

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI
(*Danio rerio*) LARVALARI ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİLERİ
VE GEN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

GÖKAY ULUTAŞ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. HALİS BORAN

TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. İLHAN ALTINOK
DOÇ. DR. ŞEVKİ KAYIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI


RİZE-2015

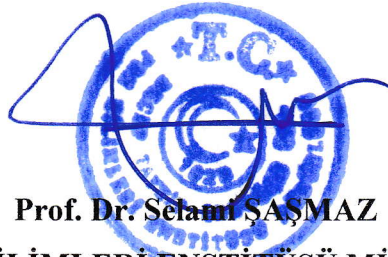
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
LARVALARI ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİLERİ VE GEN EKSPRESYON
DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN danışmanlığında, Gökay ULUTAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/06/2015 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN	
Üye	: Prof. Dr. İlhan ALTINOK	
Üye	: Doç. Dr. Şevki KAYIŞ	



Prof. Dr. Selami SAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında yürütülmüştür. “Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine genotoksik etkileri ve gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su ürünleri Fakültesi, Akuatik Toksikoloji Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı, Su Kimyası Laboratuvarı ve bir bölümü de Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

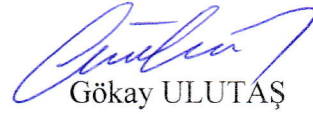
Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmaların yürütülmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen ve göstermiş olduğu ilgiden dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı’nda yapmış olduğumuz ICP-OES, SEM ve Zetasizer analizleri konusunda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Hakkı Türker AKÇAY’a ve Uzman Murat ŞİRİN’e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Yüksek Lisans öğrenimim boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme, değerli arkadaşım Huri HASANOĞLU’na ve Sinop Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’ndeki çok değerli arkadaşlarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

Gökay ULUTAŞ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine genotoksik etkileri ve gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemleri kabul ettiğimi beyan ederim. 27/05/2015


Gökay ULUTAŞ

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

ÖZET

ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARI ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİLERİ VE GEN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Gökay ULUTAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN

Endüstriyel nanopartiküller, alışılmamış fizikokimyasal özelliklerinden dolayı canlılarda bulunan doku, organ, hücre, hücre içi yapılar, DNA ve protein düzeylerinde potansiyel olarak olumsuz etkiler oluşturabilmektedirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ZnO nanopartiküllerin etkilerinin kısmen mi yoksa tamamen mi Zn^{+2} iyonlarından kaynaklandığı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, ZnO nanopartikülünün ve uygun konsantrasyonlarda suda çözünebilen $ZnCl_2$ kaynaklı Zn^{+2} iyonlarının larval zebra balıkları (*Danio rerio*, 72 saatlik) üzerine potansiyel toksik etkileri, stres gen (*p53*, *rad51* ve *mt2*) ekspresyonlarındaki değişimler eş zamanlı kantitatif PZR (RT-qPCR) tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca, $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülünün oluşturabileceği genotoksik etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, 0-60 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarının % 50'sini öldüren letal konsantrasyonlar sırasıyla $4,66 \pm 0,11$ ve $21,37 \pm 1,81$ mg/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülüne 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak DNA zincir kırıkları tespit edilmiştir. DNA hasarının $ZnCl_2$ 'e (% 55,3) maruz bırakılan larvalarda, ZnO nanopartikülüne (% 25,4) maruz bırakılanlara oranla daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Stres gen ekspresyon değişimlerinin ise direkt olarak konsantrasyona bağlı olmadığı tespit edilmesine rağmen $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülüne maruz bırakılan larvaların *mt2* gen ekspresyonlarında kontrol grubuna oranla sırasıyla 20,5 ve 2,5 kat artış belirlenmiştir. Toksik etkilerin genel olarak benzerlik göstermesi, ZnO nanopartikülünün toksisitesinin iyonlaşma nedeniyle oluşan Zn^{+2} iyonlarından kaynaklandığını ortaya koymuştur.

2015, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: ZnO Nanopartikül, DNA Hasarı, Gen Ekspresyonu, Zebra Balığı, Akut Toksikite.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS AND GENE EXPRESSION CHANGES OF ZINC OXIDE (ZnO) NANOPARTICLES IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) LARVAE

Gökay ULUTAŞ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN

Engineered nanoparticles can potentially generate adverse effects on tissue, organ, cellular, subcellular, DNA, and protein levels due to their unique physico-chemical properties. To date it is not yet completely understood, whether effects of zinc oxide (ZnO) nanoparticles are solely or partly due to dissolved Zn^{2+} . The present study compare potential effects of ZnO nanoparticles and corresponding concentrations of ion Zn^{2+} by water soluble $ZnCl_2$ to larval (72 h post fertilization) zebrafish (*Danio rerio*) by analysing changes in expression levels of stress-related genes (*p53*, *rad51*, and *mt2*) by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Another objective was to assess genotoxicity of ZnO nanoparticles and $ZnCl_2$. The lethal concentrations for 50% mortality (LC_{50}) in larval zebrafish exposed (96 h) to 0-60 mg/L ZnO nanoparticles and $ZnCl_2$ were 21.37 ± 1.81 and 4.66 ± 0.11 mg/L, respectively. A concentration-dependent increase in DNA strand breaks was detected in blood cells from larvae exposed (96 h) to ZnO nanoparticles and $ZnCl_2$. DNA damage was higher in $ZnCl_2$ (% 55.3) than ZnO nanoparticles (% 25.4) exposed larvae. Induction of stress-related genes in larvae was complex and not directly related to ZnO nanoparticles and $ZnCl_2$ concentrations, although there was 20.5 and 2.5 fold increase in *mt2* gene expression of larvae exposed to $ZnCl_2$ and ZnO nanoparticles relative to control. The similarities of the effects lead to the conclusion that effects of ZnO nanoparticles are mainly related to the release of Zn^{2+} ions.

2015, 49 pages

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

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Nanoteknolojinin Tarihi ve Günümüz Nanoteknoloji Endüstrisi	3
1.3. ZnO Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	5
1.4. Nanopartikül Toksikolojisi	6
1.5. Nanopartiküllerin Sucul Ortam Üzerine Etkileri	6
1.6. Akutik Toksikoloji Deneyleri	8
1.7. Biyodeneyleerde Deney Canlılarının Seçimi	10
1.8. Gen Ekspresyonu	11
1.9. DNA Hasarı (Comet Assay)	11
1.10. Önceki Çalışmalar	12
1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
2.2. Fizikokimyasal Analizler	16
2.3. Toksikolojik Test Canlıları	17
2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması	18
2.5. Letal ve Subletal Maruz Bırakma Deneyleri	18
2.6. Gen Ekspresyon Değişimleri	20
2.6.1. RNA İzolasyonu	20
2.6.2. Revers (Ters) Transkripsiyon	21
2.6.3. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	22
2.6.4. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması	23

2.7.	Larvalarda Hücresel DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet Assay)	24
2.8.	İstatistiksel Analizler	25
3.	BULGULAR	26
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	34
5.	ÖNERİLER	39
	KAYNAKLAR	40
	ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	C60 nanopartikül (fulleren) taneciğinin üç boyutlu görünümü	2
Şekil 2.	Nanoteknoloji üretim teknolojisinde önde gelen ülkeler ve ayırdıkları fonlar	4
Şekil 3.	ZnO nanopartiküllerin toz hali ve üç boyutlu görünümü (A) ve bir tüketici ürünü olarak güneş kremlerinde kullanılması (B)	6
Şekil 4.	Toksikolojik deneylerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (<i>Danio rerio</i>)	11
Şekil 5.	Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları	18
Şekil 6.	Zebra balığı larvaları kullanılarak 3 paralel olacak şekilde hazırlanmış ZnCl ₂ toksisite test üniteleri	19
Şekil 7.	Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir NP karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi	20
Şekil 8.	ZnO nanopartiküllerin SEM analizi ile elde edilen görüntüsü	26
Şekil 9.	96 saatlik deneyde ZnO NP'lerin (1 mg/L) su sütunundaki dağılımı	27
Şekil 10.	Nanopartikül test sistemi içerisindeki sulu fazda ZnO nanopartiküllerin 96 saatlik maruziyet süresi boyunca ölçülen konsantrasyonları	27
Şekil 11.	Toksikolojik testlerde ZnCl ₂ ve ZnO nanopartikülüne 96 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının ölüm oranları	28
Şekil 12.	ZnCl ₂ ve ZnO nanopartikül uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde Comet oluşumu	29
Şekil 13.	96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda ZnCl ₂ (üçgen) ve ZnO (daire) nanopartikülüne maruz bırakılan larvalardaki DNA hasarları	29
Şekil 14.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl ₂ ve ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki <i>mt2</i> gen ekspresyon değişimleri	30
Şekil 15.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl ₂ ve ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki <i>rad51</i> gen ekspresyon değişimleri	30
Şekil 16.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl ₂ ve ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki <i>p53</i> gen ekspresyon değişimleri	31
Şekil 17.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı miktarda ZnCl ₂ 'e maruz kalan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri....	32
Şekil 18.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarında üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri	32
Şekil 19.	Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve nanopartiküllere maruz kalan larvalarda görülen anormallikler.	33

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer dizileri	22
---	----

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
LC ₅₀	Canlıların %50'sini Öldüren Letal Konsantrasyon
mm	Milimetre
mt	Metallothionein
nm	Nanometre
np	Nanopartikül
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
Zn	Çinko
ZnO	Çinko Oksit
β -actin	Beta Aktin
μ m	Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

“Nano” yunanca ve latince cüce, metrik sistemde metrenin milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre (nm) metrenin milyarda biri kadardır. Nano ölçekteki nesnelere boyutları bilinen diğer nano ve mikro boyutundaki doğal bileşenlerle karşılaştırılarak ölçüleri konusunda daha ayrıntılı bilgi sağlanabilmektedir. Maddeler nano boyutta normal hallerinden çok farklı davranışlar gösterirler. Normalde elektriği ve ışığı iletmeyen maddelerin nano boyuttaki iletkenlikleri çok yüksektir. Sert olmayan maddeler, nano boyutta iken tam tersi özellikler göstererek elmas bile sert bir davranış gösterebilirler (Mark vd., 2007; Crane vd., 2008).

Üretilen nanoteknoloji ürünlerinin daha dayanıklı, daha hafif ve daha hassas özelliklerle donatılmış olması günümüzde nanoteknolojiyi ilgi odağı haline getirmiştir. Nanoteknoloji vizyonunun ortaya çıkmasını, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman'ın malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi ile başarılabilecekler üzerine yapmış olduğu “There's Plenty of Room at the Bottom” başlıklı ünlü konuşmasına kadar dayandırabiliriz. Nanoteknolojinin önemini “2000’li yıllarda insanlar geriye dönüp baktıklarında neden 1960’lara kadar bu konu ile ilgili ciddi çalışmaların başlamadığını merak edecekler” sözleriyle açıklayan Feynman, minyatürize edilmiş enstrümanlar ile nanoyapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda kullanılabilmesinin altını çizmiştir. Feynman'ın başlattığı bu akım, günümüze kadar müthiş bir hız ve bilgi birikimi ile devam etmiştir. 2000 yılında “Amerikan Ulusal Nanoteknoloji Gurubu” kurulmuş ve nanoteknolojiye verilen maddi destek 2005 yılında milyar dolara yaklaşmıştır. 2000 yılında “Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri Biyomühendislik Konsorsiyumu”, “Nanobilim ve Nanoteknoloji: Biyomedikal Araştırmaların Şekillendirilmesi” başlığı ile yapılmıştır. Bu konsorsiyumun en önemli faydası nanoteknolojinin tıp ve biyolojideki kullanım alanlarının daha iyi anlaşılması olmuştur (TÜBİTAK, 2004). 21. yüzyılın en önemli teknolojisi olan nanoteknolojide, ilk olarak 1985 yılında Amerikalı bilim adamı Richard B. Fuller tarafından C₆₀ (fulleren) keşfedilmiş ve üretilmiştir (Şekil 1).



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

Günümüzde de artık nanoteknolojinin gelişmesiyle, farklı sahalarda yararlanmak üzere sentetik olarak yeni özellikler kazandırılan nanomalzemeler üretilmektedir. Malzemenin boyutları nano ölçek düzeyine yaklaştıkça oluşan yeni özellikler sayesinde, nanomalzemeler sanayide geniş kullanım alanı bulmuş ve geliştirilen ürünler hızla gündelik hayatımıza girmiştir (Handy vd., 2008). Tekstil sanayiinde giyim ürünlerinin yanı sıra teknik ürünlerde de nanomalzemeler kullanılmaktadır. Ziraat tekstilleri, inşaat malzemeleri, spor malzemeleri, endüstriyel tekstiller, tıbbi tekstiller gibi teknik tekstil ürünleri nanomalzemeler kullanılarak üretilmektedir. Ayrıca boya endüstrisinde de nanoteknolojik malzemelerden yararlanılmış, binaların genellikle dış cephelerinde ve gerektiğinde iç cephelerinde faydalanılmak üzere; kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku önleme, antimikrobiyal ve antibakteriyal gibi nitelikler taşıyan boyalar üretilmiştir. Nanoteknolojiden yararlanan bir başka sektör de kozmetik endüstrisidir. Nanomalzemeler kullanılarak üretilen diş macunu, güneş kremleri, tıraş losyonu, nemlendirici, deodorant gibi çeşitli ürünler tüketici piyasasına sunulmuştur. Diğer bir sanayi dalı olan otomotiv endüstrisi de; hafif motor ve çerçeve parçalarının yapımı, sürtünmeye karşı dayanıklı malzemelerin üretimi, aşınmaya karşı koruyucu katmanlar geliştirilmesi gibi farklı alanlarda nanoteknolojiden faydalanmıştır (SCENIHR, 2006).

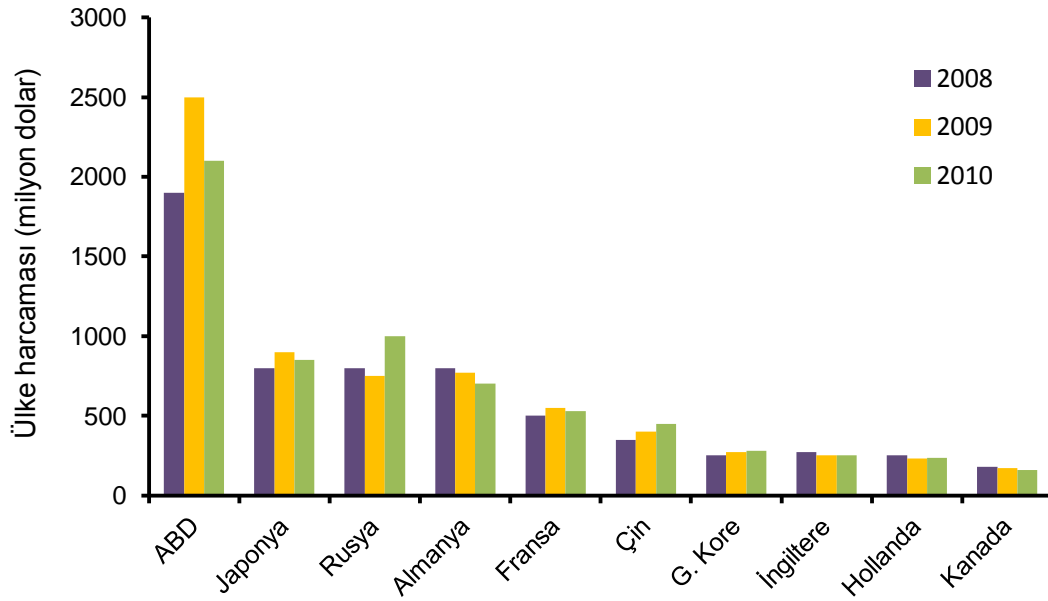
Nanoteknolojinin ve nanomalzemelerin uluslararası düzeyde önem kazanması ve kullanımının artması ile birlikte başta EPA (Çevre Koruma Örgütü) olmak üzere ABD’de ve Avrupa’da çok sayıda kuruluş bu ürünlerin potansiyel zararlı etkilerini belirleme çalışmalarına başlamıştır (Wiesner vd., 2006). Nanoteknolojinin kullanım alanının büyüklüğü ve hızlı bir şekilde gelişip yayılması göz önüne alındığında, bu malzemelerin zararlı etkilerinin belirlenmesi, çevre ve halk sağlığının korunmasında önemli bir yere sahiptir (Moore, 2006; Kroll vd., 2009).

