulundu. Fragmentor voltaj 90 V olarak uygulandı. Numune ve standartlar 10 mikrolitre cihaza enjekte edildi. 8OHdG ana stok standardı %0.01 Formik asit/Distile su içinde 1mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Bu stok standarttan %50 Metanol içerisinde seri dilüsyonlar hazırlandı. Bu standartlar ile 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/mL yedi seviyeli olacak şekilde analiz edilerek kalibrasyonu yapıldı. r^2 değeri 0.997 olarak saptandı.

Çizelge 3.1. Agilent 6420 LCMS/MS özellikleri

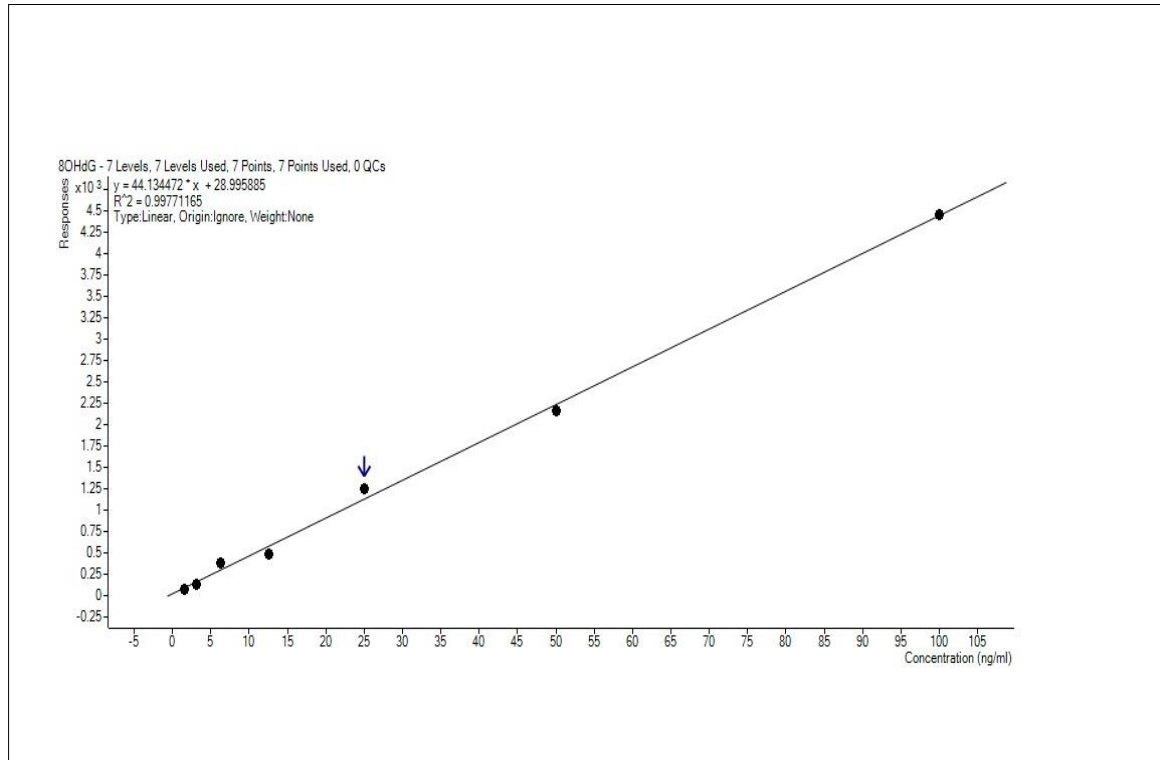
Cihaz	Agilent 6420 LCMS/MS		
Kolon	ACE C18 (50mm x 4.6 mm x 5µm)		
Kolon sıcaklığı	40°C		
Mobil faz	Solvent A (distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat+ %0,01 Formik Asit çözeltisi) Solvent B (metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi)		
İzokratik Tablosu	Zaman	Solvent A	Solvent B
	0	%70	%30
	5 dk	%70	%30
Akış hızı	0,4 ml/dk		
Enjeksiyon hacmi	10 µl		
Süre	5 dk		

Çizelge 3.2. LCMS/MS cihaz parametreleri özellikleri

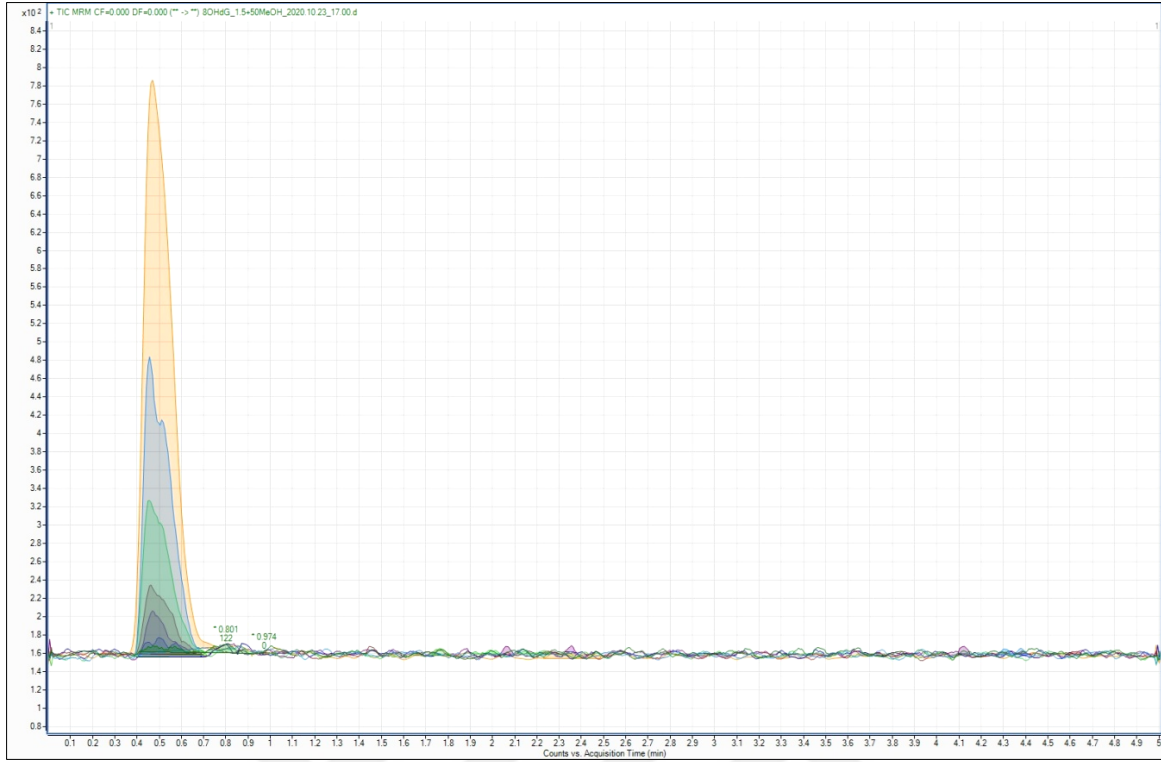
Cpd Name	Prec Ion MS1	Prod Ion MS2	Dwel	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)	Polarity
8OHdG	284.1	167.9	100	90	8	7	Pos
		150.9	100	90	34	7	Pos
		139.8	100	90	38	7	Pos
		116.7	100	90	8	7	Pos

