

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NANOPARTİKÜLER TİTANYUM DİOKSİTİN *Oreochromis niloticus*'UN
SOLUNGAÇ DOKUSU ENZİMATİK ANTİOKSİDANLARINA ETKİSİ**

RİFAT CESUR BOZAT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOPARTİKÜLER TİTANYUM DİOKSİTİN *Oreochromis niloticus*'UN
SOLUNGAÇ DOKUSU ENZİMATİK ANTİOKSİDANLARINA ETKİSİ**

Rifat Cesur BOZAT
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 30/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özgür FIRAT
BAŞKAN (DANIŞMAN)

Doç. Dr. Hikmet Y. ÇOĞUN
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
ÜYE

Prof. Dr. Ramazan GÜRBÜZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FEFYL/2015-0007

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NANOPARTİKÜLER TİTANYUM DİOKSİTİN *Oreochromis niloticus*'UN SOLUNGAÇ DOKUSU ENZİMATİK ANTİOKSİDANLARINA ETKİSİ

Rifat Cesur BOZAT

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özgür FIRAT

Yıl: 2017, Sayfa Sayısı: 57

Jüri : Doç. Dr. Özgür FIRAT
: Doç. Dr. Hikmet Y. ÇOĞUN
: Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ

Bu araştırmada titanyum dioksit nanopartiküllerin ($\text{TiO}_2\text{-NP}$) etkileşimine yanıtta tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'ta hedef doku olarak seçilen solungaçtaki bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu amaçla balıklar 4 ve 14 günlük sürelerle $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 1.0 ve 5.0 mg/L etkisine bırakılmış ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri belirlenmiştir. $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in etkisinde incelenen antioksidan enzimlerde ortam derişimi ve etkileşim süresine bağlı olarak anlamlı değişimlerin meydana geldiği saptanmıştır.

CAT aktivitesi, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 1.0 mg/L ortam derişiminde her iki etki süresi sonunda azalış gösterirken ($P<0.05$); 5.0 mg/L ortam derişiminde 4 günlük süre sonunda azalış, 14 günün sonunda ise artış göstermiştir ($P<0.05$).

4 günün sonunda $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in düşük ve yüksek ortam derişimlerinde azalış gösteren ($P<0.05$) SOD aktivitesi, 14 günün sonunda anlamlı bir değişim göstermemiştir ($P>0.05$).

5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in etkisinde GPX aktivitesi ilk etkileşim süresi sonunda azalış ($P<0.05$); son etkileşim süresi sonunda artış göstermiştir ($P<0.05$).

GST aktivitesi, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in düşük ortam derişiminde 4 günlük süre sonunda; yüksek ortam derişiminde ise hem 4 hem de 14 günlük süre sonunda artmıştır ($P<0.05$).

GR aktivitesinde ise $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in yüksek ortam derişiminde her iki etkileşim süresi sonunda artış saptanmıştır ($P<0.05$).

Sonuç olarak çalışmamız *O. niloticus*'un solungaç dokusundaki incelenen tüm antioksidan enzimlerin, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'den etkilendiğini ve belirlenen enzim aktivitelerindeki artış veya azalışların genel olarak $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'nin yüksek ortam derişiminin etkisinde daha fazla olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Oreochromis niloticus*, Balık, Titanyum Dioksit Nanopartikülleri, Enzimatik Antioksidanlar

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON ENZYMATIC ANTIOXIDANTS IN GILL TISSUE OF *Oreochromis niloticus*

Rifat Cesur BOZAT

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özgür FIRAT
Year: 2017, Number of Pages: 57

Jury : Assoc. Prof. Dr. Özgür FIRAT
: Assoc. Prof. Dr. Hikmet Y. ÇOĞUN
: Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ

In this research, it was investigated the alterations in activities of some antioxidant enzymes of gill chosen as the target tissue in *Oreochromis niloticus* in response to titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-Np). For this purpose fish were exposed to 1.0 and 5.0 mg/L TiO₂-Np for 4 and 14 days and catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione -S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) activities were determined. The significant changes in all analyzed antioxidant enzymes were observed due to medium concentration and exposure period in the exposure of TiO₂-Np.

CAT activity decreased in the exposure of 1.0 mg/L TiO₂-Np after both periods (P<0.05). In the higher concentration of TiO₂-Np, CAT activity declined at 4 days, whereas it increased at 14 days (P<0.05).

SOD activity decreased in all the tested concentrations of TiO₂-Np at 4 days (P<0.05), while it was not observed a significant change in its activity at 14 days (P>0.05).

In 5.0 mg/L TiO₂-Np exposed fish, although GPX activity declined at 4 days (P<0.05), it elevated at the end of the exposure period (P<0.05).

In response to TiO₂-Np exposure, GST activity showed an increase in its lower medium concentration after 4 days and in its higher medium concentration after both periods (P<0.05).

It was determined a significant elevation in GR activity in exposure of 5.0 mg/L TiO₂-Np after 4 and 14 days (P<0.05).

In conclusion, our study indicated that all analyzed antioxidant enzymes in gill of *O. niloticus* were affected by TiO₂-Np and that observed decreases or increases in enzyme activities of generally were higher in the exposure of 5.0 mg/L TiO₂-Np.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, Fish, Titanium Dioxide Nanoparticles, Enzymatic Antioxidants

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca ve bu tez projesinin yürütülmesinde danışmanlığımı yapan, hem bilimsel katkı ve yardımları ile hem de hayat tecrübesi ile bana yol gösteren saygı değer Hocam Sayın Doç. Dr. Özgür FIRAT'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Ekofizyolojisi laboratuvarının tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Saygıdeğer Hocam Prof.Dr. Ferit KARGIN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca deneysel çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Sayın Doç.Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN, Öğr.Gör.Dr. Tüzün AYTEKİN ve Öğr.Gör.Dr. Özge FIRAT, Yrd.Doç.Dr. Hasan KARADAĞ, Uzman Biyolog Özge TEMİZ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Proje süresince her daim yanımda olan ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Uzm. Biyolog Mustafa TEKTAŞ ve Biyolog Dilek KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına, çalışmamızı maddi olarak desteklediği için teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında ve her zaman yanımda olan saygıdeğer babam Sayın Sabri BOZAT ve canım annem Sayın Hüsna BOZAT ile tüm değerli kardeşlerime en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	15
3.1.2. Deneylerde kullanılan cihazlar	16
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Doku örneklerinin alınması ve biyokimyasal analizler	17
3.2.1.1. Homojenatların hazırlanması	17
3.2.1.2. CAT aktivite tayini	18
3.2.1.3. SOD aktivite tayini	19
3.2.1.4. GPX aktivite tayini	20
3.2.1.5. GST aktivite tayini	22
3.2.1.6. GR aktivite tayini.....	23
3.2.1.7. Protein düzeyi tayini.....	25
3.3. İstatistik	26
4. BULGULAR	27
4.1. CAT Aktivitesi.....	28
4.2. SOD Aktivitesi.....	29
4.3. GPX Aktivitesi.....	30
4.4. GST Aktivitesi.....	32
4.5. GR Aktivitesi.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37

KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	56
EK - 1	57



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Süperoksit Dismutaz Yöntemi	20
Çizelge 3.2.	Glutasyon Peroksidaz Yöntemi.....	21
Çizelge 3.3.	Glutasyon S-Transferaz Yöntemi.....	23
Çizelge 3.4.	Glutasyon Redüktaz Yöntemi.....	24
Çizelge 3.5.	Protein Yöntemi.....	25
Çizelge 4.1.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO ₂ -NP'in farklı ortam derişimlerinin solungaç dokusu CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkisi.....	27
Çizelge 4.2.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO ₂ -NP'in farklı ortam derişimlerinin solungaç dokusu SOD aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkisi.....	29
Çizelge 4.3.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO ₂ -NP'in farklı ortam derişimlerinin solungaç dokusu GPX aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkisi.....	31
Çizelge 4.4.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO ₂ -NP'in farklı ortam derişimlerinin solungaç dokusu GST aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkisi.....	33
Çizelge 4.5.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO ₂ -NP'in farklı ortam derişimlerinin solungaç dokusu GR aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkisi.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Nanopartiküllerin biyolojik yapılar ile karşılaştırılması.....	2
Şekil 3.1.	Standart protein grafiği	26
Şekil 4.1.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO_2 -NP'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	28
Şekil 4.2.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO_2 -NP'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	30
Şekil 4.3.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO_2 -NP'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GPX aktivitesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.4.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO_2 -NP'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GST aktivitesi üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.5.	<i>O. niloticus</i> 'ta TiO_2 -NP'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GR aktivitesi üzerine etkisi.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

g	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
ppm	: mg/L
µg	: Mikrogram
CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TiO ₂ -NP	: Titanyum Dioksit Nanopartikülleri

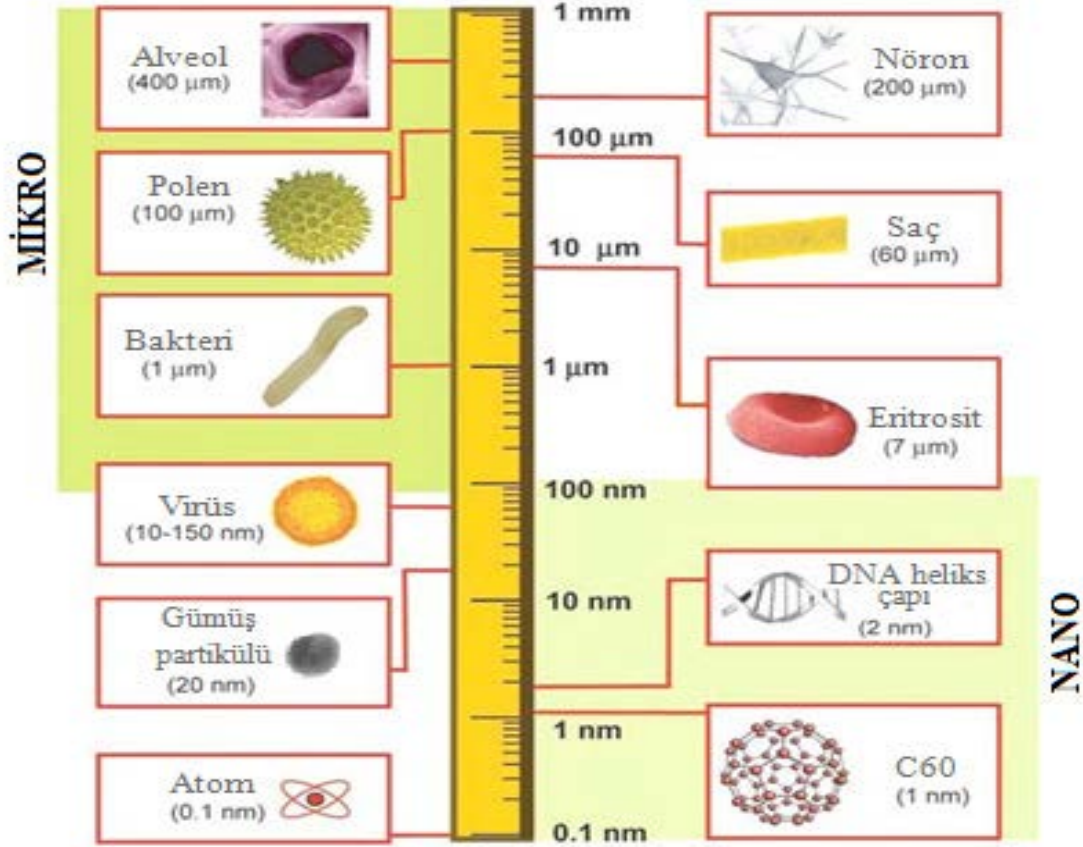
1. GİRİŞ

Nanobilim 0.1–100 nm arasındaki materyallerin özelliklerini anlama, nanoteknoloji ise bu düzeydeki yeni ürünleri sentezlemek ya da var olanı değiştirmek için uğraşmaktadır. Günümüzde nanobilim ve nanoteknoloji tıp, ilaç, implant teknolojileri, elektronik ve telekomünikasyon gibi alanlarda geniş bir yayılım göstermektedir (Royal Society 2004).

Nanoteknoloji sürekli olarak gelişmekte olan çok disiplinli bir bilim olup, nanometre (10^{-9} m) boyutundaki materyallerin sentezine dayanan uygulamaları içerir. Nanoteknoloji kavramı Yunancada küçük anlamına gelen nano sözcüğünden türetilmiştir. Bu teknoloji çok küçük boyuttaki maddeleri kullanarak yeni ürünlerin üretilmesi konusunda heyecan verici sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Çünkü, partikül büyüklüğü 100 nm altında olan materyaller ile çalışılmaktadır. Bu teknoloji ürün gelişiminde çok yönlü ve etkin bir yaklaşımı teknolojiye sunarak birçok endüstri alanında ve tıbbi uygulamalarda yeni ürünlerin üretilmesini mümkün kılmaktadır. Nanoteknolojinin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Tıp alanında görüntüleme teknikleri, ilaç taşıyıcıları ve implant materyallerinde; tekstilde su tutmayan, yanmayan ve kendini temizleyen kumaşlarda; kozmetikte güneş kremleri ile kırıksık önleyici ve yaşlanmayı geciktirici kremlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Colvin 2003). Günümüzde 1000'den fazla tüketici ürünlerinde nanomaddeler bulunmaktadır. 2007 yılında nanoteknoloji endüstrisinin 147 milyar dolar olan pazar büyüklüğünün, 2015 yılında 3.1 trilyon dolara ulaşabileceği ifade edilmiştir (Singh vd. 2009). Geniş bir endüstri kolundaki nanopartiküllerin artan kullanımlarından dolayı tasarlanmış nanomalzeme üretiminin 2011'den 2020 yılına kadar 400 tondan 58000 tona kadar çıkması beklenmektedir (Mayland 2006). Bu nedenle insanlar gelecek yıllarda dramatik bir şekilde daha fazla bu teknolojinin etkisi altında kalacaklardır.

Nanomateryaller genel olarak karbon nanotüpleri ve fullerenler olarak isimlendirilen karbon küreleri ile metal (Cu-NP, Ag-NP gibi) ve metal oksitlerden (TiO_2 -NP, ZnO-NP gibi) oluşan nanopartiküller olarak çeşitli kısımlara ayrılabilirler (Shaw ve Handy 2011). Nanopartiküller bazen çok ince parçacıklar olarak da ifade edilmekte ve genellikle bir yada iki boyutta 1-100 nm arasındaki parçacık büyüklüğüne sahip partiküller olarak tanımlanmaktadır. Bir nanometre kabaca

10 hidrojen atomu genişliğindedir. Nanopartikülleri biyolojik ve hüresel yapılarla karşılaştıracak olursak bir eritrosit yaklaşık olarak 7 μm çapında ya da 7000 nm'dir. Bazı bakterilerin büyüklükleri sıklıkla 1 μm aralığında (1000 nm), bazı virüsler ise 60 – 100 nm aralığında bir büyüklüğe sahiptir (Warheit vd. 2008).



Şekil 1.1. Nanopartiküllerin biyolojik yapılar ile karşılaştırılması (Atlı-Şekerlioğlu 2013).

Nanopartiküller deniz tuzu, volkanik küller, orman yangınları gibi doğal kaynaklarda bulunmasının yanı sıra endüstri ve otomobil gibi önemli alanlarda geniş ölçüde kullanılmaktadır (Colvin 2003). Nanopartiküller çok geniş bir yüzey alanına sahip olup bu yüzey alanı demir gibi metaller, polisiklik aromatik karbonlar gibi organik kimyasal yanma ürünleri için yüksek bir afiniteye sahiptirler (Cheng vd. 2004). USEPA atmosferik nanopartikül solunumu sonucu her yıl 60 bin insanın öldüğünü belirtmektedir. Alzheimer, parkinson, wilson gibi dejeneratif hastalıklar için nanopartikül içeren yeni ilaçlar geliştirilmektedir (Dobson 2001). Yine nanopartiküler ilaçlar kanser tedavilerinde de kullanılmaktadır (Brigger vd. 2002).

Titanyum dioksit-nanopartikülleri ($\text{TiO}_2\text{-NP}$) metal oksit nanopartikülleri olup U.V. radyasyonuna karşı etkili bir güneş kremi olarak kozmetiklerde ve ayrıca endüstriyel ürünler ile ilaçlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Diebold 2003). Yine bu $\text{TiO}_2\text{-NP}$, fotokataliz özelliğinden dolayı atık sularda dezenfektan (Cho vd. 2004) ve son çalışmalarda da insan kolon kanser hücrelerinde fotodinamik terapi yöntemlerinde ışığa duyarlaştırıcı olarak kullanılmaktadır (Zhang ve Sun 2004). $\text{TiO}_2\text{-NP}$, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından güneş koruyucularında kullanımı için güvenli olarak kabul edilmesine rağmen, *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda bu partiküllerin DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Dunford vd. 1997).