Günümüzde çok sayıda yapılan nanopartikül (NP) toksisite test araştırmalarında elde edilen veriler oldukça problemlili ve karmaşıktır. Bunun nedeni, nanopartiküllerin kümelenme özelliklerinin deney elemanları ve ölçüm sistemlerinin düzgün çalışmasına olanak sağlamamasıdır. Büyüklüklerine ve dağılım özelliklerine bağlı olarak nanopartiküller sucul ortam içerisinde hem dağılıma hem de buldukları test sisteminin tabanına çökme eğilimindedirler (Limbach vd., 2005). Nanopartiküller için günümüzde kullanılan test yöntemleri, güvenilir risk ölçümü, doğrulama ve standart test protokolü düzenleme açısından bazı problemlere sahiptir. Bu nedenle farklı laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilen testlerde farklı sonuçlar elde edilmektedir. Son zamanlarda uygulanan test metotları muhtemelen nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir, bu sorunu aşabilmek için nanopartikül risk değerlendirme çalışmalarında hücresel toksikolojik deney metotlarının uygun hale getirilmesi veya yeni bir test sisteminin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kroll vd., 2009; Boyle vd., 2015). Nanopartiküllerin su ortamındaki zararlı etkilerini değerlendirebilmek için; doğru deney sistemlerinin kullanılması ve çevresel maruz kalma şartlarını göz önüne alarak test canlıları için uygun maruz bırakma düzeneğinin oluşturulması oldukça önemli bir kriterdir.

1.2. Nanoteknolojinin Tarihi ve Günümüz Nanoteknoloji Endüstrisi

Maddeler üzerinde 100 nanometre ölçeğinden daha düşük boyutlarda gerçekleştirilen ve ticari bir amaca yönelik olarak işleme, ölçüm, modelleme ve düzenleme gibi çalışmalarını kapsayan bilim dalına nanoteknoloji adı verilmektedir. 21. yüzyılda gelişmekte olan ve en önemli bilim dallarından biri olarak ifade edilen nanoteknoloji, ilk olarak 1959 yılında Amerikalı bilim insanı Richard Feynman'ın nanoyapıların esas yapılardan daha farklı özellikler taşıdığını vurgulaması ve bilim insanlarının dikkatini nanometre boyutlarına çekmesiyle ivme kazanmıştır. İlk olarak 1981 yılında taramalı tünelleme mikroskopunun (STM), daha sonra 1985 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) keşfi, yüzeyde bulunan atomların ve moleküllerin incelenmesine, atomsal boyutta tepkimelerin izlenmesine olanak tanımıştır. Bu sayede 20. yüzyılın son döneminde nanoteknoloji endüstrisi hız kazanmış ve doğada bulunmayan yeni nanomalzemelerin atomsal seviyede üretilmesine başlanmıştır (TÜBİTAK, 2004).

Nanoteknoloji günümüzde de fizik, kimya, biyoloji, ilaç, çevre, bilgisayar, uzay ve elektronik gibi birçok endüstri alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Nano alan gelecekteki mühendislik ve bilim çalışmalarının temelini oluşturacak bilimler arası araştırmaların ve eğitimin esas basamağı olarak görülmektedir. Dünya ekonomisinde söz sahibi olan ülkeler son dönemlerde nanoteknoloji alanındaki araştırma-geliştirme çalışmalarına ve yatırımlara oldukça yüksek miktarda kaynaklar ayırmaktadır (Şekil 2).



Şekil. 2. Nanoteknoloji üretim teknolojisinde önde gelen ülkeler ve bu teknoloji için ayırdıkları fonlar.

Boyutları 1-100 nm arasında değişen bileşikler nanotoz olarak adlandırılmaktadır. Nanotoz olarak üretilen maddeler; metaller, metal oksitler, sülfidler, nitritler, boritler, ve karpitler iken metal olmayan materyaller ise silika, silikon karpitler, karbon ve kalay olarak sıralanabilir. Nanotozların günümüzdeki kullanım alanlarına aşağıda örnekler verilmiştir. Çinko oksit ve titanyum dioksit nanotozları; boya ve kaplamalar, güneş losyonu ve kozmetik, ayrıca içme sularındaki kirleticilerin elimine edilmesinde kullanılmaktadır. Gözlük camlarında, merceklerde kullanılan çizilmeyi önleyen malzemeler ve tıbbi amaçlı kullanılan camlara kendi kendini temizleme özelliği veren materyaller titanyum dioksit nanotozlarını içermektedir (Pritchard, 2004). Mikro Alüminyum nanotozlar, havai fişeklerde ve patlayıcı maddelerde yanma özelliklerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Elmas nanotozlar; ayna, mercek, zımpara ve macun gibi malzemelerde istenilen yüksek parlaklığı elde etmek için kullanılmaktadır.

Yağlama özelliklerini geliştirmek amacıyla yağlarda da elmas nanotozlar kullanılmaktadır. Gümüş ve elmas nanotozları boyalara ilave edilerek boyanın dış etkenlerle aşınmasını önlemek ve koruma sağlamak için kullanılmaktadır. Nanobakır, askeri malzemeler, elektriksel materyaller, aşınmayı önleyici yağ katkıları ve bilgisayar donanımlarında kullanılmaktadır. Nanogümüş ise daha çok antimikrobiyal özelliğiyle bilinmektedir. Bu nedenle tekstil sanayinde bakteri oluşumunu önleyici ve koku giderici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda paketlenme ve beyaz eşya sanayinde de gümüş nanopartiküller kullanılmaktadır (Mark vd., 2007).

1.3. ZnO Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Bu tez çalışmasına da konu olan çinko oksit (ZnO) nanopartiküller bant aralığı ve büyük bağlanma enerjisi gibi özelliklerinden dolayı yarı iletkenler arasında en önemlilerinden bir tanesidir. Bu özelliğinden dolayı bir çok alanda kullanılabilir. Gaz sensörleri, şeffaf elektrot, pH sensörleri, biosensörler, güneş pili ve foto kataliz çalışmalarında kullanılabilir. ZnO nanopartiküllerin kullanılan materyallerdeki performansları, özellikle tane şeklinin homojenliğine, en/boy oranına, tane yüzeyinin temizliğine ve büyütülen tanelerin yönelimlerine bağlıdır (Moezzi vd., 2012).

Yapılan pek çok çalışmada, çinko oksit nanoparçacıklarının mor ötesi ışınlarına karşı koruyucu etkisi olduğu, antioksidan ve antibakteriyel etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, gıda ambalajlanmasında kullanılarak gıdaların raf ömrünün uzatılmasında, güneş koruyucularda UV fitresi olarak ve diş macunlarında kalınlaştırıcı olarak kullanılmaktadır (Pritchard, 2004) (Şekil 3).



Şekil. 3. ZnO nanopartiküllerin toz hali ve üç boyutlu görünümü (A) ve bir tüketici ürünü olarak güneş kremlerinde kullanılması (B).

1.4. Nanopartikül Toksikolojisi

Nanotoksikoloji, nanopartiküllerin potansiyel toksik etkileri, risk değerlendirmesi ve güvenilirlik boyutlarının belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmaları ifade eder. Nanoteknoloji endüstrisi, maddelerin nano ölçekte alışılmamış bir takım özellikler kazanmasının keşfedilmesiyle hızlı bir gelişme kaydetmiştir ve nanopartiküllerin bu özellikleri aynı zamanda potansiyel toksisiteleri ve ekotoksikolojileri hakkında bir takım endişelere sebep olmuştur. Değişen kuantum davranışları ve reaktivitelerinin artması, imal edilmiş nanopartikülleri endüstride pek çok uygulamada kullanılabilir hale getirmiştir, ancak bu maddeler çevre ve canlı organizmalar üzerinde beklenmedik bazı olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir (Handy vd., 2008). Ayrıca, nanopartiküller küçük olmaları sayesinde bir bariyer oluşturarak diğer kimyasal maddelerin hücre zarı ve hücrelerarası bağlantılardan geçerek canlı organizma hücrelerine girişini engellemektedirler (Lanone ve Boczkowski, 2006).

1.5. Nanopartiküllerin Sucul Ortam Üzerine Etkileri

Nanopartiküllerin sucul çevreye karışması yakın gelecekte üzerinde durulması gereken yeni çevresel problemlere neden olmaktadır. Bilim insanları öncelikli olarak

araştırılmaya gerek duyulan alanların; küçük partiküllerin hidrodinamik davranışları, nanopartiküllerin sedimentler ve kolloit partiküllerle ilişkisi, lipofilik organik bileşiklere ve metallere bağlanma özellikleri, diğer kimyasal kirleticilerle oluşan ve toksisitenin artmasına sebep olan sinerjistik etki, canlı organizmalar tarafından vücuda alınma yolları, parçacık büyüklüğü ve yüzey özellikleri ve sucul ekosistemler üzerindeki etkileri olduğunu kesin olarak ifade etmektedirler (Moore, 2006).

Sanayi atıklarının çoğunun ve şehirsal atıksuların nehirlere, göllere ve kıyısallara karıştığı bilinmektedir. Bu nedenle, nano ölçekli endüstriyel ürünler ve yan ürünlerin de sucul ortamlara karışması kaçınılmazdır (Daughton, 2004). Ayrıca, çevresel izleme tekniklerinin yetersiz olması ve maddelerin normal ve nano formlarının ayırt edilmesindeki zorluklardan dolayı nanopartiküllerin çevreye dağılımı ve miktarları konusunda çok az bilgi mevcuttur. Günümüzdeki modelleme teknikleri nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonlarını $\mu\text{g/L}$ düzeylerinde tespit edebilmektedir (Boxall vd., 2007). İskandinav sucul ekosistemlerinde yapılan bir çalışmada TiO_2 nanopartikül konsantrasyonunun 0,0007 ile 0,0245 $\mu\text{g/L}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir (Mueller ve Nowack, 2008; Perez vd., 2009).

Yüzeyaltı denizel ve kıyısall ekosistemleri, pekçok omurgasız canlı ve balık türlerine ait pelajik yumurta ve larvaları içeren geniş mikrobiyal topluluklara sahiptir (Wurl ve Obbard, 2004). Nanopartiküllerin sucul organizmalar tarafından vücuda alınım yolları; direkt olarak yutma, solungaçlar aracılığıyla giriş, koku alma organları ve deri yoluyla vücut duvarından geçiş şeklindedir. Omurgasız canlılarda hücresel bağışıklık sistemi, bağırsak epiteli ve hepatopankreas, yutulan nanopartiküller için muhtemel hedef bölgeler iken (Moore, 1990), balıklarda ise karaciğer nanopartiküller için muhtemel hedef organdır (Smedsrud vd., 1984).

Nanopartiküller canlı organizmalarda birkaç farklı şekilde zehirlilik etkisi oluşturabilirler. Nanotoksitenin ana moleküler mekanizması, oluşan serbest radikaller nedeniyle canlı vücudunda hücresel oksidatif stres meydana gelmesidir (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllere aşırı miktarda maruz kalma durumunda, serbest radikaller; lipid, protein ve DNA'nın oksidasyonuna sebep olarak biyolojik bileşenlerde hasar meydana getirirler. Oksidatif stres, hücresel inflamasyonun oluşması ve

artmasında önemli rol oynar (Rahman, 2000; Rahman vd., 2005; Lanone ve Boczkowski, 2006). Serbest radikaller, yabancı maddelere karşı fagositik hücre etkisi, antioksidan madde miktarının yetersiz olması, geçiş metallere varlığı, çevresel faktörler ve bazı nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri gibi birkaç farklı faktörden meydana gelebilir (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllerin ürettiği potansiyel serbest radikallerin yavaş temizlenmesi ve dokularda birikim oluşturması, karaciğer ve dalak gibi organları oksidatif stresin ana hedefi haline getirmektedir. Ayrıca, böbrek gibi yüksek miktarda kan akışı olan organlar da nanopartiküllere maruz kaldığında olumsuz etkilenebilen organlardır.

Nanopartiküller canlı hücre içerisindeki hücresel bileşenlerle etkileşime girebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir veya değiştirebilir ve reaktif oksijen türleri oluşturabilirler. Nanopartiküllerin mitokondri ve hücre çekirdeği ile etkileşime girmelerinin zehirlenmenin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda da oluşan hücresel DNA hasarı, hücre döngüsünde aksama, mutajenez ve apoptozise neden olarak zehirlenmenin ana kaynağını teşkil eder (Unfried vd., 2007). Nanopartiküllerin diğer toksisite mekanizmalarının, buldukları ortamla çok hızlı bir etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanopartiküller dolaşım sistemine girdiklerinde kan bileşenleriyle etkileşime girerek hemoliz ve trombozise sebep olabilirler. Ayrıca, nanopartiküllerin bağışıklık sistemi ile etkileşimi sonucunda canlılarda immünotoksisiteyi arttırdıkları tespit edilmiştir (Dobrovolskaia ve McNeil, 2007).

1.6. Akut Toksikoloji Deneyleri

Canlı organizmaların hücreleri üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Toksikolojik deneyler, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için değil, bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılmaktadır. Deneylerde uzun süreli madde maruziyetine bağlı zehirlilik etkileri araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içerisinde de aynı özellikte maddelerin, su hacimlerinin ve test koşullarının uygulanması gerekir (Altınok vd.,

2011). Ayrıca, beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekir (Saygı vd., 1991; CPMP, 2000).

Toksikolojik deneylerde kullanılan deney canlıları artan miktarlarda toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak bu maddelerin canlılar üzerindeki etkileri araştırılır. Bu araştırmalarda; ölümler, üreme ve denge bozuklukları, gelişme durumları, yüzme yetenekleri, histolojik ve biyokimyasal değişimler ve organların aktiviteleri gibi faktörler incelenir. Testlerde kullanılan materyal tek bir kirletici olabileceği gibi birden fazla madde içeren kompleks bir karışım da olabilir (APHA, 1992; Laufer ve Nation, 1999). Toksikolojik deneylerde aynı özelliklere sahip canlılar, farklı miktarlarda toksik maddeye maruz bırakılmaktadır. Toksik madde dışındaki faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması bakımından testlerde ayrıca kontrol grubu kullanılır (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altınok, 2004).