Çizelge 3.3. LCMS/MS cihaz parametreleri özellikleri devamı

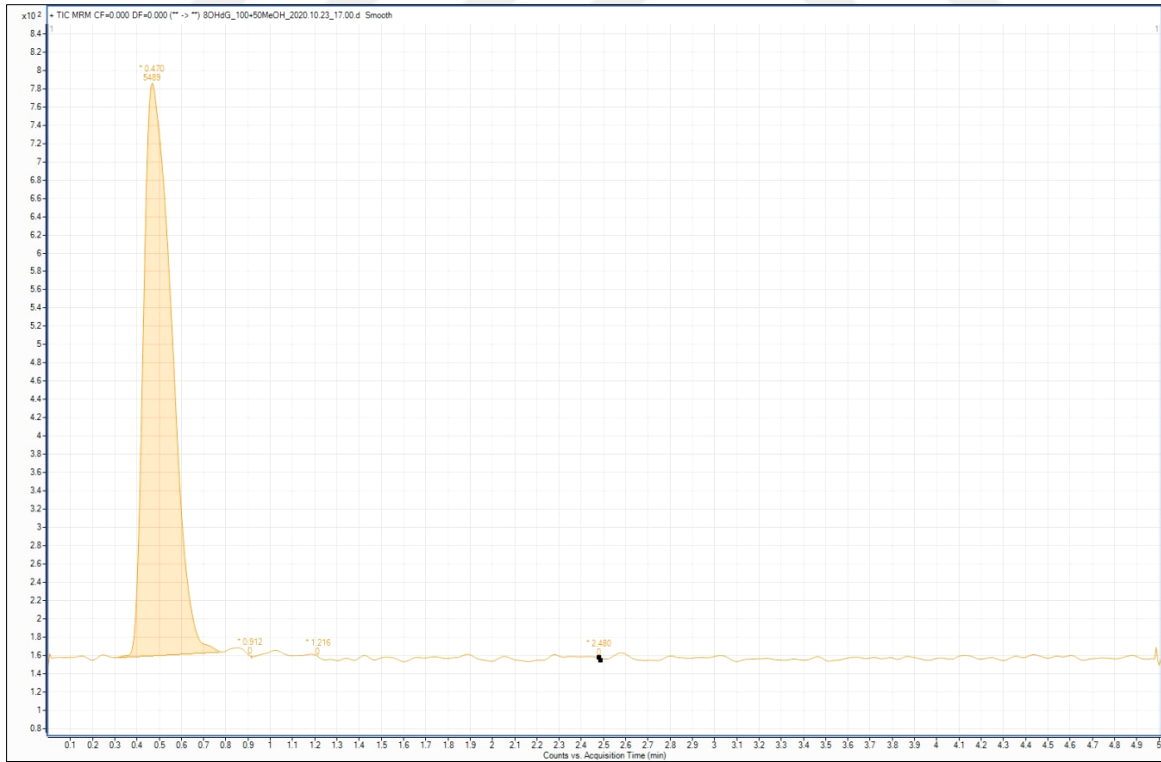
Parameter	Value (+)
Gas Temp (°C)	250
Gas Flow (l/min)	10
Nebulizer (psi)	25
Capillary (V)	4000



Şekil 3.4. Kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5. Pik değerleri



Şekil 3.6. Pik değerleri

3.4. Histopatolojik Analiz

3.4.1. Doku takibi

Çalışmanın doku takip aşaması kapalı sistem otomatik doku takip cihazında yapılmıştır. Doku takibi, cihazın reaksiyon haznesinde gerçekleştirilmiştir. Doku kasetleri cihazın sepetine dizilerek bu hazneye yerleştirilmiş, dokular bu haznede sabit kalmıştır. Cihazın kimyasal saklama haznesinde 10-12 takip solüsyon kabı, 3-4 parafin kabı bulunmaktadır. Cihaz otomatik olarak çizelge 3.4'te gösterilen sürede kimyasal sıvıları reaksiyon haznesine transfer ederek doku takibini gerçekleştirmiştir.

Çizelge 3.4. Kapalı sistem doku takip cihazında doku takip uygulaması Formalin, %10

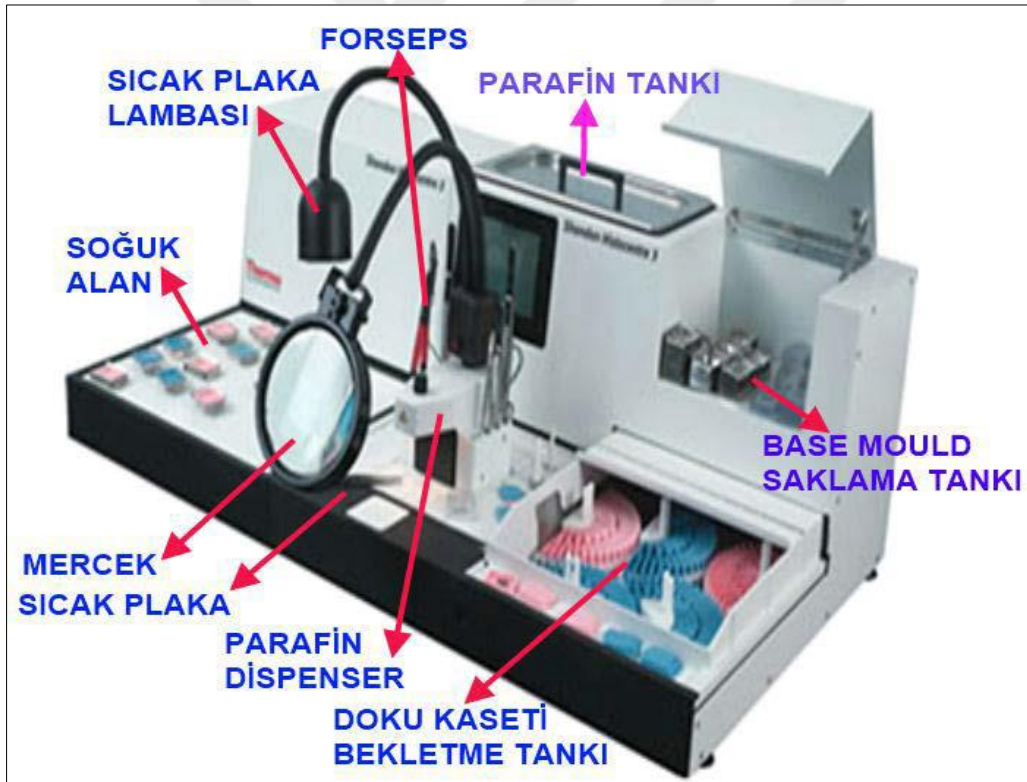
Formalin, %10	1 saat (vakum)	Fiksasyon
Alkol %70	1 saat (vakum)	
Alkol %90	1 saat	
Alkol %90	1 saat (vakum)	
Alkol %95	45 dakika	Dehidrasyon
Alkol %95	1 saat (vakum)	
Absolu alkol	45 dakika	
Absolu alkol	1 saat (vakum)	
Ksilen	1 saat	
Ksilen	1 saat (vakum)	Şeffaflaştırma
Parafin	30 dakika	
Parafin	1 saat	Sertleştirme (İnfiltrasyon)
Parafin	1 saat (vakum)	
Toplam Süre	12 Saat	

3.4.2. Doku bloklama/Parafin gömme

Parafin bloklama işlemleri doku bloklama cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz döküm işlemine hazırlanmış doku tankı, sıcak plaka ve base mould bölümlerinin sıcaklıkları ayarlanmıştır. Parafin tankı parafinle doldurularak çalışılacak olan kasetler doku depo tankı içine yerleştirilmiştir. Tank içindeki parafin seviyesi kasetleri kapatacak düzeyde

ayarlanarak doku depo tankından bir kasete doku taşınıp, kaset, doku depo tankı önündeki çalışma alanına getirilmiştir. Bloklanacak dokuya uygun ebatlarda bir base mould seçilerek base mould sıcak plaka üzerine konup belli bir seviyeye kadar parafinle doldurulmuştur. Pensle/forsepsle doku kasetinden doku örneği alınmıştır.

Doku örneğinin gömme yüzeyine karar verilip bu yüzey üzerine doku base moulda yerleştirilip base mould sıcak plakadan soğuk plakaya kaydırılmıştır. İçindeki dokuya pens/forsepsle pozisyon verilmiş parafinin biraz katılaşması için birkaç saniye beklenmiştir. Base mouldu sıcak plakanın üzerine kaydırılarak blok numarası ve kodu yazılmış kaset base mould üstüne yerleştirilmiştir. Base mould parafinle doldurulmuş base mould hızlıca soğuması için soğuk plakanın arkasına kaydırılıp bu alanda blokların katılaşması beklenmiştir. Katılaşmış blok kasetinden base mould ayrılmıştır.



Şekil 3.7. Doku gömme cihazı

3.4.3. Kesit alma

Işık mikroskopunda incelenecek preparatların hazırlanması için doku bloklarından 4 mikron kalınlıkta doku kesitleri yapılmıştır. Bu amaçla, parafin bloklardan ince doku kesitleri yapabilen rotary mikrotom denilen cihaz kullanılmıştır.



Şekil 3.8. Rotary mikrotom (Leica RM 2255)

Bloklar soğuk ortamdan buz kalıpları üzerine konularak kesit masasına getirilmiştir. Cihazın tüm kilitleme kolları kapatılıp bıçak yatağına disposable bıçak yerleştirilmiş, bıçak, bıçak sıkma koluyla sıkıştırılmıştır. Bloklar, mikrotomun blok tutucusuna yerleştirilerek blok tutucuda oynamayacak şekilde sıkıştırılmıştır.

Mikrotom ayarı 25 mikrona getirilerek dokunun tüm katmanları (deri, deri altı dokusu gözükecek şekilde) kesitte gözükecek en geniş yüzeyi elde edinceye kadar dokuya girilmiştir. Kesit kalınlık kontrol düğmesi ile mikron ayarı 4 mikron yapılarak, şerit şeklinde elde edilen kesitler 50°C'deki su banyosuna sulu boya fırçası ile atılarak açılması sağlanmıştır.

