

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARI  
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON YÖNTEMİYLE  
BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Balıkçılık Tek. Yük. Müh. Halis BORAN**

**TEMMUZ 2012  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARI  
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON YÖNTEMİYLE  
BELİRLENMESİ**

**Balıkçılık Tek. Yük. Müh. Halis BORAN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“DOKTOR (BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.06.2012**  
**Tezin Savunma Tarihi : 17.07.2012**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**

**Trabzon 2012**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında**  
**Halis BORAN tarafından hazırlanan**

**NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARI**  
**ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON YÖNTEMİYLE**  
**BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 19/06/2012 gün ve 1461 sayılı**  
**kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**  
**DOKTORA TEZİ**  
**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**



**Üye : Prof. Dr. Muhammet BORAN**



**Üye : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**



**Üye : Doç. Dr. Erol ÇAPKIN**



**Üye : Doç. Dr. Siyami KARAHAN**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora programında yürütülmüştür. “Nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine olan etkilerinin gen ekspresyon yöntemiyle belirlenmesi” adlı bu çalışmanın bir bölümü İngiltere Plymouth Üniversitesi, Biyoloji ve Biyomedikal Bölümü’nde bulunan Ekotoksikoloji ve Zebra Balığı Araştırma ve Uygulama Laboratuvarları’nda ve bir kısmı da KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Tez danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve desteklerini esirgemeyen, yurtdışına gitme konusunda teşvikte bulunan ve her konuda desteğini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Yurtdışındaki çalışmaların yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen, Dr. Theodore B. HENRY’ye, tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. Muhammet BORAN’a, yurtdışı laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. David BOYLE’e ve Arş. Gör. Helena C. REINARDY’ye ve yurtdışında kaldığım süre içerisinde maddi manevi desteğini esirgemeyen, çalışma motivasyonumu güçlendiren ve ev arkadaşlığı yapan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ’a teşekkür ederim.

Yurtdışında kaldığım süre içerisinde gösterdiği sabır ve manevi desteklerinden dolayı sevgili eşim Serpil BORAN’a ve ailesine, varlıkları ile hayatıma değer katan çocuklarım Enes ve Kerem’e, eğitim hayatıma verdikleri önem ve gösterdikleri fedakarlıklarından dolayı değerli aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Halis BORAN  
Trabzon 2012

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine olan etkilerinin gen ekspresyon yöntemiyle belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri ve örnekleri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksi bir durumun ortaya çıkması halinde her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 14/06/2012



Halis BORAN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Nanoteknoloji ve Kullanım Alanları.....	3
1.3. Nanopartiküllerin Sucul Çevreye Salınımı .....	6
1.4. Nanotoksikoloji.....	7
1.5. Nanopartiküllerin Canlılardaki Toksisite Mekanizması .....	8
1.6. Toksikolojik Testler .....	9
1.7. Toksik DeneYlerde Kullanılacak Deney Organizmalarının Seçimi.....	11
1.8. Gen Expresyonu (Gen İfadesi) ve Ölçümü .....	12
1.9. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve SYBR Green I Yöntemi .....	13
1.10. Önceki Çalışmalar.....	14
1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı .....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	18
2.1. Nanopartiküller .....	18
2.2. Deney Balıkları .....	18
2.3. Nanopartikül Test Sistemi Geliştirilmesi.....	19
2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması .....	21
2.5. Akut Letal ve Subletal Toksisite Testleri.....	22
2.6. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi.....	22
2.6.1. RNA İzolasyonu.....	22
2.6.2. Revers (Ters) Transkripsiyon.....	23

2.6.3.	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT k-PZR) .....	24
2.6.3.1.	Primerler.....	24
2.6.3.2.	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	25
2.6.3.3.	Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması .....	26
2.7.	ICP-OES Metal Konsantrasyon Analizleri .....	27
2.8.	Nanopartikül Karakterizasyonu (NanoSight).....	27
2.9.	İstatistiksel Değerlendirme .....	28
3.	BULGULAR.....	29
3.1.	NP Test Sistemi ile ICP-OES Analizi ve Doz-Etki (LC <sub>50</sub> ) Deneyleri .....	29
3.2.	C <sub>60</sub> ile Hg <sup>+2</sup> 'nin Birlikte Kontaminasyon İlişkisi ve Gen Ekspresyonu.....	33
3.3.	TiO <sub>2</sub> ile Hg <sup>+2</sup> 'nin Birlikte Kontaminasyon İlişkisi ve Gen Ekspresyonu .....	36
3.4.	Su Sertliği ve EDTA'nın Cu <sup>+2</sup> ve Cu-NP Toksisitelerine Etkisi .....	40
3.5.	Larva Anormallikleri.....	44
4.	TARTIŞMA .....	46
5.	SONUÇLAR .....	53
6.	ÖNERİLER.....	55
7.	KAYNAKLAR .....	56
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

## ÖZET

### NANOPARTİKÜLLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) LARVALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Halis BORAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2012, 65 Sayfa

Bu çalışmada, yeni bir nanopartikül (NP) test sistemi geliştirilerek, karbon 60 (C<sub>60</sub>), titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>), bakır (Cu) ve gümüş (Ag) nanopartiküllerinin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, NP'lerin letal (LC<sub>50</sub>) ve subletal konsantrasyonları belirlenerek metallothienin-2 (MT-2) proteinini kodlayan genin ekspresyonundaki değişimler, Real-time PZR ile SYBR Green I kullanılarak analiz edilmiştir. Yeni geliştirilen test sistemi ile üç farklı zamanda tekrarlanan doz-etki deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu görülmüş ve LC<sub>50</sub> değerleri Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub> NP'ler için sırasıyla 0,27; 0,65 ve 897 mg/L olarak hesaplanmıştır. Hg<sup>+2</sup>'nin farklı konsantrasyonları ile yapılan MT-2 gen ekspresyon analizleri sonucunda Hg<sup>+2</sup>'nin gen ekspresyonunu kontrol grubuna oranla 10 kat (% 89) arttırdığı tespit edilmiştir. C<sub>60</sub> ve TiO<sub>2</sub> NP'ler ile Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte etkisinin araştırıldığı gen ekspresyon deneyleri sonucunda C<sub>60</sub> ve TiO<sub>2</sub>'in Hg<sup>+2</sup>'nin toksisitesini önemli oranda azalttığı belirlenmiştir. Cu<sup>+2</sup> ve Cu-NP'ün toksisitelerinin karşılaştırıldığı deneylerde Cu<sup>+2</sup>'in sebep olduğu gen ekspresyon artışının Cu-NP'e göre 3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sertliği (mg/L CaCO<sub>3</sub>) yüksek olan sularda Cu-NP'ün toksisitesinde artış olurken, EDTA bulunan sularda Cu-NP'ün toksisitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanopartikül, Nanopartikül test sistemi, Gen ekspresyonu, Zebra balığı, Akut toksisite



PhD. Thesis

## SUMMARY

### DETERMINATION OF NANOPARTICLE TOXICITY TO LARVAL ZEBRAFISH (*Danio rerio*) BY ASSESSMENT OF GENE EXPRESSION

Halis BORAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Fisheries Technology Engineering Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2012, 65 Pages

In this study, the dose-response experiments were performed to determine lethal and sublethal concentrations of carbon 60 (C<sub>60</sub>), titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), copper (Cu), and silver (Ag) nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by developing a new nanoparticle test system. Also, the changes in expression of the gene encoding metallothienin-2 protein were analyzed with SYBR Green I method through Real-Time PCR analysis. Repeatable test results were obtained with the newly developed test system at three different time periods and LC<sub>50</sub> values for Ag, Cu, and TiO<sub>2</sub> NPs were calculated as 0.27, 0.65 and 897 mg/L, respectively. As a result of the MT-2 gene expression analysis performed with different Hg<sup>2+</sup> concentrations, it was determined that Hg<sup>2+</sup> caused an increase in MT-2 gene expression ten times (89%) higher in comparison with the control group. According to the results of gene expression of C<sub>60</sub> and TiO<sub>2</sub>-NPs associated with Hg<sup>2+</sup>, C<sub>60</sub> and TiO<sub>2</sub>-NPs decreased the toxicity of Hg<sup>2+</sup> significantly. It was determined that gene expression of Cu<sup>2+</sup> was higher three times than Cu-NPs in the comparative toxicity experiments of Cu<sup>2+</sup> and Cu-NPs. Furthermore, the toxicity of Cu-NPs decreased in water containing EDTA while increased in hard water (as mg/L CaCO<sub>3</sub>).

**Key Words:** Nanoparticle, Nanoparticle test system, Gene expression, Zebrafish, Acute toxicity

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Karbon 60 (fulleren) nanopartikülünün logaritmik olarak uzunluk ölçüleri ile gösterilerek nano ve mikro boyutlardaki biyolojik bileşenlerle karşılaştırılması .....	1
Şekil 2.	Nanoteknoloji alanında yatırım yapan ülkeler ve 2008-2010 yıllarında ayrılan fon miktarları .....	4
Şekil 3.	Dünya genelinde 2005-2010 yılları arasında üretilen ve tüketici pazarına sunulan farklı nanoteknolojik ürün sayıları .....	6
Şekil 4.	Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları.....	19
Şekil 5.	OECD 210 nolu yönergede önerilen toksikolojik test sistemi ve nanotoksikoloji testlerinde kümelenme ve sedimentasyon oluşumu. ....	20
Şekil 6.	Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir NP karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi.....	21
Şekil 7.	MT-2 gen primerlerinin cDNA örneklerinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra jelde yürütülerek görüntülenmesi .....	25
Şekil 8.	Nanopartikül karakterizasyon ölçüm cihazı ve çalışma prensibi şeması. ....	28
Şekil 9.	ICP-OES analizi yapılarak statik ve hareketli su ortamında zamana bağlı olarak ölçülen Ag-NP konsantrasyonları .....	29
Şekil 10.	ICP-OES analizi yapılarak statik ve hareketli su ortamında zamana bağlı olarak ölçülen Cu-NP konsantrasyonları .....	30
Şekil 11.	Statik test sistemi ve yeni geliştirilen NP test sisteminin Ag-NP ile doz-etki deneyleri yapılarak karşılaştırılması ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları .....	31
Şekil 12.	Statik test sistemi ve yeni geliştirilen NP test sisteminin Cu-NP doz-etki deneyleri yapılarak karşılaştırılması ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları .....	32
Şekil 13.	Yeni geliştirilen NP test sistemi kullanılarak yapılan TiO <sub>2</sub> -NP doz-etki deneyleri ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları .....	32
Şekil 14.	24 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda Hg <sup>+2</sup> ,ya maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri .....	33
Şekil 15.	NP test sistemi ile 24 saat süreyle C <sub>60</sub> , Hg <sup>+2</sup> ile birlikte C <sub>60</sub> ve sadece Hg <sup>+2</sup> ,ya maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarındaki değişimler.....	34

Şekil 16.	C <sub>60</sub> -NP'ün 25 µg/L Hg <sup>+2</sup> 'nin varlığında ve yokluğunda su ortamında gösterdiği kümelenme ve sedimentasyon özelliklerinin zamana bağlı değişimi .....	35
Şekil 17.	C <sub>60</sub> -NP ve Hg <sup>+2</sup> 'nin birlikte bulunduğu su kolonunda zamana bağlı olarak etkileşim nedeniyle Hg <sup>+2</sup> miktarında meydana gelen değişimler .....	35
Şekil 18.	Su kolonunda birlikte bulunan Hg <sup>+2</sup> ve artan konsantrasyonlarda TiO <sub>2</sub> -NP'lerin 24 saatlik test süresi sonunda zebra balığı larvalarında oluşturduğu MT-2 gen ekspresyon değişimleri.....	36
Şekil 19.	NP test sistemi ile TiO <sub>2</sub> -NP'lerin Hg <sup>+2</sup> 'nin varlığında ve yokluğunda zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında meydana getirdiği değişimler.	37
Şekil 20.	TiO <sub>2</sub> -NP - Hg <sup>+2</sup> karışımı, TiO <sub>2</sub> bulk partikül - Hg <sup>+2</sup> karışımı ve sadece Hg <sup>+2</sup> 'ya 24 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri.....	38
Şekil 21.	TiO <sub>2</sub> -NP ve bulk partikülün Hg <sup>+2</sup> 'nin varlığında ve yokluğunda su ortamında gösterdiği kümelenme ve sedimentasyon özellikleri. ....	39
Şekil 22.	NP test sistemi içerisinde TiO <sub>2</sub> -NP ve bulk partikül varlığında farklı Hg <sup>+2</sup> konsantrasyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler .....	40
Şekil 23.	NP test sistemiyle Cu <sup>+2</sup> ve Cu-NP'e 96 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının ölüm oranları. ....	41
Şekil 24.	96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda Cu <sup>+2</sup> ve Cu-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarındaki MT-2 gen ekspresyon değişimleri.....	42
Şekil 25.	96 saat süreyle Cu <sup>+2</sup> 'a maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri ve su sertliği (CaCO <sub>3</sub> ) ve EDTA'nın ekspresyon değişimleri üzerine etkisi. ....	43
Şekil 26.	96 saat süreyle Cu-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri ve su sertliği (CaCO <sub>3</sub> ) ve EDTA'nın ekspresyon değişimleri üzerine etkisi. ....	44
Şekil 27.	Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve NP'lere maruz kalan larvalarda görülen anormallikler. A: Normal larvalar, B: NP'lere maruziyet sonucu canlı kalmış fakat anormal larvalar, C: NP'lere maruziyet sonucu ölmüş larvalar. ....	45

## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer dizileri .....	25
--	----