Zehirlilik deneyleri; testin süresine, test ortamına, toksik madde ilavesine ve amaçlarına göre sınıflandırılmaktadır. Test sürelerine göre yapılan sınıflandırmada testler, akut ve kronik olmak üzere iki şekilde gruplandırılır. Akut toksikolojik testler, deney süresi 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimleri kullanılarak yapılmaktadır. Deney süresi, deneyde kullanılacak canlı türüne göre de değişiklik göstermektedir. Bu süre boyunca kullanılan organizmanın büyüme ve gelişimi de göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik testlerde deney süresi bir hafta ile bir ay arasında olabilir veya daha uzun süreler de kullanılabilir. Bu test türünde genellikle farklı toksik madde miktarlarının organizmaların üreme ve gelişmeleri üzerine etkileri incelenmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998). Toksikolojik deneyler, kirletici ilavesine göre statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olacak şekilde üç gruba ayrılmaktadır. Statik testlerde deneye tabi tutulacak organizmalar uygun bir düzenek içerisinde hazırlanmış deney ortamına konur ve deney süresi boyunca herhangi bir değişiklik yapılmaz. Bu deneylerde metabolizma sonucu oluşan atıkların su kalitesinde meydana getireceği olumsuzlukları gidermek amacıyla genellikle 96 saatlik süre tercih edilmektedir. Yarı statik toksik testlerde, deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenmekte olup, bu zaman aralıkları toksik madde ve deneyde kullanılan organizma türüne göre değişmektedir. Bu test türünde genellikle farklı zaman dilimleri tercih edilmektedir. Bu sayede, statik testlerde

metabolizma atıkları ve diğer bazı nedenlerden kaynaklanan su kalitesindeki değişimlerin olumsuz etkileri ortadan kaldırılmış olmaktadır. Sürekli akış sistemli testlerde ise, deney ortamı devamlı olarak yenilenir ve deney süresince su kalitesinde metabolizma atıkları nedeniyle herhangi bir değişiklik meydana gelmez. Bu testler doğal ortam şartlarını en iyi şekilde temsil eden deney sistemleridir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Zehirlilik testleri, toksik maddelerin zararlı etkilerini ve su kalitesini belirlemek, atıkları ve bu atıkların boşaltıldığı alanları izlemek, gıda zincirinin üst seviyesindeki canlıları korumak, insanlar tarafından tüketilen su ürünlerinin sağlık açısından zararlı olup olmadıklarını belirlemek ve toksik maddelerin organizmalar üzerindeki uyarıcı etkilerini ve biyolojik birikimini gözlemlemek için yapılmaktadır. Ayrıca, farklı toksik maddelerin canlı organizmalara olan etkilerini karşılaştırmak ve bu toksik maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da bu testler yaygın şekilde gerçekleştirilmektedir (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

1.7. Biyodenyelerde Deney Canlılarının Seçimi

Toksikolojik deneylerde kullanılacak olan canlılar mümkün olduğunca ekosistemi temsil edebilecek yerli türler olmalıdır. Seçilecek olan bu türün ekolojik ve ekonomik öneme sahip olması ve teminin de kolay olması gerekmektedir. Tür içi ve türler arasında duyarlılık farklılık gösterdiğinden mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığına sahip canlılar seçilmelidir. Bu türlerin laboratuvar koşullarına dayanıklılığının yüksek ve kültürlerinin de yapılabilir olması gerekir. Seçilecek türler en az bir ay süreyle laboratuvarında sağlıklı şartlarda muhafaza edilebilmelidir. Deney canlılarının biyolojilerinin, tuzluluk, pH ve sıcaklık isteklerinin önceden bilinmesi gerekir. Canlı organizmanın gıda zincirindeki düzeyi, ekonomik yönden önemi ve en hassas evresi bilinmelidir. Ayrıca, denemede kullanılacak organizmalar uygun boyda olmalıdır (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995; Atamanalp, 2004).

Sunulan bu tez çalışmasında deney canlısı olarak zebra balığı (*Danio rerio*) (Şekil 4) larvaları tercih edilmiştir. Çalışmamızda bu türün tercih edilme nedenleri; laboratuvar şartlarına uyum yeteneğinin yüksek olması, genel fizyolojisi, genetik yapısı ve

davranışlarının iyi bilinmesi, embriyonun dış ortamda gelişmesiyle tüm safhalarının izlenebilmesi ve değişiklik yapılabilmesi, birçok insan hastalık ve gelişim genleriyle benzer genler bulundurması, genetik analizler için uygun olması, insan genlerinin karşılaştırılmalı haritalanmasında kullanılması ve haftada yaklaşık birey başına 120-150 yumurta üretebilme kapasitesine sahip olmaları gibi özellikleridir.



Şekil. 4. Toksikolojik deneylerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (*Danio rerio*).

1.8. Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu ya da gen ifadesi, DNA dizisi olan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi süreci için kullanılan bir terimdir. DNA'da bulunan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA) sentezi suretiyle kopyalanması (transkripsiyon) ve kopyalanan genetik bilgilerin bir protein molekülü haline çevrilmesi (translasyon) işlemlerinin tamamı gen ifadesi (ekspresyonu) olarak tanımlanır. DNA'nın farklı genlere karşılık gelen bölgelerindeki baz dizilimleri, o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit dizisini belirler. DNA'daki baz dizilimlerinin proteinin amino asit dizisini nasıl şifrelediği genetik ve biyokimyasal yöntemlerin birlikte kullanılması ile ortaya konulmuştur (Yauk ve Berndt, 2007).

Gen ifadesinin en genel ölçüm amacı karşılaştırmadır. Farklı hücrelerdeki genlerin mRNA düzeylerini karşılaştırma, bir organdaki tümör hücresiyle normal bir hücrenin karşılaştırılması, farklı sürelerle ilaç uygulaması yapılan veya toksik maddelere maruz kalan canlıların genlerindeki ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması gibi amaçlarla gerçekleştirilmektedir (Suter vd., 2004).

1.9. DNA Hasarı (Comet Assay)

DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. 1988 yılında “Alkali Comet Assay” olarak tanıtılmasından sonra çeşitli modifikasyonlarla geliştirilerek çok farklı tiplerde DNA hasarının belirlenmesinde kullanılır hale gelmiştir. Yaşlanma, moleküler epidemiyoloji, klinik ve genetik toksikoloji alanlarında önemli uygulamaları olan “Comet Assay” son yıllarda giderek artan bir sıklıkta apoptozis, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında da yer almıştır. İşlem basamakları; hücre süspansiyonunun hazırlanması, mikroskop lamlarının hazırlanması, lizis işlemi, alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması (alkali unwinding), elektroforez işlemi, nötralizasyon işlemi, DNA'nın boyanması ve “comet”lerin görüntülenmesi, comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi gibi aşamaları kapsamaktadır (McKelvey-Martin vd., 1993).

1.10. Önceki Çalışmalar

Nanopartiküllerin canlı organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerinin değerlendirildiği toksikolojik çalışmalar oldukça az sayıdadır. Karbon 60 (C60) nanopartikülleri, boyutları ve fizikokimyasal özellikleri iyi bilinen nanoyapılar olmaları nedeniyle yapılan ilk çalışmaların pek çoğunda kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda, memeli hayvanlara ait hücre kültürüyle karıştırılan fullerenlerin, hücrel oksidatif strese neden olduğu ve hücrel toksisitenin, yağ içerisinde meydana gelen çözünmeden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Colvin, 2004; Sayes vd., 2004). Karbon 60 nanopartiküllerin yüzey alanlarının değişimi, yağlardaki alifatik ve hidroksil gruplara tutunarak çözünmelerini azaltabilir ve bu sayede toksisitede azalma meydana gelebilir (Sayes vd., 2004).

Günümüze kadar nanopartiküllerin toksik etkileri hakkındaki yapılmış çalışmaların çoğu memeli hayvanlar (fare, domuz vb.) ile yapılan çalışmalardır. Özellikle, karbon nanotüpler, TiO₂, kadmiyum ve metal oksit nanopartiküllerin

hayvanlardaki solunum sistemi üzerine etkilerine yönelik çalışmalar ağırlıktadır. Yapılan bu çalışmaların çoğunun sonucunda, nanopartiküllerin intratrakeal olarak hayvanlara verildiğinde önemli derecede akciğer hasarı oluşturdukları ve dokularda iltihaplanma ve fibroza neden oldukları tespit edilmiştir (Takenaka vd., 2004; Handy ve Shaw, 2007). Ancak, son yıllarda üretilen nanopartikül ve nanoteknoloji ürünlerinin hızlı artışı göz önüne alınarak, nanopartiküllerin letal ve subletal zehirlilik deneyleri; balıklar, omurgasızlar, sucül organizmalar ve midye gibi canlılarda da yapılmaya başlanmıştır. Deniz tarağı ve mavi midye (*Mytilus edulis*) kullanılarak yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin bu canlılarda endositoz yoluyla sindirim sistemine geçtikleri belirlenmiştir. Bunun yanında, nano ölçekteki patiküller denizel ortamdan toplanan midyelerin tamamının karaciğerlerinden izole edilebilmiştir (Moore vd., 1997).

Omurgasız canlılar ve balıklarla yapılan çalışmalarda C60 fullerenler mg/L düzeylerinde zehirli etki gösterebilmektedir, ancak sonuçta elde edilen LC₅₀ değerleri nanopartiküllerin hazırlanma metodu ve çözücü türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Bu deneyler sonucunda, canlı organizmaların nanopartiküllere sulu fazda maruz bırakıldıklarında birikimin, özellikle solungaçlarda ve bağırsaklarda meydana geldiği tespit edilmiştir. Alabalıklarda karaciğer, nanopartiküller için en önemli hedef organ olarak belirlenmiş ve balıkların karaciğerlerinde önemli derecede biyokimyasal değişimlerin olduğu tespit edilmiştir (Kashiwada, 2006; Lovern vd., 2007). Karbon içerikli nanopartikül toksisite deney çalışmaları, balık beyninin de potansiyel bir hedef organ olduğunu ortaya koymuştur. Karbon 60 nanopartikül uygulanan geniş ağızlı levrek (*Micropterus salmoides*) balığında beyin dokusundaki lipid peroksidasyonunda artış, golyan balığında (*Pimephales promelas*) ise peroksizomal lipid taşıyıcı protein olan PMP70 miktarında %42 oranında bir azalma belirlenmiştir (Oberdörster, 2004; Oberdörster vd., 2006). Organik bir bileşik olan tetrahidrofuran (THF) ile karbon 60 karışımına maruz bırakılan larval zebra balıklarının hayta kalma oranlarında azalma ve kontrol grubuna oranla gen ekspresyonlarında düşük miktarda bir değişim tespit edilmiştir (Henry vd., 2007). Bunun yanında, zebra balığı larvalarının embriyolojik gelişimlerinde gecikme ve yumurtadan çıkış oranlarında da azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Zhu vd., 2007).

TiO₂ nanopartiküllere maruz bırakılan gökkuşığı alabalıklarının beyin dokularında herhangi bir toksik etki görülmemesine rağmen, solungaçlarında oksidatif stres kaynaklı etkiler görülmüştür. Bu durum beyinde bir hasarın oluşumunun nanopartikül türüne bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (Federici vd., 2007). Zebra balıklarında solungaç filament genişliklerinde herhangi artış görülmezken ribozomal fonksiyonda gen ekspresyonlarında önemli derecede değişimler tespit edilmiştir (Griffitt vd., 2009). Başka bazı nanopartiküllere oranla TiO₂ nanopartiküller daha düşük oranda toksik etki göstermektedirler. Yavru sazan balıklarıyla (*Cyprinus carpio*) yapılan deneylerde yüksek nanopartikül konsantrasyonlarında dahi ölüm görülmezken solunum sisteminde konsantrasyona bağlı olarak stres oluşumu ve oksidatif stres etkisi nedeniyle süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve laktoperoksidaz enzim miktarlarında değişiklikler tespit edilmiştir (Hao vd., 2009).

Metalik nanopartiküllerden su içerisinde kısmen çözünme özelliğine sahip olan bakır (Cu) nanopartiküllerin zebra balıklarında 48 saatlik akut toksisite deneyi sonucunda LC₅₀ değeri 1,5 mg/L olarak belirlenmiştir. Diğer bir metalik NP olan gümüş (Ag) nanopartiküllerin balıklarda toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, golyan balığı embriyolarında 96 saat LC₅₀ değerleri 35 ve 100 nm boyutlarındaki nanopartiküller için sırasıyla 9,4 ve 10,6 mg/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, konsantrasyona bağlı olarak larva anormalliklerinde artış belirlenmiştir (Laban vd., 2010). Yavru gökkuşığı alabalıkları ile yapılan biyobirikim deneylerinde en fazla Ag nanopartikül birikiminin solungaçlarda ve karaciğerde olduğu tespit edilmiştir (Scown vd., 2010).

Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin zebra balığı embriyolarındaki toksik etkileri üzerine yapılan bir çalışma sonucunda, doza bağlı olarak perikardiyal ödem ve yumurtadan çıkma oranlarında önemli derecede azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ZnO nanopartiküllere maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında oksidatif stres ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşması nedeniyle toksik etkiler meydana geldiği belirlenmiştir (Zhu vd., 2009).

Nanopartiküllerin sucul organizmalarda vücut içerisindeki absorpsiyonu, dağılımı, yerleşimi, bunun yanında protein seviyeleri, metabolizma ve boşaltım üzerine etkileri

hakkında yeterince çalışma bulunmamaktadır (Handy vd., 2008). Bunun yanında, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres konusunda da araştırmaya gereksinim duyulmaktadır. Sulu fazda nanopartiküllere maruz bırakılan canlı vücudunda oluşan oksidatif stres nedeniyle, eser element metabolizmasında bozulma, damar sertliği, epitel hücrelerindeki antioksidan savunma sisteminde değişimler ve solungaçlarda hasar meydana gelebilmektedir (Kashiwada, 2006; Smith vd., 2007). Bu konuda yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin sucul organizmalarda oksidatif stres oluşturduğu ve özellikle, oksitleyici ajanlara karşı hassaslığıyla bilinen DNA'da hasar meydana getirdiğini göstermiştir (Linse vd., 2007).

Nanopartiküllerin bazı sucul omurgasızlara etkileri konusunda yapılmış birkaç çalışma mevcuttur. Su piresinin (*Daphnia magna*), ekotoksikoloji çalışmaları için standart bir organizma olduğu bilinmektedir ve bu canlı kullanılarak nanopartiküllerin LC₅₀ değerlerini belirlemeye yönelik birkaç çalışma yapılmıştır. Karbon 60 fulleren nanopartiküllere 21 gün süreyle 5 mg/L doza kadar maruz bırakılan su pirelerinde en yüksek konsantrasyonda %40 oranında ölüm meydana geldiği tespit edilmiştir (Oberdörster vd., 2006). Bunun yanında, toprak solucanı, bakteri, alg ve su bitkileri (deniz nanoplanktonları, bitki hücreleri) kullanılarak da nanopartikül ekotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Lyon vd., 2006; Tong vd., 2007).