3.4.4. Dokuları lama alma

Lam, dik şekilde sıcak su banyosuna daldırılarak su üzerinde yüzen doku şeridine yaklaştırılarak doku kesiti alınmış yüzü su yüzeyi ile dar açı yapacak şekilde sudan çıkarılarak doku lama çekilmiştir.

Doku kesitleri lama daha iyi tutunması ve kuruması için etüve (80°C) kaldırılmıştır. Ayrıca etüvde doku kesitlerine infiltre olmuş parafinlerin sıcaklık etkisiyle erimeye başlamasıyla deparafinizasyon (dokudan parafinin giderilmesi) işlemine de başlanılmıştır.

3.4.5. Deparafinizasyon

Doku kesitleri çizelge 3.5.'deki sürelerde etüvde ve aşağıdaki solüsyonlarda bekletilmiştir. Bu işlem sonunda lamdaki ve dokulardaki parafinler ksilenle uzaklaştırılmış, dokular aynı zamanda şeffaflaştırılarak dokulara kaybettiği su tekrar kazandırılmıştır.

Çizelge 3.5. Deparafinizasyon uygulaması

80°C Etüv	45 dakika	Doku kesitlerinin kurutulması, lama tutunmasını artırma ve parafinin eritilmesi
1. Ksilen	15 dakika	Dokudan parafinin uzaklaştırılması ve şeffaflaştırma
2. Ksilen	15 dakika	Hidratasyon
%96 Alkol	15 dakika	
%96 Alkol	15 dakika	
%96 Alkol	15 dakika	
Distile su	10 dakika	

3.4.6. Hematoksilen-eosin (HE) boyama

Boyama işlemi kapalı sistem tam otomatik boyama cihazında gerçekleştirilmiştir. Boya işlem basamaklarında bulunan boya ve solüsyonlar, belirtilen sıraya göre çizelge 3.6'da belirtildiği şekilde cihaz tarafından uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Doku preparatlarının HE boyama–kapatma/montaj uygulama aşamaları

Hematoksilen	4 dk	Diferansiyasyon (Fazla boyanın uzaklaştırılması) Suyla	HE BOYA UYGULAMASI
Çeşme suyu	2 dk (yıkama)		
Asit alkol (%80 alkolde %1 HCl çözeltisi)	5 sn	Diferansiyasyonun durudurulması	
Çeşme suyu	1.5 dk (yıkama)	Bazik ortamda mavileştirme	
Amonyaklı su (%1 Amonyak çözeltisi)	30 saniye		

Çizelge 3.6. (devam) Doku preparatlarının HE boyama-kapatma/montaj uygulama aşamaları

Çeşme suyu	1.5 dk (yıkama)	
Eosin	30 saniye	
Çeşme suyu	1.5 dk	
%70 Alkol	1 dk	
%96 Alkol	1 dk	DEHİDRASYON
%100 Alkol	1 dk	
Kurutma		
Ksilol		
Kapatma/Montaj		

Kapatma işleminde sırayla bütün lamlardaki kesitlerin üzerine yeterli miktarda kapatma maddesi damlatılarak uygun boyutlu lamel bırakılmıştır.

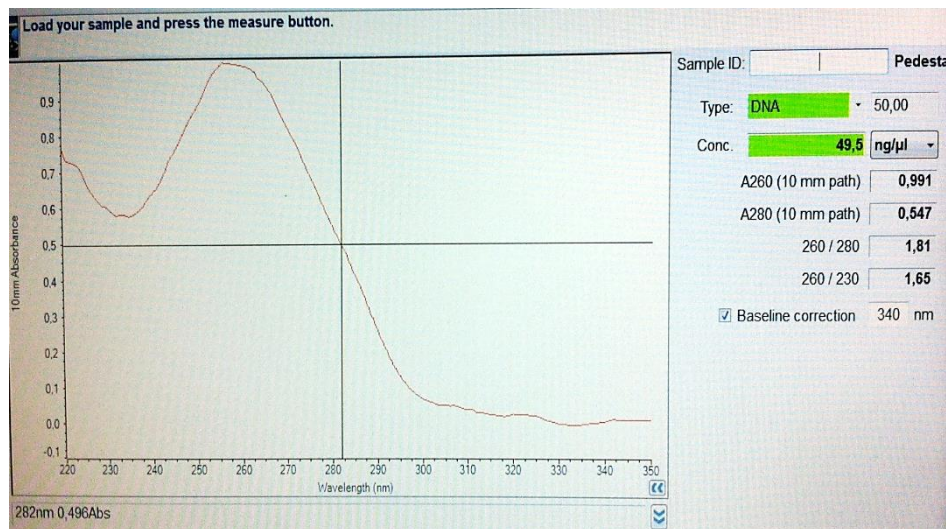
4. BULGULAR

6, 24, 96 saat ve bir hafta süre ile 1, 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarında DNA Nanodrop Ölçüm Sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

4.1. DNA Nanodrop Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.1. DNA nanodrop ölçüm sonuçları

Grup	6 saat	24 saat	96 saat	1 hafta sonra
Grup DMSO	8,63 ± 0.22	7.20 ± 1.16	9.56 ± 0.24	8.27 ± 0.19
Grup Kontrol	9.38 ± 0.33	8.70 ± 0.16	12.3 ± 0.32	10.4 ± 0.31
Grup 1 (1 mg/L)	8.63 ± 0.22	7.98 ± 0.93	10.9 ± 2.75	6.16 ± 1.63
Grup 2 (10 mg/L)	9.20 ± 2.99	6.85 ± 1.14	6.15 ± 0.69	10.6 ± 2.60
Grup 3 (50 mg/L)	9.83 ± 2.45	5.10 ± 1.06	9.73 ± 3.39	7.70 ± 1.42



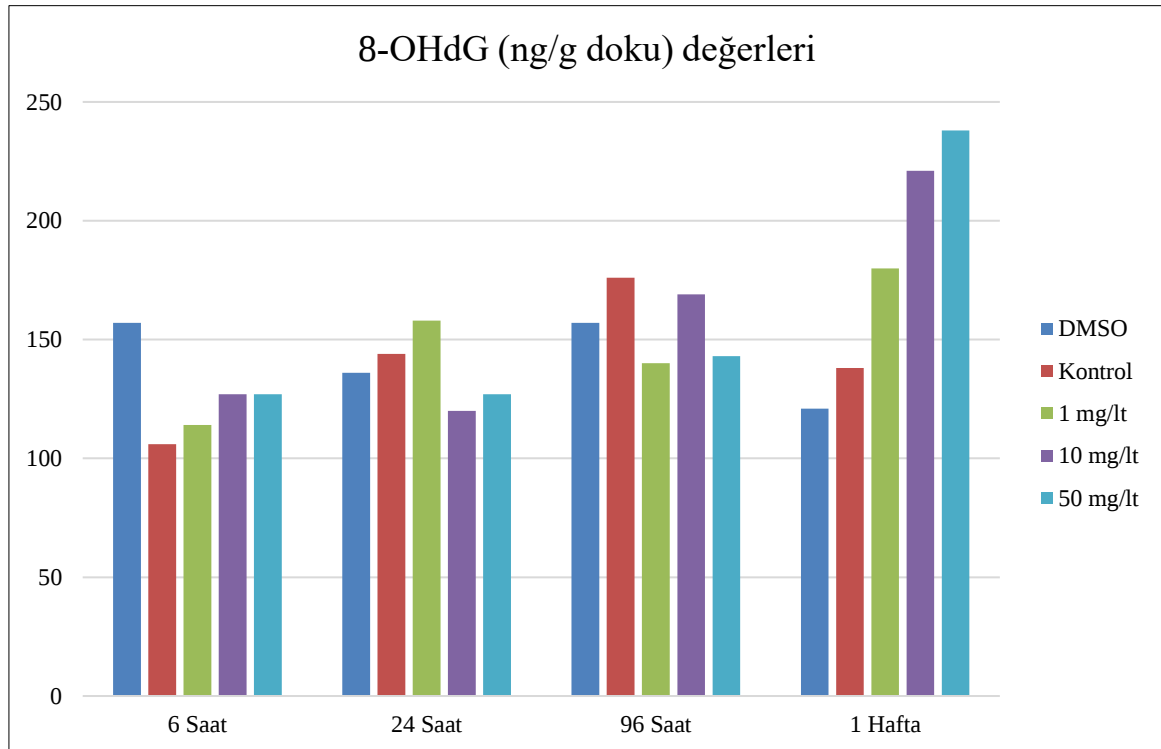
Şekil 4.1. Nanodrop DNA ölçüm grafiği örneği

4.2. 8OHdG Analiz Sonuçları

Grupların ortalama 8-OHdG (ng/g doku) değerleri elde edilerek gruplara göre karşılaştırma yapılmıştır.