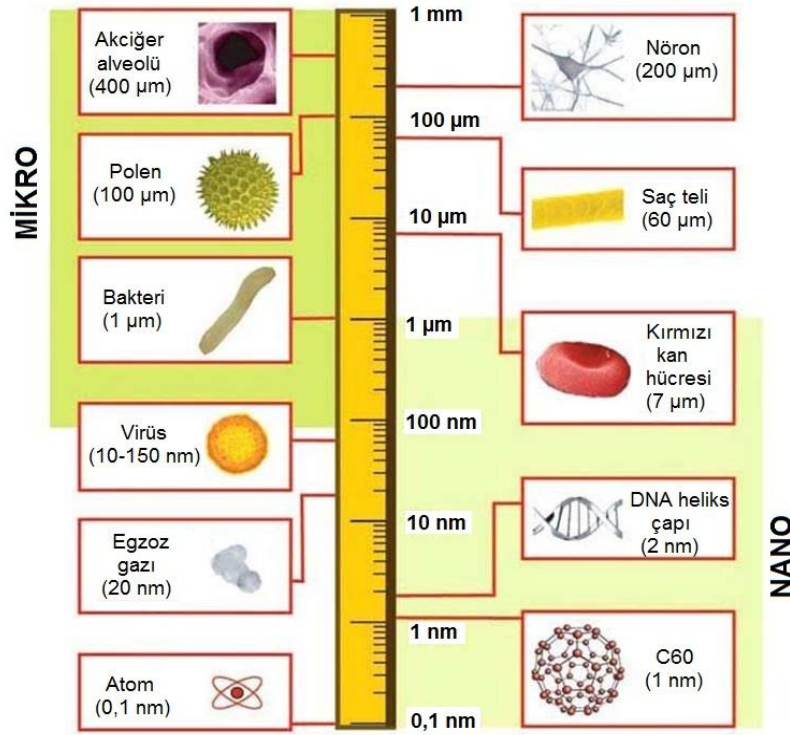
## SEMBOLLER DİZİNİ

Ag	Gümüş
ANOVA	Varyans Analizi
C <sub>60</sub>	Karbon 60
CaCO <sub>3</sub>	Kalsiyum Karbonat
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Hg	Cıva
LC <sub>50</sub>	Canlıların %50'sini öldüren letal konsantrasyon
mm	Milimetre
MT	Metallothionein
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
TiO <sub>2</sub>	Titanyum Dioksit
µm	Mikrometre

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

“Nano” kelimesi teknik bir ölçü birimi olarak kullanılmakta ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamını taşımaktadır. Bir nanometre (nm) bir milimetrenin milyonda birine eşit bir uzunluk birimidir. Bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilmekte ve yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturmaktadır (Çıracı, 2005; Mark vd., 2007; Crane vd., 2008). Nano ölçekteki nesnelere boyutları bilinen diğer nano ve mikro boyutlardaki doğal bileşenlerle karşılaştırılarak ölçüleri konusunda daha ayrıntılı bilgi sağlanabilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Karbon 60 (fulleren) nanopartikülünün logaritmik olarak uzunluk ölçüleri ile gösterilerek nano ve mikro boyutlardaki biyolojik bileşenlerle karşılaştırılması (Buzea vd., 2007).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle, çeşitli alanlarda yararlanmak üzere sentetik olarak yeni işlevler kazandırılan nanomalzemeler üretilmektedir. Bunun yanı sıra nanoboyutlu

partiküller, orman yangınları ve volkanik faaliyetler neticesinde oluşabileceği gibi viral parçacıklar ve ferritin gibi protein molekülleri şeklinde de doğada bulunabilmektedirler (Goldman ve Coussens, 2005). Nanoboyuttaki malzemeler, mikro ve makro boyuttaki malzemelerden yapısal boyutlarına özgü farklı birtakım özellikleriyle ayrılmaktadır. Malzemenin boyutu nano ölçek düzeyine yaklaştıkça (malzemeyi oluşturan atom sayısı 100'ler düzeyine indikçe), atom yapısının geometrisi ve hatta atom sayısı fiziksel özelliklerin (elektronik, optik, manyetik özellikler ve iletkenlik gibi) belirlenmesinde etken olmaktadır. Örneğin, nanoparçacığın iletkenliği o yapıya tek bir atom eklense bile değişebilmektedir. Benzer şekilde, nano ölçeklerde atomlar arası bağ yapısı da değişikliğe uğrayabilmektedir. Mekanik olarak malzeme güçlenirken ya da zayıflarken, elektriksel iletkenlik özelliği tümüyle değişebilmektedir (Oberdörster vd., 2007).

Malzemenin boyutları nano ölçek düzeyine yaklaştıkça ortaya çıkan yeni özellikler sayesinde, nanomalzemeler endüstride geniş kullanım alanı bulmuş ve geliştirilen ürünler hızla gündelik yaşamımıza girmiştir (Handy vd., 2008). Tekstil sektöründe giyim ürünlerinin yanı sıra teknik ürünlerde de nanomalzemeler kullanılmaktadır. Zira tekstiller, inşaat tekstilleri, spor tekstilleri, endüstriyel tekstiller, tıbbi tekstiller gibi teknik tekstil ürünleri nanomalzemeler kullanılarak geliştirilmektedir. Ayrıca boya sanayinde de nanoteknolojik malzemelerden yararlanılmış, binaların çoğunlukla dış cephelerinde ve gerektiğinde iç cephelerinde kullanılmak üzere; kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku giderme, antimikrobiyal ve antibakteriyal gibi özellikler taşıyan boyalar geliştirilmiştir. Nanoteknolojiden yararlanan bir başka sektör de kozmetik sektörüdür. Nanomalzemeler kullanılarak üretilen diş macunu, güneş kremleri, ruj, göz farı, tıraş losyonu, nemlendirici, deodorant gibi çeşitli ürünler raflarda yerlerini almıştır. Diğer bir endüstri dalı olan otomotiv endüstrisi de; hafif motor ve çerçeve parçalarının yapımı, sürtünmeye karşı dirençli boyaların üretimi, aşınmaya karşı koruyucu tabakalar geliştirilmesi gibi alanlarda nanoteknolojiden faydalanmıştır (SCENIHR, 2006).

Türkiye nanoteknolojik ürünleri üretebilmek ve gelişmekte olan uluslararası nanoteknoloji pazarında var olabilmek için çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. Avrupa Birliği'nin 6. Çerçeve Programı (Nanoteknoloji ve Nanobilimler, Bilgi Tabanlı Çok Fonksiyonlu Malzemeler, Yeni Üretim Süreçleri ve Araçları) ve 7. Çerçeve Programı (Nanobilimler, Nanoteknolojiler, Malzemeler ve Yeni Üretim Teknolojileri) kapsamında Türkiye'nin nanoteknoloji araştırmalarının yapılandığı ve ivme kazandığı görülmektedir. Nanoteknoloji, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından

hazırlanan Vizyon 2023 Programı'na öncelikli alanlardan biri olarak alınmıştır (TÜBİTAK, 2004).

Nanoteknolojinin ve nanomalzemelerin uluslararası arenada önem kazanması ve kullanımının artması ile beraber başta EPA (Environment Protection Agency, Çevre Koruma Örgütü) olmak üzere ABD'de ve Avrupa'da çok sayıda kuruluş bu ürünlerin risk haritasını ortaya çıkarma çalışmalarına başlamıştır (Wiesner vd., 2006). Nanoteknolojinin kullanım alanının genişliği ve hızla gelişip yayılması göz önünde bulundurulduğunda, nanomalzemelerin ekotoksikolojik etkilerinin belirlenmesi çevre ve halk sağlığını korumada önem arz etmektedir (Moore, 2006).

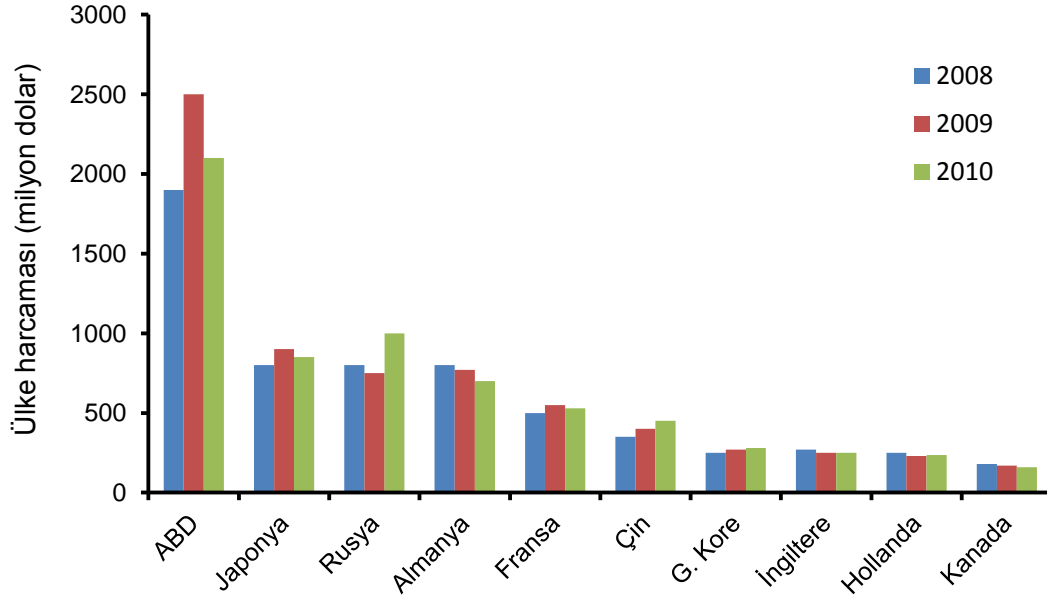
Son zamanlarda artan oranda yapılan nanopartikül (NP) ekotoksisite çalışmalarında elde edilen veriler oldukça çelişkili ve karmaşıktır. Bunun nedeni, NP'lerin kümelenme eğilimlerinin deney bileşenleri ve ölçüm sistemlerinin düzgün çalışmasına imkan vermemesidir. Büyüklüklerine ve dağılım faktörlerine bağlı olarak NP'ler sıvı içerisinde hem dağılıma hem de buldukları test ortamının tabanına çökme eğilimindedirler (Limbach vd., 2005). NP'ler için günümüzde kullanılan test metotları, güvenilir risk değerlendirmesi, doğrulama ve standart test prosedürü oluşturma açısından bazı problemlere sahiptir. Bu nedenle farklı laboratuvarlar tarafından yapılan deneylerde çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Son zamanlarda uygulanan test metotları muhtemelen NP'lerin spesifik özelliklerinden etkilenmektedir, bunun önüne geçmek için NP risk değerlendirme çalışmalarında hücresel toksisite test yöntemlerinin uygun hale getirilmesi veya yeni bir test sisteminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Kroll vd., 2009). NP'lerin sucul ortamdaki potansiyel toksik etkilerini belirlemek için; doğru test yöntemlerinin uygulanması ve çevresel maruz kalma şartlarını dikkate alarak deney hayvanları için homojen bir maruziyet ortamının sağlanması çok önemlidir.

## **1.2. Nanoteknoloji ve Kullanım Alanları**

Nanoteknoloji, nesnelere 100 nm'den daha küçük boyutlarda oluşturmakla ilgilenen bir bilim dalıdır (Mark vd., 2007; Crane vd., 2008). 1959 yılında Amerikan Fizik Cemiyeti'nden (APS, American Physical Society) Richard Feynman, nanoyapıların esas yapılardan daha farklı özellikler taşıdığını vurgulayarak bilim insanlarının dikkatini nanometre boyutlarına çekmiştir. Önce 1981 yılında taramalı tünelleme mikroskobunun (STM), daha sonra 1985 yılında atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) keşfi, yüzeyde



bulunan atomların ve moleküllerin gözlenmesine, atomsal düzeyde tepkimelerin izlenmesine olanak tanımıştır. Böylece 20. yüzyılın son çeyreğinde nanoteknolojiyle tanışılmış ve doğada bulunmayan yeni nanoyapıların atomsal düzeyde sentezlenmesine başlanmıştır (TÜBİTAK, 2004). Son yıllarda, dünya ülkeleri nanoteknoloji alanındaki yatırımlara oldukça yüklü kaynaklar ayırmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Nanoteknoloji alanında yatırım yapan ülkeler ve 2008-2010 yıllarında ayrılan fon miktarları (Xue ve Hwang, 2011).

21. yüzyılda bilgi alma teknolojileri, malzeme bilimi, biyoteknoloji, çevre mühendisliği, kimya mühendisliği, elektrik mühendisliği ve moleküler kimya gibi birçok farklı bilim dalındaki gelişmeler nano ölçekte ilerlemektedir (Nowack ve Bucheli, 2007). Nano alan gelecekteki mühendislik ve bilim çalışmalarının temelini oluşturacak bilimler arası araştırmaların ve eğitimin esas basamağı olarak görülmektedir.

Nanoteknoloji terimlerinde ortaya çıkan karmaşaya çözüm olarak, İngiliz Standartlar Enstitüsü (British Standards Institution) 2005 yılında terimlerin tanımlamalarını yayınlamıştır. Genel olarak aşağıdaki ana tanımlar önerilmektedir;

**Nano malzeme:** Bir ya da daha çok boyutu 1-100 nm olan ve nanoboyutta olmayan aynı malzemeye kıyasla birçok yeni özellikler kazanmış malzemelerdir.

**Nano partikül:** Bir ya da daha fazla boyutu nano ölçekte olan parçacıklardır.

Nano ölçek: Bir ya da daha fazla boyutu 100 nm ya da altında olan nesnelere ölçen orandır.

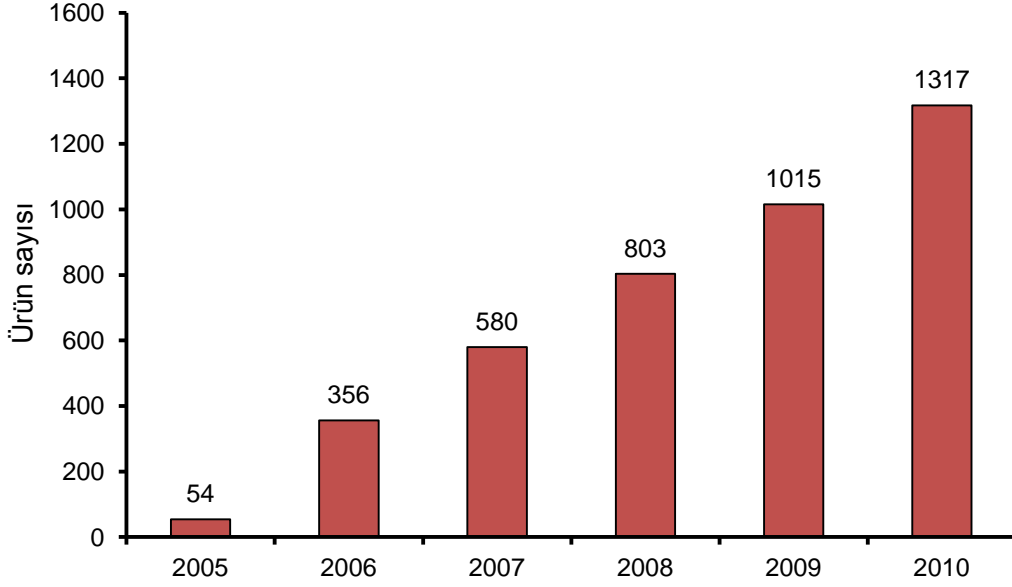
Nano bilim: Maddelerin atom, moleküler ve makro moleküler ölçekte işlenmesiyle ortaya çıkan yeni özellikler üzerinde çalışan bilim dalıdır.