1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Özellikle su kaynakları ve sucul ortamlar endüstriyel nanopartiküllere maruz kalma konusunda risk altında bulunan ortamlardır. Nanopartiküllerin su ortamındaki davranışları, sucul organizmalar tarafından vücuda alınma kapasitesi ve oluşabilecek potansiyel toksik etkileri konusunda günümüze kadar yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Nanopartiküllerin çevremizde oluşturduğu risklerin belirlenebilmesi için öncelikle sucul canlılar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Sucul ortamda organizmalar üzerindeki etkilerin anlaşılabilmesi için nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri, vücuda alınım mekanizması, davranışları ve maruz kalma yönteminin iyi anlaşılması gerekir. Ayrıca, nanopartiküllerin sucul canlılardaki toksisite mekanizmalarını tespit edebilmek için oksidatif stres nedeniyle oluşabilecek DNA

hasarları ve stres gen ekspresyonlarındaki değişimlerin moleküler düzeyde belirlenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, zebra balığı larvaları kullanılarak ticari amaçla imal edilen ZnO nanopartiküllerin homojen bir karışım ortamı sağlayan toksikolojik test sistemi yardımıyla genel ekotoksikolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve moleküler genetik düzeyinde toksik etkilerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla bu çalışmada;

- 1- ZnO nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri,
- 2- Doz-etki deneyleri yardımıyla ZnO nanopartiküllerin letal (LC₅₀) ve subletal konsantrasyonları,
- 3- Subletal konsantrasyonlarda ZnO nanopartiküllere maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde oluşabilecek DNA hasarları ve
- 4- Testlerde kullanılan zebra balığı larvalarının stres gen (*mt2*, *rad51* ve *p53*) ekspresyonlarındaki değişimler real-time PZR tekniği ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında nanoteknoloji endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmakta olan çinko oksit nanopartiküller (ZnO-NP, %80 Zn, partikül büyüklüğü: <100 nm, spesifik yüzey alanı: 25 ± 7 m²/g) zebra balığı larvalarında toksikolojik açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan ZnO nanopartiküller ve diğer kimyasal maddeler aracı medikaller aracılığıyla temin edilmiştir.

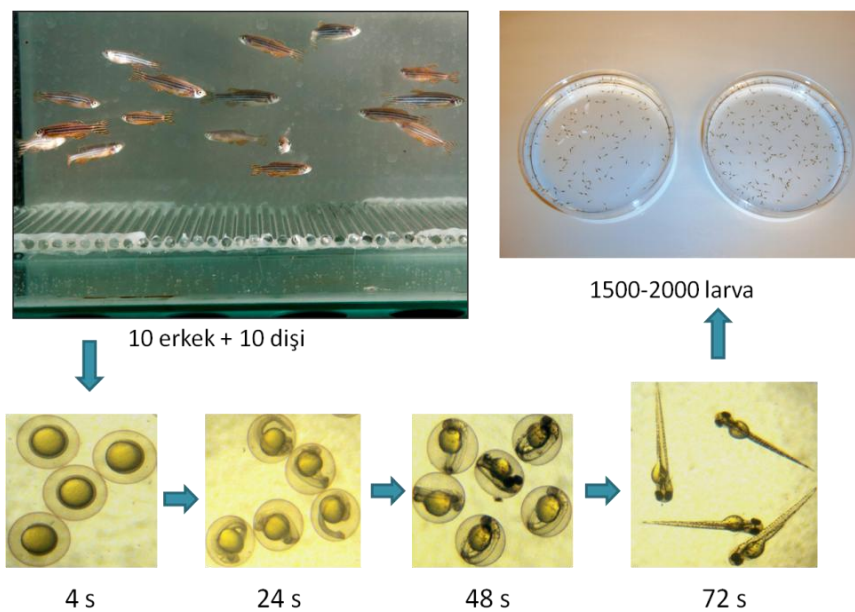
2.2. Fizikokimyasal Analizler

Toksikolojik deneylerde kullanılan ZnO nanopartiküllerin fiziksel görünüşleri, boyutları ve kümelenme durumlarının belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM; JSM-6610 Scanning Electron Microscope, JEOL Corporate, Japan) ile görüntüleme işlemi yapılmıştır. Görüntüleme işleminde, elektron mikroskopunun yaklaşma mesafesi 12 mm ve voltajı 20 kV olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca, deneylerde kullanılan test çözeltileri içerisindeki gerçek nanopartikül konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 7000 DV) kullanılmıştır. Bu amaçla test çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde su örnekleri alınmıştır. Çözeltiler içerisinde bulunan ZnO nanopartiküllerin tamamen çözünmesi için ölçüm işleminden önce su örneklerine derişik nitrik asit (HNO₃) ilave edilmiştir. Deneylerde test suları içerisindeki Zn konsantrasyonları, hazırlanan standart çözeltilere karşı ICP-OES cihazında okunarak tespit edilmiştir.

ZnO nanopartiküllerin karakteristik özelliklerinin gen ekspresyon değişimleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla Zetasizer (Nano ZSP; Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) nanopartikül izleme analizi yapılmıştır. Bu amaçla; test çözeltilerinden su örnekleri alınmış, görüntüleme sistemi içerisine konulmuş ve sıvı içerisinden geçirilen lazer ışını vasıtasıyla nanopartiküllerin görüntülenmesi sağlanarak partikül büyüklüğü, partikül konsantrasyonu ve kümelenme miktarları ölçülmüştür.

2.3. Toksikolojik Test Canlıları

Deneylerde kullanılan 10-12 aylık damızlık zebra balıkları akvaryum balıkları satıcısından temin edilmiştir. Damızlık zebra balıklarının 10 litrelik akvaryumlar içerisinde üremeleri sağlanmış, akvaryumların tabanına yerleştirilen gözenekli ızgaralar yardımıyla anaç balıkların yumurtaları yemeleri engellenmiştir. Daha sonra, akvaryum tabanında biriken döllenmiş yumurtalar sifonlanarak toplanmış ve petri plaklarına aktarılmıştır (Şekil 5). Doz-etki ve gen ekspresyon denemeleri için haftalık olarak 1500-2000 civarında larva elde edilmiştir. Döllenme işleminden 72 saat sonra yumurtadan çıkan sağlıklı larvalar toplanarak deneylerde kullanılmıştır. Damızlık balıkların laboratuvar şartlarına adaptasyonunda ve toksikolojik testlerde en az 24 saat süreyle dinlendirilmiş klor içermeyen şebeke suyu kullanılmıştır. Günlük olarak yapılan yemlemede damızlık balıklara bir defa *Artemia* sp., sabah ve akşam olmak üzere iki defa Tetramin hazır yem verilmiştir. Balıklar 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulamasına tabi tutulmuştur. Test suyunun sıcaklığı, pH'sı ve çözülmüş oksijen miktarları günlük olarak, toplam sertlik, nitrit, nitrat ve amonyak miktarları haftalık olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda, su sıcaklığı; $28 \pm 1^\circ\text{C}$, pH; $7,1 \pm 0,5$, çözülmüş oksijen; $7,2 \pm 0,8$ mg/L, toplam sertlik; $53,06 \pm 1,3$ mg/L CaCO_3 , nitrit; $<0,1$ mg/L, nitrat; <20 mg/L ve toplam amonyak; $<0,02$ mg/L olarak ölçülmüştür.



Şekil 5. Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları.

2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması

Toksikolojik açıdan karşılaştırma deneylerinde kullanılmak üzere ZnO nanopartiküller ve doğal (iyon) hali olan çinko klorür ($ZnCl_2$) çözeltilerinin hazırlanmasında saf su kullanılmıştır. ZnO nanopartikül ve $ZnCl_2$ denemeleri için, 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlanmış, konsantrasyon-etki deneyleri için 6 farklı letal, DNA hasar ve gen ekspresyon deneyleri için ise 5 farklı subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. ZnO nanopartikül stok çözeltisi içerisindeki kümelenmeyi önlemek amacıyla 1 saat süreyle banyo tip sonikatör yardımıyla sonikasyon işlemi yapılmıştır.

2.5. Letal ve Subletal Maruz Bırakma Deneyleri

$ZnCl_2$ 'ün toksik etkilerinin belirleneceği deneylerde içerisinde 200 mL dinlendirilmiş şebeke suyu bulunan 400 mL'lik beherler kullanılmıştır (Şekil 6). Toksikolojik deneylerde kullanılan ZnO nanopartiküllerin letal ve subletal konsantrasyonlarını, ayrıca larvalarda meydana gelebilecek DNA hasarları ve gen ekspresyon değişimlerini belirlemek amacıyla homojen karışım sağlayan nanopartikül test sistemleri kullanılmıştır. Bu test sistemlerinde 6 adet 2 litrelik beher kullanılmış ve deneyler 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür.



Şekil 6. Zebra balığı larvaları kullanılarak 3 paralel olacak şekilde hazırlanmış $ZnCl_2$ toksisite test üniteleri.

Toksikolojik testlerde döllenen 72 saat sonra yumurtadan çıkan sağlıklı larvalar, 96 saatlik süreyle nanopartiküllere maruz bırakılmıştır. Test sistemlerinin her biri içerisine 30'ar adet larva konulmuş ve her bir deneme için kontrol grubu oluşturulmuştur. Nanopartikül deneyleri süresince çoklu manyetik karıştırıcı yardımıyla tüm sistemler içerisindeki suların aynı hızda karışması sağlanmıştır. Cam pastör pipeti yardımıyla sisteme hava verilerek, oluşan hava kabarcıkları aracılığıyla suyun yukarı yönde hareket etmesi sağlanmıştır (Şekil 7). ZnO nanopartiküller su içerisinde homojen dağılımı sağlamak amacıyla, banyo tipi sonikatörle 1 saat sonikasyon işleminden sonra test sularına farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Konsantrasyon-etki deneyleri sonunda ölü larvalar plastik pastör pipeti yardımıyla toplanarak sayılmış ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. DNA hasar ve gen ekspresyon deneyleri için ise, maruziyet işlemi sonunda canlı larvalar toplanarak ependorf tüplerine alınmış ve analiz aşamasına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 7. Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir nanopartikül karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi.

2.6. Gen Ekspresyon Değişimleri

2.6.1. RNA İzolasyonu

Toplam RNA, zebra balığı larvaları bütün halde ve bir ependorf tüpü içerisinde 30 adet larva olacak şekilde RNeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak izole edilmiştir. Bu amaçla; larvaların içerisinde bulunduğu tüpe lizis işlemi için RLT tamponu ilave

edilmiş ve prob sonikatör kullanılarak larvaların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen lizat Qiashredder spin tüpüne aktarılmış ve 13000 g'de santrifüj edilmiştir. Tüpün dip kısmında biriken süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve lizatı temizlemek için 1:1 oranında %70'lik etanol ilave edilmiştir. Daha sonra tüp içerisinde bulunan sıvı karışımın tamamı RNeasy mini tüpe aktarılmış, 13000 g'de santrifüj edilmiş ve tüpün dibinde biriken sıvı dökülmüştür. Örnek içerisinde bulunan DNA'yı elimine etmek için örnekler DNase çözeltisine tabi tutularak 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında, mini tüp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak yıkama işlemi için üzerine RPE tamponu ilave edilmiştir. Yüksek hızda santrifüj işleminden sonra mini tüp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine RNA stoklama çözeltisi eklenmiştir. Son olarak santrifüj işlemi yapılmış ve RNA'nın mini tüpdeki silika jel membrandan ayrılarak mikrosantrifüj tüpünde toplanması sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda 30 adet larvanın bulunduğu bir örnekten yaklaşık olarak 30 µL RNA çözeltisi elde edilmiştir.

RNA izolasyon işleminden sonra NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak örneklerdeki RNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Spektrofotometrede ölçüm için 2 µL örnek kullanılmış, RNA konsantrasyonunun ≥ 100 ng/µL ve RNA kalitesinin 260/280: 1,8-2,1 aralığında olması sağlanmıştır. Bütün işlemler soğuk ortamda ve buz içerisinde gerçekleştirilmiştir.

2.6.2. Revers (Ters) Transkripsiyon

RNA örneklerinden ImProm-II Revers Transkriptaz Kiti (Promega) kullanılarak komplementer DNA'lar (cDNA) üretilmiştir. Bu amaçla, NanoDrop ile RNA konsantrasyonu ölçülen örnekler alınmış ve bütün örneklerin final konsantrasyonu 100 ng/µL olacak şekilde nükleaz içermeyen su ilave edilerek seyreltilmiştir. Daha sonra PZR tüplerine 8 µL seyreltilmiş kalıp RNA ve 16 µL revers transkripsiyon reaksiyon karışımı ilave edilmiştir. İçerisinde örnekler bulunan PZR tüpleri Termal Cycler (Bio-Rad, T100) cihazına yerleştirilmiş ve 1,5 saat süreyle reaksiyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon şartları; tutunma (annealing) 25°C'de 5 dakika, uzama (extension) 42°C'de 60 dakika, ve revers transkriptaz enziminin inaktive olması için 70°C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyon işleminin bitiminde elde edilen komplementer DNA örnekleri bir sonraki analiz işlemine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Revers transkripsiyon işleminde aşağıda miktarları verilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

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

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

Gen ekspresyon deneylerinde hedef olarak; hücrel tümör proteini olan, hücre döngüsünü düzenleyen tümör baskılayıcı ve kanser oluşumunu önleyici görev yapan *p53*, DNA onarım proteini olan, DNA'nın çift zincir kırıklarının onarımında görev alan *rad51* ve hücre içerisinde golgi aygıtının membranında lokalize olan, metal ve ağır metallere duyarlı ve bağlayıcı özelliği olan *mt2* proteinlerini kodlayan genler seçilmiştir. Ayrıca ekspresyon değişimlerini karşılaştırmalı olarak hesaplamak amacıyla standart gen olarak, sitoskeletal sistemde görev alan hücre yapısı, bütünlüğü ve hareketinden sorumlu beta aktin (*β-actin*) proteinini kodlayan gen seçilmiştir. Her bir gene spesifik primerler Bio Basic firmasından temin edilmiştir. Nükleotid primer dizileri ve hedef ampikon bölgesi büyüklükleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer dizileri.

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

Reaksiyonda kullanılacak olan mastır karışımı; forward primer, revers primer ve SYBR green (SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix, Sigma-Aldrich) floresan boya karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu sonucu elde edilen DNA örnekleri 1:10 oranında seyreltilmiş ve 3 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca reaksiyon etkinliğinin kontrolü amacıyla standart DNA örnekleri de 3 paralel olacak miktarda hazırlanmıştır. Real-time PZR reaksiyonunda 3 paralel olacak şekilde sırasıyla nükleaz içermeyen su, negatif kontrol, 1:10 oranında seyreltilmiş DNA örnekleri ve son olarak da reaksiyonun etkinliğini belirlemek için farklı oranlarda seyreltilmiş standart DNA örnekleri kullanılmıştır. Örneklerin pipet yardımıyla 0,2 mL'lik tüplere konulmasından sonra tüpler real-time PZR cihazına yerleştirilmiştir. Kantitatif PZR işlemi için real-time PZR cihazı (Qiagen, Rotor-Gene 3000) kullanılmış ve reaksiyon 40 döngü (2 saat 40 dakika) olacak şekilde aşağıda verilen döngü şartlarında gerçekleştirilmiştir.

a. Bekleme aşaması

94 °C, 2 dakika

b. Döngü aşaması

1. adım 94°C, 15 saniye

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

3. adım 72°C, floresan açık, 1 dakika

c. Erime eğrisi aşaması

1. adım 94°C, 15 saniye

2. adım 60°C, 1 dakika

3. adım 94°C, 15 saniye

d. 4 °C de bekleme

2.6.4. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması

Real-time PZR reaksiyonunda kullanılan bilgisayar yazılımı aracılığıyla, DNA replikasyonu sırasında oluşan floresan ışınım miktarının istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı seviyedeki döngü sayıları (Threshold Cycle, C_T) eş zamanlı olarak elde edilmiştir. Elde edilen, eşik seviyesindeki döngü sayıları kullanılarak aşağıdaki formüller yardımıyla gen ekspresyonlarındaki değişimler kat olarak ifade edilmiştir.