Çizelge 4.2. 8-OHdG (ng/g doku) değerleri

Grup	6 saat	24 saat	96 saat	1 hafta sonra
Grup DMSO	157.00 ± 5.41	136.00 ± 5.48	157.00 ± 0.51	121.00 ± 0.57
Grup Kontrol	106.00 ± 0.63	144.00 ± 0.61	176.00 ± 5.44	138.00 ± 0.39
Grup 1 (1 mg/L)	114.00 ± 53.40	158.00 ± 26.70	140.00 ± 78.40	180.00 ± 5.02
Grup 2 (10 mg/L)	127.00 ± 36.10	120.00 ± 25.7	169.00 ± 19.90	221.00 ± 42.70
Grup 3 (50 mg/L)	127.00 ± 60.70	127.00 ± 35.4	143.00 ± 89.80	238.00 ± 36.60



Şekil 4.2. 8-OHdG (ng/g doku) değerlerinin değişimine ait bar grafik

4.3. Histopatoloji Sonuçlar (PMMA)

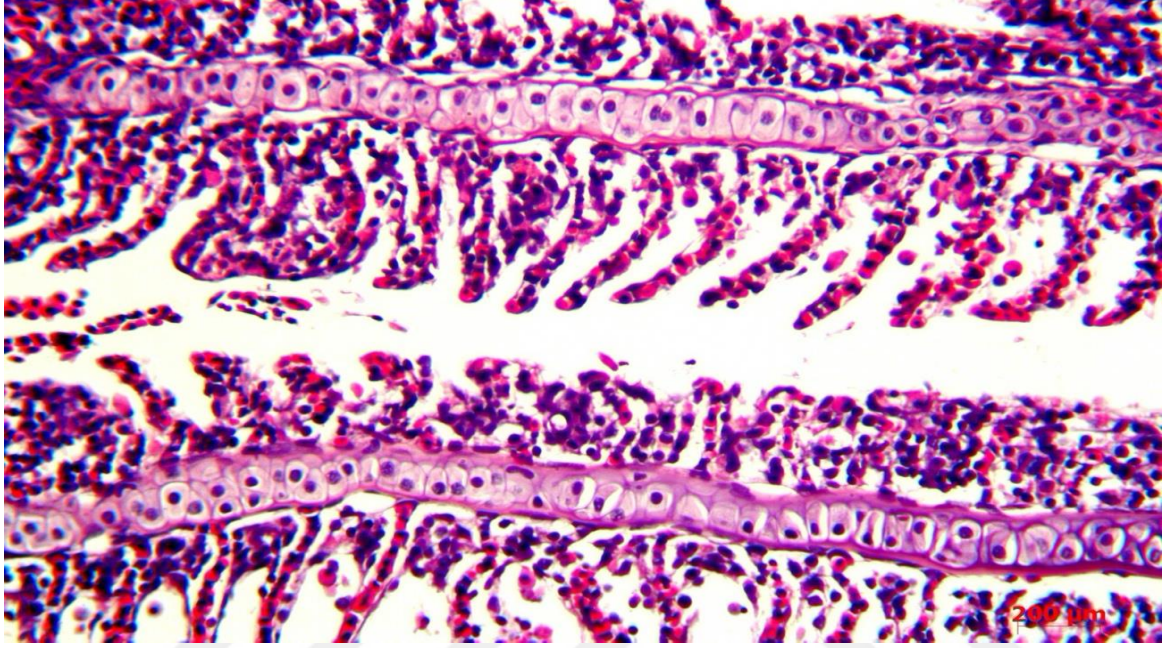
Yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda, kontrol gruplarında, 6 saat ve 24 maruziyet tüm konsantrasyonlarda ve tüm sürelerde 1 mg/L gruplarda hiçbir histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Diğer konsantrasyonlarda solungaç, karaciğer, böbrek ve beyin dokularında histopatolojik bulgular tespit edilmiştir. Histopatolojik bulgular çizelge 4.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. 1 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının çeşitli dokularında görülen histopatolojik bulgular

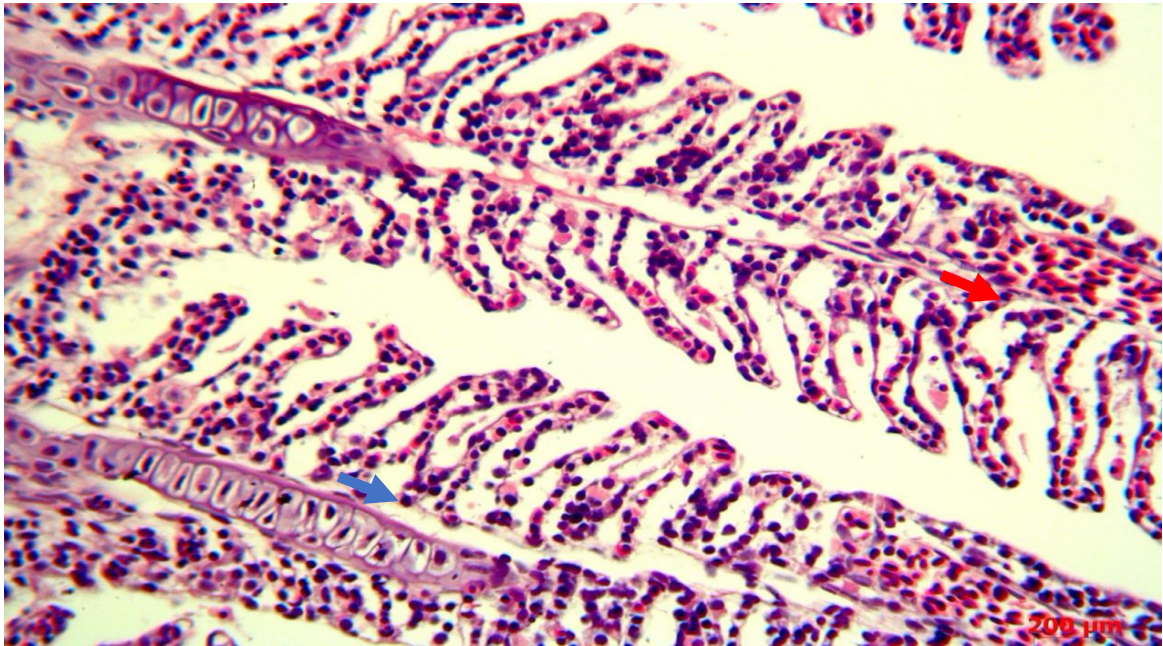
Süre	6 saat			24 saat			96 saat			1 hafta		
Konsantrasyon (mg/L)	1	10	50	1	10	50	1	10	50	1	10	50
Dokular Solungaç												
Epitel hiperplazi	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Epitel kaldırma	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Kanama	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Telanjiyektazi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Karaciğer												
Hidropik Dejenerasyon	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Kanama	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Böbrek												
Tübül dejenerasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Kanama	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Beyin												
Hiperemi	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+

Tablo 4.3 incelendiğinde 96 saat 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularında epitel hiperplazisi, epitel kalkması ve kanama (Şekil 4.3, 4.4, 4.5), 1 hafta sonunda ise aynı bulgulara ilave olarak 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularında telangiyektaziye (Şekil 4.6) rastlanmıştır. 96 saat ve 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının karaciğer dokularında

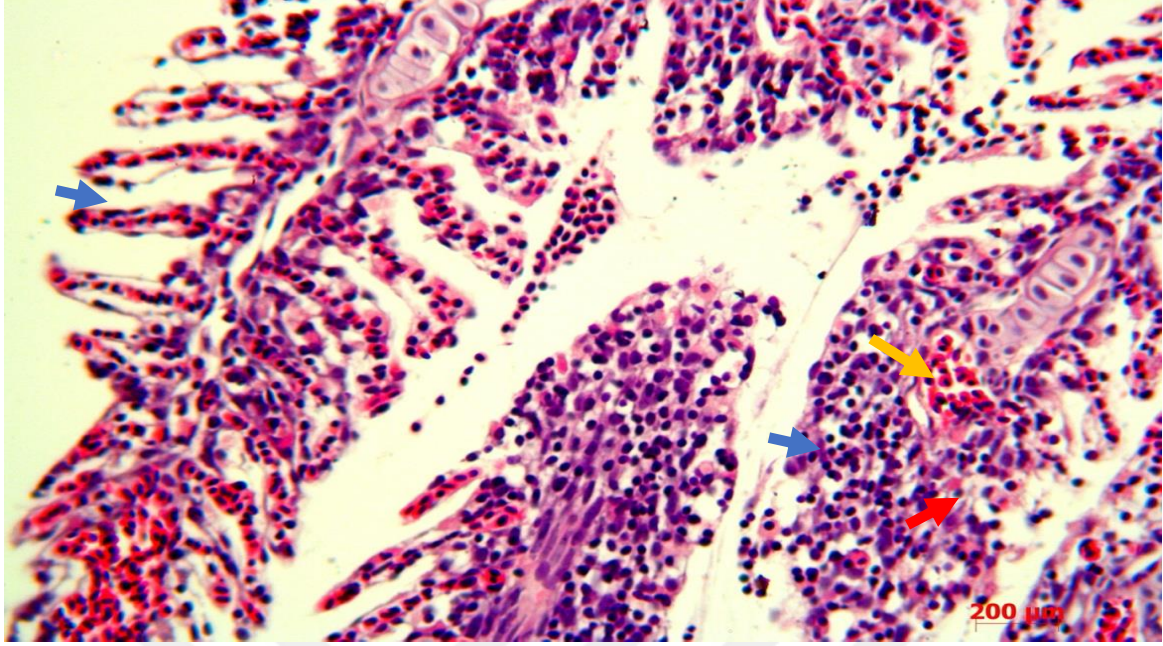
hidropik dejenerasyon ve kanama (Şekil 4.7, 4.8, 4.9) gözlenmiştir. 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının böbrek dokularında tübül dejenerasyon ve kanama (Şekil 4.10, 4.11) saptanmıştır. Beyin dokusunda ise 96 saat ve 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalma sonrasında hiperemiye (Şekil 4.12) rastlanılmıştır.