Nano yapı: Nano ölçekteki yapılardır.

İmal edilmiş NP'lerden olan karbon 60 (fulleren, buckyballs), bir karbon allotropu ailesidir. Saf karbondan oluşan fulleren molekülü futbol topunu andıran bir yapıya sahiptir. Bunlara otomobillerde ve spor malzemelerinde kullanılan karbon kompozitler ve dönme hareketi yapan elektronik elemanlar örnek verilebilir (Nowack ve Bucheli, 2007; Ju-Nam ve Lead, 2008). Karbon nanotüpler (buckytubes), grafitin 1-10 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda bir silindir oluşturacak şekilde yuvarlanmasıyla elde edilmiş yapılardır (O'Connell, 2006; Nowack ve Bucheli, 2007). Bir başka deyişle karbon nanotüpler, fullerenlerin silindir şeklindeki formlarıdır ve nanoelektronik ve nanomekanik devrelerde kullanılmak için elverişlidirler (Ju-Nam ve Lead, 2008).

Nanotozlar, büyüklüğü 1-100 nm arası değişen bileşiklerdir. Nanotoz olarak üretilen materyaller; metallere, metal oksitler, boritler, karpitler, nitritler ve sülfidler iken metal olmayan materyaller ise karbon, kalay, silika ve silikon karpitler olarak sıralanabilir. Nanotozların güncel kullanımına aşağıda örnekler verilmiştir (Pritchard, 2004). Titanyum dioksit ve çinko oksit nanotozları; güneş losyonu, kozmetik, boya ve kaplamalar, ayrıca içme sularındaki kontaminantların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Gözlük camlarında, merceklerde kullanılan çizilmeyi önleyen kaplamalar ve tıbbi amaçlı kullanılan camlara kendi kendini temizleme özelliği veren kaplamalar titanyum dioksit nanotozları içermektedir. Mikro ölçekli tozlar yerine alüminyum nanotozlar, patlayıcı maddelerde ve havai fişeklerde yanma niteliklerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Elmas nanotozlar; zımpara, macun, mercek ve ayna gibi optik aletlerde istenilen yüksek parlaklığı elde etmek için kullanılmaktadır. Yağların, yağlama özelliklerini geliştirmek amacıyla da elmas nanotozlar kullanılmaktadır. Boyalara ilave edilen gümüş ve elmas nanotozları boyanın dış etkenlerle aşınmasını önlemek ve koruma sağlamak için kullanılmaktadır. Nanobakır, aşınmayı önleyici yağ katkıları, elektriksel materyaller, bilgisayar donanımları ve askeri malzemelerde kullanılmaktadır. Nanogümüş ise daha çok antimikrobiyal özelliğiyle bilinmektedir. Bu nedenle tekstil sanayinde bakteri eliminasyonu ve koku önleyici olarak kullanılır. Ayrıca gıda paketlenme ve beyaz eşya

sanayinde de kullanılmaktadır (Mark vd., 2007). Nanoteknoloji alanındaki ürün çeşitliği, teknolojinin gelişmesine paralel olarak hızlı bir şekilde artmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Dünya genelinde 2005-2010 yılları arasında üretilen ve tüketici pazarına sunulan farklı nanoteknolojik ürün sayıları (Xue ve Hwang, 2011).

### 1.3. Nanopartiküllerin Sucul Çevreye Salınımı

NP'lerin sucul ortamlara karışması yakın gelecekte araştırılması gereken yeni çevresel problemlere neden olmaktadır. Bilim adamları öncelikli olarak araştırılmaya gerek duyulan alanların; küçük partiküllerin hidrodinamik davranışları, NP'lerin daha büyük sedimentler ve kolloit partiküllerle ilişkisi, lipofilik organik bileşiklere ve metallere bağlanma özellikleri, diğer kimyasal kirleticilerle oluşan ve toksisitenin artmasına sebep olan sinerjistik etki, NP'lerin canlı organizmalar tarafından vücuda alınma yolları, parçacık büyüklüğü ve yüzey özelliklerinin önemi ve NP'lerin sucul ekosistemler üzerindeki etkiler olduğunu kesin olarak ifade etmektedirler (Moore, 2006).

Endüstriyel atıkların çoğunun ve şehirselle atıksu deşarjlarının nehirlerle, göllere ve kıyısallara karıştığı iyi bilinen bir gerçektir. Bu nedenle, nano ölçekli endüstriyel ürünler ve yan ürünlerin de sucul ortamlara karışması kaçınılmazdır (Daughton, 2004). Bununla birlikte, çevresel izleme tekniklerinin yetersiz olması ve maddelerin normal ve nano formlarının ayırt edilmesindeki zorluklardan dolayı NP'lerin çevreye salınımı ve miktarları

konusunda çok az bilgi mevcuttur. Günümüzdeki modelleme teknikleri NP'lerin çevresel konsantrasyonlarını  $\mu\text{g/L}$  düzeylerinde tespit edebilmektedir (Boxall vd., 2007). Örneğin,  $\text{TiO}_2$ -NP'lerin İskandinav sucul ekosistemlerinde tahmin edilen konsantrasyonu 0,0007 ile 0,0245  $\mu\text{g/L}$  arasında değişmektedir (Mueller ve Nowack, 2008; Perez vd., 2009).

Yapılan çalışmalar farklı sucul ortamlarda askıda katı maddelerin, kimyasal kirleticilerin ayırımı ve uzak mesafelere taşınımı konusunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, nehirlerin ve kıyusal bölgelerin hidrodinamik ve morfolojik özellikleri de NP'lerin dağılım sınırlarını belirlemektedir (Smedes, 1994). Denizel ve kıyusal sucul çevrelerde; şeker, protein ve lipid içeren deniz yüzey suyu mikrotabakası NP'lerin davranışlarında önemli rol oynamaktadır. Özellikle lipid kısmı, lipofilik NP'lerin ayrışmasında önemli bir faktör olmaktadır (fullerenler ve karbon nanofiberler). Şüphesiz bu durum NP'lerin yüzeyaltı su ekosistemlerindeki davranışlarını ve biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkilemektedir. Yüzeyaltı denizel ve kıyusal ekosistemleri, pekçok omurgasız canlı ve balık türlerine ait pelajik yumurta ve larvaları içeren geniş mikrobiyal topluluklara sahiptir (Wurl ve Obbard, 2004). NP'lerin sucul organizmalar tarafından vücuda alınım yolları; direkt olarak yutma, solungaçlar aracılığıyla giriş, koku alma organları ve deri yoluyla vücut duvarından geçiş şeklindedir. Protista ve metazoanlar gibi ökaryotik organizmalar nano (<100 nm) ve mikro (100 nm-100.000 nm) ölçekli partiküllerin hücrel olarak içselleştirilmesi için endositoz ve fagositoz olarak ifade edilen çok gelişmiş süreçlere sahiptir (Pelkmans ve Helenius, 2002; Reiman vd., 2004). Omurgasız canlılarda hücrel bağışıklık sistemi, bağırsak epiteli ve hepatopankreas, yutulan NP'ler için muhtemel hedef bölgeleri iken (Moore, 1990), balıklarda ise karaciğer NP'ler için muhtemel hedef organdır. NP'ler bağırsak epitelinden endositik taşınım yoluyla geçerek hepatik portal dolaşım sistemi aracılığıyla hepatositlere ulaşır ve endositoz işlemiyle süreç sonlanır (Smedsrud vd., 1984).

#### **1.4. Nanotoksikoloji**

Nanotoksikoloji, NP'lerden kaynaklanan sağlığa zararlı etkilerin açıklandığı toksikolojinin yeni bir dalı olarak ifade edilmektedir (Donaldson vd., 2004). Nanoteknoloji endüstrisi, maddelerin nano ölçekte alışılmamış özellikler kazanmasının keşfedilmesiyle hızlı bir gelişme göstermiştir ve NP'lerin bu özellikleri aynı zamanda potansiyel toksisiteleri ve ekotoksikolojileri hakkında endişelere sebep olmuştur. Değişen kuantum

davranışları ve reaktivitelerinin artması, imal edilmiş NP'leri sanayide pek çok uygulamada kullanılabilir hale getirmiştir, fakat bu maddeler çevre ve canlı organizmalar üzerinde beklenmedik etkiler meydana getirebilmektedir (Handy vd., 2008). Bunun yanında, NP'ler küçük boyutları sayesinde bir bariyer oluşturarak diğer ksenobiyotiklerin membran ve hücrelerarası bağlantılardan geçerek canlı organizma hücrelerine girişini engellemektedirler. NP'lerin reaktivitelerinin artması potansiyel olarak zararlı hücresel etkiler oluşturabilmekte ve canlı organizmalara zarar verebilmektedir. Bugüne kadar imal edilmiş NP'lerin, özellikle sucul ortamlardaki canlı organizmalar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı pek az çalışma mevcuttur (Oberdörster vd., 2007; Crane vd., 2008; Griffitt vd., 2008; Kroll vd., 2009).

### **1.5. Nanopartiküllerin Canlılardaki Toksik Etki Mekanizması**

NP'ler canlı organizmalarda birkaç farklı mekanizmayla toksik etki oluşturabilirler. In vivo nanotoksitenin ana moleküler mekanizması, oluşan serbest radikaller nedeniyle canlı vücudunda hücresel oksidatif stres meydana gelmesidir (Lanone ve Boczkowski, 2006). NP'lere 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. İltihaplanma oluştuğunda redoks duyarlı transkripsiyon faktörü, protein-1 aktivatörü ve kinaz miktarında artış meydana gelir (Rahman, 2000; Rahman vd., 2005; Lanone ve Boczkowski, 2006). Serbest radikaller, yabancı maddelere karşı fagositik hücre etkisi, antioksidan madde miktarının yetersiz olması, geçiş metallerinin varlığı, çevresel faktörler ve bazı NP'lerin fizikokimyasal özellikleri gibi birkaç farklı faktörden meydana gelebilir (Lanone ve Boczkowski, 2006). NP'lerin ürettiği potansiyel serbest radikallerin yavaş temizlenmesi ve dokularda birikim oluşturması, ayrıca retikuloendotelial sisteme ait organlarda çok sayıda fagositik hücrenin yaygın olarak bulunması, karaciğer ve dalak gibi organları oksidatif stresin ana hedefi haline getirmektedir. Bunun yanında, böbrek ve akciğer gibi yüksek miktarda kan akışı olan organlar da NP'lere maruz kalındığında olumsuz etkilenebilen organlardır.

NP'ler canlı hücre içerisindeki hücresel bileşenlerle etkileşime girebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir veya değiştirebilir ve reaktif oksijen türleri oluşturabilirler. NP'lerin mitokondri ve hücre çekirdeği ile etkileşime girmelerinin zehirlenmenin ana

kaynağı olduğu düşünülmektedir. Gümüş ile kaplanmış altın NP'ler, fullerenler, blok kopolimer tanecikleri ve karbon nanotüpler hücre içerisindeki mitokondriye yerleşebilir ve apoptozise ya da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olabilirler. Bunun sonucunda da oluşan hücresel DNA hasarı, hücre döngüsünde aksama, mutagenез ve apoptozis zehirlenmenin ana kaynağını teşkil eder (Unfried vd., 2007). Günümüzde hala tartışılan bir durum olmasına rağmen, NP'lerin makrofaj ve nötrofillerdeki serbest radikal kaynakları olan NADPH oksidaz ve ksantin oksidazın artmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Lanone ve Boczkowski, 2006).

NP'lerin diğer toksisite mekanizmalarının, buldukları ortamla çok hızlı bir etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. NP'ler dolaşım sistemine girdiklerinde kan bileşenleriyle etkileşime girerek hemoliz ve trombozise sebep olabilirler. Bununla birlikte, NP'lerin bağışıklık sistemi ile etkileşimi sonucunda canlılarda immünotoksisiteyi arttırdıkları tespit edilmiştir (Dobrovolskaia ve McNeil, 2007).

### **1.6. Toksikolojik Testler**

Toksikoloji yani zehir bilimi, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri, zararlı sonuçları yönünden inceleyen veya kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalıdır. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir. Ortaya çıkan etki, geri dönüşümlü olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir (Vural, 1996). Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978).

Toksisite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılır. Eğer uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içerisinde de aynı özellikte maddelerin, su hacimlerinin ve test koşullarının uygulanması gerekir (Altınok vd., 2011). 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 testlerde kullanılan deney hayvanları farklı konsantrasyonlarda toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak bu maddelerin hayvanlar 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. Toksik maddenin belirli miktarlarda çözeltileri kullanılacağı için bu maddenin bir çözücü yardımıyla çözülebilir olması gerekmektedir. Kullanılan bu çözücü maddelerin de toksik etkilerinin dikkate alınması gerekir (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altınok, 2004).