$\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'nin süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerine (ROT) neden olduğu gösterilmiştir (Singh vd. 2009). Ayrıca bu nanopartiküllerin perinükleer bölgede konsantre oldukları ve ilginç olarak bu bölgede ROT üretimini arttırdığı rapor edilmiştir (Park vd. 2008). *In vivo* çalışmalarda $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in inflamasyona, fibrozise, akciğer ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Singh vd. 2009).

$\text{TiO}_2\text{-NP}$, ticari olarak yapılmış ilk nanomalzemelerin yapısında bulunması ve çeşitli endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılmasından dolayı metal oksit nanopartikülleri arasında ekotoksosite açısından en çok çalışılan nanometaldir (Cattaneo vd. 2009). TiO_2 rutil, anataz ve brokit olarak bilinen üç kristal formda bulunabilen ve doğal olarak oluşan bir mineraldir. Element olarak titanyum keza ilmenit (FeTiO_3) ve TiO_2 'den üretilebilen diğer mineral ve cevherlerde de bulunabilmektedir (NRC 1999). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'lerin ticari üretimi 2006 – 2010 yılları arasında yıllık 5000 ton iken, 2011 – 2014 yılları arasında 10000 tondan fazla olup, yaklaşık olarak 2025 yılında 2,5 milyon ton olarak hesaplanmaktadır (Robichaud vd. 2009).

Rutil faz TiO_2 'nin doğada en yaygın bulunduğu formdur. Rutil formda TiO_2 boya, kağıt, mürekkep ve diş macununda opaklık sağlayan beyaz pigment; kozmetik ürünlerinde pigment ve koyulaştırıcı ve U.V. ışın absorplayıcı özelliği ile de plastik ve diğer uygulamalarda kullanılmaktadır. Anataz form en yüksek foto katalitik aktivite gösterdiğinden kataliz ve fotokataliz uygulamada; brokit ise daha çok güneş pillerinde elektrot olarak kullanılmaktadır (Menard vd. 2011).

$\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in bu şekildeki geniş kullanım alanları çevreye bu partiküllerin yüksek düzeylerde karışmasına ve çevrede zararlara neden olmasına yol açmaktadır. Özellikle

son 10 yılda $\text{TiO}_2\text{-NP}$ kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Günümüzde $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'nin çevresel konsantrasyonuyla ilgili çok az veri bulunmaktadır. $\text{TiO}_2\text{-NP}$ çeşitli yollarla su ekosistemine girebilmektedir. Yüzey akış sularında metalik konsantrasyonu en yüksek olarak 600 $\mu\text{g/L}$ olarak ölçülmüştür. Atık su arıtma tesislerinde de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ düzeyleri ölçmüş ve kanalizasyon sularında 100–3000 $\mu\text{g/L}$ düzeyleri saptanmıştır (Menard vd. 2011). Nanopartiküllerin su ortamında pH, iyonik güç ve doğal elektrotlar gibi çeşitli faktörlerin etkisi altında olabilmektedirler (Sharma 2009). Su ortamlarına giren nanopartiküller bir araya toplanma, sedimente karışma ya da askıda partikül madde ile birlikte bir arada bulunabilmektedirler (Boxall vd. 2007). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'nin toksik etkileri partikül büyüklükleri, şekilleri, bir araya gelme düzeyleri, kimyasal ve katalitik özelliklerine bağlı olarak bakteri, alg, omurgasız ve omurgalıları içeren türlerde değişim gösterebilmektedir (Sharma 2009).

Nanopartiküllerin küçük boyutları ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak organizmalar için olumsuz biyolojik etkilere neden olacağı ifade edilmektedir. Yaklaşık 13 yıldır nanomateriyallere çevre ve insan sağlığı ile ilgili olarak artan bir ilgi gösterilmekte olup bu konuda ilk rapor nanomateriyallerin insan sağlığı ve çevreye etkileri üzerine belirgin bir bilgi eksikliği bulunduğunu vurgulamak için Kraliyet Bilimler Akademisi tarafından 2004 yılında yayınlanmıştır (Royal Society 2004). Daha sonra bu konuda bazı hükümet raporları da ortaya çıkmıştır. Ancak şuan nanoteknoloji endüstrisindeki şaşırtıcı gelişme ve büyümeye paralel olarak bu malzemelerin güvenilirliği ile ilgili bir şüphe uyanmış bulunmaktadır. Dahası bu maddelerin sitotoksik, oksidatif stres ve inflamatuvar etkileri yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır (Singh vd. 2009). Bu nanopartiküller genotoksik etkilere yol açabilmektedirler. Eğer yeterince küçük boyutta iseler hem hücre hem de çekirdek zarını geçerek doğrudan DNA hasarına neden olabildikleri ve/veya hücre içinde biriken nanomateriyallerin mitozda çekirdek zarının kaybolması esnasında DNA ile etkileşime girebildikleri ifade edilmektedir. Nanopartiküllerin hücre içerisindeki redoks dengesini bozarak, antioksidan savunma sistemlerini baskılayarak ya da artan hücre içi ROT ile ilişkili olarak oksidatif strese neden olduğu öngörülmektedir. Nanopartiküllerin ROT üretimini arttırdığı ile ilgili birçok çalışma vardır (Reeves vd. 2008, Saquib vd. 2012). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'nin de ROT üretimine neden olduğu gösterilmiştir (Shukla vd. 2011).

Biyolojik sistemlerdeki TiO_2 -NP etkileri çalışılmıştır. TiO_2 -NP fotoindüklenebilir ve redoks aktivitesine sahip bir partikül olduğundan ROT'ların potansiyel üreticileri olarak bilinmektedir. TiO_2 -NP'nin ve diğer metal nanopartiküllerin toksisite mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte son çalışmalar nanopartikül toksisitesinin partikül büyüklüğü, şekli ve yüzey özelliklerine bağlı olarak oluştuğu ifade edilmektedir (Crane vd. 2008). Balıklar üzerine TiO_2 - NP'nin toksik etkileri son yıllarda rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda TiO_2 -NP'nin birçok balık türü için toksik olduğu görülmüştür (Menard vd. 2011).

Çevresel koşullardaki değişimler ve kirleticiler dünya üzerindeki ekosistemleri tehdit etmekte ve değiştirmektedir. Yeryüzünün %70'inden fazlasını su kütlesi oluşturmaktadır. Bu nedenle hem bu ekosistem hem de içinde yaşayan organizmalar ne yazık ki bu değişim ve kirlilikten son derece etkilenmektedir. Akuatik ekosistemler kirleticilerin etkilerine en açık olan sistemlerdir. Nehirler ve göller gibi tatlı sular ve denizler hemen tüm çevresel kirleticiler için nihai bir alıcı ortamdır. Şehirleşme ve endüstrileşme ile tarımsal ve madencilik aktivitelerinin su kaynaklarına yakın olması sucul ekosistemleri bu antropojenik kirleticilere karşı savunmasız hale getirerek ciddi boyutlarda etkilenmesine neden olmaktadır. Balıklar su ortamlarının en önemli biyolojik ögesi olup su besin zincirinin en üstünde bulunduklarından kirlilikten daha çok etkilenmektedir. Balıklar keza protein ve mineral kaynağı olarak özellikle de insanların önemli bir besin kaynağını oluşturduklarından kirleticilerin sucul ortamlara olan etkileri sadece bu canlılarda değil dolaylı olarak insanlarda da toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle su kirliliğinin izlenmesinde ve kirleticilerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde balıklar biyoindikatör türler olarak bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Çoğu çevresel durumlar ve kirleticisi stresli sucul organizmalardaki oksijen radikallerinin oluşturulması ve bunların etkisiz hale getirilmesi arasındaki dengeyi bozmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır (Abele vd. 2012). Kimyasal toksik kirleticiler biyolojik sistemlerdeki ROT'un önemli kaynaklarıdır. Organizmaların antioksidan savunma sistemleri ve temel biyomoleküllerinde hasara neden olan oksidatif stres, bu ROT'ların toksik etkilerinin bir sonucudur. Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan arasındaki denge mekanizmasının bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Normal olarak hücrelerde aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak

oluşan ROT ve bunların hasarlarına karşı etkin bir savunma mekanizması bulunmaktadır. Bununla birlikte şiddetli bir oksidatif stres durumunda bu savunma mekanizmasının baskılanmasına bağlı olarak hücreleri ölüme kadar götürecek toksik mekanizmaların ortaya çıkması kaçınılmaz olmaktadır. Gerek alan gerekse de laboratuvar çalışmaları çok çeşitli çevresel kirleticilerin etkisinde oluşan ROT'lar nedeniyle canlılarda DNA hasarı, hücre ve organel zarlarında lipid peroksidasyonu, enzim sistemlerinin inhibisyonu, karbonhidrat ve protein metabolizmasının bozulması gibi toksikolojik sonuçları göstermiştir.

Su organizmalarında ksenobiyotiklerin süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi hücre ve dokularda ciddi patolojik durumlara neden olan ROT'ları oluşturduğu iyi bilinmektedir (Wilhelm-Filho vd. 2001). Son yıllardaki ekotoksikolojik çalışmaların bu nedenle akuatik organizmalardaki çeşitli kirleticilerin neden olduğu oksidatif stres toksisitesinin araştırılması üzerine yoğunlaşmış olması şaşırtıcı değildir. Akuatik organizmalar arasında balıklar oksidatif strese oldukça duyarlı olan organizmalardır. Diğer yüksek yapılı canlılar gibi balıklarda oksidatif strese karşı önemli bir savunma stratejisi geliştirmiştir. Genel olarak antioksidanlar adı verilen bu savunma mekanizması balıkların hayatta kalması ve sağlıklı yaşam sürmeleri için hücrelerde önemli görevler üstlenmiştir. Bu savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar arasında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri önemli bir yer tutmaktadır. Antioksidan enzim aktivitelerin değerlendirilmesi organizmalardaki oksidatif durum hakkında yararlı bilgiler sağladığından bu enzimler oksidatif stresin biyomarkırları olarak ifade edilmektedir (Kohen and Nyska 2002). Çevresel kirleticilerin balıkların dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişimlere (azalış ve/veya artışlara) neden olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Xiong vd. 2011, Abdel-Khalek vd. 2015, Afifi vd. 2016, Fırat 2016, Tutuş 2016).

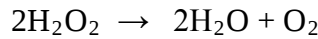
Hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyan en önemli antioksidan enzimler SOD ve CAT'dır. Bu enzimlerden SOD süperoksit anyonunu; CAT ise hidrojen peroksite etki ederek bu iki ROT'dan hücresel yapılar için oldukça tehlikeli olan hidroksil radikalının oluşmasını engellemektedirler. Bu nedenle SOD ve CAT'ın

ROT'lara karşı hücrel antioksidan savunma sisteminin ilk hattını oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu biyolojik önemlerinden dolayı bu iki enzim kirleticilerin etkilerinin değerlendirilmesinde toksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

SOD, tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde bulunan bir metalloenzim olup yapısında bulunan metallere göre Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD şeklinde isimlendirilebilmektedirler. Cu-Zn-SOD'lar hücrenin sitozol ve çekirdeğine; Mn-SOD'lar ise mitokondri organeline yerleşmiş olarak hücrede lokalize olmuşlardır. Bu enzim sadece toksikantların varlığında değil normal koşullarda da oksijen toksisitesine karşı hücreleri korumaktadır. SOD başka bir elektron ekleyerek daha az reaktif ve daha az toksik olan hidrojen peroksit'e dönüştürerek süperoksit anyon radikalini detoksifiye etmektedir (Abele vd. 2012). Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;



CAT yapısında demir atomları bulunduğundan bir hemoprotein olarak da adlandırılan ve hücrelerin özellikle de peroksizomlarında lokalize olmuş bir enzimdir. SOD'nin katıldığı ya da başka reaksiyonlar sonucunda oluşan hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürerek ROT'ların uzaklaştırılmasında kritik bir rol oynamaktadır (Vander vd. 2003). Bir CAT molekülü dakikada yaklaşık olarak 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü toksik olmayan bileşenlere ayırmakta ve bu nedenle de tüm enzimler içerisinde en yüksek katalitik aktiviteye sahip enzimlerden biri olarak kabul edilmektedir (Polidoros ve Scandolios 1999). Katalizlediği tepkime aşağıdaki gibidir;

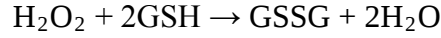


GST hücrelerin sitozolünde bulunan bir multienzim ailesi olup faz-II reaksiyonlarındaki detoksifiye edici rolü ile hücreleri ksenobiyotiklerin zararlı etkilerine karşı koruyan bir enzimdir. GST epoksitler, alifatik heterosiklik radikaller ve birçok ksenobiyotiğin glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu katalize ederek detoksifikasyon süreçlerinde önemli roller oynamaktadır (Sherratt ve Hayes 2002). Gene lipid peroksitlerine karşı aktivite göstererek antioksidan savunmada hayati bir rol oynamaktadır. Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;



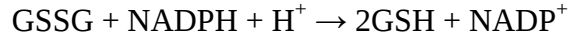
GPX de hücrelerin sitozolüne yerleşmiş bulunan ve yapısındaki dört selenyum atomundan dolayı tetramerik yapıda olan bir enzimdir. Se-bağımlı bu enzimler hem

hidrojen peroksit hem de hidroperoksitlere etki etmektedirler. Katalizlediği reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.



Yukarıdaki reaksiyonlarda da görüldüğü üzere GPX, tıpkı CAT gibi hidrojen peroksit'e etki ederek bu peroksidin dönüşümüyle oluşacak ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatma riski yüksek olan hidroksil radikalının oluşumunu önleyerek ve/veya başlamış olan lipid peroksidasyonu ile oluşan lipid peroksitlerine etki ederek çok önemli bir antioksidan savunma sağlar. Bu nedenle bu enzim hücre zarlarının stabil yapısının korunmasında hayati bir rol oynamaktadır (Ralston ve Raymond 2010).

GR hücrelerde birçok hayati fonksiyonu bulunan ve aynı zamanda da önemli bir antioksidan olan GSH metabolizmasındaki rolleri ile dikkat çeken bir enzimdir. Bir flavoprotein olan bu enzim NADPH yardımıyla okside glutatyondan redükte glutatyonun oluşumunu katalize ederek hücre içi glutatyon düzeylerini korumaktadır. GSH da diğer önemli görevlerinin yanında GST'nin ksenobiyotiklerin konjugasyonu için ve CAT enziminin yapısının korunmasında rol oynamaktadır. GR'nin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Günümüzde hızlı teknolojik ve endüstriyel gelişmeler insan yaşamı için kolaylıklar sağladığı gibi ne yazık ki çevrede de ciddi problemlere neden olmaktadır. Özellikle de sanayi devriminden bu yana üretilen ve sentezlenen ancak çevre dostu olmayan doğaya toksik kimyasalların gerek doğrudan gerekse de besin zinciri ya da başka bir yolla dolaylı olarak insan yaşamını da olumsuz etkileyecek bir çok çevre sorunlarına neden olması dikkat edilmesi ve üzerinde düşünülmesi gereken bir durumdur. 1960'lı yıllarda ortaya çıkan ve günümüzde büyük bir ivme kazanan nanoteknolojideki gelişmelere paralel olarak hayatımıza yeni ve çok küçük boyutlarda olan kimyasallar girmektedir. Gelecekte nanoteknolojinin, tarihte buhar gücünün, transistörlerin veya elektriğin kullanımı kadar etkili olacağı belirtilmektedir (Australian Government 2005). Böylesine yüksek bir potansiyele sahip bir teknolojinin tüm ekosistemleri ve içinde yaşayan canlıları da gelişimi ve büyülüğü kadar etkileyebileceği düşünülmektedir. Tarihe baktığımızda da insanoğlunun DDT, asbest ve cıva gibi birçok

kimyasalla yaşamış olduğu acı deneyim bu yeni teknolojiyle hayatımıza giren nanopartiküllerin de potansiyel bir toksikant olarak dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin çevre ve içinde yaşayan canlılarda ve hatta insanlarda ciddi toksik ve patolojik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Sucul ortamlar ağır metaller, pestisitler gibi bilinen geleneksel kirleticiler kadar bu nanopartiküllerin de son alıcı ortamları olarak düşünölmektedir. Her geçen gün artan kullanımlarına bağılı olarak bu ortamlara giren nanopartiküllerin miktarlarında da artış olmaktadır. Akuatik ekosistemlerin bu kimyasallar tarafından kontaminasyonu balıkları da içeren sucul organizmalar için oldukça yüksek bir tehdit oluşturmaktadır. Nanopartiküllerin özellikle de metal oksit nanopartiküllerin balıklar üzerine etkileriyle ilgili bilimsel çalışmalar oldukça azdır. Sucul ekosistemin önemli bir ögesi olan, dünyada çok geniş bir şekilde kültürü yapılan ve insanların birinci dereceden besinini oluşturan *Oreochromis niloticus* tatlı su çuprasıyla ilgili bu tarz çalışmalar ise daha bir sınırlıdır. Bu nedenle sunulan bu araştırmada TiO₂-NP'nin *O. niloticus* üzerine olası toksik etkilerinin antioksidan enzim sistemleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla TiO₂-NP'nin farklı ortam derişimlerinin etkisine bırakılan balıklarda hedef doku olarak seçilen solungaç dokusundaki SOD, CAT, GST, GPX ve GR enzim aktiviteleri ölçölmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Federici vd. (2007), 14 gün süreyle 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L TiO₂-NP'nin etkisine bırakılan *Oncorhynchus mykiss*'te doku hasarı, oksidatif stres ve diğer fizyolojik etkiler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda TiO₂-NP'nin, solungaçlarda lamellerin incilmesi ve ödem oluşumu gibi bazı patolojik durumlara neden olduğu; ancak, kanın hematolojik ve biyokimyasal parametrelerinde önemli bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır. Bunun yanı sıra TiO₂-NP'nin solungaç ve bağırsaklarda Na/K-ATPaz aktivitesinde azalışlara ve lipid peroksidasyonunda ise artışlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca total glutatyon düzeyinin solungaçlarda arttığı, karaciğerde ise azaldığı ifade edilmiştir.