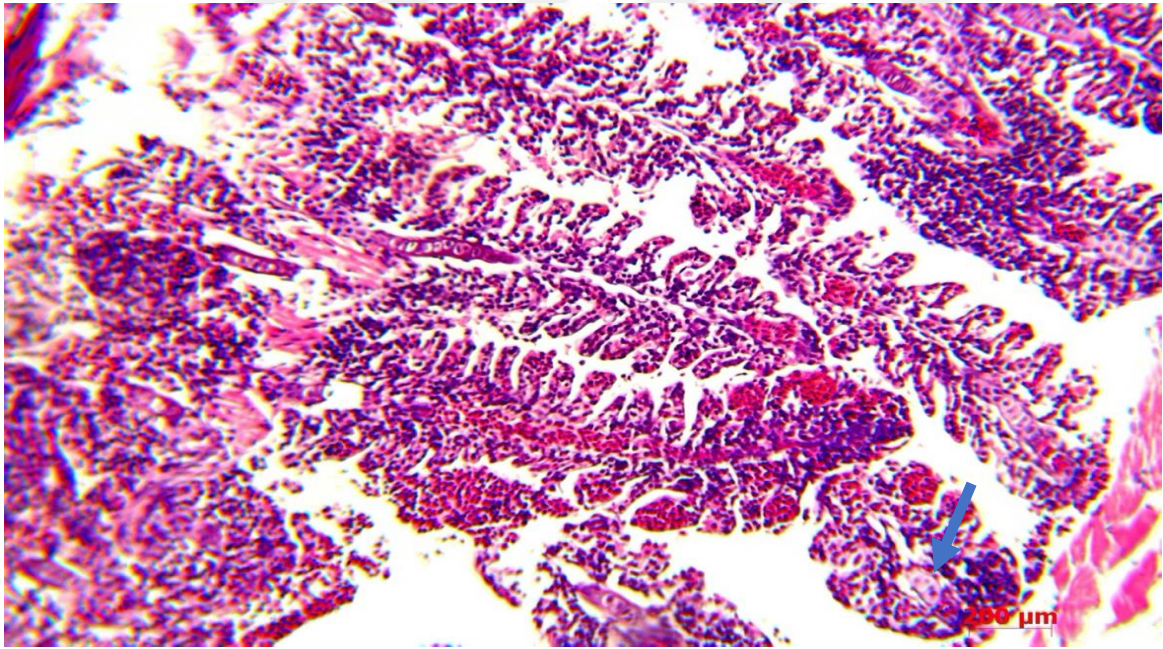
Şekil 4.3. 96 saat 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) solungaç dokusunda epitel hiperplazisi (mavi ok).



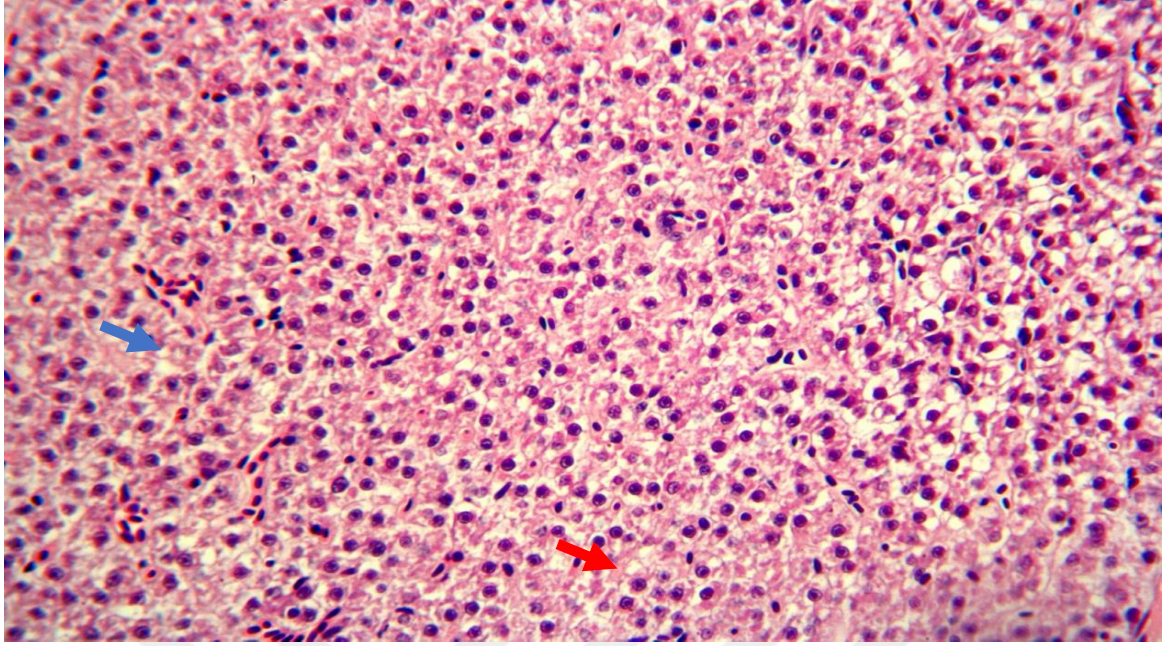
Şekil 4.4. Bir hafta boyunca 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) solungaç dokusunda epitel kaldırma (mavi ok) ve kanama (kırmızı ok).



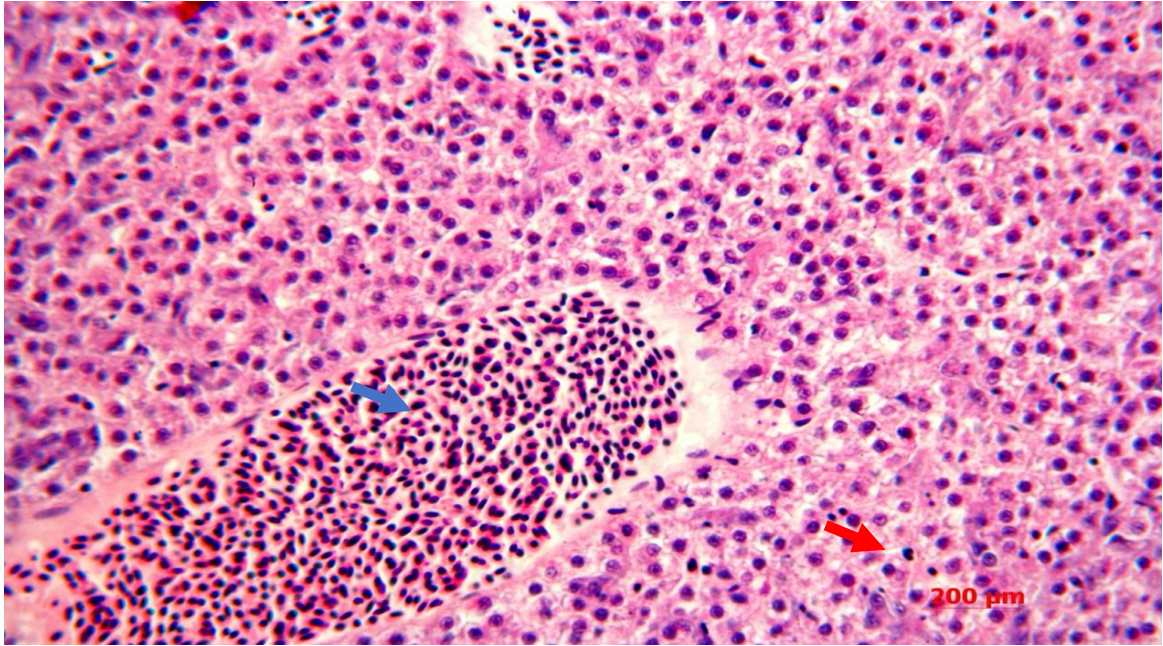
Şekil 4.5. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) solungaç dokusunda epitelial kaldırma (mavi ok), hiperplazi (sarı ok) ve kanama (kırmızı ok).