Toksisite testleri; 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 testler, deney ortamına 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 kısa süreli toksik deneyler için tercih edilmekle birlikte, doğal ortam şartlarını en iyi şekilde temsil etmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Toksisite deneyleri, 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 gözlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca, farklı toksik maddelerin canlı organizmalara olan etkilerini karşılaştırmak ve bu toksik maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da bu testler yaygın olarak kullanılmaktadır (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Braunbeck ve Appelbaum, 1999; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

### **1.7. Toksik Deneylerde Kullanılacak Deney Organizmalarının Seçimi**

Toksikolojik testlerde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için sadece uygun test tipinin değil aynı zamanda uygun test organizmasının da seçilmesi gerekmektedir (Rand, 1995). Toksisite testlerinde seçilecek organizmalar mümkün olduğunca ekosistemi temsil eden yerli türler olmalıdır. Seçilecek tür ekolojik ve ekonomik öneme sahip olmalı, temini kolay ve sayıları yeterli olmalıdır. Tür içi ve türler arasında duyarlılık farklılık gösterdiğinden mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığına sahip organizmalar seçilmelidir. Türlerin laboratuvar çalışmalarına adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek ve kültürlerinin yapılabilir olması gerekmektedir. Seçilecek türler en az bir ay süreyle laboratuvar ortamında sağlıklı şartlarda muhafaza edilebilmelidir. Türlerin biyolojilerinin, tuzluluk, pH ve sıcaklık isteklerinin önceden bilinmesi gerekir. 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).

Akuatik toksikolojide canlı materyali oluşturacak organizmalar doğrudan doğal ortamdaki temin edilebileceği gibi üreticilerden de satın alınabilir veya laboratuvar, kuluçkahane vb. suni koşullarda yetiştirme yollarıyla da elde edilebilir (Atamanalp, 2004). Akuatik toksikolojide test türlerinin seçimi daha çok araştırmanın amacına bağlı olmakla birlikte, omurgalılar içerisinde balıklar temel grubu oluşturmaktadır. Toksikolojik testlerde yaygın olarak kullanılan balık türleri; kaynak alabalığı, gökkuşacağı alabalığı, japon balığı, sazan balığı, golyan balığı, kanal yayın balığı, güneş balığı, turna balığı, dikence balığı,



zebra balığı ve lepistes balığıdır. Balıkların yanı sıra bakteriler, algler, yüksek yapılı bitkiler, protozoa, sölenterata, rotifer, annelidler, krustasea, su böcekleri ve yumuşakçalar da testlerde kullanılan diğer gruplardır (Pascoe ve Edwards, 1989).

Bu çalışmada, zebra balıkları (*Danio rerio*); laboratuvar şartlarına uyum kabiliyetlerinin yüksek olması, genel fizyolojisi, genetik yapısı ve davranışlarının iyi bilinmesi, embriyonun dış ortamda gelişmesi nedeniyle tüm safhalarının izlenebilmesi ve değiştirilebilmesi, birçok insan hastalık ve gelişim genlerinin benzerinin zebra balığının genomunda mevcut olması, genetik analizler için uygun ve insan genlerinin karşılaştırmalı haritalamasında kullanılması ve haftada 150-200 yumurta üretebilme kabiliyetine sahip olması gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmiştir.

### **1.8. Gen Ekspresyonu (Gen İfadesi) ve Ölçümü**

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. Basitçe, bu durum genlerin açık (aktif) olup olmadıkları olarak da tanımlanabilir. 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 ekspresyonunun 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 yapılmaktadır (Suter vd., 2004).

### 1.9. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve SYBR Green I Yöntemi

Real-time PZR, floresan boyalar yardımıyla DNA'nın miktarının belirlenmesi ve gerçek zamanlı olarak gösterilmesi tekniğidir (Gibson vd., 1996). PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirme yapılan bu teknoloji, yabancı yayınlarda “kinetik PZR”, “homojen PZR”, “kantitatif real-time PZR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Bustin, 2000). Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (Kubista vd., 2006). Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PZR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı, kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları gibi özellikleri ile ayrılırlar (Kubista vd., 2001).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PZR cihazında okunan floresan miktarı da eş zamanlı olarak artar. SYBR Green I, en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder (Kubista vd., 2006). Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Baslangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış real-time cihazının monitöründen izlenebilir (Kubista vd., 2006). Bu yöntem optimize edilmiş PZR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları ise; istenmeyen PZR ürünlerinin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman

istenilen DNA'nın çoğaldığını göstermez ve yanlış pozitif sonuç verebilir. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda primer dimerleri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir ve çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin (melting curve, dissociation) yapılmasını gerektirir.

### 1.10. Önceki Çalışmalar

Nanopartiküllerin zararlı etkilerinin araştırıldığı toksikolojik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fullerenler (C<sub>60</sub>), boyutları ve fizikokimyasal özellikleri iyi bilinen nanoyapılar olmaları nedeniyle yapılan ilk çalışmaların pek çoğunda kullanılmıştır. Bu çalışmalar göstermiştir ki, memeli hayvanlara ait hücre kültürüyle karıştırılan fullerenler, hücreler oksidatif strese neden olmakta ve hücreler toksisite, yağ içerisinde meydana gelen çözünmeden kaynaklanmaktadır (Colvin, 2004; Sayes vd., 2004). Fullerenlerin yüzey alanlarının değişimi, yağlardaki alifatik ve hidroksil gruplara tutunarak çözümlerini azaltır ve bu sayede toksisitede azalma meydana gelir (Sayes vd., 2004).

Son zamana kadar NP'lerin toksisite hakındaki çalışmaların çoğu memeli hayvanlar (fare, domuz vb.) ile yapılan çalışmalardır. Bu çalışmalar özellikle, karbon nanotüpler, TiO<sub>2</sub>, kadmiyum ve metal oksit NP'lerin hayvanlardaki solunum sistemi üzerine etkilerine yöneliktir. Çalışmaların çoğu göstermiştir ki, NP'ler intratrakeal olarak hayvanlara verildiğinde önemli derecede akciğer hasarı oluşturmakta ve dokularda iltihaplanma ve fibroza neden olmaktadır (Takenaka vd., 2004; Handy ve Shaw, 2007). Fakat son yıllarda imal edilmiş NP ve nanoteknoloji ürünlerinin hızlı artışı göz önüne alınarak, NP'lerin letal ve subletal toksisite deneyleri; balıklar, omurgasızlar, sucul organizmalar ve midye gibi canlılarda da uygulanmaya başlanmıştır. Mavi midye (*Mytilus edulis*) ve deniz tarağıyla yapılan çalışmalarda NP'lerin canlılarda endositoz yoluyla sindirim sistemine geçiş yaptığı görülmüştür. Ayrıca, nano ölçekteki patiküller (sukroz polyester, sıfır kalorili besin katkıları) denizel ortamdan toplanan midyelerin tamamının hepatopankreaslarından izole edilmiştir (Moore vd., 1997).

Balıklar ve omurgasız canlılarla yapılan çalışmalarda C<sub>60</sub> fullerenler mg/L düzeylerinde toksik etki göstermektedir, fakat sonuçta elde edilen LC<sub>50</sub> değerleri NP'lerin hazırlanma metoduna ve kullanılan dağıtıcı türüne göre farklılık göstermektedir. Bu

çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, canlılar NP'lere sulu fazda maruz bırakıldığında birikim, özellikle solungaçlarda ve bağırsaklarda meydana gelmektedir. Alabalıklarda karaciğer, NP'ler için en önemli hedef organ olarak tespit edilmiş ve balıkların karaciğerlerinde önemli derecede biyokimyasal değişimlerin meydana geldiği belirlenmiştir (Kashiwada, 2006; Lovern vd., 2007). Karbon içerikli NP toksik test çalışmaları, balık beyninin de potansiyel bir hedef organ olduğunu göstermiştir. C<sub>60</sub>-NP 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 tespit edilmiştir (Oberdörster, 2004; Oberdörster vd., 2006). Zebra balığı embriyoları ile yapılan C<sub>60</sub>-NP deneylerinde perikardiyal ödem, malformasyonlarda artış ve bunun sonucunda da ölümler meydana gelmiştir (Usenko vd., 2007). Organik bir bileşik olan tetrahidrofuran (THF) ile C<sub>60</sub> karışımına maruz bırakılan larval zebra balıklarının yaşam oranlarında azalma ve kontrol grubuna oranla gen ekspresyonlarında az miktarda bir değişim tespit edilmiştir (Henry vd., 2007). Ayrıca, zebra balığı larvalarının embriyonik gelişimlerinde gecikme ve yumurtadan çıkış oranlarında da azalma meydana gelmektedir (Zhu vd., 2007).

TiO<sub>2</sub>-NP'lere maruz kalan gökkuşağı alabalıklarının beyinlerinde herhangi bir hasar oluşmamasına rağmen, solungaçlarında oksidatif stres kaynaklı hasarlar tespit edilmiştir. Bu da göstermektedir ki, beyinde bir hasarın oluşumu NP türüne bağlı olarak değişmektedir (Federici vd., 2007). Zebra balıklarında solungaç filament genişliklerinde artış görülmezken ribozomal fonksiyonda gen ekspresyonlarında değişimler tespit edilmiştir (Griffitt vd., 2009). Diğer NP'lere oranla TiO<sub>2</sub>-NP daha düşük oranda toksik etki göstermektedir. Yavru sazan balıklarıyla (*Cyprinus carpio*) yapılan deneylerde yüksek NP konsantrasyonlarında dahi ölüm görülmezken solunum sisteminde doza bağlı olarak stres oluşumu ve oksidatif stres etkisi nedeniyle süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve laktoperoksidaz enzim miktarlarında değişiklikler tespit edilmiştir (Hao vd., 2009).

Metalik NP'lerden su içerisinde kısmen çözünme özelliğine sahip olan bakır (Cu) NP'lerin zebra balıklarında 48 saatlik akut toksisite deneyi sonucunda LC<sub>50</sub> değeri 1,5 mg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca, doza bağlı olarak solungaç epitel doku proliferasyonu, birincil ve ikincil filamentlerde ödem, branşiyal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aktivitesinde inhibisyon tespit edilmiştir (Griffitt vd., 2007). Diğer bir metalik NP olan gümüş (Ag) NP'lerin balıklarda toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, golyan balığı embriyolarında 96 saat LC<sub>50</sub> değerleri 35 ve 100 nm boyutlarındaki NP'ler için sırasıyla 9,4 ve 10,6 mg/L

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca konsantrasyona bağlı olarak larva anormalliklerinde artış görülmüştür (Laban vd., 2010). Yavru gökkuşuğu alabalıkları ile yapılan biyobirikim deneylerinde en fazla Ag-NP birikiminin solungaçlarda ve karaciğerde olduğu tespit edilmiştir (Scown vd., 2010).

Şimdiye kadar yapılan nanotoksikolojik çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte pekçok organ sistemleri (iskelet kas, dalak, böbrek, kemik fonksiyonu) üzerine etkileri hakkında bilgi mevcut değildir. NP'lerin sucul organizmalarda vücut içerisindeki absorpsiyonu, dağılımı, yerleşimi, bunun yanında protein seviyeleri, metabolizma ve boşaltım üzerine etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Handy vd., 2008). Ayrıca, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres konusunda da araştırmaya gereksinim vardır. Oksidatif stres, canlı organizmalar sulu fazda NP'lere maruz bırakıldıklarında, vücutlarındaki eser element metabolizmasında bozulmaya, damar sertliğine, epitel hücrelerindeki antioksidan savunma sisteminde değişimlere ve solungaçlarda hasara sebep olmaktadır (Kashiwada, 2006; Smith vd., 2007). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, NP'ler sucul organizmalarda oksidatif stres oluşturmakta ve özellikle, oksitleyici ajanlara karşı hassaslığıyla bilinen DNA'da hasar meydana gelmektedir. Çözünebilir protein içeren tampon ile yapılan in vitro deneylerde hidrofobik NP'lerin protein fibril nükleasyon oranlarında artış meydana getirdiği tespit edilmiştir (Linse vd., 2007).

NP'in sucul omurgasızlara etkileri konusunda yapılmış birkaç çalışma mevcuttur. Su piresinin (*Daphnia magna*), ekotoksikoloji çalışmaları için standart bir organizma olduğu bilinmektedir ve bu canlı kullanılarak NP'lerin LC<sub>50</sub> değerlerini belirlemeye yönelik birkaç çalışma yapılmıştır. C<sub>60</sub> fulleren NP'lere 21 gün süreyle 5 mg/L doza kadar maruz bırakılan su pirelerinde en yüksek konsantrasyonda %40 oranında ölüm meydana gelmiştir (Oberdörster vd., 2006). Su piresi ile yapılan diğer çalışmalarda lokomotor davranışlarda değişimler tespit edilmiştir (Hund-Rinke ve Simon, 2006; Lovern vd., 2007). Ayrıca toprak solucanı, bakteri, alg ve su bitkileri (deniz nanoplanktonları, bitki hücreleri) kullanarak da NP ekotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Lyon vd., 2006; Tong vd., 2007).

### 1.11. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Özellikle sucul çevreler NP'lere maruz kalma konusunda risk altında bulunan ortamlardır. NP'in su ortamındaki davranışları, sucul organizmalar tarafından vücuda

alınma kapasitesi ve oluşabilecek potansiyel toksik etkileri konusunda halen çok az bilgi mevcuttur. NP'in çevremizde oluşturduğu risklerin belirlenebilmesi için öncelikle sucul organizmalar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Sucul ortamda organizmalar üzerindeki etkilerin anlaşılabilmesi için NP'lerin vücuda alınım mekanizması, davranışları ve maruz kalma yönteminin iyi anlaşılması gerekir. Sucul canlıların su ortamındaki muhtemel NP alınımını tahmin edilebilmek için NP'lerin su sütunundaki küme oluşturma eğilimi, uzun ömürlülüğü ve çevrede bulunan doğal organik maddelerle olan etkileşimi gibi fiziksel özelliklerinin de iyi bilinmesi gerekir.