Smith vd. (2007), C-NP etkisinde *O. mykiss*'in kan, solungaç, beyin, bağırsak ve karaciğer dokularında patolojik ve diğer fizyolojik etkilerini araştırmışlardır. C-NP etkisinde solungaçlarda mukus salgısının artması, ödem gibi hasarlar belirlenmiştir. Ayrıca bu nanopartikülün etkisinde, solungaç ve karaciğerde total glutatyon düzeyi de artmıştır.

Reeves vd. (2008), yaptıkları *in vitro* çalışmalarında TiO₂-NP etkisindeki *Carassius auratus* balıkların hücrelerinde oksidatif stresin meydana geldiği ve bunun sonucunda da DNA hasarlarının olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar TiO₂-NP'nin hidroksil radikalının oluşumuna bağlı olarak bu hasarların meydana geldiğini saptamışlardır.

Chae vd. (2009), *Oryzias latipes* türü balıklarda Ag-NP toksik etkilerini araştırmışlardır. Balıklar, 1.25 mg/L Ag-NP etkisine 1, 2 ve 4 gün süreyle bırakılmış ve metallothionein, HSP 70, GST gibi stresle ilişkili parametrelerin gen ekspresyonu çalışılmıştır. Ag-NP'lerin hücresel ve DNA hasarına neden olduğu ve oksidatif stresi indüklediği belirlenmiştir.

Dropne vd. (2009), 3 ve 14 günlük sürelerle TiO₂-NP'nin etkisine bırakılan *Porcellio scaber* türü omurgasızda hepatopankreas dokusundaki CAT ve GST aktivitesini ölçülmüştür. Süreye ve derişime bağlı olarak GST ve CAT aktivitelerinde artış ve azalışlar belirlenmiştir.

Linhua vd. (2009), *Cyprinus carpio*'da oksidatif stres ve histopatolojik değişkenler üzerine TiO₂-NP'nin subakut etkisini araştırmışlardır. Balıklar 8 gün

süreyle 10, 50, 100, 200 mg/L TiO₂-NP etkisine bırakılmış ve karaciğer, solungaç ve beyin dokularındaki SOD, CAT ve peroksidaz aktiviteleriyle lipid peroksidasyonu düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda TiO₂-NP'in özellikle yüksek ortam derişimlerinde (100 ve 200 mg/L), incelenen dokulardaki SOD, CAT ve peroksidaz aktivitelerinde anlamlı azalışlar, lipid peroksidasyon düzeylerinde ise önemli artışlar meydana geldiği belirlenmiştir. Yine bu yüksek derişimlerin etkisinde, solungaçlarda lamel ve filamentlerde incelme ve ödem oluşumu, karaciğerde ise nekrotik apoptoz içeren patolojik durumların olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar TiO₂-NP'nin balıklarda oksidatif strese yol açtığını ve enzim aktivitesi ile lipid peroksidasyonda önemli değişimlere neden olduğunu belirtmişlerdir.

Ramsden vd. (2009), besin yoluyla verilen TiO₂-NP'nin *O. mykiss*'in büyüme ve bazı doku biyokimyasal parametreleri üzerine etkilerini incelenmişlerdir. Balıklar 8 hafta süreyle 10 ve 100 mg/kg TiO₂-NP içeren diyetlerle beslenmiştir. Çalışma sonunda TiO₂-NP'lerinin büyüme üzerine bir etki göstermediği, solungaç, karaciğer, bağırsak ve beyin total glutatyon düzeyinde önemli bir değişim meydana getirmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte solungaç ve bağırsaklarda TBARS düzeyinin önemli oranda azaldığı ifade edilmiştir.

Kim vd. (2010), TiO₂-NP'nin etkisine bırakılan *Daphnia magna*'da oksidatif stres yanıtlarını araştırmışlardır. *D. magna* 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 mg/L TiO₂-NP etkisine 48 saat ve 21 gün süreyle bırakılarak CAT, SOD, GPX, GST aktiviteleri araştırılmıştır. Uzun dönemli etkileşimde 5 ve 10 mg/L TiO₂-NP etkisinde ölümler gözlenmiştir. TiO₂-NP konsantrasyonuna bağlı olarak CAT, GPX ve GST aktivitesi artarken, SOD aktivitesi değişim göstermemiştir. Araştırmacılar, antioksidan parametrelerdeki değişimlerin TiO₂-NP'nin *D. magna*'da oksidatif strese neden olan ROT oluşumu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Tedesco vd. (2010), Au-NP'lerin *Mytilus edulis* midyesinde meydana getirdiği oksidatif stres ve toksisitesini araştırmışlardır. Midyeler 24 saat süreyle 750 ppb Au-NP etkisine maruz bırakıldığında, süre sonunda dokulardaki lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığı belirlenmiştir.

Chen vd. (2011), *Danio rerio* larvalarında TiO₂-NP'nin toksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 0.1, 1, 5 ve 10 mg/L TiO₂-NP etkisine balıklar bırakılmıştır. Çalışma sonucunda balıklarda oksidatif stres olduğu ve bu strese bağlı

olarak da balık davranışlarında önemli bir değişikliklerin meydana geldiği belirlenmiştir.

Chen vd. (2011), *D. rerio*'da uzun dönem TiO₂-NP etkisinde büyüme ve bazı histolojik parametrelerdeki değişimleri araştırmışlardır. Balıklar 1, 2, 4, 5 ve 7 mg/L TiO₂-NP etkileşimine 2, 4 ve 6 aylık sürelerle bırakılmış ve karaciğer, solungaç, kalp ve beyin dokuları incelenmiştir. Balıkların büyümesinde süreye ve derişime bağılı olarak azalma ve dokularında ise önemli histopatolojik değişiklikler meydana gelmiştir.

Shukla vd. (2011), yaptıkları *in vitro* çalışmalarında insan epidermal hücrelerinde TiO₂-NP'nin indüklediği serbest O₂ türleriyle genotoksik değişimler belirlemişlerdir. Çalışmada TiO₂-NP'nin lipid peroksidasyonu ve serbest O₂ türlerinin oluşumunu arttırdığı, glutatyon düzeyini ise azalttığı belirlenmiştir.

Xiong vd. (2011), *D. rerio*'da NP'lerin akut toksisitelerini, oksidatif stres ve hasarını araştırdıkları çalışmalarda, balıklar TiO₂ ve ZnO NP etkisine bırakılmıştır. Araştırmada radikal üretimi, SOD, CAT ve GST aktivitesi ile MDA düzeyi araştırılmıştır. Çalışmada 96 saat süre sonunda NP etkisinde hidroksi radikalının arttığı, bunun sonucu olarak da lipidperoksidasyonunun oluştuğu ve MDA düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Diğer dokulara oranla oksidatif stresin etkisine en fazla maruz kalan doku karaciğer olmuştur. SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH düzeyleri NP'nin türüne ve dokulara bağılı olarak azalış ve artış göstermiştir.

Zhu vd. (2011), 0.1, 1.0 ve 10 mg/L TiO₂-NP etkisinde 96 saat süreyle bırakılan deniz omurgasız *Haliotis diversicolor supertexta*'da oksidatif stres parametreleri çalışmışlardır. TiO₂-NP etkisinde SOD aktivitesi ve lipid peroksidasyon düzeyi artış göstermişken GSH düzeyi azalış göstermiştir.

Lee vd. (2012), 48 ve 96 saat süreyle 25, 50, 100 ve 200 µg/L Ag-NP etkisine bırakılan *C. carpio*'da solungaç, karaciğer ve beyin dokuları CAT, SOD ve GST antioksidan enzim aktiviteleri ile histopatolojik değişimleri incelemişlerdir. Ag-NP etkisinde balıklarda mortalite gözlenmemesine rağmen incelenen dokularda çeşitli patolojik durumlar belirlenmiştir. CAT, SOD ve GST enzim aktivitelerinde beyin dokusunda yüksek ortam derişimlerinde özellikle de 200 µg/L Ag-NP etkisinde anlamlı azalışlar belirlenmişken; solungaç ve karaciğer dokularında ise metal-nanopartikülün ortam derişimi ve etki süresine bağılı olarak önemli azalış ya da artışlar belirlenmiştir.

Saquib vd. (2012), *in vitro* olarak insan amnion epitelya hücrelerinde TiO₂-NP'nin sitotoksik, oksidatif stres ve DNA hasarı araştırılmıştır. TiO₂-NP bu hücrelerde CAT aktivitesi ve glutatyon düzeylerinde önemli azalışlara, ROT'ların oluşumunda ise artışlara neden olmuştur.

Al-Bairuty vd. (2013), bakır nanopartiküller ve bakır sülfatın *O. mykiss*'te histopatolojik etkilerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan laboratuvar çalışmalarında balıklar 20 ve 200 µg/L Cu-NP ve CuSO₄ etkisine 4 ve 10 günlük sürelerle bırakılmıştır. Her iki bakır etkileşiminde de dokularda önemli lezyonlar belirlenmiştir. Çalışmada genel olarak Cu-NP'nin CuSO₄ oranla daha fazla histopatolojik durumlara yol açtığı ve daha toksik olduğu belirlenmiştir.

Faria vd. (2014), TiO₂-NP etkisinde *D. rerio* embriyolarında oksidatif stres parametrelerini çalışmışlardır. Çalışma sonunda, TiO₂-NP etkisinde ROT üretiminde ve SOD aktivitesinde bir artış, GSH düzeylerinde ise genel olarak azalış meydana geldiği belirlenmiştir.

Varela-Valencia vd. (2014), *O. niloticus*'ta TiO₂-NP'nin antioksidan gen ekspresyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 0.1, 1.0, 10.0 mg/L TiO₂-NP'nin intraperitoneal enjeksiyonu sonrasında CAT, GST ve SOD gen ekspresyonları ölçülmüştür. TiO₂-NP etkisinde balıkların karaciğer CAT, GST ve SOD gen ekspresyonları artış göstermiştir.

Abdel-Khalek vd. (2015), Nil tilapiası *O. niloticus*'ta çinkonun metal ve nanopartiküler formlarının karşılaştırılmalı toksikolojisini incelemişlerdir. Zn ve Zn-NP'nin 96 saatlik LC₅₀ değerlerinin 1/2'sine 7, 14 ve 28 günlük sürelerle bırakılan balıklarda serum biyokimyasal parametreleri ile karaciğer ve solungaç dokuları oksidatif stres parametreleri çalışılmıştır. Hem Zn hem de Zn-NP serum dokusu total lipid, total protein ve globülin düzeylerinde azalışlara albümin, glukoz, kreatinin ve ürik asit düzeyleri ile AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerin de ise artışlara neden olmuştur. Ayrıca Zn-NP anlamlı olacak şekilde karaciğer ve solungaç dokularındaki CAT, SOD ve GPX aktiviteleri ile MDA düzeylerinde artışlara GSH düzeylerinde ise azalışlara neden olmuştur. Araştırmacılar Zn-NP'nin Zn meteline oranla daha yüksek toksik etkiye sahip olduğunu da rapor etmişlerdir.

Srinonate vd. (2015), *O. niloticus*'ta Ag-NP'nin kısa dönemli patolojik, biyokimyasal toksisitesi ile biyobirikimini araştırmışlardır. 1, 2, 3 ve 4 günlük sürelerle

1, 10 ve 100 ppm Ag-NP etkisine bırakılan balıklarda karaciğer, solungaç, böbrek ve dalaktaki değişimler belirlenmiştir. Hem süreye hem de ortam derişimlerine bağı olarak önemli histopatolojik lezyonlar saptanmıştır. Yine dokuların SOD aktivitesi de Ag-NP etkisinde artış göstermiştir. Araştırmacılar Ag-NP'nin *O. niloticus*'ta oksidatif stresi indüklediğini ve bu balıklar için toksik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Afifi vd. (2016), *O. niloticus* ve *Tilapia zilli*'de beyin dokusu üzerine Ag-NP'nin etkisini araştırdıkları çalışmalarında 2 ve 4 mg/L Ag-NP etkisinde GSH, total GSH (tGSH) ve MDA düzeyleri, SOD, CAT, GR, GST ve GPX aktiviteleri ile gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Özellikle de yüksek Ag-NP etkisinde beyin dokusundaki tüm antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH ve tGSH düzeylerinde azalışlar MDA düzeylerinde ise artışlar belirlenmiştir. Araştırmacılar yüksek Ag-NP düzeylerinin her iki balığın antioksidan savunma mekanizmalarını bozduğunu ve balıklarda oksidatif strese neden olduğunu vurgulamışlardır.

Ates vd. (2016), *O. niloticus*'ta Fe-NP'nin uzun dönemli etkisinde meydana gelen histolojik ve immün yanıtların yanı sıra birikim ve atılım düzeylerini araştırmışlardır. 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L Fe-NP etkisine 30 ve 60 günlük sürelerle bırakılan balıkların solungaç, karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin, dalak ve kas dokularında Fe-NP birikiminin gerçekleştiği ve ortam derişim ve etki süresine bağı olarak serum biyokimyasal parametrelerinde (glukoz, ALT, AST ve LDH) azalış/artışların meydana geldiği rapor edilmiştir.

Kaya vd. (2016), 14 gün süreyle 1 ve 10 mg/L Zn-NP etkileşimini takiben *O. niloticus*'ta bağırsak, böbrek, karaciğer, solungaç, beyin ve kasta Zn-NP birikimi ve serum glukoz, ALT, AST ve ALP düzeyleri ile doku histolojisini araştırmışlardır. Zn-NP organ ve dokularda önemli histopatolojik değişikliklere neden olmuştur. Bu nanopartikül, etki süresine ve ortam derişimine bağı olarak bağırsak, karaciğer, böbrek ve solungaçlarda anlamlı düzeylerde birikim göstermiştir. Ayrıca Zn-NP serum biyokimyasal parametrelerinde de önemli değişimlere neden olmuştur.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Sunulan çalışma için gerekli Etik Kurul onayı Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar No:7, Tarih: 27.07.2015, EK-1). Çalışmamızda araştırma materyali olarak *Oreochromis niloticus* kullanılmıştır. Balıklar, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki balık yetiştirme havuzlarından alınmış ve Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Ekofizyoloji laboratuvarına getirilerek içerisinde 110 L bekletilmiş çeşme suyu bulunan 40x140x40 cm ebatlarındaki 8 stok cam akvaryumda ortam koşullarına uyumları için üç ay süre ile bırakılmışlardır. Bu sürede deneyde kullanılacak balıklar 11.29 ± 0.34 cm boy ve 34.49 ± 0.93 g ağırlığa ulaşmıştır.

Deneyler 25 ± 1 °C'de yürütülmüş, günde sekiz saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Merkezi havalandırma sistemiyle akvaryumların havalandırılması sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarına uyumları sırasında balıklar, hazır balık yemi kullanılarak (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Denemelerden 48 saat öncesinde yem kesilmiş ve denemeler boyunca günde iki defa olmak üzere vücut ağırlıklarının %2'si kadar yem ile balıklar beslenmiştir. Deney suyunun fizikokimyasal özellikleri; akvaryum suyunun sıcaklığı 21.67 ± 0.35 °C, çözünmüş oksijen 7.39 ± 0.23 mg/L, pH 8.07 ± 0.09 , toplam sertlik 329 ± 4.2 mg/L CaCO₃ olarak ölçülmüştür.