C_T (Threshold cycle) : DNA örneğindeki floresan ışınım miktarının eşik seviyesine ulaştığı noktadaki döngü sayısı

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

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

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

Ayrıca, reaksiyonun düzgün çalışıp çalışmadığının bir göstergesi olarak reaksiyonun etkinliği hesaplanmıştır. Bu amaçla elde edilen değerler yardımıyla standart eğri oluşturulmuş ve eğrinin eğimi belirlenerek $10^{(-1/\text{eğim}) - 1}$ formülünde yerine yazılarak etkinlik değeri belirlenmiştir. Reaksiyonun düzgün bir şekilde çalışması için etkinlik değeri 0,9 ile 1,1 (%90 - %110) aralığında olmalıdır. Real-time PZR reaksiyonunun etkinliğinin bu değerler dışında hesaplanması durumunda, hatanın kaynağı tespit edilerek reaksiyon yenilenmiştir.

2.7. Larvalarda Hücresel DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet Assay)

ZnO nanopartiküllere 96 saat süreyle maruz kalan larvalar deney süresi sonunda 1,5 ml'lik santifirüj tüplerine (bir tüpte 30 adet larva) alınmış ve üzerine 300 µL RLT buffer (Qiagen) ilave edildikten sonra doku homojenizatörü yardımıyla homojenize edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra 10 µl hücre süspansiyonu 75 µl % 0,5 LMP (düşük erime ısı) agaroz ile karıştırılmıştır (LMP agaroz 37°C'de bekletilerek kullanılmıştır). Üzerinde hücre sayımı yapılan rodajlı lamaların ilk aşamada 200 µL %1'lik NMP (normal erime ısı) agaroz ile yüzeyleri kaplanmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin üzerini kaplama işlemi için lameller kullanılmıştır. Daha sonra ikinci tabaka olarak hazırlanmış hücre süspansiyonu ve LMP karışımından 80 µl kullanılarak ikinci tabaka oluşturulmuş ve üzeri lamelle kapatılmıştır. Bu işlemden sonra 20 dakika süreyle agarozun donması beklenmiştir. Üçüncü tabakada örnekler sadece 80 µL %0,5 LMP agarozla kaplanmış ve yine üzeri lamelle kapatılarak agarozun donması beklenmiştir. Hazırlanan slaytlar daha önce hazırlanmış ve +4°C'de bekletilen lizis solüsyonuna (2,5 M NaCl, 100 mM Na2 EDTA, 10 mM Tris, pH 10, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) daldırılmış ve en az 2 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. Slaytlar yan yana elektroforeze konulmuş ve +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler 30 dakika 24 V 300 mA +4°C'de elektroforezde yürütülmüştür. Yürütme

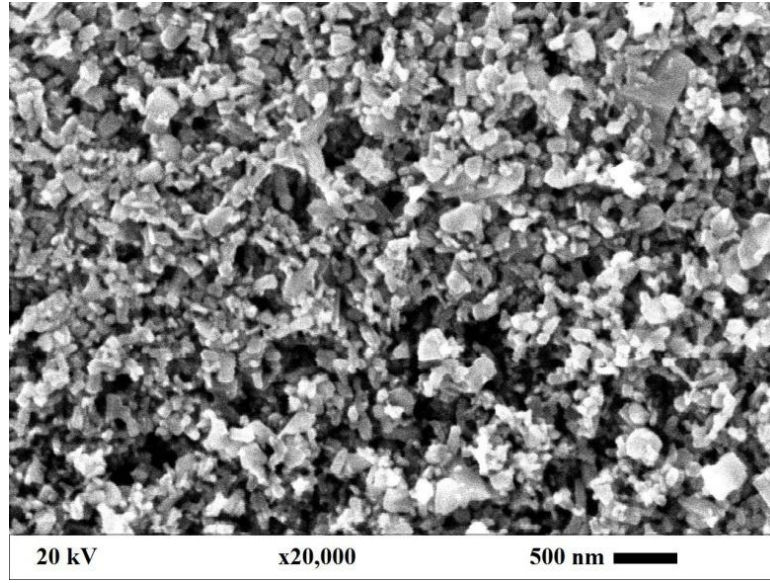
işleminde sonra slaytlar nötrale buffer ile 15 dakika yıkanmış ve 0,5 mg/mL konsantrasyonunda Etidium Bromür ile boyanmıştır. Pozitif kontrol için hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Son olarak boyanmış slaytlar 400 X'de floresan mikroskop (çıkış filtresi 515-560 nm, bariyer filtresi 590 nm) altında görüntülenmiş ve sonuçlar Comet IV bilgisayar yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

2.8. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada gerçekleştirilen doz-etki deneylerinin tamamı bağımsız olarak 3 farklı zamanda tekrarlanmış ve tüm veriler ortalama standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ekspresyon düzeyleri, kontrol örneklerinin ortalamaları ile karşılaştırılarak kat değişim olarak ifade edilmiştir. Farklı test koşulları altında hedef genler ve *β-actin* gen ekspresyonlarındaki önemli farklılıkları belirlemek amacıyla eşit değişkenler için veri değerlerine önce Levene testi, sonrasında ise ANOVA testi uygulanmıştır. Çoklu gruplar arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır. LC₅₀ değerleri Probit analiz metoduyla hesaplanmıştır.

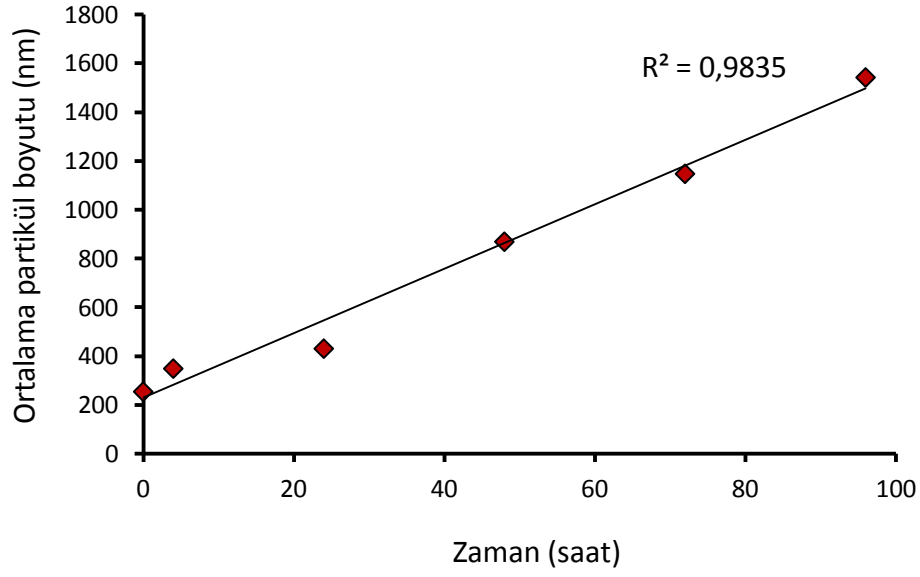
3. BULGULAR

ZnO nanopartiküllerin fiziksel görünüşlerinin, parçacık boyutlarının ve kümelenme durumlarının belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda ZnO nanopartiküllerin düzgün olmayan kompleks bir yapıya sahip oldukları, parçacık boyutlarının 50-100 nm arasında olduğu ve yüksek oranda kümelenme eğiliminde oldukları tespit edilmiştir (Şekil 8).

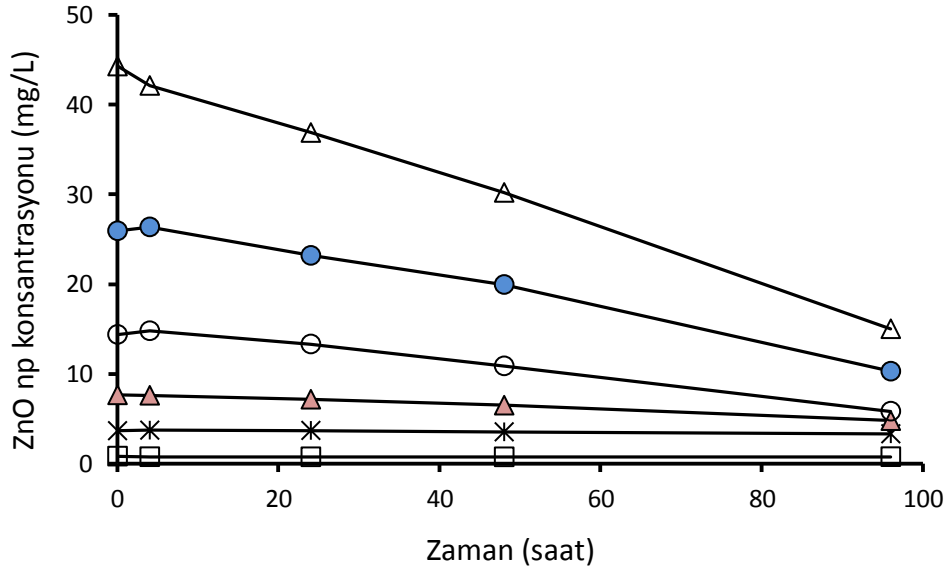


Şekil 8. ZnO nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile elde edilen görüntüsü. Ölçek çubuğu 500 nm.

Nanopartiküller hareketsiz su ortamlarında kümelenme ve tabana çökme eğilimi göstermektedirler. Bu özelliklerinden dolayı toksisite deneyleri sonucunda çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu sorunun önüne geçilebilmesi için nanopartiküllerin su içerisindeki davranış özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. ZnO nanopartiküllerin bu özelliklerinin belirlenmesi amacıyla nanopartikül izleme analizi ve ICP-OES analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda, su sütununda başlangıçta ortalama 255 nm olan partikül boyutunun 96 saatlik test süresi sonunda kümelenme nedeniyle 1543 nm'ye kadar yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 9). Benzer şekilde ICP-OES analizi sonucunda da su sütunundaki ZnO nanopartikül konsantrasyonunun zamana bağlı olarak kümelenme ve sedimentasyon nedeniyle miktarında % 40 oranında bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 10).



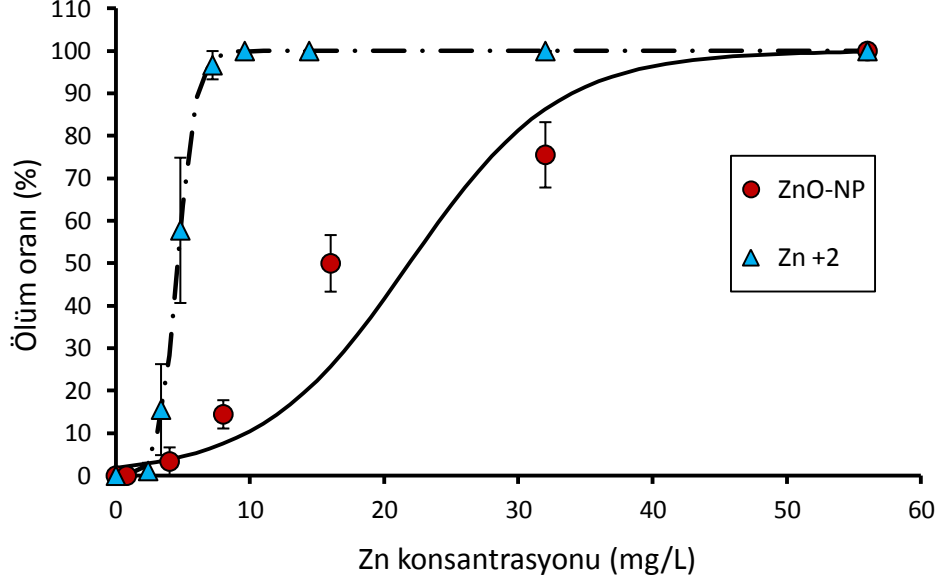
Şekil 9. 96 saatlik deney süresince ZnO nanopartiküllerin (1 mg/L) su sütunundaki boyutsal dağılımı.



Şekil 10. Nanopartikül test sistemi içerisindeki sulu fazda ZnO nanopartiküllerin 96 saatlik maruziyet süresi boyunca ölçülen konsantrasyonları.

Metalik nanopartiküller su içerisinde kısmen iyonlaşarak çözünebilirler. Zn metalinin iyon (doğal) haliyle nanopartikül halinin toksisite bakımından farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla, bu çalışmada ZnCl₂ ile ZnO nanopartikülünün zebra balığı larvalarındaki zehirlilik düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, 96 saat süreyle ZnCl₂ ve ZnO nanopartikülünün 3 farklı zamanda yapılan

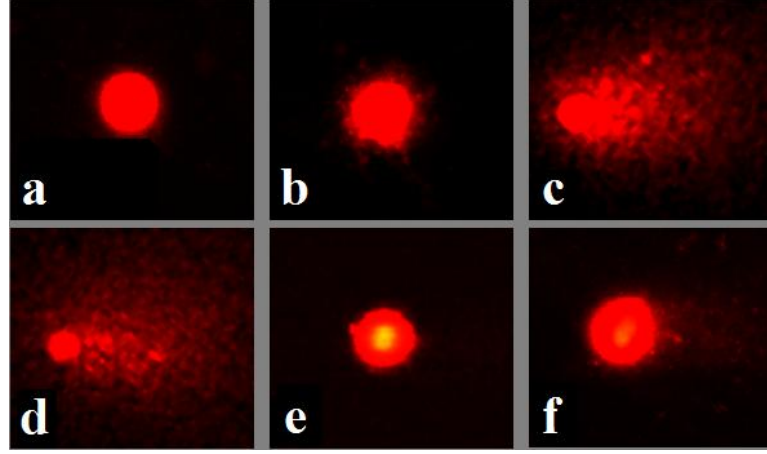
konsantrasyon-etki deneyleri sonucunda LC₅₀ değerleri sırasıyla 4,66 ± 0,11 mg/L (GA: 3,96 - 5,88) ve 21,37 ± 1,81 mg/L (GA: 16,75 - 28,87) olarak hesaplanmıştır (Şekil 11).



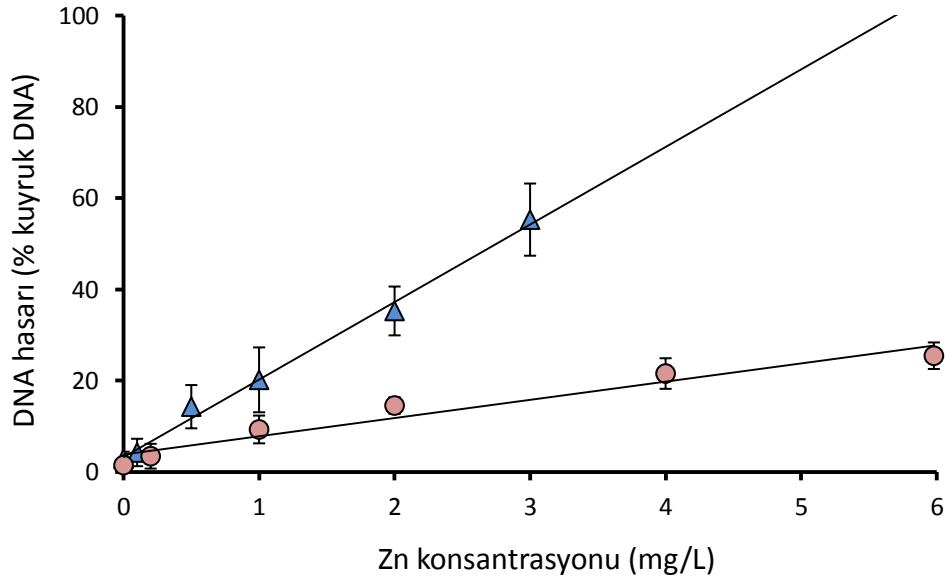
Şekil 11. Toksikolojik testlerde ZnCl₂ ve ZnO nanopartikülüne 96 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının ölüm oranları.