NP'ler suda çözünme özelliğine sahip değildir, bu nedenle buldukları su ortamı hareketsiz ise tabana çökme ya da ortamda bulunan diğer materyallere tutunma eğilimindedirler. Bu yüzden nanotoksikolojik çalışmalarda geleneksel statik toksikolojik test düzenekleri kullanılamamaktadır. Dolayısıyla, nanotoksikoloji denemeleri için hareketli su ortamı sağlayan yeni bir test sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, zebra balığı larvaları kullanılarak ticari amaçla imal edilen NP'lerin yeni bir test sistemi geliştirilerek genel ekotoksikolojik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi ve moleküler genetik düzeyinde etkilerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla;

1- Kullanılan test canlılarına zarar vermeden homojen bir karışım ortamı sağlayan NP test sistemi geliştirilmesi ve çalışmasının kanıtlanması,

2- Doz-etki deneyleri yapılarak NP'lerin letal (LC<sub>50</sub>) ve subletal konsantrasyonlarının belirlenmesi,

3- Testlerde kullanılan NP'lerin parçacık büyüklüğü etkilerinin, diğer toksik maddelerle ve test suyunun özellikleri ile etkileşimlerinin belirlenmesi,

4- Testlerde kullanılan zebra balığı larvalarının gen ekspresyon değişimlerinin SYBR Green I kullanılarak real-time PZR ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

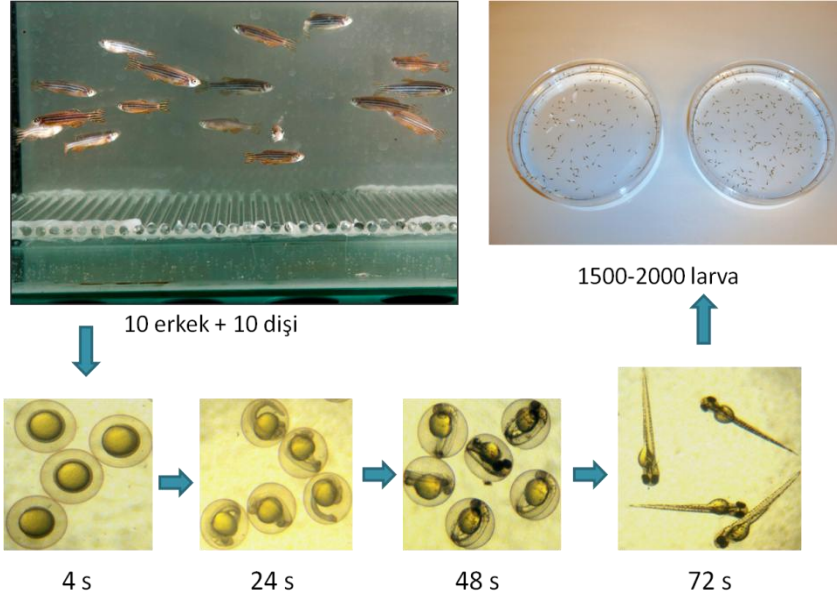
## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Nanopartiküller

Toksikolojik deneylerde karbon 60 (C<sub>60</sub>, %99,5, 1 nm; SES Research, Houston, Texas, USA), titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>, 25-30 nm; Degussa AG, Frankfurt, Almanya), bakır (Cu-NP, %99,9, <50 nm) ve gümüş (Ag-NP, %99,5, <100 nm) nanopartiküller kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler Sigma Aldrich (Steinheim, Almanya)'den temin edilmiştir.

### 2.2. Deney Balıkları

Deneylerde kullanılan 10-12 aylık damızlık zebra balıkları (*Danio rerio*) Plymouth Üniversitesi Zebra Balığı Araştırma ve Uygulama Ünitesi'nden temin edilmiştir. Damızlık zebra balıklarının 10 litrelik akvaryumlar içerisinde üremeleri sağlanmış, akvaryumların tabanına yerleştirilen cam ızgaralar yardımıyla anaç balıkların yumurtaları yemeleri engellenmiştir. Daha sonra, akvaryum tabanında biriken döllenmiş yumurtalar sifonlanarak toplanmış ve petri plaklarına aktarılmıştır (Şekil 4). 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 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 verilmiştir. Balıklar 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulamasına tabi tutulmuştur. Test suyunun sıcaklığı, pH'sı ve çözünmüş oksijen miktarları günlük olarak, toplam sertlik, nitrit, nitrat ve amonyak miktarları haftalık olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda, su sıcaklığı; 27 ± 1°C, pH; 7,2 ± 0,3, çözünmüş oksijen; 7,4 ± 0,5 mg/L, toplam sertlik; 52,02 ± 1,2 mg/L CaCO<sub>3</sub>, nitrit; <0,1 mg/L, nitrat; <20 mg/L ve toplam amonyak; <0,02 mg/L olarak ölçülmüştür.

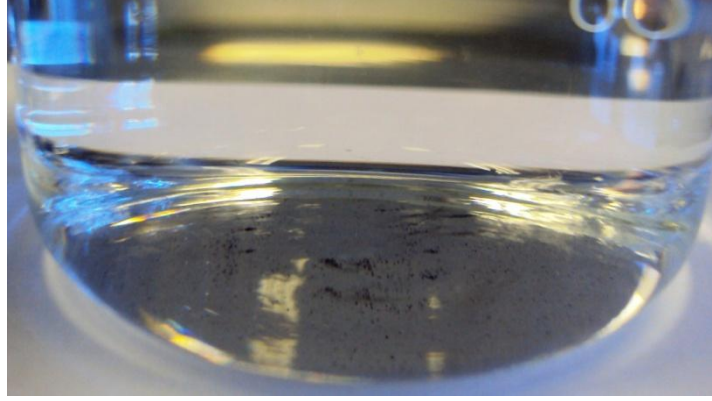


Şekil 4. Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları

### 2.3. Nanopartikül Test Sistemi Geliştirilmesi

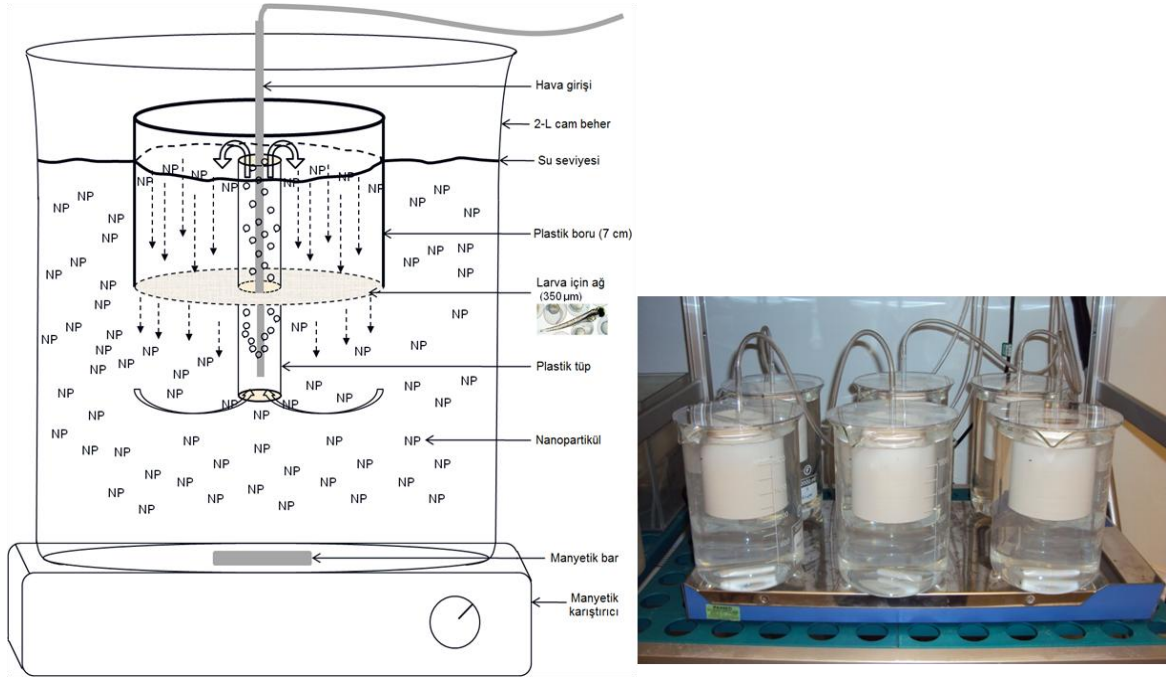
Ekonomik İşbirliği ve Kakınma Teşkilatı (OECD)'nin 210 nolu, kimyasalların letal, subletal ve kronik toksik etkilerinin belirlenmesinde erken hayat evresindeki balıkların kullanılması adlı yönergesinde “toksikolojik testlerde cam veya paslanmaz çelikten üretilmiş, hareketsiz su ortamı içeren üniteler (Şekil 5) kullanılmalı ve deney sistemi kullanılan canlıları istenmeyen ve rahatsız edici dış faktörlerden uzak tutacak şekilde dizayn edilmelidir” ifadeleri yer almaktadır (OECD, 1992). NP'ler bilinen maddelerden çok daha farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler. Buldukları sulu ortam içerisinde küme oluşturma ve tabana çökme eğiliminde olduklarından sulu fazda toksik etkilerinin araştırılmasında bu test sistemleri kullanılamaz. Bu nedenlerden dolayı toksik testler için hareketli bir ortam sağlayan, ancak test canlılarını rahatsız etmeyecek şekilde yeni bir test sisteminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.





Şekil 5. OECD 210 nolu yönergede önerilen toksikolojik test sistemi ve nanotoksikoloji testlerinde kümelenme ve sedimentasyon oluşumu

Bu çalışmada yürütülen toksikolojik deneylerde, 2 litrelik beherler, manyetik karıştırıcı ve barlar, plastik tüpler, cam çubuklar, plastik borular, küçük gözenekli ağlar, plastik plaklar, cam pastör pipetleri ve yapıştırma amaçlı silikon kullanılmıştır. Beherler içerisinde bulunan test çözeltisinin manyetik karıştırıcı vasıtasıyla düşük hızda karışması sağlanmıştır. Larvaların oluşacak dönme hareketinden etkilenmeyeceği ve içerisinde yüzebilmelerini sağlayacak şekilde beherin su yüzeyine yakın kısmına 7 cm'lik boru yerleştirilmiş ve borunun alt kısmı 350  $\mu\text{m}$ 'lik ağ ile kapatılmıştır. Sisteme hava girişi sağlamak amacıyla hava motoru, cam pastör pipeti ve plastik hortum kullanılmıştır. Ayrıca, zamanla su buharlaşmasını önlemek amacıyla sistemin üst kısmına plastik kapak konulmuştur. 24 ve 96 saatlik test süresince bu deney sistemleri kullanılmıştır (Şekil 6). Deneyler süresince su değişimi yapılmamış ve test sistemlerine herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır.



Şekil 6. Larvalara zarar vermeden dönme hareketi yaparak homojen bir NP karışım ortamı sağlayan yarı-izole toksikolojik test sistemi

#### 2.4. Test Çözeltilerinin Hazırlanması

Test çözeltilerinin hazırlanmasında ultra saf su (Milli-Q water) kullanılmıştır.  $C_{60}$ -NP denemeleri için 500 mg/L stok çözelti homojen dağılım için 10 hafta süreyle karıştırılmış ve test sularına %5, %10 ve %20 (10, 20 ve 40 mL) olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda ilave edilmiştir.  $TiO_2$ -NP denemeleri için 20 mg/mL stok çözelti hazırlanmış, homojen dağılım için 1 saat süreyle sonikasyona tabi tutulmuş ve doz-etki deneyleri için nominal konsantrasyonlar; 0, 10, 50, 100, 300, 600 ve 1000 mg/L olarak belirlenmiştir.  $TiO_2$ -NP gen ekspresyon deneyleri için; 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 10 ve 100 mg/L'lik subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. Cu-NP denemeleri için, 1 mg/mL stok çözelti (1 saat sonikasyon) hazırlanmış, doz-etki deneyleri için 0; 0,2; 0,5; 1; 3 ve 6 mg/L'lik letal ve gen ekspresyon deneyleri için; 0, 10, 20, 40, 60, 100 ve 150  $\mu$ g/L'lik subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. Ag-NP denemeleri için, 1 mg/mL stok çözelti (1 saat sonikasyon) hazırlanmış, doz-etki deneyleri için 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 ve 2 mg/L'lik letal konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Deneylerde ayrıca NP'lerin diğer toksik maddelerle olan etkileşimlerini belirlemek ve karşılaştırma yapmak amacıyla cıva klorür ( $HgCl_2$ ) ve bakır sülfat ( $CuSO_4$ )

kullanılmıştır. HgCl<sub>2</sub> için 100 mg/mL stok çözelti hazırlanmış ve gen ekspresyon deneyleri için 25 µg/L'lik subletal doz kullanılmıştır. CuSO<sub>4</sub> için 1 mg/mL stok çözelti hazırlanmış, doz etki deneyleri için 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,75 ve 1,5 mg/L'lik letal ve gen ekspresyon deneyleri için 0, 5, 10, 20, 40, 60 ve 100 µg/L'lik subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. Ayrıca, Cu<sup>+2</sup> ve Cu-NP gen ekspresyon deneylerinde test suyunun özellikleri ile olan etkileşimi araştırmak için 220 mg/L Ca<sup>+2</sup> (CaCO<sub>3</sub>) ve 5 mg/L EDTA kullanılmıştır.