3.1.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄.3H₂O, Merck)

Potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄, Merck)

Sukroz (C₁₂H₂₂O₁₁, Sigma)

Hidro Klorik Asit (HCl, Merck)

Sodyum Hidroksit (NaOH, Merck)

Tris HCl (Sigma)

Tris Baz (sigma)

Redükte Glutasyon (GSH, Sigma)

Monosodyum Fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma)
Nikotin Amid Adenindinükleotit Fosfat (NADPH, Sigma)
Oksideglutasyon (GSSG, Sigma)
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA, Sigma)
Glutasyon Redüktaz (GR, Sigma)
tert-Butil Hidroperoksit (Sigma)
Sodyum Klorür (NaCl , Merck)
Hidrojen Peroksit (H_2O_2 , Merck)
Ksantin (Sigma)
Nitrobluetetrazolium (NBT, Sigma)
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3 , Merck)
Sığır Serum Albümini (Merck)
Ksantin Oksidaz (XOD, Sigma)
Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Merck)
Bakır Klorür ($\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck)
Tri-Sodyum Sitrat (Merck)
Bakır (II) Sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma)
Folin Ciocalteu Fenol Ayırıcı (Merck)

3.1.2. Deneylerde kullanılan cihazlar

Homojenizatör : WİSETİS HG-15D
Soğutmalı Santrifüj : Hettich Universal 320R
Vortex : Labort Multi-Mixer MVS-1
pH metre : Thermo Scientific Orion 2 Star
Manyetik Karıştırıcı : VELP Scientifica ARE
Santrifüj : Nüve NF400
Spektrofotometre : SHIMADZU UV-1800
Hassas Terazî : OHAUS Pioneer PA214C
Derin Dondurucu (-80°C) : New Brunswick Scientific U410 Premium
Su Banyosu : Jeio Tech BS-11
Distile Su Cihazı : Millipore Rios 8

3.2. Yöntem

Deneylerde nanopartiküler titanyum dioksit ($\text{TiO}_2\text{-NP}$, SIGMA, 2016) kullanılmıştır. Deneyler her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan 3 adet cam akvaryumda yürütülmüştür. Balıklar $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 1.0 ve 5.0 mg/L derişimlerinin etkisine 4 ve 14 gün süreler boyunca bırakılmıştır.

Deneylerde 3 akvaryumun ilk ikisine 120 L farklı $\text{TiO}_2\text{-NP}$ çözeltileri (1.0 ve 5.0 mg/L); üçüncü akvaryum ise kontrol grubu olarak kullanılarak içerisinde aynı hacimde (120 L) dinlendirilmiş çeşme suyu konmuştur. Deney akvaryumlarında kullanılan nanopartikül çözeltilerinin derişimlerinde zamana bağlı olarak değişim olabileceği dikkate alınarak çözeltiler her gün yeni hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir. Deneyler altı tekrarlı olarak yürütülerek her tekrarda bir balık kullanılmıştır.

3.2.1. Doku örneklerinin alınması ve biyokimyasal analizler

Belirlenen her sürenin sonunda deney akvaryumlarından rastgele seçilen balıklar, çeşme suyuyla yıkanarak temizlenmiş, yüzeylerinde bulunan su damlacıkları kurutma kağıdıyla alınmış ve boy ve ağırlıkları saptanarak diseksiyona hazır hale getirilmiştir. Balıklar diseksiyondan önce spinal yapılarak öldürülmüştür. Steril aletlerle solungaç örnekleri buz üzerinde disekte edilmiş, bu örnekler % 0.59 NaCl ile yıkanmış ve ağırlıkları alındıktan sonra biyokimyasal analize kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.1.1. Homojenatların hazırlanması

Disekte edilen dokular 1/10 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde 0.25 M süktroz içeren 0.05 M soğutulmuş Na-P tamponu (pH: 7.4) ile buz içerisinde ultra-turrax homojenizatörde 3 dakika süreyle 10.000 rpm'de homojenize edilmiştir. Homojenatlar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10.000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda CAT, SOD, GR, GST ve GPX aktiviteleri ile protein düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

3.2.1.2. CAT aktivite tayini

Prensip: Katalaz aktivite tayini, H_2O_2 'nin 240 nm dalga boyundaki absorbansının enzim ile etkileşiminden sonra zamana bağlı olarak azalması dikkate alınarak yapılmıştır (Lartillot vd. 1988).

Ayırıcılar:

- a. 50 mM Fosfat Tamponu (pH 6.8): 2.482 g K_2HPO_4 ve 4.864 g KH_2PO_4 alınır ve pH ayarlandıktan sonra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
- b. 10 mM H_2O_2 : %30'luk peroksitten 10 μ L alınır ve 9990 μ L saf suyla tamamlanır.
- c. 1 M HCl: %37'lik HCl'den 43 μ L alınır ve fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanır

Yöntem: 50 mmol/L fosfat tamponu (pH 6.8) içerisinde 10 mmol/L H_2O_2 olacak biçimde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 20 μ L örnek üzerine 2.5 ml substrat çözeltisi eklenerek 37 °C sıcaklıkta iki dakika bekletilmiş ve tepkimeyi durdurmak için üzerine 0.5 ml 1 M HCl çözeltisi eklenerek 240 nm dalga boyundaki absorbansı (A_r) ölçülmüştür.

Kör için 2.5 ml 50 mmol/L fosfat tamponu (pH 6.8) ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözelti kullanılmıştır.

H_2O_2 'in başlangıç absorbans (A_s) değerini saptamak için 2.5 ml substrat ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.

Proteinin neden olduğu absorbansı (A_t) tespit etmek için 20 μ L örnek, 2.5 ml fosfat tamponu ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.

Hesaplama:

Enzimatik aktivite kaynaklı absorbans (A) değişimi:

$$A = (A_s + A_t) - A_r$$

Enzim aktivitesi hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{CAT aktivitesi (U/mL)} = \frac{A.Vt}{\epsilon.t.Vö}$$

Vt = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

Vö = Örnek hacmi (mL)

ϵ = H₂O₂ 'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0.0396 cm²/μmol)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{CAT Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.1.3. SOD aktivite tayini

Prensip: Enzim aktivite tayini, ksantin ve ksantin oksidazın reaksiyonuyla oluşan süperoksit anyon radikallerinin, nitrobluetetrazolium ile oluşturduğu mavi renkli formazan boyasının 560 nm'deki absorbansının okunması esasına dayanmaktadır (Sun vd. 1988).

Ayırıcılar:

1. Reaktif:

- 0.3 mM Ksantin:** 9.13mg alınıp 200 mL saf suda çözölmüştür.
- 0.6 mM EDTA:** 22.3 mg alınıp 100 ml saf suda çözölmüştür.
- 150 μg/L N.B.T.:** 12.3 mg alınıp 100 mL saf suda çözölmüştür.
- 400 mM Na₂CO₃:** 2.544 g alınıp 60 mL saf suda çözölmüştür.
- 1g/L Sığır serum:** 30 mg alınıp 30 mL saf suda çözölmüştür.

2. Ksantin Oksidaz (167 U/L): 18 μl alınıp 3 ml 2 M (NH₄)₂SO₄ da çözölmüştür.

3. CuCl₂.2H₂O (0.8 mM): 13.6 mg alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Yöntem: Enzim aktivite tayini için iki tüp alınmış ve Çizelge 3.1'te belirtilen ayırıcılar konmuştur.

Çizelge 3.1. Süperoksit Dismutaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör	Numune
Reaktif	2.85 ml	2.85 ml
Numune	-	0.1 ml
Ksantin oksidaz	50 µL	50 µL
25 °C’de oda sıcaklığında 20 dakika bekletilip		
CuCl ₂	0.1 ml	0.1 ml
Numune	0.1 ml	-

560 nm dalga boyunda absorbands değerleri distile suya karşı okunmuştur.

Hesaplama:

$$\text{SOD Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{KörOD} - \text{NumOD}}{\text{KörOD}} \times 20$$

20: zaman (dakika)

$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.1.4. GPX aktivite tayini

Prensip: Glutasyon peroksidaz, GSH’ın H₂O₂ ile GSSG’ye yükseltgenmesini katalizler. T-butil hidroperoksit varlığında GPX’in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH’ın NAD⁺’ye yükseltgenmesi esnasındaki absorbands farkının 37 °C 340 nm’de okunması ile belirlenir (Beutler 1984).

Ayırçılar:

1- 1 M Tris Tamponu (pH=8.0)

Tris HCl	8.80 g
Tris Baz	5.40 g
EDTA	0.14 g

100 mL saf suda çözündürülür.

2 -0.1 M GSH:

0.0155 g GSH alınır ve 0.5 mL saf su eklenir.

3- 10 U/mL GR:

50µL GR alınır ve 2450 mL saf su eklenir.

4- 2mM NADPH:

0,0045 g NADPH tartılır ve 2500 ml saf su eklenir.

5- 7 mM t butil Hidroperoksit:

5 µL t butil hidroperoksit alınıp 5 mL saf su eklenir.

Yöntem: GPX aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.2’de belirtilen ayıracılar konmuştur.

Çizelge 3.2. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Saf Su	+	660
Tris Tamponu	-	100
GSH	-	20
GR	-	100
NADPH	-	100
Örnek	-	10
37 °C’de 10 dakika inkübe edilir		
t- butil hidroperoksit	-	10

Kör için saf su kullanılmış ve tepkimeler ise 37°C’de 1 cm ışık yollu kuvartz küvetlerde 340 nm’de 0. , ve 5. ’ absorbans değeri ile izlenmiştir.

Hesaplama:

$$\text{GPX Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_o}$$

ΔOD = Zamana bağılı absorbens farkı

V_t = Toplam hacim

t = Zaman

V_o = Örnek hacim

6.22= 1 cm'lik ışık yolunda 1 nmol NADPH'ın verdiği absorbens değeri

$$\text{GPX Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPX Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.1.5. GST aktivite tayini

Prensip: Enzim aktivite tayini, CDNB'nin redükte glutatyon ile konjugasyonu esnasındaki absorbens değişiminin 340 nm'de okunması esasına dayanır (Habig vd. 1974).

Ayırıcılar:**1-100 mM Tris Tamponu (pH=7.4)**

Tris HCl 3.2846 g

Tris Baz 0.5036 g

250 mL saf suda çözündürülür.

2- 20 mM CDNB (%95'lik 10 mL alkolde çözülür.)

0.0405 g CDNB tartılır üzerine 9.52 mL mutlak alkol konur. 0.44 mL su eklenir.

3-Redükte Glutatyon (taze hazırlanır)

0.0030 g GSH alınır üzerine 10 mL tris tamponu eklenir.

Yöntem: GST aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.3'te gösterilen çözeltiler konmuştur.

Çizelge 3.3. Glutatyon S-Transferaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

25°C’de 340 nm’de 0. ve 2. dakikalarda okunur.

Hesaplama:

$$\text{GST Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{0.0096 \times V_o}$$

ΔOD = Zamana bağlı absorbans farkı

V_t = Toplam hacim

t: zaman

V_o = Örnek hacim

0,0096= 1cm’lik ışıık yolunda 1 mM CDNB’nin verdiği absorbans değeri

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi (U /mg protein)} = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.1.6. GR aktivite tayini

Prensip: GR aktivitesi, NADPH’IN NADP⁺’a yükseltgenmesi esnasındaki absorbans değışminin 340 nm’de okunmasına göre belirlenir (Carlberg ve Mannervik 1975).

Ayır   lar:**1-100m  Na-P Tamponu: (pH=8.0)**

Na₂HPO₄.7H₂O 5.7554 g

NaH₂PO₄.2H₂O 0.5328 g

Saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

2-Günlük Tampon

1mM GSSG ve 0.12 mM NADPH'in tampon içinde çözülmesiyle hazırlanır.

0.0165 g GSSG + 0.002 g NADPH 27 mL 100 mM Na-P içinde çözülür.

Yöntem: GR aktivitesi için iki küvet alınmış ve  izelge 3.4'te gösterilen ayır   lar konmuştur.

Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Çözeltiler	K�r (�L)	�rnek (�L)
Saf su	100	-
Günlük tampon	900	900
�rnek	-	100

 alkalanır ve 37  C'de 340 nm'de 0. ve 5. dk. k re karşı absorbens değerleri  l l r.

Hesaplama:

$$\text{GR Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_ }$$

ΔOD =Zamana bağlı absorbens farkı

t= Zaman

V_t = Toplam hacim

$V_ $ = rnek hacmi

6,22= 1 cm'lik ışık yolunda 1nmol NADPH'in verdiği absorbens değeri

$$\text{GR Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GR Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.1.7. Protein düzeyi tayini

Prensip: Proteinler, alkali ortamda bakır sülfat eklenmesiyle fosfotungustik-fosfomolibdik asidi redükleyerek mavi renk oluştururlar. Bu renkli bileşiğin absorbans değeri 750 nm’de ölçülerek protein miktarları tespit edilir (Lowry vd. 1951).

Ayıraçlar:

1. Çözelti A:

Na₂CO₃ 10 g

NaOH 2 g

alınır ve 500 mL’ye saf su ile tamamlanır

2. Çözelti B:

CuSO₄.5H₂O 0.5 g

Na-sitrat 1.0 g

alınır ve 100 mL’ye saf su ile tamamlanır.

3. Çözelti C: 50 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ile karıştırılarak hazırlanır.

4. Folin-Ciocalteu Ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu, 1 mL saf su ile seyreltilerek hazırlanır.

Yöntem : Protein tayini için iki tüp alınır ve çizelge 3.3’te belirtilen ayıraçlar konur.

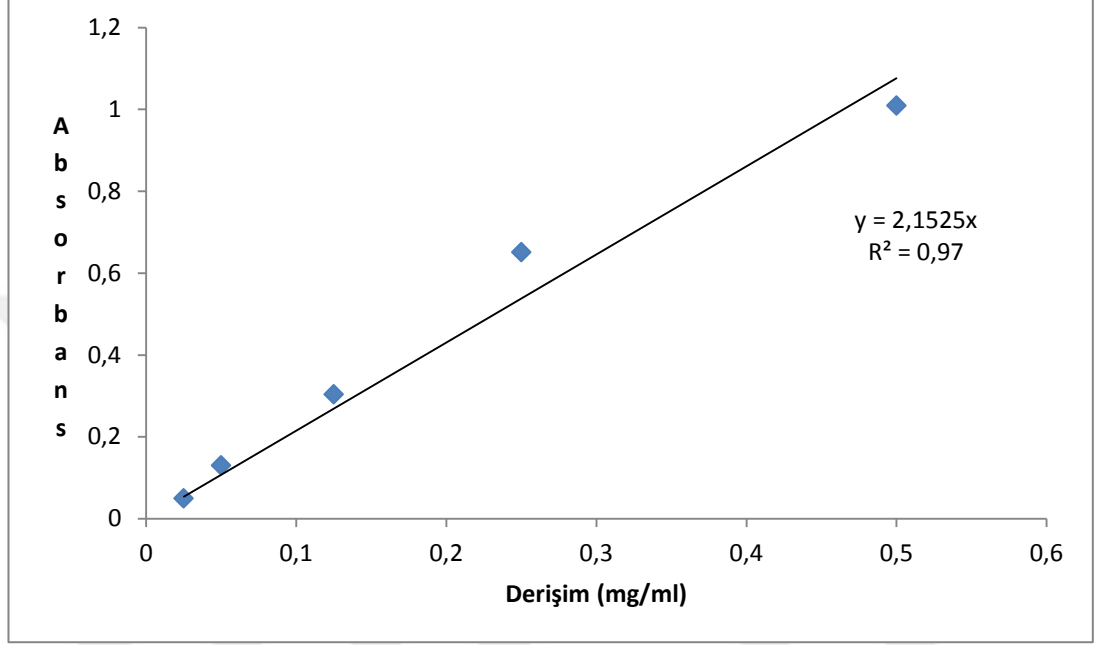
Çizelge 3.3. Protein Yöntemi

Çözeltiler	Kör (mL)	Örnek (mL)
Saf Su	0.50	0.45
Örnek	-	0.05
Çözelti C	2.50	2.50
Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.		
Folin-Ciocalteu	0.25	0.25

Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra ve spektrofotometrede 750 nm’de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama

Protein düzeyleri sığır serum albumini kullanılarak hazırlanmış olan standart grafikten yararlanarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Standart protein grafiği

3.3. İstatistik

Verilerin istatistiksel analizi, IBM SPSS Statistics 21.0 paket programında One Way-ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi)-Student – Newman Keul's Test (SNK) ve Student-t Test (Independent-Sample t Test) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Sunulan çalışmada 4 ve 14 günlük sürelerle 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisini takiben *O. niloticus*'ta solungaç dokusundaki bazı antioksidan enzim (SOD, CAT, GST, GR ve GPX) aktiviteleri araştırılmıştır. TiO₂-NP'in denenen tüm ortam derişimlerinde etki süreleri boyunca balıklarda ölüm gözlenmemiştir.

4.1. CAT Aktivitesi

Belirli bir etki süresinde *O. niloticus*'un solungaç dokusu CAT aktivitesi üzerine TiO₂-NP'in derişime bağı etkileri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Etki süreleri dikkate alındığında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CAT aktivitesinin, 4 günlük süre sonunda 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisinde önemli olacak şekilde azaldığı saptanmıştır (P<0.05). 14 günlük süre sonunda ise CAT aktivitesi, TiO₂-NP'in düşük ortam derişiminde anlamlı bir azalış gösterirken; yüksek derişiminde ise önemli bir artış göstermiştir (P<0.05). 4 günün sonunda 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisinde CAT aktivitesinin sırasıyla %46 ve %60 düzeyinde azaldığı saptanmıştır. 14 günlük süre sonunda ise enzim aktivitesi, düşük ortam derişiminde %35 azalmış; bununla birlikte, yüksek ortam derişiminde %61 düzeyinde artmıştır.