ZnCl₂ ve ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde oluşabilecek DNA hasarlarını belirlemek amacıyla “Comet Assay” tekniği kullanılmıştır. Subletal konsantrasyonlarda ZnCl₂ ve ZnO nanopartikülüne maruz bırakılan larvaların DNA’larında maruziyet konsantrasyonuna bağlı olarak önemli derecede hasar tespit edilmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol grubuna H₂O₂ uygulanması sonucunda oluşan hasarın ZnCl₂ ve ZnO nanopartikül uygulanan larvalarda oluşan hasardan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 12).

En yüksek subletal konsantrasyonlarda ZnCl₂ (3 mg/L) ve ZnO (6 mg/L) nanopartikülüne maruz kalan larvaların Comet analizi sonucunda oluşan ortalama DNA hasarları, kontrol grubuna oranla sırasıyla % 55,3 ve % 25,4 olarak hesaplanmıştır (P < 0,05). En düşük konsantrasyonlarda ZnCl₂ (0,1 mg/L) ve ZnO (0,2 mg/L) nanopartikülüne maruz kalan larvaların Comet analizi sonucunda ise oluşan ortalama DNA hasarları, kontrol grubuna oranla sırasıyla % 4,2 ve % 3,4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 13).

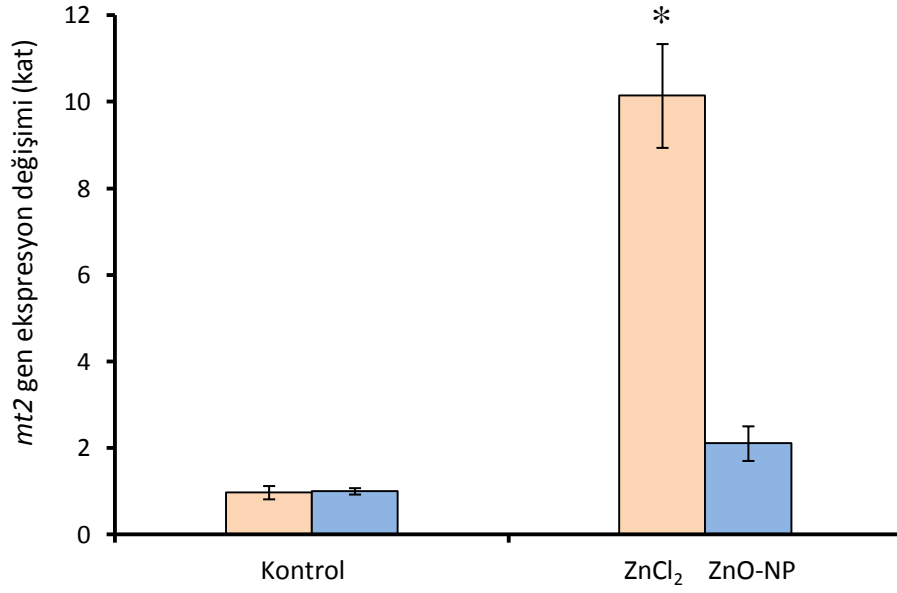


Şekil 12. ZnCl₂ ve ZnO nanopartikül uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde Comet oluşumu. (a) Kontrol, (b) 0,1 mg/L ZnCl₂, (c) 3 mg/L ZnCl₂ (d) H₂O₂ ile pozitif kontrol, (e) 0,2 mg/L ZnO np, (f) 6 mg/L ZnO np.



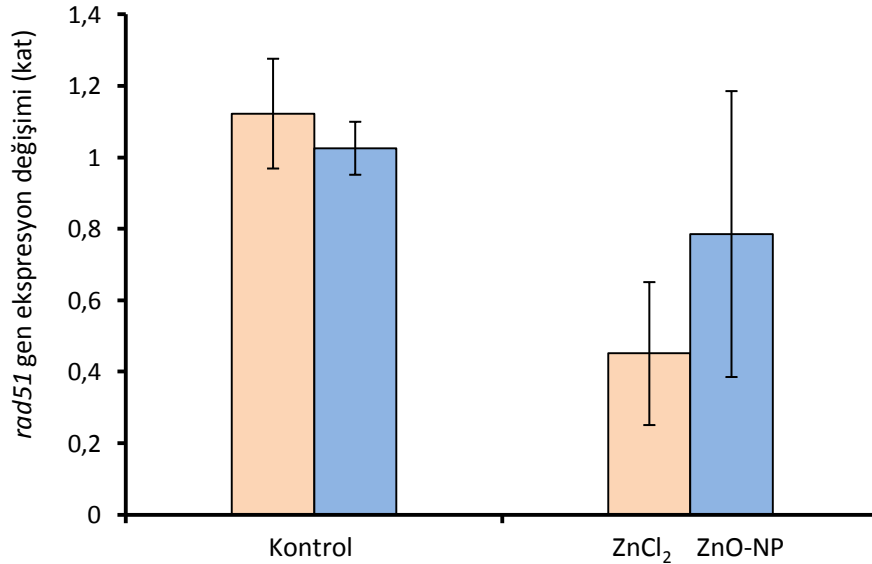
Şekil 13. 96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda ZnCl₂ (üçgen) ve ZnO (daire) nanopartikülüne maruz bırakılan larvalardaki DNA hasarları (% kuyruk DNA, Comet assay), P < 0.05.

ZnCl₂ ile ZnO nanopartikülünün gen ekspresyon değişimleri açısından karşılaştırıldığı deneme sonuçlarında, 96 saat süreyle her iki maddeye de maruz kalan zebra balığı larvalarında *mt2* geni için kontrol grubuna oranla sırasıyla 10 kat ve 2 kat artış meydana gelmiştir. Ayrıca ZnCl₂'ün sebep olduğu gen ekspresyon artışının ZnO nanopartikülüne oranla *mt2* geni için yaklaşık olarak 5 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).



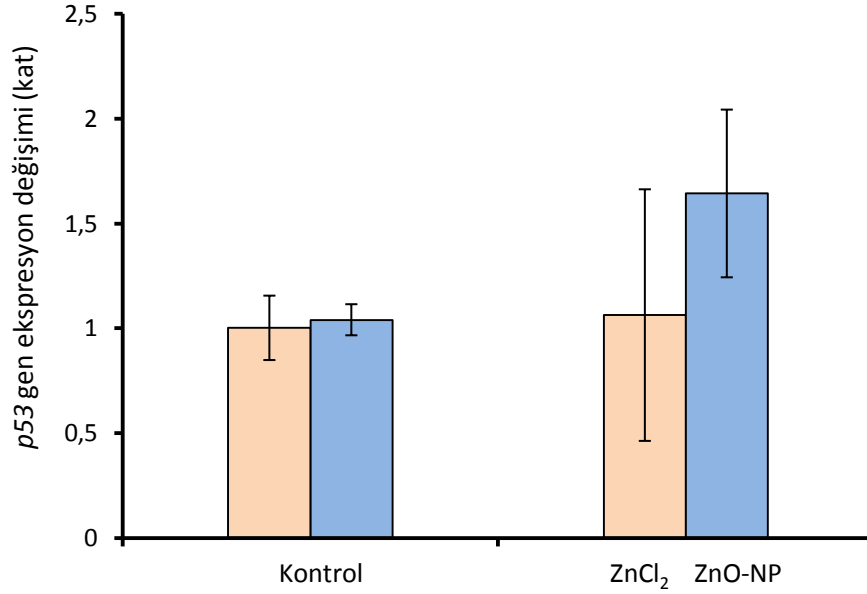
şekil 14. Toksikolojik testlerde 96 saat sũreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl₂ ve ZnO nanopartikũlũne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki *mt2* gen ekspresyon değişimleri.

rad51 geni ekspresyonunda kontrol grubuna oranla ZnCl₂ ve ZnO nanopartikũl için sırasıyla 2,5 kat ve 1,3 kat azalma meydana gelmiştir. Ayrıca ZnO nanopartikũllerin sebep olduğu gen ekspresyon artışının ZnCl₂'e oranla *rad51* geni için yaklaşık olarak 1,6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (şekil 15).



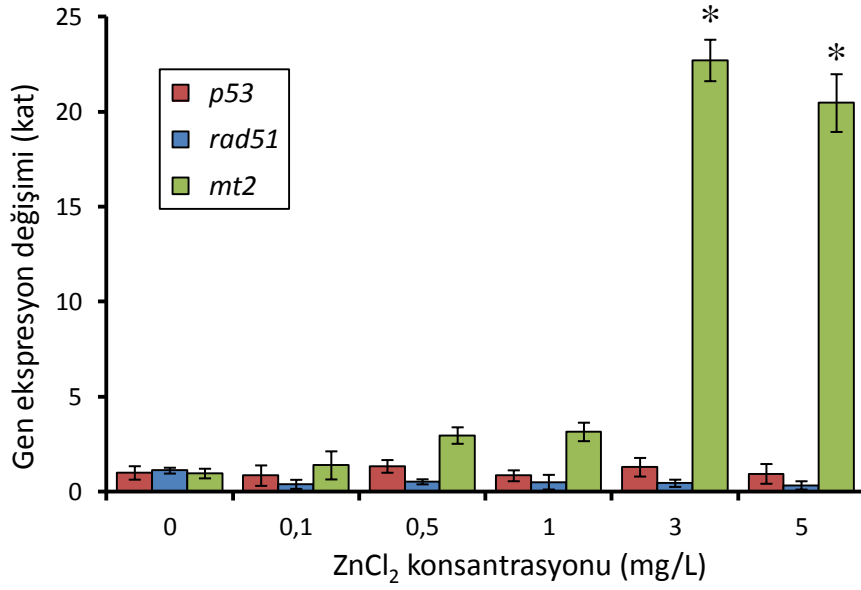
şekil 15. Toksikolojik testlerde 96 saat sũreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl₂ ve ZnO nanopartikũlũne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki *rad51* gen ekspresyon değişimleri.

p53 geni ekspresyonunda ise kontrol grubuna oranla $ZnCl_2$ için önemli bir değişiklik görülmezken, ZnO nanopartikül deneylerinde 1,6 kat artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca ZnO nanopartiküllerin sebep olduğu gen ekspresyon artışının $ZnCl_2$ 'e oranla *p53* geni için yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 16).



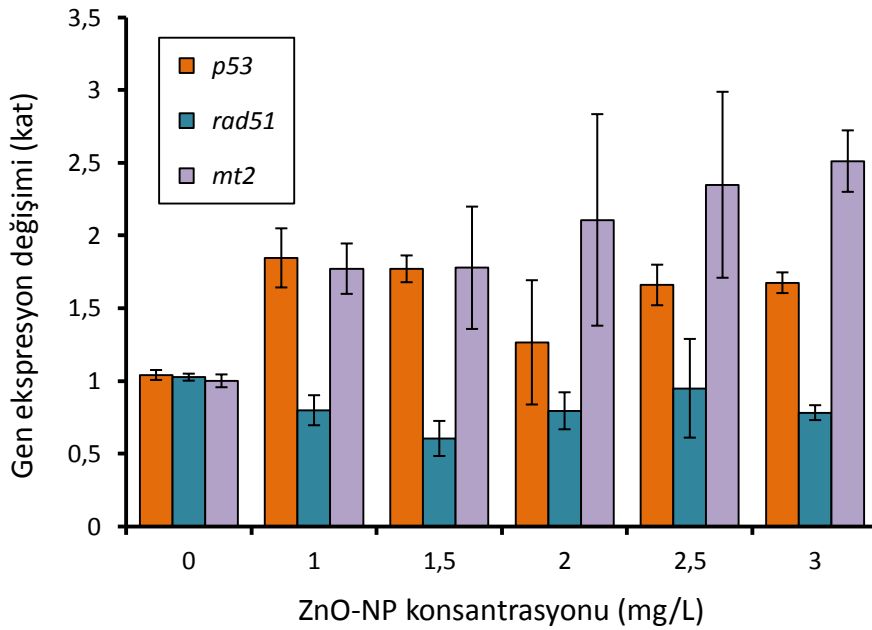
Şekil 16. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarındaki *p53* gen ekspresyon değişimleri.

Farklı konsantrasyonlarda $ZnCl_2$ 'ün *mt2*, *rad51* ve *p53* genlerindeki ekspresyon değişimleri açısından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda *mt2* genindeki ekspresyon değişiminde, yüksek konsantrasyonlarda yaklaşık olarak 20 kat artış meydana geldiği görülmüştür. Bunun yanında, *rad51* ve *p53* gen ekspresyonlarında önemli bir değişikliğin oluşmadığı tespit edilmiştir (Şekil 17).



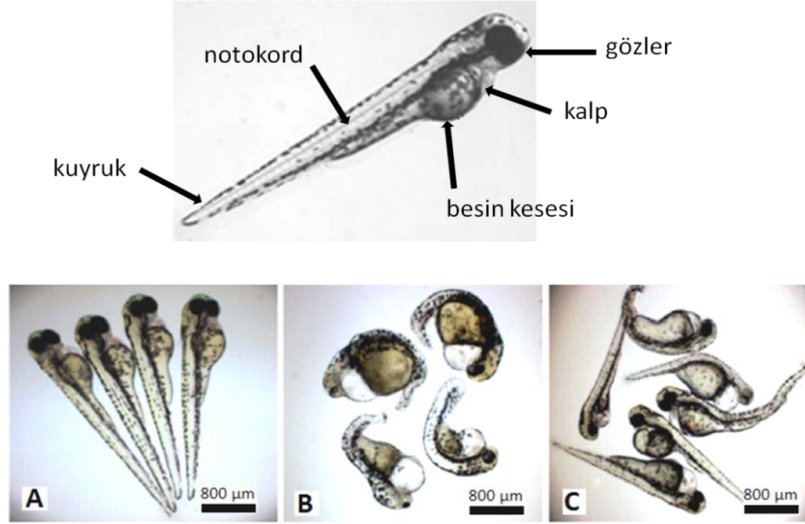
Şekil 17. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnCl₂'e maruz kalan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri.

Farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartiküllerin *mt2*, *rad51* ve *p53* genlerindeki ekspresyon değişimleri açısından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda *mt2* ve *rad51* genlerindeki ekspresyon değişimlerinde, yüksek konsantrasyonlarda yaklaşık olarak sırasıyla 2,5 kat ve 1,7 kat artış meydana geldiği görülmüştür (Şekil 18).



Şekil 18. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartikülüne maruz kalan zebra balığı larvalarında üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri.

Su içerisinde kısmen iyonlaşmaları nedeniyle özellikle metalik nanopartiküller sucul organizmalar üzerinde toksik etkilere ve bunun sonucunda da ölümlere neden olabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan ZnO nanopartiküller, zebra balığı larvalarında notokord eğriliği, besin kesesinde şişme ya da büzülme, kuyrukta erime gibi etkiler oluşturabilmekte ve ileri aşamada da ölümlerine sebep olabilmektedir (Şekil 19).