## **2.5. Akut Letal ve Subletal Toksikite Testleri**

Toksikolojik deneylerde kullanılan NP'lerin letal ve subletal konsantrasyonlarını, ayrıca larvalarda meydana gelebilecek gen ekspresyon değişimlerini belirlemek amacıyla yeni geliştirilen NP test sistemleri kullanılmıştır. Testlerde herbir NP için 6 adet 2 litrelik beherler kullanılmış ve deneyler 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Toksikolojik testlerde döllenmeden 72 saat sonra yumurtadan çıkan sağlıklı larvalar, 24 ve 96 saatlik sürelerde NP'lere maruz bırakılmıştır. Test sistemlerinin herbiri içerisinde 30'ar adet larva konulmuş ve herbir deneme için kontrol grubu oluşturulmuştur. Deneyler 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. NP'ler su içerisinde homojen dağılımı sağlamak amacıyla, banyo tipi sonikatörle 1 saat sonikasyon işleminden sonra test sularına farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Doz-etki deneyleri sonunda ölü larvalar plastik pastör pipeti yardımıyla toplanarak sayılmış ve LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyon deneyleri sonucunda ise, canlı larvalar toplanarak eppendorf tüplerine alınmış ve analiz aşamasına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

## **2.6. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi**

### **2.6.1. RNA İzolasyonu**

Toplam RNA, zebra balığı larvaları bütün halde ve bir tüp içerisinde 30 adet larva olacak şekilde RNeasy mini kit (Qiagen, West Crawley, UK) 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 aktararak 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 spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak örneklerdeki RNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Spektrofotometrede ölçüm için 2 µL örnek kullanılmış, RNA konsantrasyonunun  $\geq 100$  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, Southampton, UK) 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 (GeneAmp PCR System, 9700, Applied Biosystems, Warrington, UK) 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 reaksiyon karışımı;

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

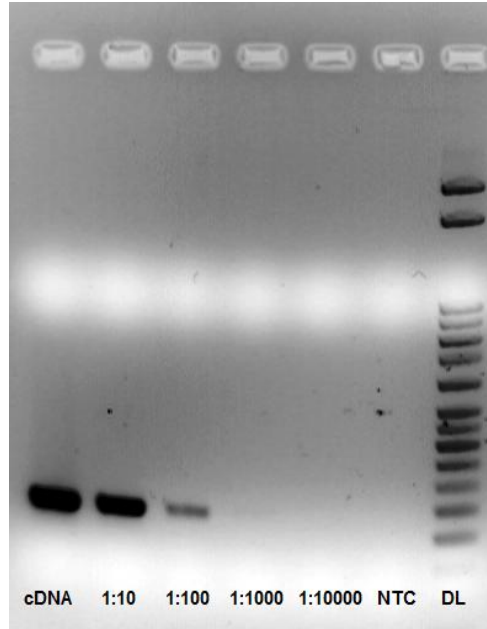
### **2.6.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT k-PZR)**

#### **2.6.3.1. Primerler**

Gen ekspresyon deneylerinde hedef gen olarak, hücre içerisinde golgi aygıtının membranında lokalize olan, metal ve ağırmetallere duyarlı ve bağlayıcı özelliği olan metallothienin-2 (MT-2) proteinini kodlayan gen seçilmiştir. Ayrıca ekspresyon değişimlerini karşılaştırmalı olarak hesaplamak amacıyla standart gen olarak, sitoiskeletal sistemde görev alan hücre yapısı, bütünlüğü ve hareketinden sorumlu beta aktin ( $\beta$ -actin) proteinini kodlayan gen seçilmiştir. Her iki gene spesifik primerler Eurofin UK'dan (Wolverhampton, UK) temin edilmiştir. Nükleotid primer dizileri ve hedef ampikon bölgesi büyüklükleri Tablo 1'de belirtilmiştir. Ayrıca, MT-2 genine ait primerlerin düzgün çalışıp çalışmadığının kontrolü amacıyla cDNA örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanarak PZR ile çoğaltılmış ve jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 7).

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer dizileri

Hedef gen	Primer	Nükleotid dizisi 5' - 3'	Amplikon büyüklüğü
MT-2	Forward	CTG CGA ATG TGC CAA GAC TGG AAC	243 bp
	Reverse	GCG ATG CAA AAC GCA GAC GT	
$\beta$ -actin	Forward	ACA CAG CCA TGG ATG AGG AAA TCG	138 bp
	Reverse	TCA CTC CCT GAT GTC TGG GTC GT	



Şekil 7. MT-2 gen primerlerinin cDNA örneklerinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra jelde yürütülerek görüntülenmesi (NTC: negatif kontrol, DL: DNA markır)

### 2.6.3.2. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Reaksiyonda kullanılacak olan mastır karışımı; forward primer, revers primer ve SYBR green (SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 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 48 kuyucuklu plak kullanılmış ve plağın kuyucuklarına 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 konulmuştur. Örneklerin pipet yardımıyla kuyucuklara konulmasından sonra plağın üzeri şeffaf film ile kapatılmış ve real-time PZR cihazına yerleştirilmiştir.

Kantitatif PZR işlemi için real-time PZR cihazı (Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Warrington, UK) 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

### 2.6.3.3. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması

Kantitatif real-time PZR reaksiyonunda kullanılan bilgisayar yazılımı (Step One Real-Time PCR Software) 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.

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

$$\Delta C_T = \text{ortalama } C_{T \text{ hedef gen (MT-2)}} - \text{ortalama } C_{T \text{ standart gen } (\beta\text{-actin})} \quad (1)$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ örnek}} - \text{ortalama } \Delta C_{T \text{ kontrol}} \quad (2)$$

$$\text{RQ (Relative quantification)} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ (gen ekspresyon değişimi)} \quad (3)$$

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.

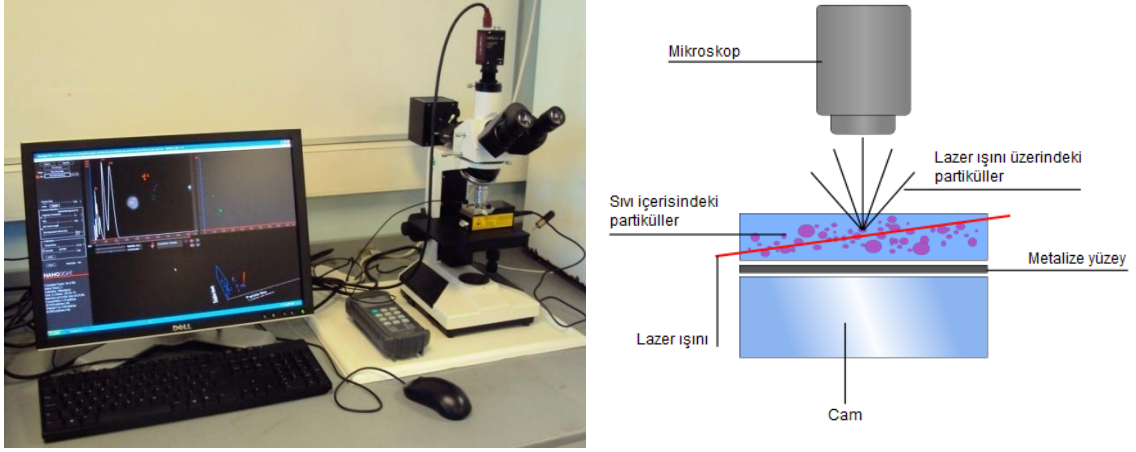
## 2.7. ICP-OES Metal Konsantrasyon Analizleri

Deneýlerde kullanılan test çözeltileri içerisindeki gerçek NP konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer, Varian 725, Mulgrave, Avustralya) kullanılmıştır. Bu amaçla test çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde su örnekleri alınmıştır. Çözeltiler içerisinde bulunan NP'lerin tamamen çözünmesi için ölçüm işleminden önce su örneklerine derişik nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ilave edilmiştir. Deneýlerde test suları içerisindeki Cu-NP, Ag-NP ve Hg<sup>+2</sup> konsantrasyonları, hazırlanan standart çözeltilere karşı ICP-OES cihazında okunarak tespit edilmiştir.

## 2.8. Nanopartikül Karakterizasyonu (NanoSight)

NP'lerin karakteristik özelliklerinin gen ekspresyon değişimleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla NanoSight (Amesbury, UK) analizi yapılmıştır. Bu amaçla; test çözeltilerinden su örnekleri alınmış, görüntüleme sistemi içerisine enjekte edilmiş ve sıvı içerisinden geçirilen lazer ışını vasıtasıyla mikroskop altında NP'lerin görüntülenmesi sağlanarak (Şekil 8) partikül büyüklüğü, partikül konsantrasyonu ve kümelenme miktarları ölçülmüştür.





Şekil 8. Nanopartikül karakterizasyon ölçüm cihazı ve çalışma prensibi şeması

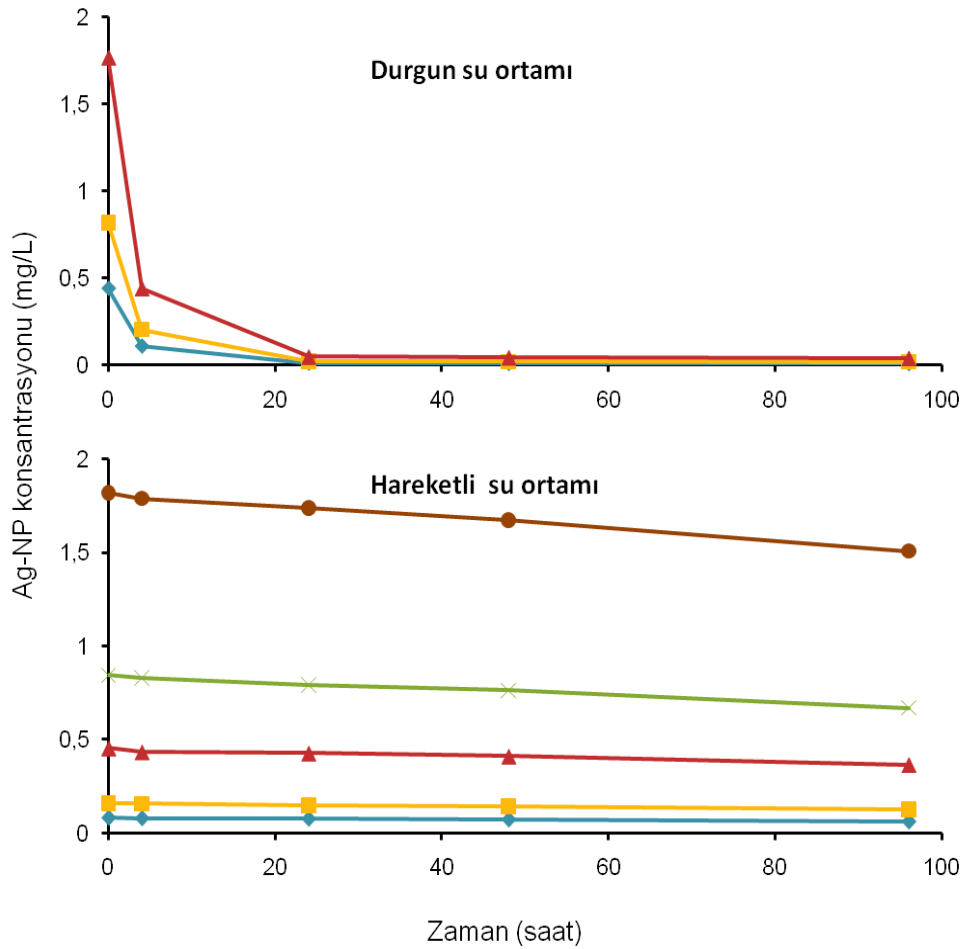
## 2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada gerçekleştirilen doz-etki deneylerinin tamamı bağımsız olarak 3 farklı zamanda tekrarlanmış ve tüm veriler ortalama standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler Statgraphics Centurion 16.1.15. (Statistical Graphics Corp., USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MT-2 gen ekspresyon düzeyleri, kontrol örneklerinin ortalamaları ile karşılaştırılarak kat değişim olarak ifade edilmiştir. Farklı test koşulları altında MT-2 ve  $\beta$ -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.  $LC_{50}$  değerleri Trimmed Spearman-Kärber (US EPA, USA) metoduyla hesaplanmıştır.

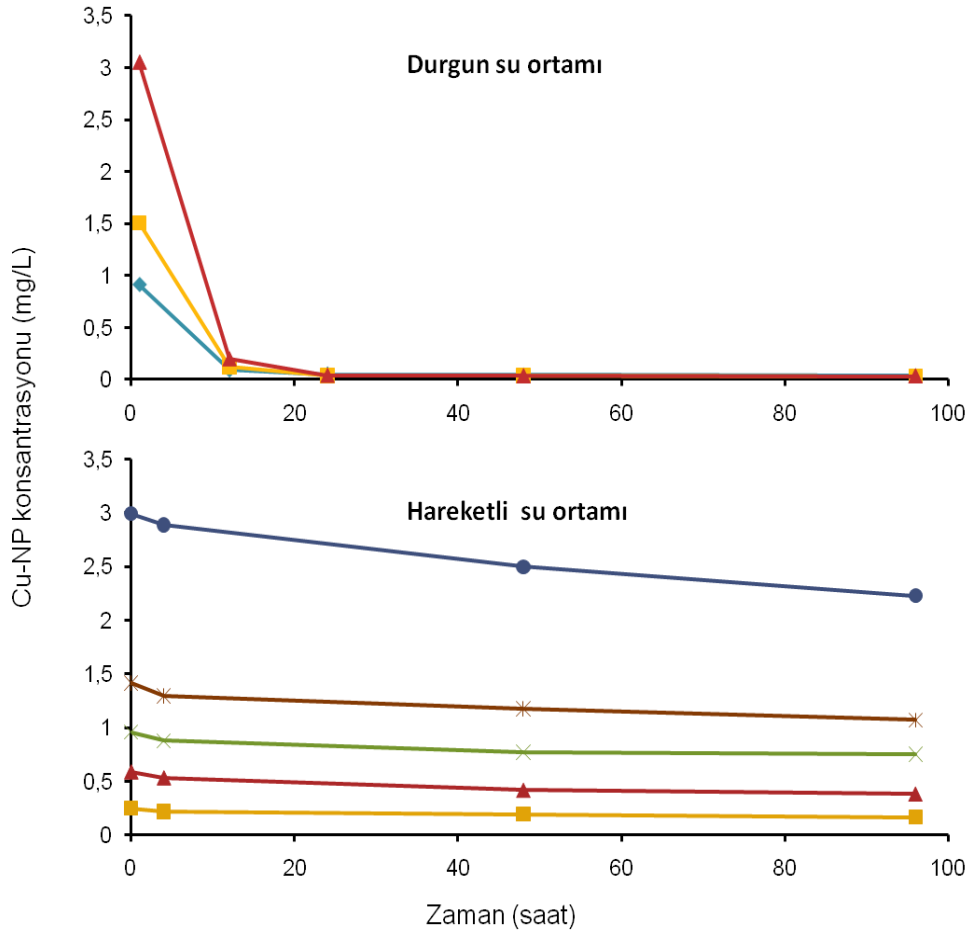
### 3. BULGULAR

#### 3.1. NP Test Sistemi ile ICP-OES Analizi ve Doz-Etki (LC<sub>50</sub>) Deneyleri

İki litrelik cam beherler ve çoklu manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir karışım ortamı sağlayan NP test sistemi geliştirilmiş ve yapılan ICP-OES metal analizleri sonucunda statik sistemde oluşan NP kaybının %95'den %20 seviyelerine kadar düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 9, 10). Yeni geliştirilen test sisteminde karışım olmasına rağmen oluşan %20'lik NP kaybının kümelenme ve kullanılan sistem elemanlarına yapışma nedeniyle olduğu düşünülmektedir.