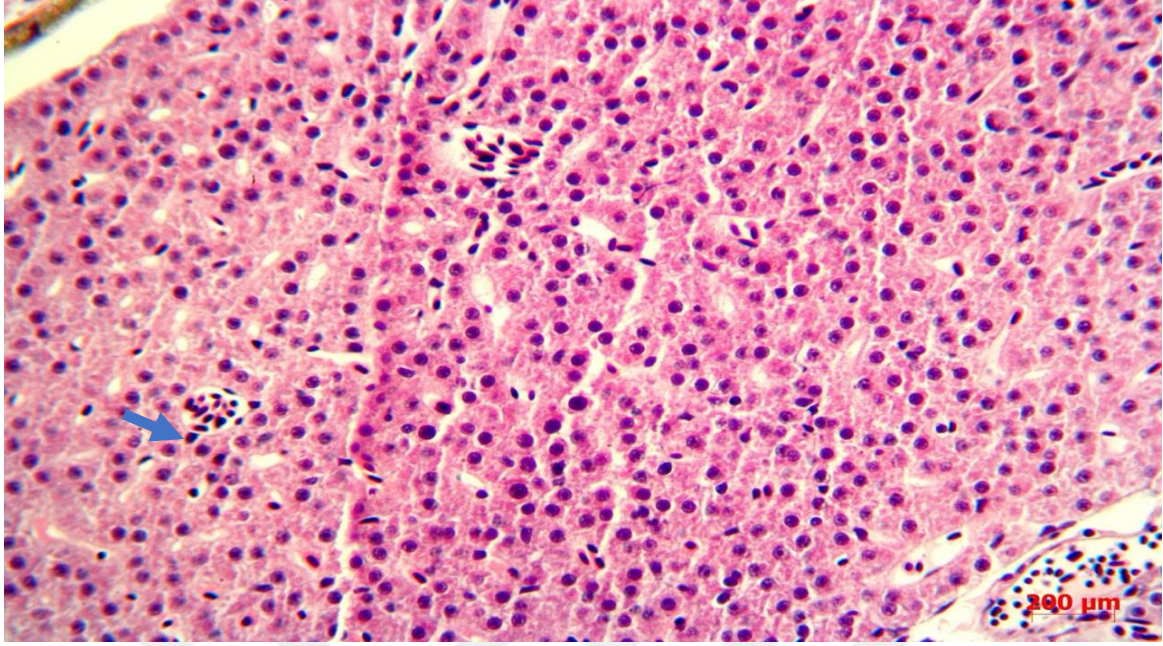
Şekil 4.6. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) solungaç dokusunda telanjiektazi (ok).



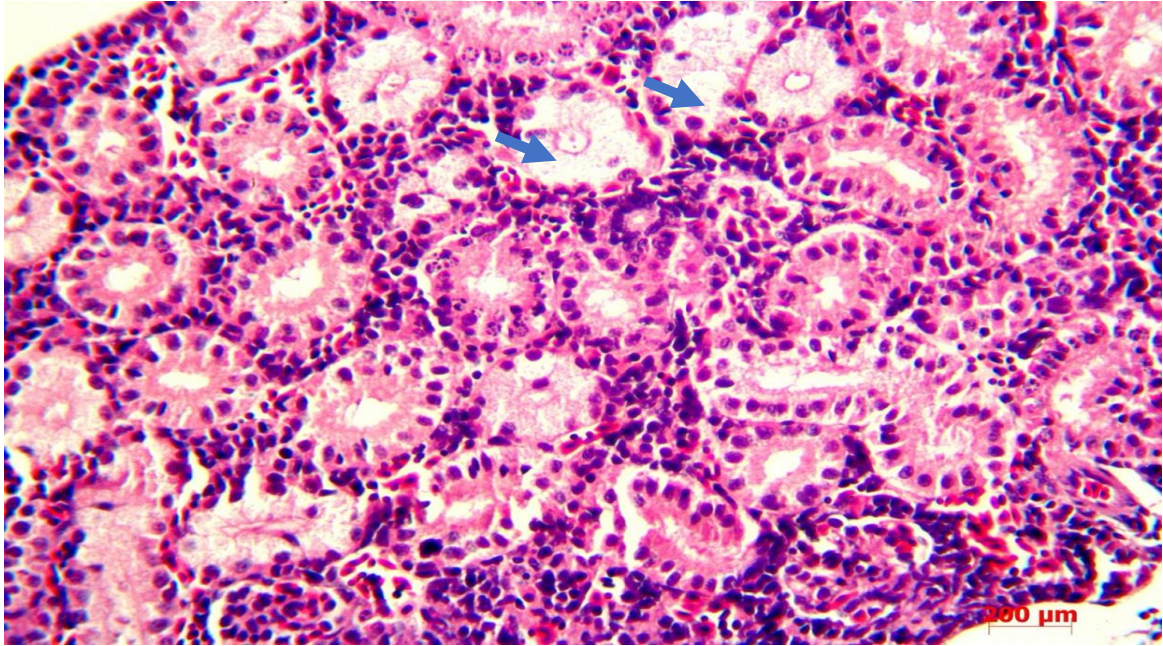
Şekil 4.7. 96 saat boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) karaciğer dokusunda kanama (mavi ok) ve hidropik dejenerasyon (kırmızı ok).



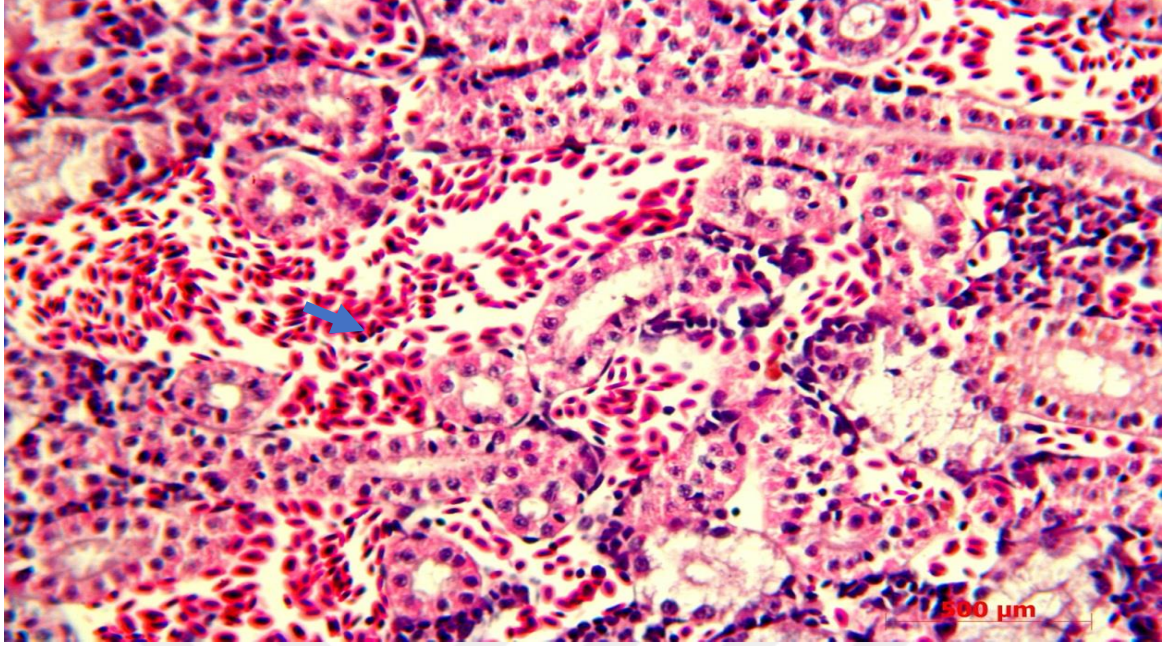
Şekil 4.8. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) karaciğer dokusunda kanama (mavi ok) ve hidropik dejenerasyon (kırmızı ok).