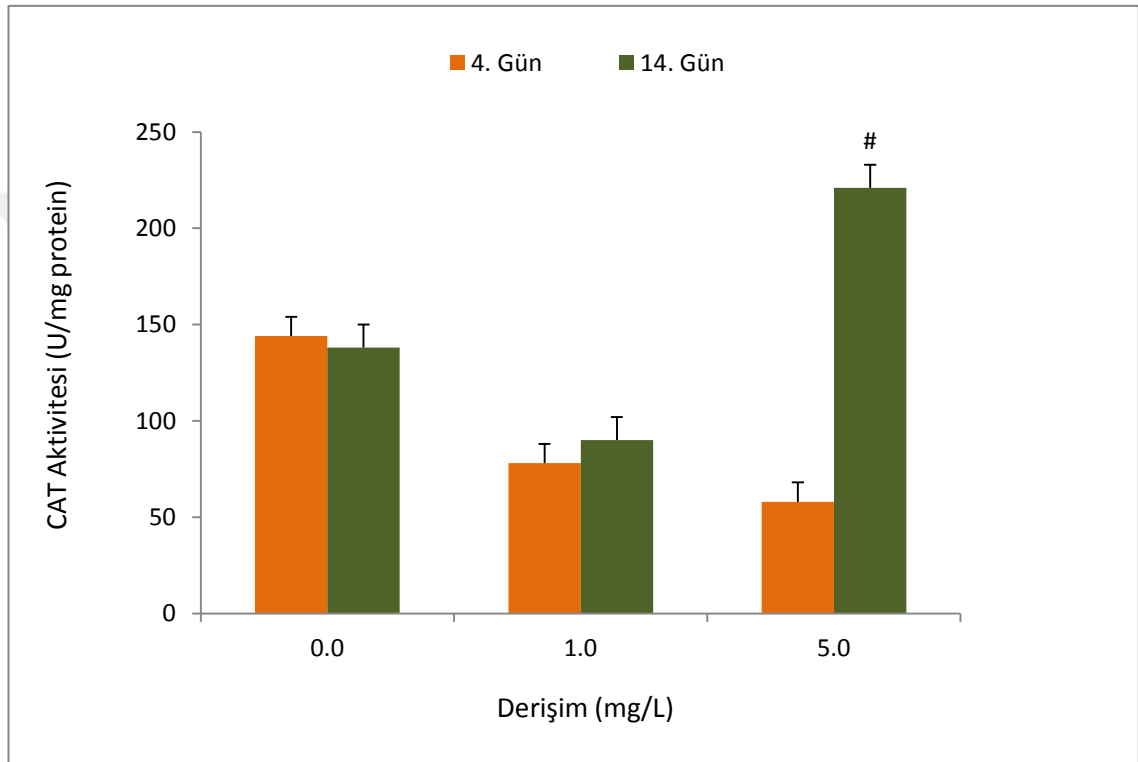
Çizelge 4.1. *O. niloticus*'ta solungaç dokusu CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine TiO₂-NP'in ortam derişimine bağı etkisi

	4. Gün	14. Gün
DERİŞİM (mg/L)	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$
0.0	144 ± 2.89 x	138 ± 4.94 x
1.00	78 ± 4.91 y	90 ± 5.59 y
5.00	58 ± 4.63 z	222 ± 8.21 z

*: x, y ve z harfleri belirli bir etki süresinde derişimler arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Harflerin farklı olması veriler arasında istatistiksel bir ayırımı ifade etmektedir (P<0.05).

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama ± Standart hata

Aynı ortam derişiminde *O. niloticus*'ta solungaç dokusu CAT aktivitesi üzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in süreye bağı etkisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Etki süresine bağı olarak CAT aktivitesinin $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in her iki ortam derişiminde arttığı; ancak, bu artışın yüksek ortam derişiminde istatistiki olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). 4 günlük etki süresine oranla 14 günlük etki süresi sonunda CAT aktivitesi, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 5.0 mg/L ortam derişiminde %283 düzeyinde bir artış göstermiştir.



Şekil 4.1. *O. niloticus*'ta $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu CAT aktivitesi üzerine etkisi. “#” işareti aynı derişimde süreler arasında istatistiksel ayırım olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

4.2. SOD Aktivitesi

Denenen etki sürelerinde *O. niloticus*'un solungaç dokusu SOD aktivitesi üzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in derişime bağı etkileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. 4 günlük etki süresi sonunda 1.0 ve 5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ etkisinde SOD aktivitesinde anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($P<0.05$). Ancak bu azalış $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in düşük ve yüksek derişimleri arasında anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0.05$). Son etkileşim süresi sonunda ise SOD aktivitesinde $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in her iki ortam derişimlerinin etkisinde kontrole göre

anlamli bir değişim belirlenmemiştir ($P>0.05$). İlk etkileşim sũresi sonunda SOD aktivitesinde $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 1.0 ve 5.0 mg/L etkileşimini takiben sırasıyla %27 ve %26 dũzeylerinde bir azalış saptanmıştır.

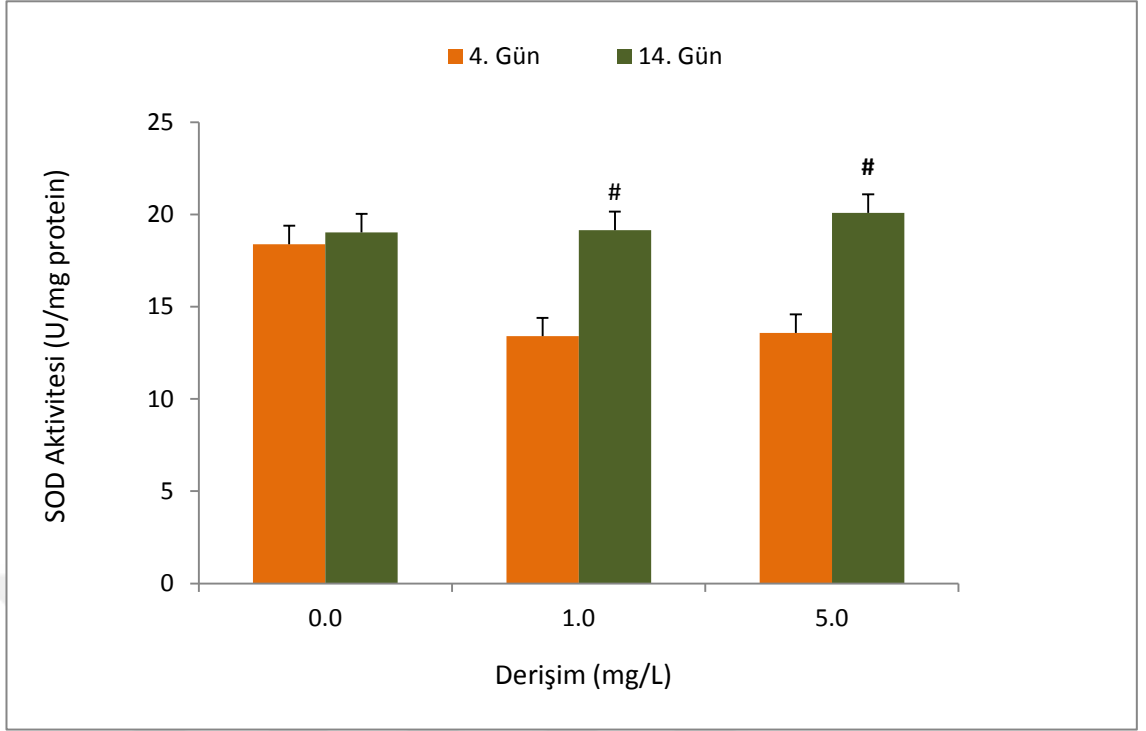
Çizelge 4.2. *O. niloticus*'ta solungaç dokusu SOD aktivitesi (U/mg protein) ũzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in ortam derişimine bağlı etkisi

DERİşİM (mg/L)	4. Gũn	14. Gũn
	$\bar{X} \pm S\bar{x} *$	$\bar{X} \pm S\bar{x} *$
0.0	$18.39 \pm 0.29 \text{ x}$	$19.03 \pm 0.53 \text{ x}$
1.00	$13.40 \pm 0.34 \text{ y}$	$19.15 \pm 0.78 \text{ x}$
5.00	$13.58 \pm 0.39 \text{ y}$	$20.09 \pm 0.81 \text{ x}$

*: x ve y harfleri belirli bir etki sũresinde derişimler arasındaki ayırımı gũstermek amacıyla kullanılmıştır. Harflerin farklı olması veriler arasında istatistiksel bir ayırımı ifade etmektedir ($P<0.05$).

$\bar{X} \pm S\bar{x}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

Aynı ortam derişiminde *O. niloticus*'ta solungaç dokusu SOD aktivitesi ũzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in sũreye bağlı etkileri şekil 4.2'te gũsterilmiřtir. Belirli bir ortam derişiminde etkide kalma sũresi uzadııkça SOD aktivitesinde $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in her iki derişiminde ȳnemli bir artış saptanmıştır ($P<0.05$). 4 gũnlũk sũreye oranla 14 gũnlũk sũre sonunda 1.0 ve 5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ etkisinde SOD aktivitesinde sırasıyla, %43 ve %48 dũzeylerinde bir artış belirlenmiştir.



Şekil 4.2. *O. niloticus*'ta $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu SOD aktivitesi üzerine etkisi. “#” işareti aynı derişimde süreler arasında istatistiksel ayırım olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

4.3. GPX Aktivitesi

Belirli bir etkileşim süresi sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusu GPX aktivitesi üzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in derişime bağlı etkileri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. 4 ve 14 günün sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında GPX aktivitesinde $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in düşük derişiminin etkisinde önemli bir değişim belirlenmemiştir ($P>0.05$). Bununla birlikte 5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in etkisinde GPX aktivitesinde ilk etkileşim süresi sonunda anlamlı bir şekilde azalış ($P<0.05$); son etkileşim süresi sonunda ise anlamlı bir şekilde artış saptanmıştır ($P<0.05$). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in yüksek derişiminin etkisinde GPX aktivitesi 4 günlük süre sonunda %37 düzeyinde azalmış; 14 günlük süre sonunda ise %32 düzeyinde artmıştır.

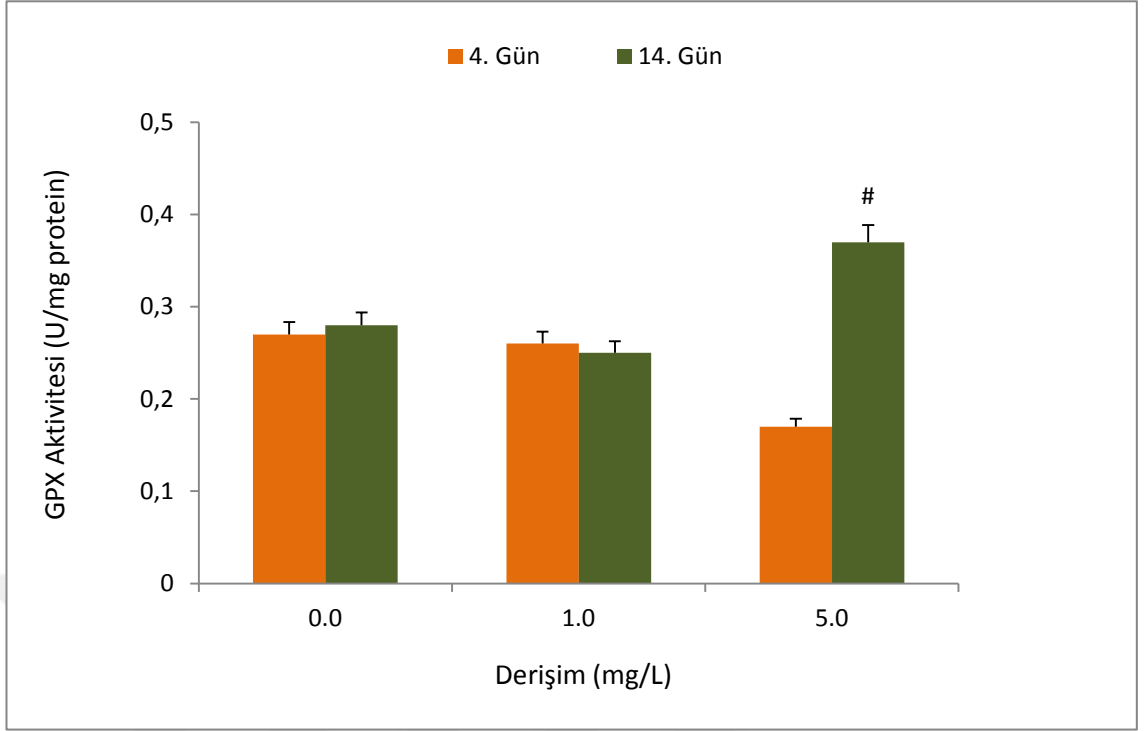
Çizelge 4.3. *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GPX aktivitesi (U/mg protein) üzerine TiO₂-NP'in ortam derişimine bağı etkisi

	<u>4. Gün</u>	<u>14. Gün</u>
DERİŞİM (mg/L)	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$
0.0	0.27 $\pm$ 0.02 x	0.28 $\pm$ 0.03 x
1.00	0.26 $\pm$ 0.03 x	0.25 $\pm$ 0.03 x
5.00	0.17 $\pm$ 0.02 y	0.37 $\pm$ 0.04 y

*: x ve y harfleri belirli bir etki süresinde derişimler arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Harflerin farklı olması veriler arasında istatistiksel bir ayırımı ifade etmektedir (P<0.05).

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

Aynı ortam derişiminde *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GPX aktivitesi üzerine TiO₂-NP'in süreye bağı etkileri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Etkide kalma süresi arttıkça TiO₂-NP'in düşük derişiminde anlamlı bir değışim göstermeyen (P>0.05) GPX aktivitesinde, yüksek derişiminde anlamlı olacak şekilde bir artış belirlenmiştir (P<0.05). 4 günlük süreye oranla 14 günlük süre sonunda 5.0 mg/L TiO₂-NP ortam derişiminde GPX aktivitesinde %117 düzeyinde bir artış saptanmıştır.



Şekil 4.3. *O. niloticus*'ta $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GPX aktivitesi üzerine etkisi. “#” işareti aynı derişimde süreler arasında istatistiksel ayırım olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

4.4. GST Aktivitesi

Belirli bir etkileşim süresi sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusu GST aktivitesi üzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in derişime bağlı etkileri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Denenen etki sürelerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında GST aktivitesinin, 4 günlük süre sonunda $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in düşük ve yüksek derişimlerinde anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Bu artış $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in ortam derişimleri arasında da istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Bu durum ortam derişimindeki artışa bağlı olarak GST aktivitesinin de arttığını göstermektedir. Son etkileşim süresi sonunda ise $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in 1.0 mg/L etkisinde önemli bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) GST aktivitesinde, yüksek derişiminin etkisinde anlamlı bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$). GST aktivitesinin 4 günlük süre sonunda 1.0 ve 5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ etkisinde sırasıyla %44 ve %100 düzeyinde; 14 günlük süre sonunda ise yüksek ortam derişiminde %54 düzeyinde arttığı saptanmıştır.