Şekil 19. Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve nanopartiküllere maruz kalan larvalarda görülen anormallikler. (A) Normal larvalar, (B) nanopartiküllere maruziyet sonucu canlı fakat anormal larvalar, (C) nanopartiküllere maruziyet sonucu ölmüş larvalar.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Nanopartiküllerin bildiğimiz maddelerden çok değişken özelliklere sahip olması ve bu özelliklerinin yeterli düzeyde anlaşılabilmesi zehirlilik deneylerinde istenmeyen olumsuz durumlara sebebiyet vermektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin karakteristik özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmaksızın günümüzde yapılmakta olan toksikolojik test yöntemleri, nanopartikül zehirlilik değerlendirme çalışmaları için uygun değildir (Schulze vd., 2008). Nanopartiküllerin maddelerin doğal hallerinden çok değişken özellikler sergilemesi, zehirlilik testlerinde kullanılan malzeme ve elemanlarla etkileşime girmelerine neden olmaktadır, bu yüzden nanopartikül zehirlilik belirleme çalışmalarında farklı maruz bırakma yöntemleri kullanılmalı ve uygun bir kontrol sistemi sağlanmalıdır.

Zehirlilik düzeylerinin belirlenmesi için yapılan nanotoksikolojik çalışmalarda nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri uygun bir test sisteminin oluşturulmasını sınırlamaktadır. Nanopartiküllerin zehirlilik düzeylerini belirlemek için kullanılan test sistemleri nanospesifik özelliklerden etkilenmeyecek şekilde dizayn edilmelidir (Nel vd., 2006). Ayrıca, günümüzde gerçekleştirilen nanopartikül risk değerlendirme çalışmalarında kullanılan test sistemlerinin standardizasyon eksikliği nedeniyle, elde edilen sonuçlar bakımından farklı laboratuvarlar arasında önemli farklılıklar olduğu gözlenmektedir (Lilienblum vd., 2008). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, nanopartiküller için sucul ortamda yapılması düşünülen zehirlilik testlerini standart hale getirecek ve farklı laboratuvarlar tarafından yapılan çalışma sonuçları arasındaki tekrarlanabilirlik sorununu ortadan kaldıracak bir nanopartikül test sistemi kullanılmıştır. Yapılan testler ve doğrulama deneyleri sonucunda, bu test sisteminin nanopartiküllerin spesifik özelliklerinden etkilenmediği ve genel bir zehirlilik test prosedür standardı sağladığı tespit edilmiştir.

Günümüzde nanopartiküller geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen nanopartiküllerin risk değerlendirmesi ve standardize test protokolleri konusunda ulusal veya uluslararası işbirliği ya da anlaşmalar yeterli düzeyde değildir. Nanopartiküllerin kütleleri, sayıları, yüzey alanları ve diğer ölçülerine oranla doz tanımı henüz standardize edilememiştir. Bu nedenle, nanopartiküller arasındaki veri ve karşılaştırma analizlerinin

objektifliği günümüzde halen sorun teşkil etmekte olan bir durumdur (SCENIHR, 2007). Bu çalışmada, kullanılan ve homojen bir karışım sağlayan nanopartikül test sistemleri (Boran vd., 2012) nanopartikül-bağımlı deneysel sorunların üstesinden gelebilecek ve nanopartikül risk değerlendirmesi için bir standart oluşturabilecek potansiyele sahiptir.

Bütün nanopartiküller çok küçük boyutlarda (<0.1 µm) olduğu için kolayca çevre kirliliğine sebep olabilir ve insanlar ve diğer organizmalar için risk oluşturabilirler (Griffitt vd., 2007; Lanone vd., 2009). Bu nedenle, nanopartiküllerin olası toksikolojik etkilerinin belirlenmesi ve hangi partiküllerin çevreye en fazla zarar verdiği tespit edilmesi gittikçe artan bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, ZnO nanopartiküllerin zebra balığı larvaları üzerine etkileri araştırılmış ve biyomarkır genler (*p53*, *rad51* ve *mt2*) kullanılarak toksisite mekanizmasının anlaşılabilmesi için iyon haldeki Zn⁺²'nin toksik etkileri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, ZnCl₂ ve ZnO nanopartikül kaynaklı DNA zincir kırıklarının oluşup oluşmadığı “Comet Assay” tekniği kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Akuatik toksikoloji testlerinde kullanılan nanopartiküllerin su içerisinde dağılması nedeniyle, kümelenme durumu ve yüzey gerilimi gibi fizikokimyasal özelliklerinin de değişikliğe uğradığı bilinmektedir (Maynard, 2002; Powers vd., 2006; Vielkind vd., 2013). Bu nedenle, çevresel uygulamalarda ve nanotoksikoloji araştırmalarında nanopartikül dağılımının doğru şekilde karakterizasyonu oldukça önemlidir. Vielkind vd. (2013) ZnO nanopartiküllerin sucul ortamdaki fizikokimyasal özelliklerini (hidrodinamik boyut, yüzey gerilimi ve kümelenme derecesi) belirlemeye çalışmışlar ve çalışma sonucunda partikül boyutu azaldıkça partikül yüzey alanının dramatik şekilde arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, yapmış olduğumuz çalışmalarda da 96 saatlik deney süresi boyunca su sütunundaki ZnO nanopartikül konsantrasyonunda azalma görülürken partikül çapı ve kümelenme miktarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

Nanopartiküllerin sanayide yaygın şekilde kullanılması, onların çevresel etkileri konusunda belirsizliklere neden olmaktadır. Özellikle metal nanopartiküllerin su içerisinde kısmen çözünebilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle, kirletici özelliği

olan metallere üretilmiş nanopartiküllerin balıklarda toksik etkilerinin biyomarkır gen ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirilerek araştırılması büyük önem arz etmektedir (Klaine vd., 2008). Yapılan bu çalışmada konsantrasyona bağlı olarak $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülünün, hedef genlerin (*p53*, *rad51* ve *mt2*) mRNA düzeylerinde değişimlere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu genler kendi işlevsel özelliklerinin yanı sıra, çevresel Zn kirliliğinin izlenmesi için de potansiyel biyomarkırlar olarak görev yapmaktadırlar. Sonuç olarak, $ZnCl_2$ ile ZnO nanopartikülünün zebra balığı larvalarında toksisitelerini karşılaştırdığımız çalışmalarda $ZnCl_2$ 'ün ZnO nanopartikülüne oranla çok daha toksik olduğu belirlenmiştir. Suda çözünebilir iyon haldeki Zn için varolan çalışmalar ve düzenlemeler, metalik nanopartiküllerle ilgili güvenilirlik endişesini ortadan kaldıracak yeterlilikte değildir. Bunun yanında, zebra balığı embriyo-larva sistemi, biyomarkır gen ekspresyon değişimleri yardımıyla toksik etkilerin belirlenmesi için oldukça faydalı bir yöntemdir. Bu nedenle yapılan bu araştırma, entegre edilmiş nanotoksikolojik denemelere ışık tutabilecek niteliktedir.

$ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikül LC_{50} değerleri bakımından karşılaştırıldığında 96 saatlik deney sonunda $ZnCl_2$ 'ün ZnO nanopartikülünden yaklaşık olarak 5 kat daha fazla toksik olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, nano ZnO ve çözünebilir Zn iyonlarıyla yapılmış önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (Wong vd., 2006; Ma vd., 2013). Zebra balığı larvalarında nano ZnO ve iyon haldeki Zn^{+2} arasındaki toksisite farklılığının ZnO nanopartiküllerin alıılmamış fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bilindiği gibi, su ortamında bulunan metallerin larvalar tarafından vücuda alınması, solungaçlardan geçerek ve bağırsaklardan emilim yoluyla gerçekleşmektedir (Minghetti vd., 2010). Hücre içerisindeki değişken Zn^{+2} konsantrasyonlarını kontrol eden önemli bir sistem metallothioneinlerdir (*mts*). Bu proteinler gerekli olduğu zaman iyon haldeki Zn^{+2} 'yu bağlamak ya da serbest bırakmakla görevlidirler (Maret, 2009). Metallothioneinler, gümüş ve kadmiyum gibi toksik metaller veya bakır ve çinko gibi temel eser elementler tarafından uyarılırlar (Kimura ve Itoh, 2008). Hayvansal organizmalarda *mt* genlerinin dört önemli izoformu bulunmaktadır ve bunlardan ikisi olan *mt1* ve *mt2* genleri sinirsel olmayan dokularda ağır metallerin zehirlilik etkisini

ortadan kaldırır, bakır ve çinko seviyelerini düzenler ve oksidatif hasarı sınırlandırır (Cho vd., 2009). Yapmış olduğumuz çalışmada, $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülü zebra balığı larvalarındaki *mt2* gen ekspresyonlarında değişikliğe neden olmuştur. $ZnCl_2$ 'deki *mt2* gen ekspresyon artışının ZnO nanopartiküllerin sebep olduğu gen ekspresyon artışından yaklaşık olarak 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yüksek seviyede *mt2* gen ekspresyon artışının olması larvaların dokularındaki Zn birikiminin de yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Zebra balığı embriyoları kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, hem ZnO nanopartikül hem de Zn^{+2} maruziyeti sonucunda bütün konsantrasyonlarda *mt2* gen ekspresyonlarında önemli derecede bir artış belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, oksidatif stresle ilgili genler olan Cu/Zn SOD ve sitokinlere ait transkriptlerde de önemli derecede değişimler tespit edilmiştir (Brun vd., 2014).

Bu çalışmada, *rad51* ve *p53* gen ekspresyonlarındaki değişimlere bakıldığında, larvalarda konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna oranla önemli bir fark görülmemiştir. En yüksek subletal konsantrasyonda (6 mg/L) ZnO nanopartiküllere maruz kalan larvalarda *p53* gen ekspresyonunda 1,7 kat artış tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda ise *p53* gen ekspresyonunda önemli bir değişim görülmemiştir. Bu durumun nedeni, muhtemelen DNA onarım mekanizmasının daha erken harekete geçmesinden kaynaklanmaktadır (Checkik ve Koller, 2009). Canlı organizmalarda hücrenin hayatta kalmasında, DNA onarımının öneminden ve standart gen olarak kullanılmalarından dolayı, bu onarım genleri devamlı olarak uyarılırlar (Kim vd., 2001; Iwanaga vd., 2004; Bladen vd., 2007). Bu nedenle, aktif şekilde bölünen hücrelerde belirli oranda, DNA onarım genlerine ait transkriptler devamlı olarak yüksek miktarda bulunabilirler (Lu ve King, 2009) ve DNA onarım aktivitesindeki artış nedeniyle de önemli bir ekspresyon değişimi görülmez. Bu çalışmada incelenen *rad51* ve *p53* gen ekspresyonlarında ortalama 1,5 kat değişim görülmüştür. Bu sonuçlar daha önce yapılan ve düşük seviyede ekspresyon değişimi görülen çalışma sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir (Sandrini vd., 2009).

β -actin geninin ekspresyon düzeylerinin hiçbir durumda değişiklik göstermemesi hedef genlerin (*p53*, *rad51* ve *mt2*) normalizasyonu için standart gen olarak seçilmesine olanak sağlamaktadır. Casadei vd. (2011) 8 farklı zebra balığı standart genini analiz ettikleri bir çalışmada kantitatif PZR'nda normalizasyon için en uygun genin hangisi

olduğunu belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlarda, *β-actin*'in larvaların farklı gelişim aşamalarında en fazla ifade edilen gen olduğunu ve ekspresyonunun en yüksek ve en sabit düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada, $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülüne maruz bırakılan zebra balığı larvalarında konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarlarında artış tespit edilmiştir. İnsan hücreleri ve zebra balığı kullanılarak yapılan bir karşılaştırma deneyinde 20 mg/L ZnO nanopartikül maruziyeti sonucunda insan hücrelerinde % 20 ve 100 mg/L maruziyet sonucunda ise zebra balıklarında kontrol grubuna oranla % 50 oranında DNA hasarı tespit edilmiştir (Ng vd., 2011; Zhao vd., 2013). Hücresel oksidatif stres; protein yapısının bozulması, iyon kaybı, membran peroksidasyonu ve DNA zincir kırıkları gibi pekçok zararlı etkiye neden olabilmektedir. Çevresel kirlenmeler, direkt olarak canlı vücudunda bulunan bazı bileşiklerle ve onların metabolitleriyle etkileşime girerek ve dolaylı olarak da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna zemin hazırlayarak DNA da hasar meydana getirebilirler (Oliveira vd. 2009). Bu çalışmada, subletal konsantrasyonlarda $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartiküllere maruz kalan larvalarda kontrol grubuna oranla sırasıyla % 55,3 ve % 25,4 oranında DNA hasarı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Zhu vd., (2011) yaptıkları bir çalışma sonucunda nanopartiküllere maruz bırakılan zebra balıklarının karaciğer hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artan oranda DNA hasarı tespit etmişlerdir.

Günümüz bilim insanları nano ölçekli ürünlerin geliştirilmesinin bilime, sağlık sektörüne ve teknolojiye faydalı olacağı konusunda hemfikirler, fakat onların çevreye, özellikle de sucul çevreye salınımı insanlarda, canlı organizmalarda ve hassas ekosistemlerde zararlı etkilere neden olabilmektedir (Guzman vd., 2006; Barrena vd., 2009). Ülkeler, endüstriler ve bağımsız bir çevresel bilim topluluğu arasında etkin bir ilişkinin geliştirilmesi, uygun ekotoksikolojik çalışmaların geliştirilmesini kolaylaştıracak, çevresel zararların belirlenmesini ve önlenmesini sağlayacaktır. Günümüzde nanopartiküllerin su ortamındaki davranışları, organizmalar tarafından vücuda alınma mekanizması ve potansiyel toksik etkileri konusunda halen çok az bilgi mevcuttur. Yapılan bu çalışma, nanopartiküllerin çevremizde oluşturduğu risklerin tespit edilebilmesine kolaylık sağlayabilecek ve gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutabilecektir.

5. ÖNERİLER

Nanoteknoloji günümüz dünyasında ekonomik büyümede, sağlık sektöründe ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda nanomalzemelerin üretim, geliştirme, taşınma, kullanım ve sonrasında imha işlemleri esnasında farklı ekosistemlerle teması kaçınılmazdır. Bundan dolayı nanomalzemelerin çevre sağlığı üzerinde oluşturabileceği riskler göz önünde bulundurulmalıdır. Nanopartiküllerin çevresel düzeylerinin günümüzde çok düşük seviyelerde olduğu düşünülmeyle birlikte bu konuda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle yeni izleme, ölçme ve görüntüleme tekniklerinin geliştirilerek ekotoksikolojik çalışmalar vasıtasıyla çevresel seviyelerinin zararlı düzeyde olup olmadığı belirlenmelidir.

Nanopartiküllerin ekosistemlerde izleyecekleri yolların tanımlanmasında ve etkilerinin belirlenmesinde küme oluşturma ve sedimentasyon özelliklerinin açıklığa kavuşturulması gerekir. Yapılacak çalışmalarda nanopartiküllerin kolloidal çözeltilerinin doğal ekosistemlerde gösterecekleri kararlılığın ve kümelenme üzerinde diğer organik maddelerin etkisinin araştırılması için yüzey suyu örneklerinden yararlanılmalıdır. Ayrıca, kümelenmenin ardından nano boyutlarını koruyup korumadıkları ve kümelenen parçacıkların sedimente taşınıp burada yaşayan canlılarla etkileşimleri konularının ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekir. Maruz kalma süresini artırarak gerçekleştirilecek deneylerle canlıların uzun vadede davranışlarındaki değişikliklerin incelenmesi de nanopartiküllerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli bulgular sağlayabilir. Av-avcı ilişkisi içinde olan canlılarla yürütülecek kronik testler vasıtasıyla uzun vadede nanopartiküllerin izleyeceği yollar ve besin zincirinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutabilecektir.