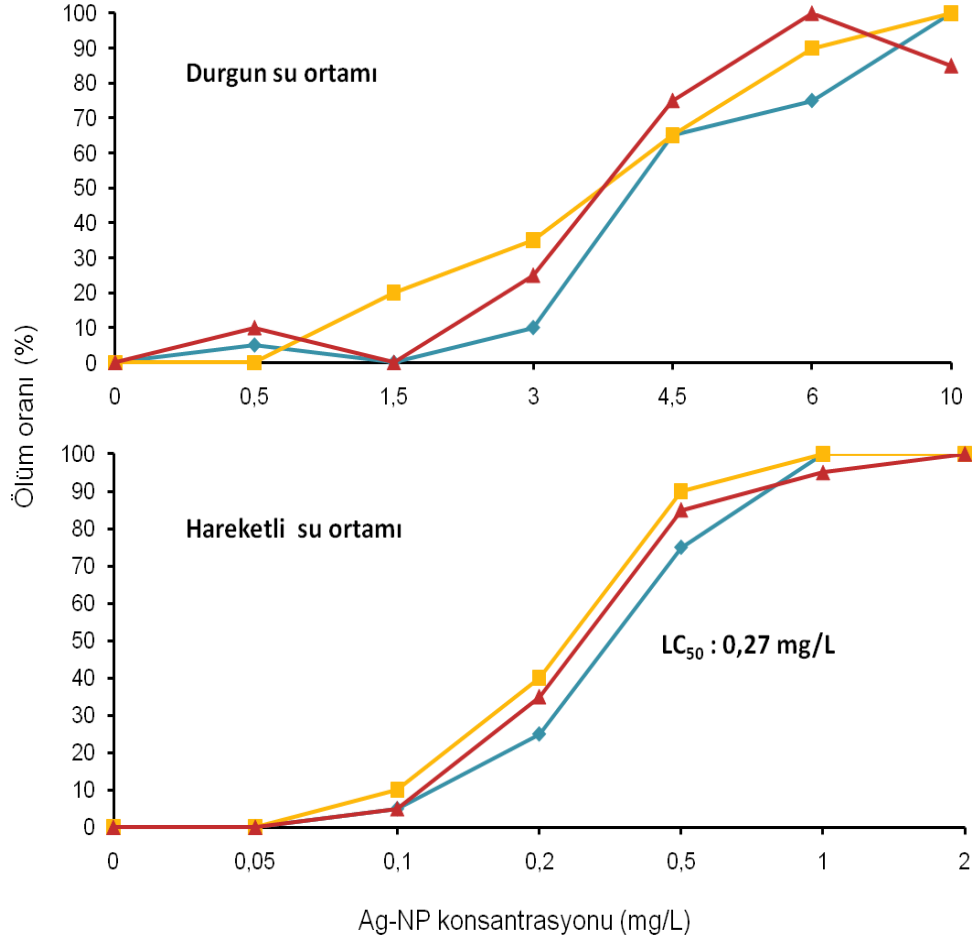
Şekil 9. ICP-OES analizi yapılarak statik ve hareketli su ortamında zamana bağlı olarak ölçülen Ag-NP konsantrasyonları



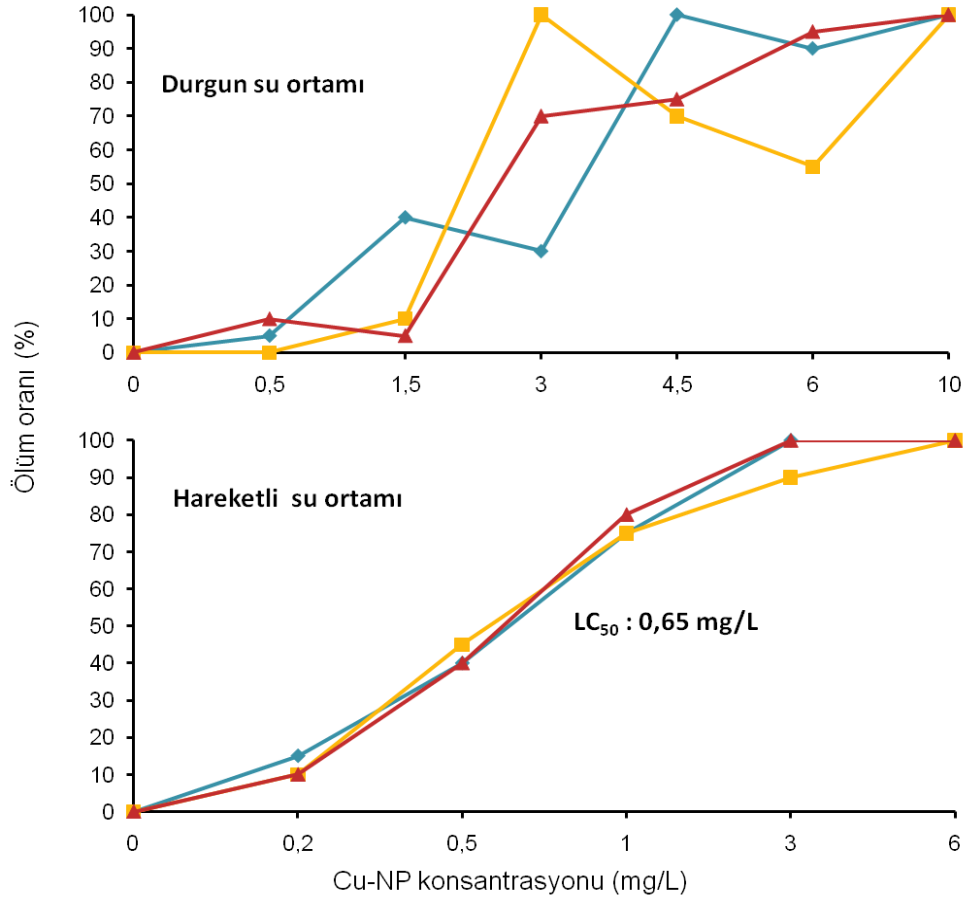
Şekil 10. ICP-OES analizi yapılarak statik ve hareketli su ortamında zamana bağlı olarak ölçülen Cu-NP konsantrasyonları

Statik test sistemi kullanılarak larval zebra balıklarıyla farklı zamanlarda gerçekleştirilen Ag ve Cu NP doz-etki deneylerinde benzer sonuçlar elde edilemezken, hareketli test sistemi ile üç farklı zamanda yapılan doz-etki deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu görülmüştür (Şekil 11, 12). Statik sistem kullanılarak yapılan TiO<sub>2</sub> NP doz-etki deneylerinde ölüme rastlanmazken hareketli test sistemi ile yapılan deneylerde ölümler görülmüştür (Şekil 13). Hareketli NP test sistemi kullanılarak yapılan doz-etki deneyleri sonucunda 96 saat LC<sub>50</sub> değerleri Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub> NP'ler için sırasıyla 0,27; 0,65 ve 897 mg/L olarak hesaplanmıştır. C<sub>60</sub>-NP'lerin kullanıldığı deneyler sonucunda larvalarda herhangi bir ölüm tespit edilmemiştir. Üç bağımsız deneyin LC<sub>50</sub> değerlerinin varyasyon katsayıları oldukça düşük olmakla birlikte Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub>-NP'ler için sırasıyla %14,81; %10,94 ve %12,69 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre yeni geliştirilen test düzeneği, sistemde oluşabilecek NP kaybını minimuma indirmekte ve farklı zamanlarda

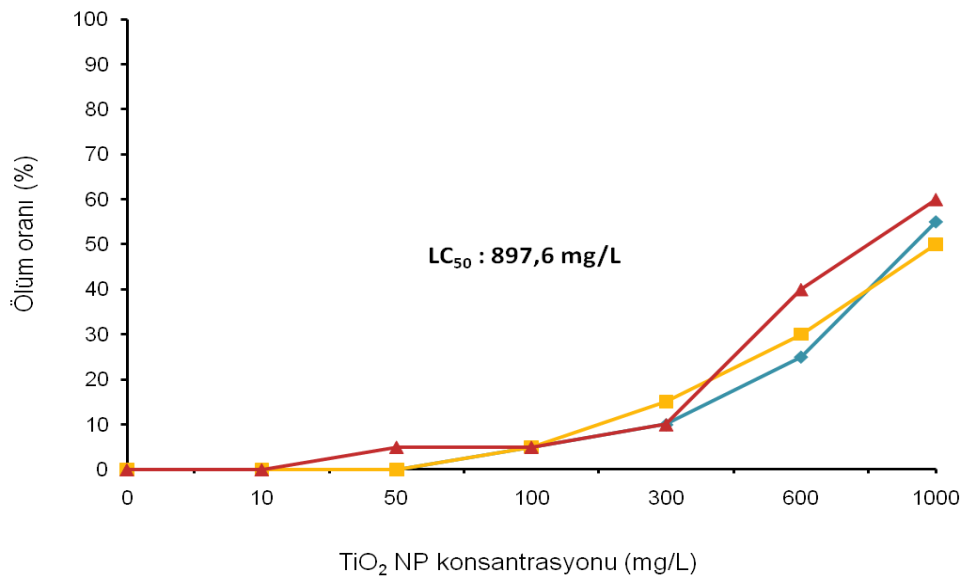
yapılan deneyler sonucunda benzer ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesine imkan tanımaktadır.



Şekil 11. Statik test sistemi ve yeni geliştirilen NP test sisteminin Ag-NP ile doz-etki deneyleri yapılarak karşılaştırılması ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları



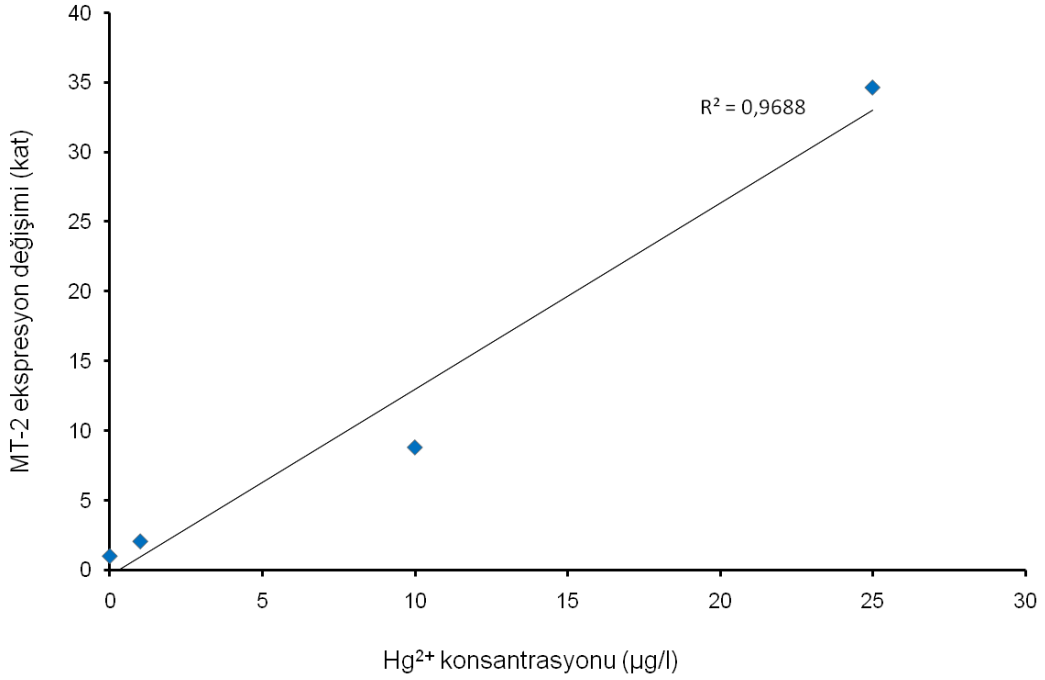
Şekil 12. Statik test sistemi ve yeni geliştirilen NP test sisteminin Cu-NP doz-etki deneyleri yapılarak karşılaştırılması ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları



Şekil 13. Yeni geliştirilen NP test sistemi kullanılarak yapılan TiO<sub>2</sub>-NP doz-etki deneyleri ve zebra balığı larvalarındaki ölüm oranları

### 3.2. C<sub>60</sub> ile Hg<sup>+2</sup>'nin Birlikte Kontaminasyon İlişkisi ve Gen Ekspresyonu

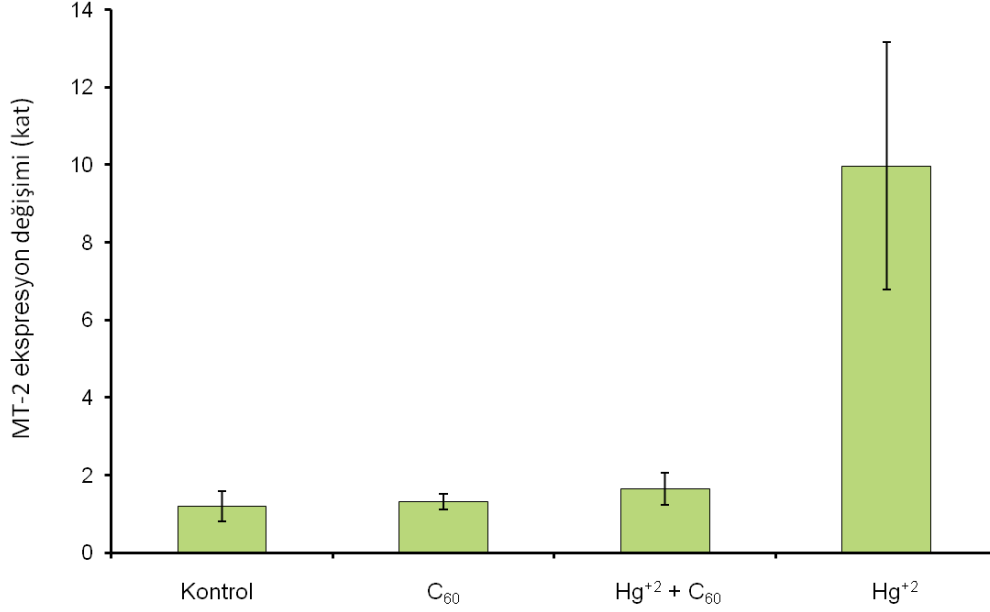
NP'ler farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı buldukları ortamlarda diğer toksik olan veya toksik olmayan maddelerle etkileşime girebilirler. Bu deneyde, çevresel bir kirlenici olan ve canlılar üzerinde yüksek toksisiteye sahip Hg<sup>+2</sup>'nin gen ekspresyon değişimleri üzerine etkileri ve NP'lerle olan etkileşimleri incelenmiştir. Farklı miktarlarda Hg<sup>+2</sup> konsantrasyonları ile yapılan MT-2 gen ekspresyon değişimlerinin regresyon analizi sonucunda, bulunan sonuçlar arasında güçlü bir lineer ilişki ( $R^2=0,9688$ ) olduğu belirlenmiş ve 25 µg/L Hg<sup>+2</sup> varlığında gen ekspresyon değişiminde kontrol grubuna oranla 35 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 14) ( $P < 0,001$ ).