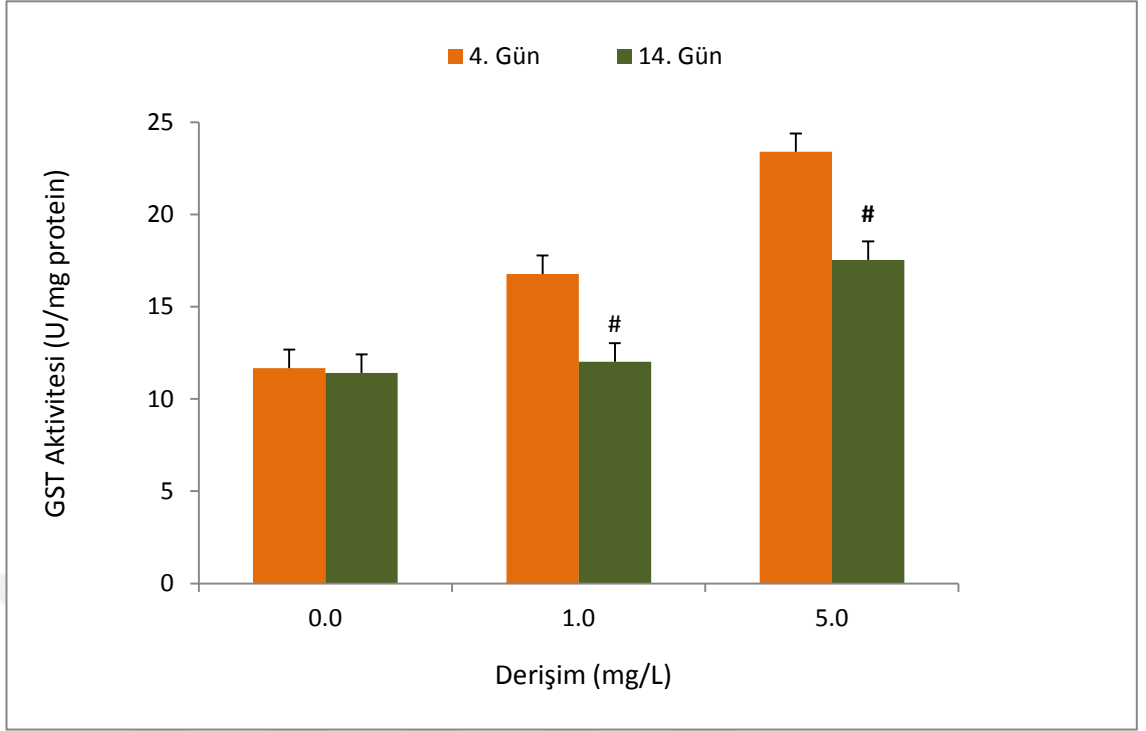
Çizelge 4.4. *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GST aktivitesi (U/mg protein) üzerine TiO₂-NP'in ortam derişimine bağı etkisi

	<u>4. Gün</u>	<u>14. Gün</u>
DERİŞİM (mg/L)	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$
0.0	11.68 $\pm$ 0.83 x	11.41 $\pm$ 0.52 x
1.00	16.78 $\pm$ 0.76 y	12.02 $\pm$ 0.69 x
5.00	23.40 $\pm$ 0.49 z	17.54 $\pm$ 0.34 y

*: x, y ve z harfleri belirli bir etki süresinde derişimler arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Harflerin farklı olması veriler arasında istatistiksel bir ayırımı ifade etmektedir (P<0.05).

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

Aynı ortam derişiminde *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GST aktivitesi üzerine TiO₂-NP'in süreye bağı etkisi Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Etki süresine bağı olarak GST aktivitesinde TiO₂-NP'in düşük ve yüksek derişimlerinde önemli olacak şekilde bir azalış bulunmuştur (P<0.05). 4 günlük etki süresine oranla 14 günlük etki süresi sonunda GST aktivitesinin, 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP'de sırasıyla %28 ve %25 düzeylerinde azaldığı belirlenmiştir



Şekil 4.4. *O. niloticus*'ta $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GST aktivitesi üzerine etkisi. “#” işareti aynı derişimde süreler arasında istatistiksel ayırım olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

4.5. GR Aktivitesi

Denenen etki süreleri dikkate alındığında *O. niloticus*'un solungaç dokusu GR aktivitesi üzerine $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in derişime bağlı etkileri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Her iki etkileşim süresi sonunda da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 1.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in ortam derişiminde anlamlı bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) GR aktivitesinde, 5.0 mg/L $\text{TiO}_2\text{-NP}$ etkisinde önemli bir artış saptanmıştır ($P<0.05$). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in yüksek derişiminde GR aktivitesinde, 4 ve 14 günlük etki süreleri sonunda sırasıyla %47 ve %93 düzeylerinde bir artış belirlenmiştir.

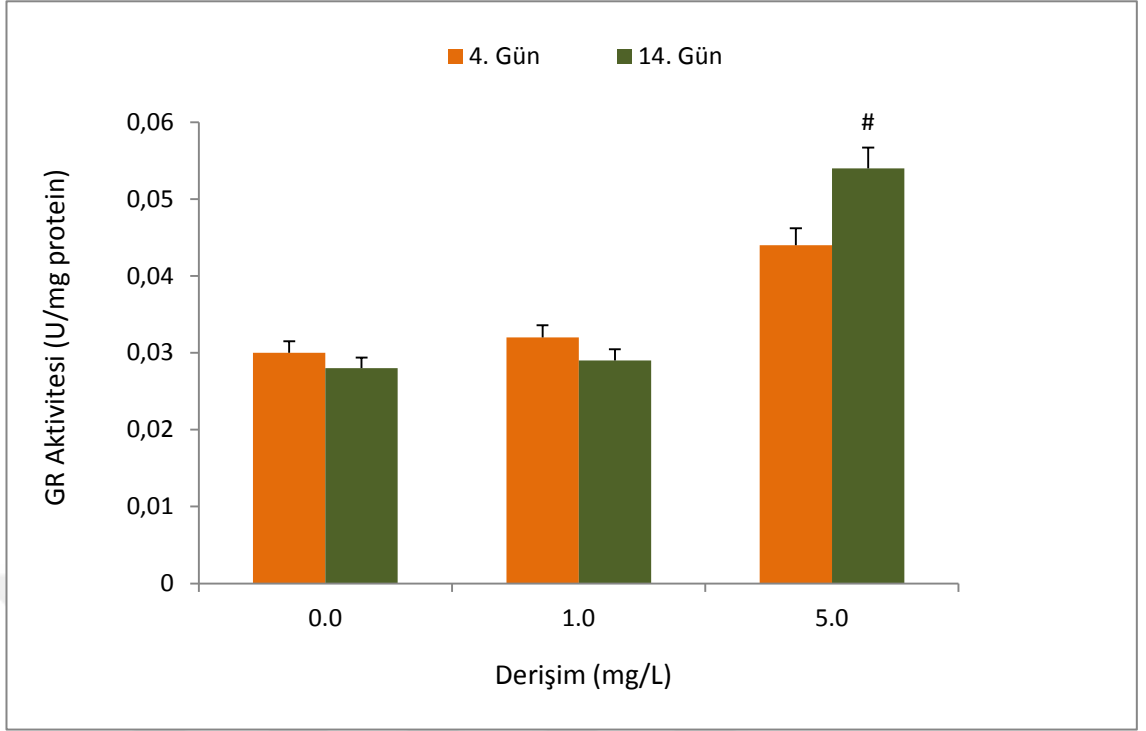
Çizelge 4.5. *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GR aktivitesi (U/mg protein) üzerine TiO₂-NP'in ortam derişimine bağı etkisi

DERİŞİM (mg/L)	4. Gün	14. Gün
	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$	$\bar{X} \pm S\bar{X} *$
0.0	0.030 $\pm$ 0.003 x	0.028 $\pm$ 0.004 x
1.00	0.032 $\pm$ 0.002 x	0.029 $\pm$ 0.003 x
5.00	0.044 $\pm$ 0.003 y	0.054 $\pm$ 0.006 y

*: x ve y harfleri belirli bir etki süresinde derişimler arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Harflerin farklı olması veriler arasında istatistiksel bir ayırımı ifade etmektedir (P<0.05).

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

Aynı ortam derişiminde *O. niloticus*'ta solungaç dokusu GR aktivitesi üzerine TiO₂-NP'in süreye bağı etkileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresi uzadıkça GR aktivitesi TiO₂-NP'in yalnızca yüksek derişimin etkisinde önemli bir değışim gösterdiği saptanmıştır (P<0.05). TiO₂-NP'in 5.0 mg/L ortam derişiminde GR aktivitesi süreye bağı olarak artış göstermiştir. 4 günlük süreye oranla 14 günlük süre sonunda TiO₂-NP'in yüksek ortam derişiminde GR aktivitesinde %23 düzeyinde bir artış belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *O. niloticus*'ta $\text{TiO}_2\text{-NP}$ 'in belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin solungaç dokusu GR aktivitesi üzerine etkisi. “#” işareti aynı derişimde süreler arasında istatistiksel ayırım olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde endüstriyel ve teknolojik alanlarda çok hızlı gelişmeler yaşanmaktadır. Özellikle de yaklaşık 60 yıllık bir tarihi ve yenilikçi bir alan olan nanoteknolojide her geçen gün hayatımıza yeni nano-ürünler girmektedir. Sağlıktan kozmetiğe kadar birçok alandaki kullanımına bağlı olarak nano-mucize olarak görülen bu nanomaddeler aslında ağır metaller ve pestisitler gibi geleneksel ve bilinen kirleticiler kadar çevrede ciddi problemlere neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda metal ve metal oksit nanopartiküllerin su canlılarından karasal organizmalara kadar birçok canlı grubunda ve hatta insanlarda bile DNA hasarı, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli sağlık sorunlarına neden olduğu belirtilmektedir. Nanopartiküllerin bu etkileri dışında artan derişim ve etki sürelerine bağlı olarak mortaliteye neden olacağı da ifade edilmektedir. Nanometallerin $\mu\text{g/L}$ ortam derişimlerinde bile balıklar için letal olabileceği vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *D. rerio*'da 48 saat LC_{50} değeri sadece Cu metali için 1.78 mg/L; Cu-NP için ise 0.71 mg/L olduğu bulunmuştur (Shaw ve Handy 2011). Bu durum geleneksel metal kirliliğine oranla nanometallerin daha toksik olabileceğini göstermektedir. Nanopartiküllerin öldürücü etkilerinin yanı sıra balıklarda oksidatif stres, Na^+/K^+ -ATPaz enzim inhibisyonu, dokularda iz element dağılımı ve solunum toksisiteleri gibi subletal etkilere neden olabileceği de belirtilmektedir. Ayrıca bu partiküllerin balıkların solungaç, karaciğer, bağırsak ve beyin gibi farklı dokularında patolojik durumlara neden olduğu da gösterilmiştir (Shaw ve Handy 2011). Sunulan çalışmada 5.00 mg/L TiO_2 -NP etkisinde ve 14 günlük süre sonunda *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir. Bununla birlikte solungaç dokusu antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişimler bu metal oksit partiküllerin etkisinde belirlenmiştir. *O. niloticus*'ta TiO_2 -NP etkisinde mortalite gözlenmemesi bu balıklardaki güçlü detoksifikasyon ve savunma mekanizmasına ve TiO_2 -NP'ye karşı adaptasyon yeteneğine bağlı olabilir. Çalışmamızla paralel olarak Abdel-Khalek vd. (2015) yaptıkları çalışmalarında da 28 gün süreyle 0.09 g/L Zn-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir.

O. niloticus ağır metal ve pestisitler gibi çeşitli kirleticilere karşı oldukça dayanıklı bir türdür. Birçok alan ve laboratuvar çalışmalarında bu balıkların toksikantlara uyum yeteneklerine bağlı olarak yoğun kirliliğin bulunduğu ortamlarda

bile yaşamlarını sürdürebildikleri gözlemlenmiştir. Güçlü bir immün sistemleri bulunmakta ve bu da hastalıklara karşı bu balıkların dirençli olmasını sağlamaktadır. Bu dirençli-dayanıklı yapılarının yanı sıra yetiştiriciliğinin kolay olması, dünyada en fazla kültürü yapılan tatlı su balıklarından birini ve insanların da besinini oluşturduğundan *O. niloticus*, kirleticilerin akuatik organizmalar üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda bir model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Sunulan bu çalışmada da bu biyolojik ve ekolojik önemlerinde dolayı *O. niloticus* araştırma materyali olarak seçilmiştir.

Balıklar sudaki toksikantları en çok solungaçları aracılığıyla vücuda almaktadırlar. Solungaçlar balıkların solunum, iyon regülasyonu ve asit-baz dengesinde önemli roller oynamaktadır. Bu dokular ayrıca boşaltıma da yardımcı olarak vücuttan atıkların atılmasında da işlevseldir. Sularda havaya oranla oksijen düzeyi yaklaşık 40 kat daha az bulunmaktadır. Bu çok az olan oksijenden vücutun gereksinim duyulan miktarlarının karşılanması için balık solungaçları bazı önemli uyum mekanizmaları geliştirmiştir. Bunlardan en önemlileri çok geniş bir yüzey alanına sahip olmaları ve kılcallarda akan kan ile suyun akış yönünün ters olmasıdır. Bu özellikler aynı zamanda sudaki kirleticilerin organizmaya hem girişini kolaylaştırmakta hem de fazla miktarlarda alınmasını sağlamaktadır. Balık dokuları içerisinde solungaçlar, suyla doğrudan temas halinde olması ve toksikantlar için vücutun ilk alım bölgelerini oluşturmalarından dolayı kirleticilerden en fazla etkilenen doku olarak ifade edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı da sunulan bu çalışmada solungaç dokuları nanopartiküllerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde hedef doku olarak seçilmiştir.

Nanopartikül ya da nanomalzemelerin biyolojik sistemler üzerine olan toksisiteleriyle ilgili çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır. Günümüzde ekotoksikologlar nanopartikül toksisitesi ve patolojisi üzerine yoğunlaşmış durumundadırlar (Moore 2006). Bu alandaki çalışmalarda dikkatler daha çok metal (Au, Ag, Cu ve Ni) nanopartikülleri ve metaloksit (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , CuO , CeO_2 , SiO_2 ve Al_2O_3) nanopartiküllerine verilmiştir (Menard vd. 2011). Nanopartiküller potansiyel akuatik kirleticiler olarak ifade edilmektedir. Endüstriyel ürün ve atıklar gibi çeşitli yollardan su ortamlarına ulaşabilmektedirler. Nanoteknoloji endüstrisinin gelişimindeki hızına bağlı olarak bu partiküllerin akuatik ortamlara giriş miktarlarında da artış olmaktadır (Moore 2006). Ultra düşük boyutlu bu partiküllerin birçok

oksidiradikallerin doğrudan yada dolaylı olarak oluşumunu sağlayabilmektedir. Bu oksidiradikaller de DNA, protein ve membranlarda hücrel hasarlara neden olmaktadır (Brown vd. 2001). Ayrıca çoğu nanopartiküllerin geçiş metallerine ve organik kimyasal kirleticilere bağlanma ilgisinin, bu partiküllerin toksik etkisini artırıcı bir etkiye neden olduğu da belirtilmektedir (Cheng vd. 2004). Yine bu partiküllerin vücuda ve hücrelere doğrudan ve kolaylıkla girebilmeleri daha yüksek toksik etkiler göstermesine neden olmaktadır (Berry vd. 2004) .

TiO₂-NP boyalarda, güneş kremlerinde, kozmetiklerde, kondansatörlerde, yapı materyallerinde, hava temizlenmesinde, çeşitli kaplama malzemesinde, anti-bakteriyel, -viral, -alg ve -fungus olarak ve spor ekipmanlarında yaygın bir şekilde kullanıldığından (Shaw ve Handy 2011) her geçen gün su ortamlarındaki düzeyleri artmaktadır. Bu nanopartiküllerin balıklarda süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi ROT'nin üretimine neden olduğu belirtilmektedir (Federici vd. 2007). Bu ROT'larda hücrelerin biyomoleküllerine ve yapısal bileşenlerine saldırarak hücre içi homeostaziyi bozmakta ve sonuçta da oksidatif stresi ortaya çıkarmaktadırlar. Bu strese karşı hücreler kendilerini antioksidan savunma sistemleriyle korumaktadırlar. SOD, CAT, GST, GPX ve GR önemli antioksidanlar olup ROT'ların oluşumu yada uzaklaştırılması süreçlerinde etkin rolleri bulunduğundan biyolojik açıdan çok önemli enzimlerdir.

Çevresel kirleticilerin etkilerinin biyobelirteçleri olarak birçok biyokimyasal ve fizyolojik parametreler kullanılmaktadır. Biyobelirteçler geleneksel ve bilinen kirleticiler de olduğu gibi su ortamındaki nanopartiküllerin alınımlarını, biyolojik bulunurluğu ve zararlı etkilerinin değerlendirmek için de kullanılmaktadır (Wels vd. 2001, Moore vd. 2004). Biyobelirteçler oksidatif hasar, antioksidan savunma sistemi etkinliği ile doku ve hücre patolojisini gösteren belirteçlerdir (Livingstone vd. 2000). Birçok araştırmacı nanopartiküllerin etkisinde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde önemli değişimlerin meydana geldiğini belirlediklerinden bu enzimlerin nanopartiküllerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini belirtmektedir (Xiong vd. 2011, Abdel-Khalek vd. 2015, Afifi vd. 2016). Sunulan çalışmada da TiO₂-NP'nin ortam derişimi ve etkileşim süresine bağlı olarak *O. niloticus*'un solungaç dokusundaki CAT, SOD, GPX, GST ve GR enzim aktivitelerinde önemli değişimlerin olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde önceki

çalışmalarda da nanopartikül çeşidine, balık türüne, ortam derişimi ve etkileşim peryoduna bağlı olarak antioksidan enzim aktivitesinde anlamlı azalış veya artışlar rapor edilmiştir (Lee vd. 2012, Varela-Valencia vd. 2014, Abdel-Khalek vd. 2015).