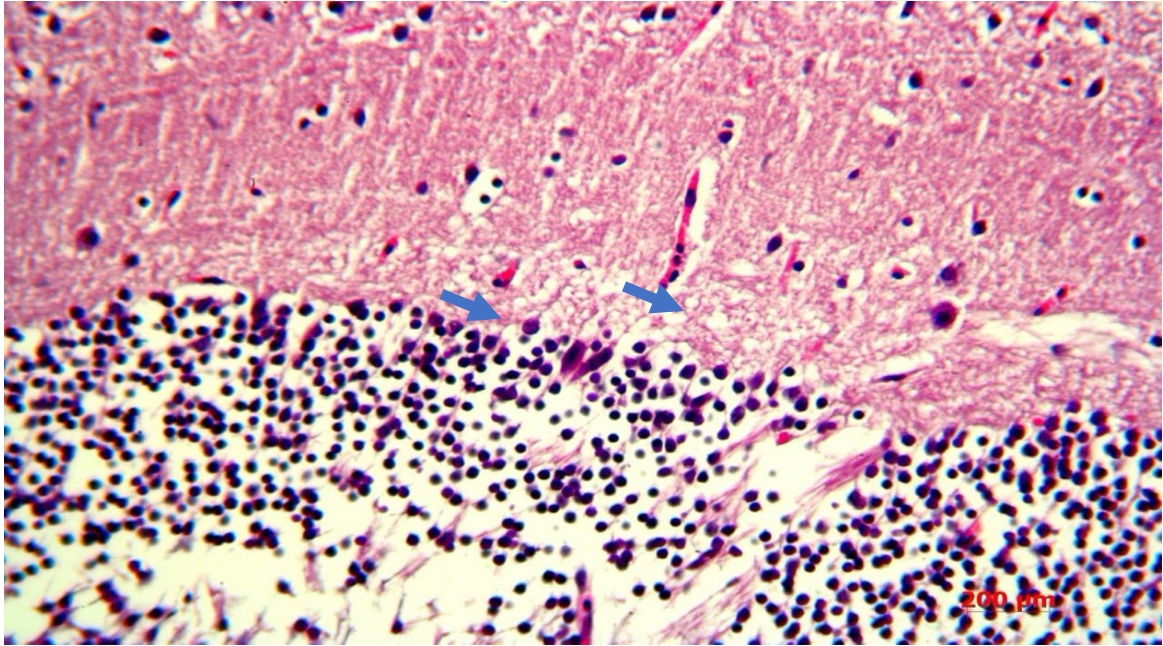
Şekil 4.9. 96 saat 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) karaciğer dokusunda (ok) kanama



Şekil 4.10. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) böbrek dokusunda (ok) tübül dejenerasyonu.



Şekil 4.11. Bir hafta boyunca 50 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) böbrek dokusunda (ok) kanama.



Şekil 4.12. 96 saat 10 mg/L PMMA'ya maruz kaldıktan sonra zebra balığı (*D. rerio*) beyin dokusunda (ok) hiperemi.

5. TARTIŞMA

DNA hasarı, hücrenin yaşam sürecinde yaygın olarak görülebilen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve nihai olarak hücre ölümüne yol açabilen bir süreçtir. DNA, yaşam boyunca hücresel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Bu değişimler sonuçta tek hücreli organizmalarda hücresel ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (Sancar ve ark., 2004; Rupp, 2006). Reaktif oksijen türleri DNA’da 20’den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (Dizdaroğlu, 1998). 8-OHdG, guaninin 8-hidroksilasyonu sonrası, özgül enzimatik bölünmeyi takiben oluşan oksidatif DNA hasarının bir ürünü ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemlidir ve hassas bir belirleyicidir. Literatürde PMMA’nın zebra balıklarının DNA oksidatif hasarına ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır.

Polimetilmetakrilat kemik çimentosu olarak da bilinir ve bu madde protez kaide materyali olarak yaygın kullanıma sahiptir. Kemik çimentosu asıl olarak implantların kemiğe tespiti için kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Toz halindeki polimer ve sıvı halindeki monomerin karıştırılmasıyla kıvam alıp, yaklaşık 60–80° sıcaklığa ulaşan ve egzotermik tepkimeyle sertleşen bir biyomateryaldir. Yaklaşık olarak 60 yıldan fazla bir süredir ortopedi alanında kullanılmaktadır [36, 37].

Polimetilmetakrilatda diğer kimyasallar gibi oksidatif strese neden olabilmekte ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Son yıllarda çevresel kirleticiler ile ilişkili olarak konuya verilen önemin giderek arttığıda görülmektedir. Moleküler etkileri arasında DNA yapısını bozarak DNA hasarına neden olma, lipid ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarını hızlandırma sayılabilir.

Sepici Dinçel ve ark. (2011), fenitrotiyona maruz kalan sazan balıklarında (*Cyprinus carpio* L.) DNA hasarı ve mikronükleus testi ile gerçekleştirdikleri genotoksisite çalışmalarında, karaciğer dokusu için önemli ölçüde artmış 8OHdG/10⁶dG seviyesi gözlemlerken, solungaçta doz ve zamana bağlı farklılık gösteren DNA hasarı ve beyin dokusunda artmış DNA hasarı tespit etmişlerdir [38].

Farklı konsantrasyonlarda çinko/bakır (Zn/Cu) piritiyona maruz bırakılan zebra balıklarında meydana gelen olası toksik etkilerin DNA hasarı ve oksidatif hasar belirteçleri dikkate

alınarak yapılan değerlendirmesinde, bu belirteçlerin endokrin bozucu biyobelirteç olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. Çalışmada Zn ve Cu piritiyona maruziyet süresi arttıkça toksik etkinin de arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda lipit peroksidasyonu düzeyinde artmış toksik etkinin akut dönemde değil artan maruziyet süresine bağlı olarak ortaya çıktığı gözlemlenmiştir [39].

Brandts et al (2021) denizel kültür balığı olan çipura balıklarında (*Sparus aurata*) kısa süreli olarak 45 nm polimetilmekakrilat nanoplastikleri ile yaptıkları çalışma, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ L PPMA ların 24 ve 96 saat etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar, lipit metabolizması (örneğin apolipoprotein A1 ve retinoid X reseptörü) ile ilişkili anahtar genlerin mRNA seviyelerinin genel bir şekilde düzenlenmesini göstermiştir. Lipit genlerinin modülasyonu ile plazmada kolesterol ve trigliseritlerde genel bir artış saptanmıştır. Total antioksidan kapasitesinde artış saptanmıştır. Aynı araştırmacılar tarafından deniz levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) yapılan çalışmada yaklaşık 45 nm oranındaki PMMA nanoplastiklerinin (NPs) 96 saat süresince etkilerini araştırmışlardır. Lipit metabolizması, ppara ve ppar α ile ilgili mRNA transkriptlerinin bolluğu, NP'lere maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde artmıştır. Biyokimyasal uç noktalar plazmadaki esteraz aktivite düzeylerinde azalma ve balıkların bağışıklık sistemini etkilediklerini bildirmişlerdir (Brandts 2018). İki türde yapılmış çalışmalarda maddenin farklı toksik etkileri incelenmiş ve kısa sürede bile etki yaratabileceği saptanmıştır.

Bu çalışmada 96 saat 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularında epitel hiperplazisi, epitel kalkması ve kanama, 1 hafta sonunda ise aynı bulgulara ilave olarak 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularında telangiektaziye rastlanmıştır. 96 saat ve 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının karaciğer dokularında hidropik dejenerasyon ve kanama gözlenmiştir. 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarının böbrek dokularında tübül dejenerasyon ve kanama saptanmıştır. Beyin dokusunda ise 96 saat ve 1 hafta süre ile 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalma sonrasında hiperemiye rastlanılmıştır.

Literatürde PMMA'nın zebra balıklarının histopatolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bulgular incelendiğinde özellikle yüksek dozlarda ve 96 saat ve 1 haftalık maruziyet sonucunda etkilerin arttığı saptanmıştır. Çalışmada elde edilen

histopatolojik çalışmalar farklı toksik maddelere maruz kalan balıklarda saptanan sonuçlarla benzerlikler göstermektedir. Mikroplastiklere maruz kalan Zebra balığı ayrıca solungaç epitelinin değişiklikleri, nötrofillerin oluşumu, sekonder lamellada mukoza hipersekresiyonu ve füzyon saptanmıştır (Limonta et al 2019). Yıldıırım ve ark. [26], deltametrinin subletal konsantrasyonlarına maruz tilapia *Oreochromis niloticus* balıklarının solungaç dokularında hiperemi, sekonder lamellerde füzyon ve telangiektazi, karaciğer dokularında ise hidropik dejenerasyon saptamıştır.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut literatürde tüm canlı hayvanlarda endokrin-aracılı advers etkilerin tanımı mevcut değildir, türe özgü memeli ve memeli olmayan (omurgasız, balık, amfibi ve kuş) canlılarda OECD ve EPA'nın ilgili yönergeleri de yetersiz kalmaktadır.