Nanopartiküllerin ekosistemler üzerindeki etkilerini tartışmak için uluslararası kuruluşların düzenlediği birçok kongre ve toplantılar bulunmaktadır. Ülkemizde ise nanopartiküllerin ekotoksikolojisi konusuna yeterince ilgi gösterilmemektedir. Ülke genelinde bu konu üzerindeki çalışmalara hız verilmesi ve konuya gereken önemin gösterilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Altinok, I., Capkin, E. and Boran, H., 2011.** Influence of bioassay volume, water column height, and octanol-water partition coefficient on the toxicity of pesticides to rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 596-600. DOI: 10.1007/s00128-011-0281-4
- APHA/AWWA/WEF, 1992.** Standart Metods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1, 167 p.
- Arnold, H., Pluta, H.J. and Braunbeck, T., 1996.** Cytological alterations in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to low concentrations of waterborne endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 39-52. DOI: 10.3354/dao025039
- Atamanalp, M., 2004.** Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum, 8 s.
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sanchez, A. and Puntès, V., 2009.** Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75, 850-857. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078
- Bladen, C.L., Navarre, S., Dynan, W.S. and Kozłowski, D.J., 2007.** Expression of the Ku70 subunit (XRCC6) and protection from low dose ionizing radiation during zebrafish embryogenesis. *Neuroscience Letters*, 422, 97-102. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.05.045
- Boran, H., Boyle, D., Handy, R.D., Altinok, I. and Henry, T.B., 2012.** Development of a test chamber to enable homogenous aqueous phase dispersions of nanoparticles for testing nanoparticle toxicity in fish. 6th SETAC World Congress 2012, SETAC Europa 22nd Annual Meeting, Berlin, 20-24 May.
- Boxall, A.B.A., Chaundhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B. and Watts, C., 2007.** Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Report by the Central Science Laboratory (CSL) York for the Department of the Environment and Rural Affairs (DEFRA), UK, 89 p.
- Boyle, D., Boran, H., Atfield, A.J. and Henry, T.B., 2015.** Use of an exposure chamber to maintain aqueous phase nanoparticle dispersions for improved toxicity testing in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 583-588. DOI: 10.1002/etc.2840
- Brun, N.R., Lenz, M., Wehrli, B. and Fent, K., 2014.** Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. *Science of the Total Environment*, 476-477, 657-666. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.053

- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P. and Frabetti, F., 2011.** Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis. *Gene Expression Patterns*, 11, 271-276. DOI: 10.1016/j.gep.2011.01.003
- Checkik, G. and Koller, D., 2009.** Timing of gene expression responses to environmental changes. *Journal of Computational Biology*, 16, 279-290. DOI: 10.1089/cmb.2008.13TT
- Cho, Y.S., Lee, S.Y., Kim, K-Y. and Nam, Y.K., 2009.** Two metallothionein genes from mud loach *Misgurnus mizolepis* (Teleostei; Cypriniformes): Gene structure, genomic organization, and mRNA expression analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 153, 317-326. DOI: 10.1016/j.cbpb.2009.04.002
- Colvin, V.L., 2004.** Sustainability for Nanotechnology. *The Scientist*, 18, 26-27.
- CPMP, 2000.** The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity, CPMW/SWP/1042/99, 1-9.
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J. and Owen, R., 2008.** Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 421-437. DOI: 10.1007/s10646-008-0215-z
- Daughton, C.G., 2004.** Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24, 711-732. DOI: 10.1016/j.eiar.2004.06.003
- Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E., 2007.** Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469-478. DOI: 10.1038/nnano.2007.223
- EPA, 1993.** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C., EPA/600/4-90/027F.
- FAO, 1987.** Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shorterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247, Roma, 81 p.
- Federici, G., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007.** Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 415-430. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. and Clesceri, L.S., 1985.** Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition, 541 p.

- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D. and Barber, D.S., 2009.** Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Science*, 107, 404-415. DOI: 10.1093/toxsci/kfn256
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D. and Barber, D.S., 2007.** Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 41, 8178-8186. DOI: 10.1021/es071235e
- Guzman, K.A., Taylor, M.R. and Banfield, J.F., 2006.** Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding. *Environmental Science & Technology*, 40, 1401-1407. DOI: 10.1021/es0515708
- Handy, R.D. and Shaw, B.J., 2007.** Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*, 9, 125-144. DOI: 10.1080/13698570701306807
- Handy, R.D., Owen, R. and Valsami-Jones, E., 2008.** The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17, 315-325. DOI: 10.1007/s10646-008-0206-0
- Hao, L., Wang, Z. and Xing, B., 2009.** Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1459-1466. DOI:10.1016/S1001-0742(08)62440-7
- Henry, T.B., Menn, F.M., Fleming, J.T., Wilgus, J., Compton, R.N. and Sayler, G.S., 2007.** Attributing effects of aqueous C₆₀ nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1059-1065. DOI: 10.1289/ehp.9757
- Iwanaga, R., Komori, H. and Ohtani, K., 2004.** Differential regulation of expression of the mammalian DNA repair genes by growth stimulation. *Oncogene*, 23, 8581-8590. DOI: 10.1038/sj.onc.1207976
- Kashiwada, S., 2006.** Distribution of nanoparticles in the see-trough medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 114, 1697-1702. DOI: 10.1289/ehp.9209
- Kim, G.W., Noshita, N., Sugawara, T. and Chan, P.H., 2001.** Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 32, 1401-1407.
- Kimura, T. and Itoh, N., 2008.** Function of metallothionein in gene expression and signal transduction: Newly found protective role of metallothionein. *Journal of Health Science*, 54, 251-260.

- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., Mclaughlin, M.J. and Lead, J.R., 2008.** Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1825-1851. DOI: 10.1897/08-090.1
- Klauning, J.E., 2000.** Pesticide Toxicology, Evaluating Safety and Risk, Purdue Pesticide Programs, Purdue University Cooperative Extension Service, PPP-40, Indiana University School of Medicine.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. and Schnekenburger, J., 2009.** Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 370-377. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.08.009
- Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W. and Sepulveda, M.S., 2010.** The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, 19, 185-195. DOI: 10.1007/s10646-009-0404-4
- Lanone, S. and Boczkowski, J., 2006.** Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: Molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 6, 651-663. DOI: 10.2174/156652406778195026
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. and Hoet, P., 2009.** Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 14, 1-12. DOI: 10.1186/1743-8977-6-14
- Laufer, B. and Nation, P.A., 1999.** Vocabulary-size test of controlled productive ability. *Language Testing*, 16, 36-55.
- Leblond, V.S., Bisson, M. and Hontela, A., 2001.** Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*O. mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *General and Comparative Endocrinology*, 121, 1, 48-56. DOI: 10.1006/gcen.2000.7556
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H. and Wollin, K.M., 2008.** Alternative methods to safety studies in experimental animals: Role in the risk assessment of chemicals under the new european chemicals legislation (REACH). *Archives of Toxicology*, 82, 211-236. DOI: 10.1007/s00204-008-0279-9
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. and Stark, W.J., 2005.** Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology*, 39, 9370-9376. DOI: 10.1021/es051043o

- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W.F., Lynch, I. and Lindman, S., 2007.** Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8691-8696. DOI: 10.1073/pnas.0701250104
- Loomis, T.A., 1978.** *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R. and Klaper, R., 2007.** Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium oxide, nano-C-60, and C(60)HxC(70)Hx). *Environmental Science & Technology*, 41, 4465-4470. DOI: 10.1021/es062146p
- Lu, C. and King, R.D., 2009.** An investigation into the population abundance distribution of mRNAs, proteins, and metabolites in biological systems. *Bioinformatics*, 25, 2020-2027. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp360
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C. and Alvarez, P.J.J., 2006.** Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size, *Environmental Science & Technology*, 40, 14, 4360-4366. DOI: 10.1021/es0603655
- Ma, H., Williams, P.L. and Diamond, S.A., 2013.** Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*, 172, 76-85. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.08.011
- Maret, W., 2009.** Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals*, 22, 149-157. DOI: 10.1007/s10534-008-9186-z
- Mark, R., Wiesner, P.E. and Bottero, J., 2007.** *Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials*. Inc. McGraw-Hill, 231-331.
- Maynard, A.D., 2002.** Experimental determination of ultrafine TiO₂ de-agglomeration in surrogate pulmonary surfactant - preliminary results. *Annals of Occupational Hygiene*, 46, 197-202. DOI: 10.1093/annhyg/mef630
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P. and Collins, A., 1993.** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288, 47-63. DOI: 10.1016/0027-5107(93)90207-V
- Minghetti, M., Leaver, M.J. and George, S.G., 2010.** Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream *Sparus aurata*. *Aquatic Toxicology*, 97, 23-33. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.11.017
- Moezzi, A., McDonagh, A.M. and Cortie, M.B., 2012.** Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal*, 185-186, 1-22. DOI: 10.1016/j.cej.2012.01.076

- Moore, M.N., 1990.** Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemical Journal*, 22, 187-191. DOI: 10.1007/BF02386003
- Moore, M.N., 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. *Environmental International*, 32, 967-976. DOI: 10.1016/j.envint.2006.06.014
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Soverchia, C., Haigh, S.D. and Hales, S.G., 1997.** Uptake of anon-caloric, edible sucrose polyester oil by marine mussels and their Influence on uptake and effects on anthracene. *Aquatic Toxicology*, 39, 307-320. DOI: 10.1016/S0166-445X(97)00028-3
- Mueller, N.C. and Nowack, B., 2008.** Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 42, 4447-4453. DOI: 10.1021/es7029637
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N., 2006.** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-627. DOI: 10.1126/science.1114397
- Ng, K.W., Khoo, S.P.K., Heng, B.C., Setyawati, M.I., Tan, E.C., Zhao, X.X., Xiong, S.J., Fang, W.R., Leong, D.T. and Loo, J.S.C., 2011.** The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 8218-8225. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.036
- Nowak, B., 1992.** Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 23, 65-83. DOI: 10.1016/0166-445X(92)90012-C
- Oberdörster, E., 2004.** Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1058-1062. DOI: 10.1289/ehp.7021
- Oberdörster, E., Zhu, S.Q., Blickley, T.M., Clellan-Green, P. and Haasch, M.L., 2006.** Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms. *Carbon*, 44, 1112-1120. DOI: 10.1016/j.carbon.2005.11.008
- Oliveira, M., Maria, V.L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M. and Santos, M.A., 2009.** Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*-an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 157, 959-967. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.10.019
- Perez, S., Farre, M. and Barcelo, D., 2009.** Analysis, behaviour and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 820-832. DOI: 10.1016/j.trac.2009.04.001

- Powers, K.W., Brown S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M. and Roberts, S.M., 2006.** Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, 90, 296-303. DOI: 10.1093/toxsci/kfj099
- Pritchard, D.K., 2004.** Literature review explosion hazards associated with nanopowders, HSL/2004/12, 22 p.
- Rahman, I., 2000.** Regulation of nuclear factor- κ B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 60, 1041-1049. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00392-0
- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M. and Forman, H.J., 2005.** Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 42-59. DOI: 10.1089/ars.2005.7.42
- Rand, G.M., 1995.** *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Second Edition, ISBN 1-56032-090-7, 1148 p.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E. and Marins, L.F., 2009.** Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology*, 95, 285-291. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.02.016
- Sayes, C.M., Fortner, L.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M. and Ausman, K.D., 2004.** The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. *Nanoletters*, 4, 1881-1887. DOI: 10.1021/nl0489586
- Saygi, S., Deniz, G., Kutsal, O. and Vural, N., 1991.** Chronic effect of cadmium on kidney, liver, testes and fertility of male rats. *Biological Trace Element Research*, 31, 209-214.
- SCENIHR, 2006.** Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate C - Public Health and Risk Assessment C7 - Risk Assessment: The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies, 71 p.
- SCENIHR, 2007.** Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, European Commission, Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials, 87 p.
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.M., Schäfer, U.F., Becker, K., Schnekenburger, J., Schulze Isfort, C., Landsiedel, R. and Wohleben, W., 2008.** Not ready to use-overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-61. DOI: 10.1080/17435390802018378

- Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., van Aerle, R. and Tyler, C.R., 2010.** Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 115, 521-534. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076
- Smedsrud, T., Dannevig, B.H., Tolleshaug, H. and Berg. T., 1984.** Endocytosis of a mannoseterminated glycoprotein and formaldehyde-treated human serum albumin in liver and kidney cells from fish (*Salmo alpinus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 8, 579-588. DOI: 10.1016/0145-305X(84)90090-9
- Smith, C.J., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007.** Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82, 94-109. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.02.003
- Suter, L., Babiss, L.E. and Wheeldon, E.B., 2004.** Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chemistry & Biology*, 11, 161-171. DOI: 10.1016/j.chembio.2004.02.003
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Schulz, H., Ziesenis, A., Schramel, P. and Heyder, J., 2004.** Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhalation Toxicology*, 16, 83-92. DOI: 10.1080/08958370490443141
- Tong, Z., Bischoff, M., Nies, L., Applegate, B. and Turco, R.F., 2007.** Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environmental Science & Technology*, 41, 2985-2991. DOI: 10.1021/es061953I
- TÜBİTAK, 2004.** Nanoteknoloji Strateji Grubu, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi, Ankara, Türkiye, 26 s.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. and Schins, R.P.F., 2007.** Cellular response to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1, 52-71. DOI: 10.1080/00222930701314932
- Ünsal, M., 1998.** Kirlilik Deneyleri-Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No:11, 168 s.
- Vielkind, M., Kampen, I. and Kwade, A., 2013.** Zinc oxide nanoparticles in bacterial growth medium: Optimized dispersion and growth inhibition of *Pseudomonas putida*. *Advances in Nanoparticles*, 2, 287-293. DOI: 10.4236/anp.2013.24039
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. and Biswas, P., 2006.** Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40, 4336-4345. DOI: 10.1021/es062726m

- Wong, W.T., Nissom, P.M., Sim, S-L., Yeo, J.H.M., Chuah, S-H. and Yap, M.G.S., 2006.** Zinc as an insulin replacement in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 3, 553-563. DOI: 10.1002/bit.20746
- Wurl, O. and Obbard, J.P., 2004.** A Review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): A unique habitat for marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1016-1030. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2004.03.016
- Yauk, C.L. and Berndt, M.L., 2007.** Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 380-394. DOI: 10.1002/em.20290
- Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H. and Lv, L., 2013.** Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 136-137, 49-59. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.03.019
- Zhu, L.S., Dong, X.L., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Su, J. and Yu, C.W., 2011.** DNA damage and effects on glutathione-S transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 26, 480-488. DOI: 10.1002/tox.20575
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. and Chen, Y., 2009.** The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20, 19, 195103. DOI: 10.1088/0957-4484
- Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., Duan, Z., Chen, W. and Alvarez, P.J.J., 2007.** Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 976-979. DOI: 10.1897/06-583.1

ÖZGEÇMİŞ

Gökay ULUTAŞ, 1990 yılında Samsun'da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini 2006 yılında İzmir'de tamamladı. 2008 yılında başladığı lisans eğitimini 2012 yılında Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü'nde tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilimdalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.