SOD ve CAT oksidatif hasara karşı hücrelerin ilk savunma hattı olarak biyolojik sistemlerin korunması açısından önemli enzimlerdir. Bu enzimlerden SOD hücre bileşenlerine ciddi zarar veren radikallerden bir olan süperoksit anyonuna; CAT ise radikal olamayan ama hücreler için en tehlikeli radikal olan hidroksil radikaline dönüşme potansiyeli yüksek olan hidrojen perokside etki ederek bu ROT'ların zararlı etkilerinden hücreleri koruyan antioksidandırılar. Nanopartiküller balıkların SOD ve CAT enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaktadır.

SOD oksiradikaller ile uğraşan ilk enzim olarak ifade edilmektedir. Bu enzim kirletici stresine karşı oldukça duyarlı olduğundan çevresel kirliliğin indüklediği oksidatif stresin erken uyarıcı bir belirteci olarak kullanılmaktadır. SOD aktivitesindeki azalışların hücrelerin serbest radikallerin temizlenme yeteneğinin bir göstergesi olabileceği ve antioksidan savunma sisteminin ROT'lar tarafından etkisizleştirildiğini gösterebileceği ifade edilmektedir (Vander vd. 2003). Sunulan çalışmada da *O. niloticus*'un solungaç dokusu SOD aktivitesinin TiO₂-NP'nin düşük ve yüksek ortam derişimlerinde 4 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış gösterdiği belirlenmiştir. TiO₂-NP'nin toksik etkilerinin bir sonucu olarak SOD enzim aktivitesinin azalmış olabileceği ve bu enzim aktivitesindeki azalışların sonucunda da süperoksit anyon radikalinin uzaklaştırılmamasına bağlı olarak doğrudan ya da dolaylı yollardan hücre ve bileşenlerin bu radikalden olumsuz etkilenebileceği düşünölmektedir. Çalışmamızla paralel olarak 0.09 g/L Zn-NP etkisine farklı sürelerle bırakılan *O. niloticus*'ta solungaç dokusu SOD aktivitesi 28 günlük süre sonunda bir azalış göstermiştir (Abdel-Khalek vd. 2015). Yine başka bir çalışmada geleneksel bir kirletici olan insektisitlerin etkisinde de *O. niloticus*'un karaciğer dokusu SOD enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Tutuş 2006). Araştırıcı toksikantların etkisinde SOD aktivitesindeki azalışların, süperoksit anyonunun toksik etkilerine karşı hücrelerin daha duyarlı hale getirebileceğini belirtmektedir. Keza Yonar ve Sakin (2011) de kirleticilerin etkisinde SOD aktivitesindeki azalışların bu ksenobiyotiklerin hücresel toksisitesine bağlı olarak oluşan oksidatif stresle açıklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Önceki çalışmalarda da metal ya da metaloksit bazlı nanopartiküllerin etkisinde SOD enzim aktivitesinde anlamlı azalışlar rapor edilmiştir. Linhua vd. (2009) yaptıkları laboratuvar çalışmalarında 100 ve 200 mg/L TiO₂-NP etkisinde *C. carpio*'nun solungaç, karaciğer ve beyin dokusu SOD aktivitesinde önemli azalışlar belirlemişlerdir. Araştırmacılar azalan SOD aktivitesinin, süperoksit anyon radikalinin düzeylerinde artışlara bunun da azalan bir antioksidan savunma potansiyeline neden olacağını vurgulamışlardır. Yine Xiong vd. (2011) de 50 mg/L TiO₂-NP 96 saatlik kısa dönemli etkileşim süresi sonunda *D. rerio*'da karaciğer SOD aktivitesinde azalışların olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise 4 mg/L Ag-NP etkisini takiben *O. niloticus* ve *T. zillii* türü balıkların beyin dokusu SOD aktivitesi azalış göstermiştir (Afifi vd. 2016).

CAT aktivitesindeki değişimlerde SOD aktivitesinde olduğu gibi kirleticilerin oksidatif toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Sunulan araştırmada *O. niloticus*'un solungaç dokusu CAT aktivitesi, TiO₂-NP'nin 1.0 mg/L ortam derişiminde her iki etki süresi sonunda azalış gösterirken; 5.0 mg/L ortam derişiminde 4 günlük süre sonunda azalış, 14 günlük süre sonunda ise artış göstermiştir. CAT enzim aktivitesinde özellikle de ilk etki süresi sonundaki azalışların SOD aktivitesindeki azalışla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü azalan SOD aktivitesine bağlı olarak hücre içinde artan süperoksit anyonunun CAT enzim aktivitesini inhibe edebileceği belirtilmektedir (Ballesteros vd. 2009). CAT aktivitesindeki artışlar ise H₂O₂'ye karşı bir adaptasyon yanıtını gösterebilir. Tutuş (2016), toksikantların etkisinde azalan CAT aktivitesinin artan süperoksit anyonunun toksik etkisinin bir sonucu; bununla birlikte bu enzim aktivitesindeki artışların ise antioksidan savunma yanıtı olarak oluştuğunu ifade etmektedir. Çalışmamızla benzer sonuçlar Linhua vd. (2009) yaptıkları araştırmalarında da TiO₂-NP'nin farklı ortam derişimlerinin etkisinde *C. carpio*'da rapor edilmiştir. Araştırmacılar sazanların solungaç ve karaciğerlerinde TiO₂-NP'nin düşük ortam derişimlerinde başlangıçta azalan CAT aktivitesinin etkisi süresinin uzamasıyla arttığını belirlemişlerdir.

Farklı balık türleri ile yürütülen çalışmalarda nanopartiküllerin etkisinde CAT enzim aktivitesinde azalış ve/ve ya artışlar rapor edilmiştir. Zhu vd. (2008) *C. carpio*'da karbon nanopartiküllerinin etkisinde düşük ortam derişimlerinde ve 32 günlük etki süresi sonunda CAT enzim aktivitesinde anlamlı azalışlar saptamışlardır. Başka bir çalışmada da TiO₂-NP ve ZnO-NP'nin *D. rerio*'nun dokularında CAT enzim

aktivitelerinde azalışlara neden olduğu belirlenmiştir (Xiong vd. 2011). Afifi vd. (2016) yaptıkları laboratuvar çalışmalarında Ag-NP etkisinde artan ROT üretimine bağlı olarak *O. niloticus* ve *T. zillii*'de CAT enzim aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir. Alkaladi vd. (2014) de 1 ve 2 mg/L ZnO-NP etkisinde *O. niloticus*'ta solungaç ve karaciğer dokularında CAT aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. 0.09 g/L Zn-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta 7 ve 14 günlük süreler sonunda solungaç ve karaciğer CAT enzim aktivitesinde anlamlı artışlar belirlenmiştir (Abdel-Khalek vd. 2015). Varela-Valencia vd. (2014) 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 0.1, 1.0, 10.0 mg/L TiO₂-NP'nin intraperitoneal enjeksiyonu sonrasında *O. niloticus*'ta karaciğer CAT gen ekspresyonlarının arttığını rapor etmişlerdir.

Hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korumada çok önemli rolleri olan GSH'ın hücre içi düzeylerinin korunması organizmanın sağlığı açısından oldukça önemlidir. GST, GPX ve GR hücre içi GSH metabolizmasında ve düzeylerinin korunmasında görevli enzimlerdir. Bu enzimler bu tripeptidi bazen substrat bazen de kofaktör olarak kullanarak oksidatif hasardan hücreleri korumaktadırlar.

GST önemli bir detoksifikasyon enzimi olup ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda GSH'ı bir substrat olarak kullanmaktadır. GST'nin çeşitli kirleticilerin detoksifikasyonunda kritik bir rol oynadığı ve böylelikle ROT'ların neden olduğu örneğin DNA hasarı gibi toksik etkilere karşı hücreleri koruduğu belirtilmektedir (Salinas ve Wong 1999). Bu nedenle bu enzim aktivitesi hücrelerin toksikantları detoksifiye etme yeteneklerinin ve oksidatif stresin değerlendirilmesinde yararlı bilgiler verdiği vurgulanmaktadır (Hayes ve Strange 1995). Sunulan bu çalışmada *O. niloticus*'un solungaç dokusu GST aktivitesinin, TiO₂-NP'nin düşük ortam derişiminde 4 günlük; yüksek ortam derişiminde ise hem 4 hem de 14 günlük süre sonunda arttığı belirlenmiştir. GST aktivitelerinin bir detoksifikasyon yanıtı olarak TiO₂-NP'nin toksik etkilerini nötralize etmek için arttığı düşünülmektedir. Çalışmamızla paralel olarak Lee vd. (2012) 25, 50, 100 ve 200 µg/L Ag-NP etkisine bırakılan *C. carpio*'da karaciğer dokusu GST aktivitesinin 96 saatlik etkisi süresi sonunda önemli düzeylerde arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar enzim aktivitesindeki artışların bu metal bazlı nanopartikülün toksik etkilerinin önleminde yararlı olduğunu belirtmişlerdir. Fırat (2016) da yaygın bir kirletici olan cıvanın 0.01 ve 0.1 ppm ortam derişimlerinin etkisine 7 ve 21 günlük süreler ile bırakılan *O. niloticus*'ta solungaç ve

karaciğer dokuları GST aktivitelerinin anlamlı olacak şekilde arttığını belirlemiştir. Araştırmacı artan GST aktivitelerinin metalin oksidatif stresine bir adaptasyon yanıtı sonucunda oluştuğunu ve böylelikle bu toksikantın toksik etkilerinin nötralize edildiğini vurgulamıştır. Çalışmamızla benzer sonuçlara Varela-Valencia vd. (2014) yürüttüğü çalışmada da ulaşılmıştır. Araştırmacılar *O. niloticus*'ta 0.1, 1.0 ve 10 mg/L TiO₂-NP'nin 3, 6, 12 ve 24 saatlik intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda karaciğer doku GST gen ekspresyonunun genel olarak arttığını rapor etmişlerdir. Monteiro vd. (2010) kirleticilerin etkisinde balık dokularında artan GST aktivitesinin oksidatif stres hasarının önlenmesinde önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

Farklı organizma gruplarında nanopartiküllerin GST enzim aktivitelerin artışlara neden olduğu gösterilmiştir. Lorenzo (2012) TiO₂-NP'nin farklı ortam derişimlerinin etkisine bırakılan *Carassius auratus*'ta solungaç, karaciğer ve bağırsak dokuları GST aktivitelerinin özellikle de 10 ve 100 mg/L ortam derişimlerinde ve 7 ve 14 günlük süreler sonunda önemli düzeylerde arttığını saptamıştır. Su besin zincirinin önemli öğeleri olan *D. magna* (Kim vd. 2010) ve *D. pulex* (Klaper vd. 2009) ile yürütülen çalışmalarda TiO₂-NP'nin farklı ortam derişimlerinin etkisinde GST enzim aktivitesinin bu nanopartikülün toksik etkilerine bir yanıt olarak arttığı belirlenmiştir. Chae vd. (2009) de Ag-NP'in *O. latipes* balıklarının karaciğer dokusunda GST enziminin gen ekspresyonunu arttırdığını ve bu artışın bu metal bazlı nanopartikülün detoksifikasyonunda ya da bu toksikanta karşı hücresel savunmada önemli olduğunu belirtmişlerdir.

GPX, indirgeyici ajan olarak GSH'ı kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri detoksifiye etmektedir (Halliwell and Gutteridge 1998). Böylelikle GPX enzimi, hücreleri bu toksik moleküllerin zararlı etkilerinden korumada kritik bir rol oynamaktadır (Vinodhini ve Narayanan 2009). Bu araştırmada *O. niloticus*'un solungaç dokusu GPX aktivitesi TiO₂-NP'in yüksek ortam derişiminde 4 günlük süre sonunda azalış; 14 günlük süre sonunda ise artış göstermiştir. Azalan GPX enzim aktivitesinin TiO₂-NP'in enzim üzerine olan doğrudan yada hücre içi GSH düzeylerini azaltmasına bağlı olarak dolaylı toksik etkisi ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak Afifi vd. (2016) de *O. niloticus* ve *T. zilli* ile yürüttükleri çalışmalarında beyin dokusu GPX aktivitesinin 4 mg/L Ag-NP etkisinde anlamlı olacak şekilde azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar bu enzim aktivitesinin GSH

düzeyleriyle ilişkili olduğunu ve metal-nanopartiküllerinin toksik etkileri sonucunda azalan GSH miktarlarına bağlı olarak bu enzim aktivitesinin azalmış olabileceğini belirtmişlerdir. Ali ve Ali (2015) başka bir metaloksit nanopartikül olan CuO-NP etkisinde tatlı su salyangozu *Lymnea luteola*'da GPX enzim aktivitesinin bu nanopartikülün toksisitesi sonucunda azaldığını saptamışlardır.

Çalışmamızda TiO₂-NP etkisinde artan GPX enzim aktivitesi ise bu nanopartikülün indüklediği H₂O₂ ve/veya hidroperoksitlere karşı bir savunma yanıtı olarak meydana gelmiş olabilir. Abdel-Khalek vd. (2015) de benzer şekilde *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer GPX aktivitelerinin Zn-NP'in etkisinde 7, 14 ve 28 günlük süreleri sonunda arttığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar GPX enzim aktivitesindeki artışların serbest radikallerin temizlenmesinde ve çeşitli türlerdeki peroksit moleküllerinin zararlı etkilerinin nötralize edilmesinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yine başka araştırmalarda da yaygın kirleticiler olan ağır metallerin etkisinde çeşitli balık türlerinde GPX enzim aktivitelerinin bir adaptasyon yanıtı olarak ve hücresel bileşenlerin özellikle de lipid peroksidasyonuna karşı hücre zarlarının korunmasında arttığı rapor edilmiştir. Örneğin; *O. niloticus*'ta cıva (Fırat 2016), *C. carpio*'da Cd, Pb ve Cr (Vinodhini ve Narayanan 2009) ve *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* ve *Pomatoschistus microps*'ta Cu, Zn, Pb ve Cr etkisinde (Ahmad vd. 2008) GPX enzim aktiviteleri anlamlı artışlar göstermiştir.

GR oksidatif hasara karşı ilk savunma hattını sağlayan bir başka antioksidan enzimdir (Cnubben vd. 2001). Bu enzim aktivitesi GSH'ın sitosolik konsantrasyonlarının korunmasında işlevseldir. GR aktivitesindeki artışların oksidatif stresin potansiyel bir biyokimyasal belirteci olduğu ifade edilmektedir (Cazenave vd. 2006). Sunulan bu araştırmada da *O. niloticus*'un solungaç dokusundaki GR enzim aktivitesinin yüksek TiO₂-NP ortam derişiminin etkisinde 4 ve 14 günlük süreler sonunda arttığı belirlenmiştir. Bu enzim aktivitesinin TiO₂-NP etkisinde artan ROT oluşumuna bağlı olarak meydana gelen oksidatif stresle baş etmek için artmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca artan GR aktivitesine bağlı olarak okside glutatyondan redükte glutatyonun oluşumunun oksidatif toksisite ile mücadelede biyolojik açıdan önemli olabileceği öngörülmektedir. Araştırma sonuçlarımıza benzer sonuçlar Ramesh vd. (2013) tarafından 7 gün süreyle 2.5 ve 5.0 mg/L SiO₂-NP ortam derişimlerinin etkisine bırakılan zebra balığının dokularındaki oksidatif stres

parametrelerini incelediği çalışmalarında da bulunmuştur. Araştırmacılar bu nanopartikülün etkisinde *D. rerio*'nun özellikle de karaciğer ve solungaç dokularındaki GR enzim aktivitelerinin bir oksidatif stres yanıtı olarak arttığını ifade etmişlerdir. Ribeiro vd. (2015) de metal-nanopartiküllerin etkisinde oksidatif stresin olumsuz etkilerini nötralize etmek için gerekli GSH düzeylerinin korunması amacıyla GR enzim aktivitesinin artış olabileceğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada da 0.5 ve 5.0 mg/L CuO-NP'in etkisine bırakılan *O. mossambicus*'ta karaciğer GR aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Villarreal vd. 2014).

Nanopartikülleri de içeren çeşitli çevresel kirleticilerin farklı organizma gruplarında GR enzim aktivitesinde artışlara neden olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Sequero (2014) gümüş nanopartiküllerin balık hücreleri üzerine toksik etkilerini incelediği *in vitro* çalışmasında Ag-NP'in *D. rerio*'da karaciğer hepatosit hücrelerinde GR enzim aktivitesini arttırdığını rapor etmiştir. Farklı derişimlerde TiO₂-NP etkisine bırakılan *Xenopus laevis* Afrika pençeli kurbağası embriyolarında özellikle de yüksek ortam derişimlerinde GR enzim aktivitesinde anlamlı artışlar belirlenmiştir (Birhanlı vd. 2014). Karbamat türü insektisit olan methomyl etkisinde *O. niloticus* karaciğerinde (Meng vd. 2014) ve organofosfat insektisit olan methyl parathion etkisinde ise *Poecilia reticulata* balıklarının solungaç ve karaciğer dokularındaki (Sharbidre vd. 2011) GR aktiviteleri artış göstermiştir. Kumari vd. (2014) Cr etkileşimini takiben *Labeo rohita* balıkların solungaç, karaciğer, beyin ve kas dokularındaki GR enzim aktivitelerinde genel olarak bir artış saptamışlardır.