Bu çalışmada, 6, 24, 96 saat ve bir hafta süre ile 1, 10 ve 50 mg/L PMMA'ya maruz kalan zebra balıklarında, DNA oksidatif hasarı 8-hidroksi-2'deoksiguanosin (ng/g doku) düzeyinin tüm vücut dokusunda miktar tespiti ile belirlenmiştir. Düşük dozlara 24 saat maruz kalan gruplarda istatistik olarak önemli düzeyde artarken ($p<0.05$), 96 saat ve 1 haftalık yüksek dozlarda istatistiksel bir farka rastlanmamıştır.

Solungaç dokularında epitel hiperplazisi saptanmıştır. 96 saat ve bir hafta boyunca 10 mg/L ve 50 mg/L dozlara maruz kalan gruplarda epitel hiperplazisi'nin artışı gözlemlenmiştir. Ayrıca, karaciğer dokularında da aynı konsantrasyon ve sürelerde histolojik olarak hidropik dejenerasyonlar gözlenmiştir. Histolojik hasar 50 mg/L PMMA maruz kalan grupta daha şiddetli olarak saptanmıştır. Çalışma sonuçları bu maddenin canlılar üzerinde olumsuz etkiler yarattığı ve ekosistem üzerinde etkilerinin de ileri de yapılacak daha detaylı çalışmalarla irdelenmesi gerektiğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

1. Yüce, E., Kılıç, M. (2014). PVC ve PET Atıkların Seçimli Flotasyonu Bölüm 1: Plastikler, Çevresel Etkileri, Geri Dönüşümü. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(2), 79–94.
2. İnternet: Tiseon, I. (August, 2021). Plastic waste worldwide - statistics & facts. Web: <https://www.statista.com/topics/5401/global-plastic-waste/> Erişim Tarihi: 07.08.2021
3. Plastics Europe Association of Plastics Manufacturers. (2020). Plastics – the facts 2020 An analysis of European plastic production demand and waste data. Plastics Europe. Belgium. 15-27.
4. Türk Plastik Sanayicileri Araştırma Geliştirme ve Eğitim Vakfı. (2020). Türkiye Plastik Sektör İzleme Raporu 2019. PAGEV. İstanbul. 8-16.
5. İnternet: Türkiye’de plastik atık ithalatı son 15 yılda 173 kat arttı. (2020). *Greenpeace Türkiye*. Web: <https://www.greenpeace.org/turkey/basin-bultenleri/turkiyede-plastik-atik-ithalati-son-15-yilda-173-kat-artti/> Erişim Tarihi: 13.05.2021
6. Uğurtaş, S. (September, 2020). Why Turkey became Europe’s garbage dump. *POLITICO*. Web: www.politico.eu/article/why-turkey-became-europes-garbage-dump/ Erişim Tarihi: 13.05.2021
7. Brooks, A. L., Wang, S., Jambeck, J. R. (2018). The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Science Advances*, 4(6), 1–7.
8. Auta, H. S., Emenike, C. U., Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102, 165–176.
9. Kanlı, İ. B., Kurt, Y. (2019). Türkiye’nin Çevre Politikaları Kapsamında Mikroplastik Kirlilik Üzerine Bir Değerlendirme. *Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Dergisi*, 495–514.
10. Law, K. L., Starr, N., Siegler, T. R., Jambeck, J. R., Mallos, N. J., Leonard, G. H. (2020). The United States’ contribution of plastic waste to land and ocean. *Science Advances*, 6(44), 1-7.
11. Doğal Hayatı Koruma Vakfı Türkiye. (2019). Plastik Kirliliğini Hesap Verebilirlik Yoluyla Çözmek. WWF Türkiye. İstanbul. 11-25.
12. İnternet: The Life Cycle of a Plastic Water Bottle. (2014). *Deutsche Welle*. Web: www.dw.com/en/life-cycle-of-a-plastic-water-bottle/g-17266360 Erişim Tarihi: 15.05.2021
13. Yurtseven M. (2019). Nano- ve Mikro-plastiklerin insan sağlığı ve ekosistem üzerine olası etkileri. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 5(2); 17-24

14. Trifuoggi, M., Pagano, G., Oral, R., Pavičić-Hamer, D., Burić, P., Kovačić, I., Siciliano, A., Toscanesi, M., Thomas, P. J., Paduano, L., Guida, M., Lyons, D. M. (2019). Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*. *Environmental Research*, 179 (2019).
15. Rist, S., Carney Almroth, B., Hartmann, N. B., Karlsson, T. M. (2018). A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *Science of The Total Environment*, 626 (2018), 720–726.
16. Chen, C., Chen, L., Li, Y., Fu, W., Shi, X., Duan, J., Zhang, W. (2020). Impacts of microplastics on organotins' photodegradation in aquatic environments. *Environmental Pollution*, 267 (2020).
17. Kayhan E. F., Mikroplastiklerin (MP) Sucul Organizmalar Üzerindeki Risk Profillerinin Değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 45(2), 126-135.
18. Thomas, P. J., Oral, R., Pagano, G., Tez, S., Toscanesi, M., Ranieri, P., Trifuoggi, M., & Lyons, D. M. (2020). Mild toxicity of polystyrene and polymethylmethacrylate microplastics in *Paracentrotus lividus* early life stages. *Marine Environmental Research*, 161 (2020).
19. Nottrott, M. (2010). *Acrylic bone cements Influence of time and environment on physical properties*. Doktora Tezi, Haukeland University Hospital Department of Orthopedic Suregry, Bergen Norway, 1–27.
20. Kuehn, K. D., Ege, W., Gopp, U. (2005). Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthopedic Clinics of North America*, 36(1), 17–28.
21. Vaishya, R., Chauhan, M., Vaish, A. (2013). Bone cement. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 4(4), 157–163.
22. Marangoz, S. (2011). Kemik çimentosu. *TOTBİD Dergisi*, 10(2), 103-108.
23. Şerbetçi, K., Orhun, S., Korkusuz, F., Hasırcı, N. (2002). Hidroksi Apatit İçeren Kemik Çimentosunun İn-vivo Biyouyumluluğu. *Joint Diseases and Related Surgery*, 13(4), 259-263.
24. Aran, B. (2004). *Polymerization And Characterization Of Methylmethacrylate By Atom Transfer Radical Polymerization*. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 3-4.
25. Koltzenburg, S., Maskos, M., Nuyken, O., Mülhaupt, R., Matyjaszewski, K., Hughes, K. (2017). *Polymer Chemistry* .(1. Baskı). Berlin: Springer, 398.
26. Baleani, M., Viceconti, M. (2010). The effect of adding 10% of barium sulphate radiopacifier on the mechanical behaviour of acrylic bone cement. *Fatigue and Fracture of Engineering Materials and Structures*, 34(5), 374–382.
27. Unosson, E. (2010). *Mechanical Properties and Spreading Characteristics of Bone Cement for Spinal Applications*. Yüksek Lisans Tezi. Lulea University of Technology, Lulea, 11.

28. Kemal, Ş. (2001). *Formulation and Biomechanical Evaluation of Bone Cements*. Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 11-18.
29. De Tommaso, J., Dubois, J.-L. (2021). Risk analysis on PMMA Recycling Economics. *Polymers*, 13(16).
30. Kutluyer, F., Aksakal, E. (2013). Sucul Model Organizmalar Ve Biyoteknolojide Kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(2), 101-107.
31. Kayhan, F, Kaymak, G, Esmer Duruel, H, Tartar Kızılkaya, Ş. (2018). Biyolojik Araştırmalarda Zebra Balığının (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Kullanılması ve Önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 38-45.
32. Brandts, I., Barriá, C., Martins, M. A., Franco-Martínez, L., Barreto, A., Tvarijonaviciute, A., Tort, L., Oliveira, M., Teles, M. (2021). Waterborne exposure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to polymethylmethacrylate nanoplastics causes effects at cellular and molecular levels. *Journal of Hazardous Materials*, 403.
33. Brandts, I., Teles, M., Tvarijonaviciute, A., Pereira, M. L., Martins, M.A., Tort, L., Oliveira, M. (2018). Effects of polymethylmethacrylate nanoplastics on *Dicentrarchus labrax*. *Genomics*, 110 (6), 435-441.
34. Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Nature Scientific Report*, 9.
35. Webb, J. C. J., Spencer R. F. (2007). The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *Journal of Bone Joint Surgery*, 89(7), 851-857.
36. Kuehn K. -D., Ege, W., Gopp, U. (2005). Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthopedic Clinics of North America*, 36, 17-28.
37. Sepici-Dinçel, A., Sahin, D., Karasu Benli, A. C., Sarikaya, R., Selvi, M., Erkoc, F., Altan, N. (2011). Genotoxicity assessment of carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings by tissue DNA damage and micronucleus test, after environmental exposure to fenitrothion. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(5), 388–392.
38. İpiçürük, N. (2018). *Çevresel Kirlenici Çinko ve Bakır Piritiyonun (Zn/Cu Pyrithione) Zebra Balıklarında (Danio rerio) Genotoksik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 65-76.





GAZİ GELECEKTİR...