Sonuç olarak sunulan çalışmada *O. niloticus*'un solungaç dokusu antioksidan enzim aktivitelerinin TiO₂-NP'den etkilendiği belirlenmiştir. SOD, CAT, GST, GPX ve GR enzim aktivitelerinde belirlenen artış ve/veya azalışların TiO₂-NP'in düşük ortam derişimlerine oranla yüksek ortam derişimlerinde ve etki süresinin de uzamasına bağlı olarak daha fazla olduğu gözlenmiştir. Balıkların önemli metabolik dokusu olan solungaçların bu nanopartikülden olumsuz etkilendiği ve bu nedenle solungaçların TiO₂-NP'in toksik etkilerinin değerlendirilmesinde hedef doku olarak kullanılabileceği vurgulanabilir. Solungaçların suyla doğrudan temas halinde olması ve sudaki toksikantlar için ilk alım bölgesi olmasına bağlı olarak bu nanopartikülün olumsuz etkisine daha açık hale gelmiş olabilir.

Nanoteknolojideki gelişmeler ve nanomateryallerin günlük yaşantımızda artan kullanımlarına bağlı olarak akuatik ortamların gittikçe artan kirlilik yükü hem bu ekosistemlerin canlı gruplarının hem de onlarla beslenen insanların sağlığı için dünya çapında bir endişe kaynağı olmaya başlamıştır. Bu nanopartiküllerin çok düşük boyutlarına rağmen büyük ekolojik sorunlara neden olması bunların dikkatle incelenmesi ve bu alandaki çalışmaların da daha fazla ivme kazanması gerektiğini düşündürmektedir. Ne yazık ki nanotoksosite alanındaki araştırmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Özellikle de geleneksel ve bilinen kirleticiler olarak kabul edilen ağır metaller ve pestisitlerle karşılaştırıldığında nanotoksosite çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmada metaloksit bazlı nanopartiküllerin toksik etkileri ortaya çıkarılmıştır. TiO_2 -NP etkisinde *O. niloticus*'ta genel olarak artan GST ve GR aktiviteleri, azalan SOD aktivitesi ile etkileşim sürecinin başında azalan daha sonra da artan CAT ve GPX aktivitelerinin olasılıkla bu nanopartikülün etkisinde oluşan ROT'larla ve sonuçta da oksidatif stresle ilişkili olabilir. Bu sonuçlar TiO_2 -NP'in antioksidan savunma sistemlerini etkilediğini ve bu nedenle de oksidatif strese neden olan bir nanotoksik ajan olarak dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Son olarak araştırma sonuçlarımıza dayalı olarak TiO_2 -NP'in toksik etkilerinin değerlendirilmesinde solungaçların hedef doku ve antioksidan enzimlerin de biyokimyasal belirteçler olarak kullanabileceği vurgulanabilir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Khalek, A., Kadry, M., Hamed, A. and Marie, M.A., (2015). Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*, The Journal of Basic & Applied Zoology, 72: 113–125.
- Abele, D., Vazquez-Medina, J.P. and Zenteno-Sav, T., (2012). Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystems, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.
- Afifi, M., Saddick, S. and Zinada, O.A.A., (2016). Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*, Saudi Journal of Biological Sciences, 23: 754–760.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M. and Santos, M.A., (2008). DNA damage and lipid peroxidation vs. protection responses in the gill of *Dicentrarchus labrax* L. from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal), Sci. Total Environ., 406: 298–307.
- Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D. and Henry, T.B., (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquatic Toxicology, 126: 104–115.
- Ali, D., and Ali, H., (2015). Susceptibility of the freshwater pulmonate snail *Lymnea luteola* L. to copper oxide nanoparticle, Toxicological and Environmental Chemistry, 97(5): 1–26.
- Alkaladi, A., Afifi, M., Mosleh, Y. and AbuZinada, O., (2014). Histopathological effects of zinc oxide nanoparticles on the liver and gills of *Oreochromis niloticus*, protective effect of vitamins C and E, J. Pure Appl. Microbiol., 8(6): 4549-4558.
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yılmaz, S. and Camas, M., (2016). Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses, Aquatic Toxicology, 177: 22–32.
- Atlı-Şekeroğlu, Z., (2013). Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi, Turk. Hij. Den. Biyol. Derg., 70(1): 33-42.
- Australian Government, (2005). Nanotechnology: enabling technologies for Australian innovative industries.

- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A. and Bistoni, M.A., (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 199–205.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. and Curtis, A.S.G., (2004). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization, *Biomaterials*, 25: 5405–5413.
- Beutler, E., (1984). *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods*, 2nd edition, Grune and Starton, New York, 160s.
- Birhanlı, A., Emre, F.B., Sayılkan, F. and Güngördü, A., (2014). Effect of nanosized TiO₂ particles on the development of *Xenopus laevis* embryos, *Turk. J. Biol.*, 38: 283-288.
- Boxall, A., Tiede, K. and Chaudhry, Q., (2007). Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health, *Nanomedicine* 2: 919-927.
- Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P., (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 631–651.
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V. and Donaldson, K., (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 175: 191–199.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver, *Journal of Biological Chemistry*, 250: 5475–5480.
- Cattaneo, A.G., Gornati, R., Chiriva-Internati, M. and Bernardini, G., (2009). Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing, *Invertebrate Survival Journal*, 6: 78-97.
- Cazenave, J., Bistoni, M.D.A., Pesce, S.F. and Wunderlin, D.A., (2006). Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR, *Aquat. Toxicol.*, 76: 1–12.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J. and Gu, M.B., (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Aquatic Toxicology*, 94: 320–327.

- Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M., (2011). Effects of titanium dioxide nanoparticles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure, *Aquatic Toxicology*, 101: 493–499.
- Chen, T.H., Lin, C.Y. and Tseng, M.C., (2011). Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*), *Marine Pollution Bulletin*, 63: 303–308.
- Cheng, X.K., Kan, A.T. and Tomsom, M.B., (2004). Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C-60 fullerene, *J. Chem. Eng. Data*, 49: 675–83.
- Cho, M., Chung, H., Choi, W. and Yoon, J., (2004). Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection, *Water Res.*, 38: 1069–1077.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Zenden, J. and Bladeren, P.J., (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10: 141–152.
- Colvin, V.L., (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials, *Nat. Biotechnol.*, 21: 1166–1170.
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J. and Owen, R., (2008). Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles, *Ecotoxicology*, 17: 421–437.
- Diebold, U., (2003). The surface science of titanium dioxide, *Surf. Sci. Reports*, 48: 53–229.
- Dobson, J., (2001). Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease, *FEBS Lett.*, 496: 1–5.
- Drobne D., Jemec, A. and Tkalec, Z.P., (2009). *In vivo* screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂, *Environmental Pollution*, 157: 1157–1164.
- Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S. and Hidaka, H., (1997). Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients, *FEBS Lett.*, 418: 87–90.
- Faria, M., Navas, J.M., Soares, A.M.V.M. and Barata, C., (2014). Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos, *Science of the Total Environment*, 470–471: 379–389.

- Federici, G., Shaw, B.J. and Handy, R.D., (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects, *Aquatic Toxicology*, 84: 415–430.
- Fırat, Ö., (2016). Cıva, cıva-selenyum ve cıva-zeolit karışımlarına bırakılan *Oreochromis niloticus*'ta cıvanın, dokulardaki birikimi ve GSH ile ilişkili enzim aktivitelerine etkisi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 101s.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., (1998). *Free radicals in biology and medicine*, New York: Oxford University Press.
- Hayes, J.D. and Strange, R.C., (1995). Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress, *Free Radical Research*, 22(3): 193-207.
- Kaya, H., Duysak, M., Akbulut, M., Yılmaz, S., Gurkan, M., Arslan, Z., Demir, V. and Ates, M., (2016). Effects of subchronic exposure to zinc nanoparticles on tissue accumulation, serum biochemistry, and histopathological changes in *Tilapia (Oreochromis niloticus)*, *Environmental Toxicology*, 49: 1-13.
- Kim, T.K., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.H. and Kim, S.D., (2010). Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction, *Science of the Total Environment*, 408: 2268–2272.
- Klaper, R., Crago, J., Barr, J., Arndt, D., Setyowati, K. and Chen, J., (2009). Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: changes in toxicity with functionalization, *Environ. Pollut.*, 157: 1152–1156.
- Kumari, K., Khare, A. and Dange, S., (2014). The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induced toxicity in the fish *Labeo rohita*, *BioMed Research International*, 15: 1-12.
- Lartillot, S., Kadziora, P. and Athios, A., (1988). Purification and characterization of new fungal catalase, *Preparative Biochemistry*, 18 (3): 241-246.

- Lee, B., Duong, C.N., Cho, J., Lee, J., Kim, K., Seo, Y., Kim, P., Choi, K. and Yoon, J., (2012). Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 34: 1-14.
- Linhua, H., Zhenyu, W. and Baoshan, X., (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile Carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Environmental Sciences*, 21: 1459–1466.
- Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L. and Moore, M.N., (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids, *Int. J. Environ. Pollut.*, 13: 56–91.
- Lourenço, J.F.C., (2012). Toxicological effects of TiO₂ nanoparticles in two freshwater species: *Carassius auratus* and *Corbicula fluminea*, Universidade Da Beira Interior, M.Sc Thesis, pp94.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mayland, A.D., (2006). Nanotechnology: a research strategy for addressing risk, Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC.
- Menard, A., Drobne, D. and Jemec, A., (2011). Ecotoxicity of nanosized TiO₂: Review of *in vivo* data, *Environmental Pollution*, 159: 677-684.
- Meng, S.L., Chen, J.Z., Hu, G.D., Song, C., Fan, L.M., Qui, P.L. and Xu, P., (2014). Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101: 1–6.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T. and Kalinin, A.L., (2010). Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829), *Ecotoxicology*, 19: 105–123.
- Moore, M.N., (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32: 967–976.

- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. and Leonard, P., (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management, *Mutat. Res.*, 552: 247–268.
- NRC, (1999). Toxicity of military smokes and obscurants, National Academy Press, National Research Council, Washington, D.C.
- Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J. and Park, K.. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells, *Toxicol Lett.*, 180: 222–229.
- Polidoros, A.N. and Scandalios, J.G., (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.), *Physiol. Plant.*, 106: 112–120.
- Ralston, N.V.C. and Raymond, L.J., (2010). Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, *Toxicology*, 278: 112-123.
- Ramesh, R., Kavitha, P., Kanipandian, N., Arun, S., Thirumurugan, R. and Subramanian, P., (2013). Alteration of antioxidant enzymes and impairment of DNA in the SiO₂ nanoparticles exposed zebra fish (*Danio rerio*), *Environ. Monit. Assess.*, 185: 5873–5881.
- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J. and Handy, R.D., (2009). Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain, *Ecotoxicology*, 18: 939–951.
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F. and Jha, A.N., (2008). Hydroxyl radicals (•OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells, *Mutation Research*, 640: 113–122.
- Ribeiro, M.J, Maria, V.L., Scott-Fordsmand, J.J. and Amorim, M.J.B., (2015). Oxidative stress mechanisms caused by ag nanoparticles (NM300K) are different from those of AgNO₃: effects in the soil invertebrate *Enchytraeus crypticus*, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12: 9589-9602.
- Robichaud, C.O., Uyar, A.E., Darby, M.R., Zucker, L. and Wiesner, M., (2009). Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment, *Environmental Science and Technology*, 43: 4227-4233.

- Royal Society, (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, RS policy document 19/04. London, p. 113.
- Salinas, A.E. and Wong, M.G., (1999). Glutathione S-transferases-a review, *Current Medicinal Chemistry*, 6(4): 279–309.
- Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A. and Musarrat, J., (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells, *Toxicology in Vitro*, 26: 351–361.
- Sequero, A.M., (2014). Comparative study of oxidative stress-related toxicity induced by silver nanoparticles in rainbow trout and zebrafish cell lines, Department of Biological and Environmental Sciences University of Gothenburg, Degree project for Bachelor Environmental Science, pp 12.
- Sharbidre, A.A., Metkari, V. and Patode, P., (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101: 132–141.
- Sharma, V.K., (2009). Agregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environmentda review, *Journal of Environmental Science and Health Part*, 44: 1485-1495.
- Shaw, B.J. and Handy, R.D., (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions, *Environment International*, 37: 1083–1097.
- Sherratt, P.J. and Hayes, J.D., (2002). Glutathione S-transferases enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, pp. 319-352.
- Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S. and Dhawan, A., (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology in Vitro*, 25: 231–241.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J. and Doak, S.H., (2009). Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*, 30: 3891–3914.

- Smith, C.J., Shaw, B.J. and Handy, R.D., (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects, *Aquatic Toxicology*, 82: 94–109.
- Srinonate, A., Banlunara, W., Maneewattanapinyo, P., Thammacharoen, C., Ekgasit, S. and Kaewamatawong, T., (2015). Acute Toxicity study of nanosilver particles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): pathological changes, particle bioaccumulation and metallothionein protein expression, *Thai. J. Vet. Med.*, 45(1): 81-89.
- Sun Y., Oberley L.W. and Li Y., (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clin. Chem.*, 34: 497-500.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G. and Sheehan, D., (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*, *Aquatic Toxicology*, 100: 178–186.
- Tutuş, R., (2016). *Oreochromis niloticus*'un karaciğer dokusundaki antioksidan sistemler ve lipid peroksidasyonu üzerine chlorpyrifos, emamectin benzoate ve abamectin türü pestisitlerin etkileri, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 88.
- Vander, O.R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57–149.
- Varela-Valencia, R., Gomez-Ortiz, N., Oskam, G., Coss, D., Rubio-Pina, J., Rio-Garcia, M., Albores-Medina, A. and Zapata-Perez, O., (2014). The effect of titanium dioxide nanoparticles on antioxidant gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *J. Nanopart. Res.*, 16: 2369.
- Villarreal, F.D., Das, G.K., Abid, A., Kennedy, I.M. and Kültz, D., (2014). Sublethal effects of CuO nanoparticles on mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity, *PLoS ONE*, 9(2): 88723.
- Vinodhini, R., and Narayanan, M., (2009). Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure, *Turk. J. Vet. Sci.*, 33: 273–278.

- Warheit, D.B., Sayes, C.M., Reed, K.L. and Swain, K.A., (2008). Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks, *Pharmacology & Therapeutics*, 120: 35–42.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J.J. and Knap, A.H., (2001). Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants-exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests, *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 799–804.
- Wilhelm-Filho, D., Torres, M.A., Tribbes, T.B., Pedrosa, R.C. and Soares, C.H.L., (2001). Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*), *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34: 719–726.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X. and Zhu, W., (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage, *Science of the Total Environment*, 409: 1444–1452.
- Yonar, M.E. and Sakin, F., (2011). Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 226–231.
- Zhang, A.P. and Sun, Y.P., (2004). Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells, *World J. Gastroenterol.*, 10: 3191–3193.
- Zhu, X., Zhou, J. and Cai, Z., (2001). The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*), *Marine Pollution Bulletin*, 63: 334–338.
- Zhu, X.S., Zhu, L., Lang, Y.P. and Chen, Y.S., (2008). Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9): 1979–1985.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rifat Cesur BOZAT
Doğum Yeri : ADIYAMAN
Doğum Tarihi : 14.02.1978
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Gölbaşı Sağlık Meslek Lisesi – 1996
Ön Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü – 2010
Lisans : Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – 2014
Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü - 2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- Adıyaman 400 Yataklı Eğitim ve Araştırma Hastahanesi 2009-Devam Ediyor

Yayınları (SCI ve diğer)

- Ö. Fırat, Ö. Fırat, R. Tutuş, H. Karadağ, Ö. Koç, **R.C. Bozat**. Adıyaman'ın Güncel Çevre Sorunları. Adıyaman Üniversitesi Bilim, Kültür ve Sanat Sempozyumu-II, 02-03 Nisan 2015, Adıyaman.
- Ö. Fırat, Ö. Fırat, H. Karadağ, **R.C. Bozat**, H.Y. Çoğun, T.A. Yüzereroğlu, G.G. Firidin, F.Kargın. Atatürk Baraj Gölü'nde Adıyaman Şehir ve Sanayi Atık Sularının Neden Olduğu Kirlilik. Adıyaman Üniversitesi Bilim, Kültür ve Sanat Sempozyumu-II, 02-03 Nisan 2015, Adıyaman.

EK-1. Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
6	27.07.2015	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 7- Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr.Özgür FIRAT'ın sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, "NANOPARTİKÜLER TİTANYUM DİOKSİTİN OREOCHROMIS NİLOTICUS'UN SOLUNGAÇ DOKUSU ENZİMATİK ANTİOKSİDANLARINA ETKİSİ" başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyoistatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Mehmet Ali AKGÜL
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]