Şekil 14. 24 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda Hg<sup>+2</sup>,ya maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri

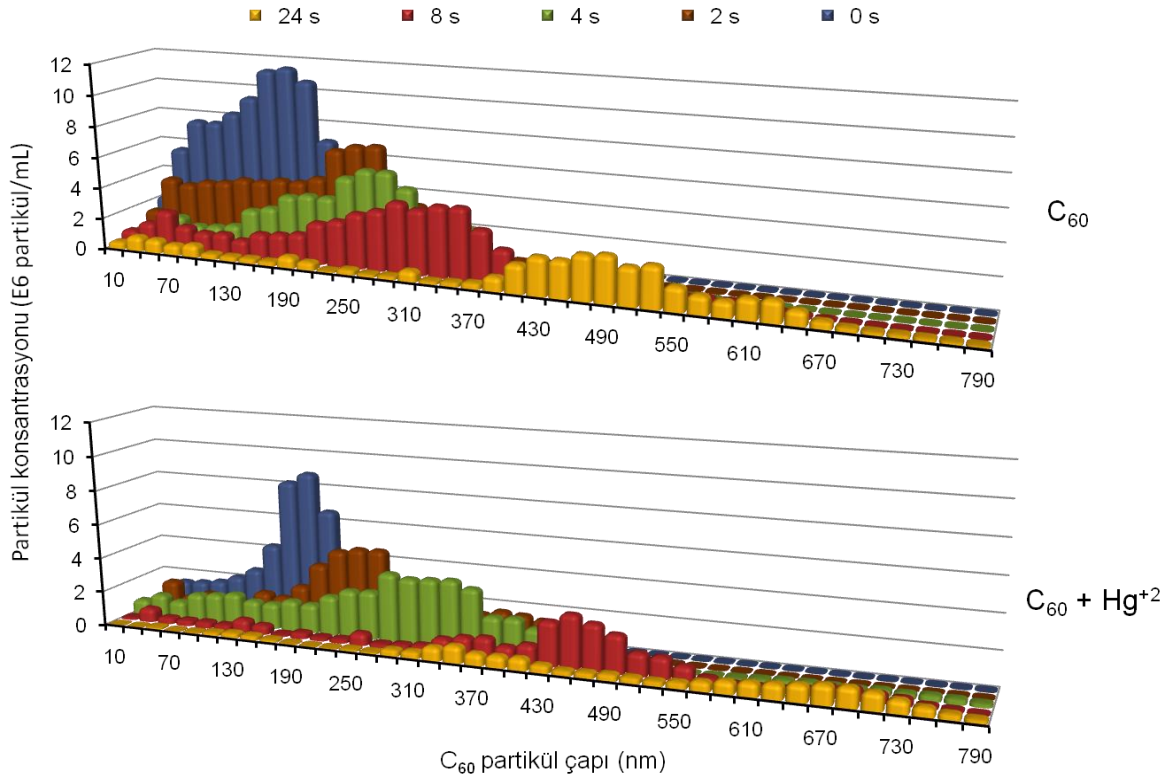
C<sub>60</sub>-NP'ün sucul ortamda Hg<sup>+2</sup> ile olan birlikte kontaminasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, sadece C<sub>60</sub>-NP'ün gen ekspresyonlarında bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. En yüksek subletal doz olan 25 µg/L Hg<sup>+2</sup>'nin MT-2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna oranla 10 kat (% 89) arttırdığı belirlenmiştir. C<sub>60</sub>-NP'ü ile Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte etkisinin incelendiği deney sonucunda ise, 50 mg/L C<sub>60</sub>-NP'ün Hg<sup>+2</sup>'nin

toksitesini gen ekspresyon değişimi açısından %84 oranında azalttığı tespit edilmiştir (şekil 15) ( $P < 0,001$ ).

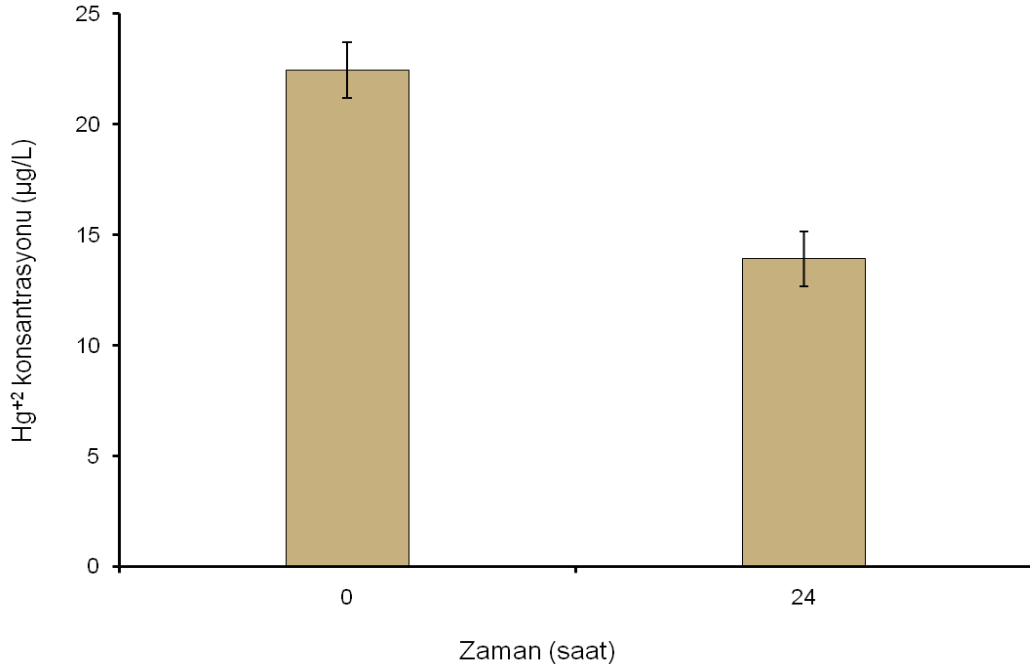


şekil 15. NP test sistemi ile 24 saat sureyle C<sub>60</sub>, Hg<sup>+2</sup> ile birlikte C<sub>60</sub> ve sadece Hg<sup>+2</sup>,ya maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarındaki değişimler

NP'ler hareketsiz su ortamlarında kumelenme ve tabana okme eğilimi göstermektedirler. Bu özelliklerinden dolayı toksisite deneyleri sonucunda çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu sorunun önüne geçilebilmesi için NP'lerin su içerisindeki davranış özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. NP'lerin bu özelliklerinin belirlenmesi amacıyla nanosight ve ICP-OES cihazları ile analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, sadece C<sub>60</sub>-NP'n bulunduğu test sularında zamana bağlı olarak su stnundaki C<sub>60</sub> miktarında kumelenme ve sedimentasyon nedeniyle bir azalma görülürken C<sub>60</sub> ve Hg<sup>+2</sup>,nın birlikte bulunduğu su ortamındaki madde miktarlarında yaklaşık olarak iki kat daha hızlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (şekil 16, 17). Elde edilen bu sonuçlara göre, C<sub>60</sub>-NP ile Hg<sup>+2</sup>,nın su içerisinde birlikte bulunduğu durumlarda, etkileşim nedeniyle kompleks bir yapı oluşturmaları ve bu sayede Hg<sup>+2</sup>,nın larvalar tarafından vcudaya alınımının önemli düzeyde azaldığı söylenebilir ( $P < 0,001$ ).



Şekil 16.  $C_{60}$ -NP'nin  $25 \mu\text{g/L}$   $Hg^{+2}$ 'nin varlığında ve yokluğunda su ortamında gösterdiği kümelenme ve sedimentasyon özelliklerinin zamana bağlı değişimi

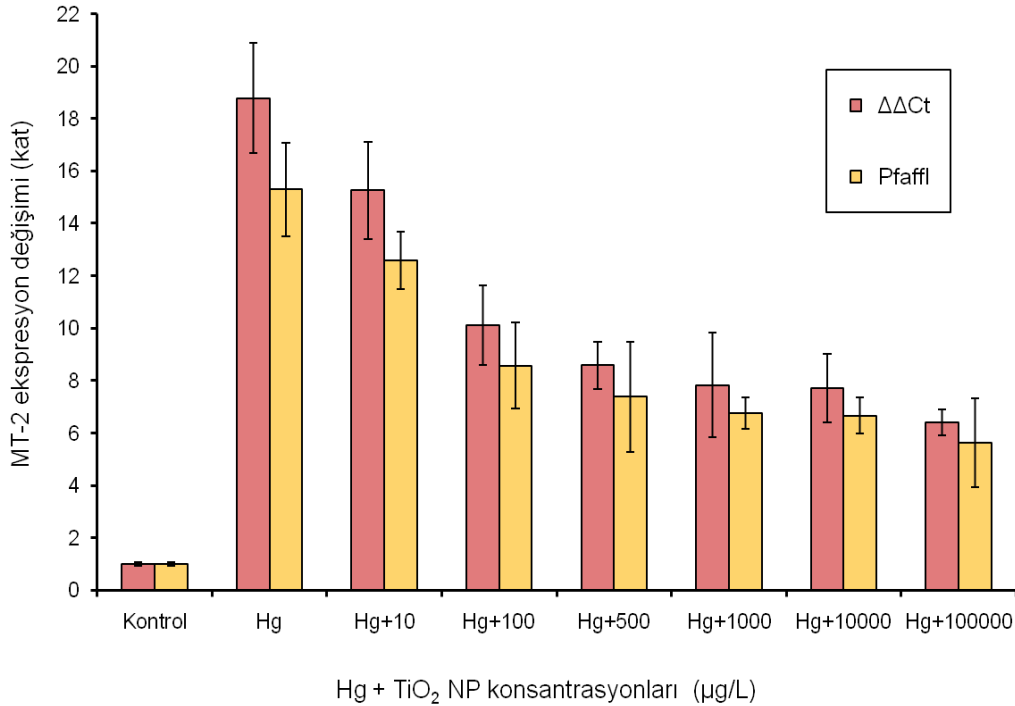


Şekil 17.  $C_{60}$ -NP ve  $Hg^{+2}$ 'nin birlikte bulunduğu su kolonunda zamana bağlı olarak etkileşim nedeniyle  $Hg^{+2}$  miktarında meydana gelen değişimler

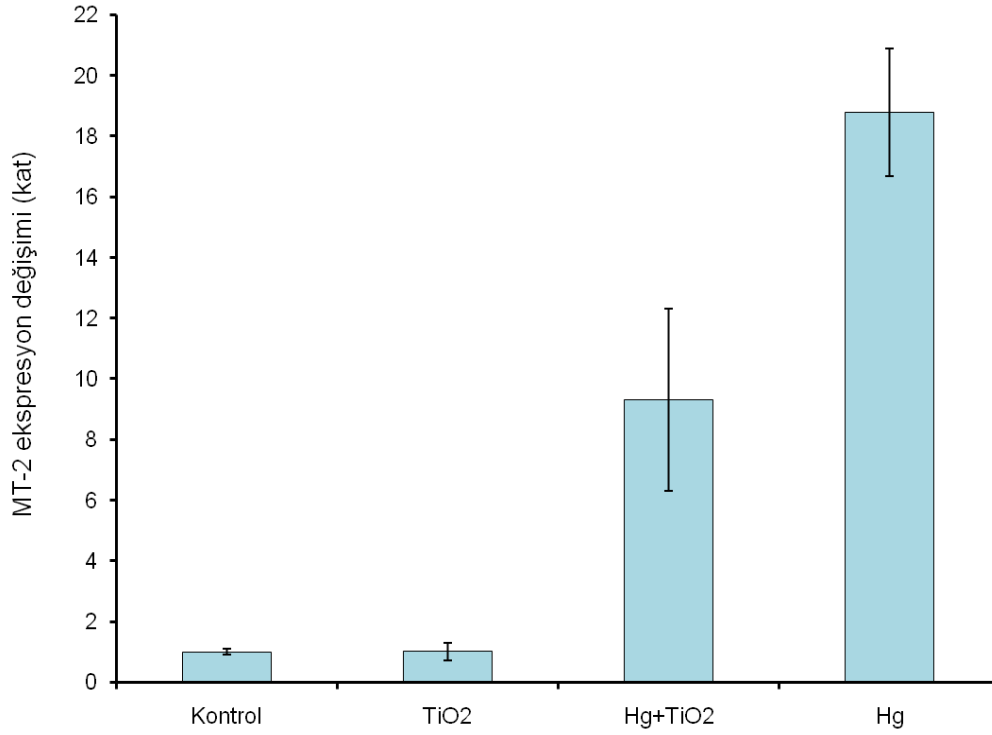


### 3.3. TiO<sub>2</sub> ile Hg<sup>+2</sup>'nin Birlikte Kontaminasyon İlişkisi ve Gen Ekspresyonu

Aynı şekilde diğer bir NP olan TiO<sub>2</sub>'in sucul ortamda Hg<sup>+2</sup> ile olan birlikte kontaminasyon ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, 24 saat süreyle 25 µg/L Hg<sup>+2</sup> ve artan miktarlarda TiO<sub>2</sub>-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında ters orantılı bir ilişki olduğu belirlenmiş, TiO<sub>2</sub>-NP konsantrasyonu artarken gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 18). Bu deneylerde ayrıca, tek başına TiO<sub>2</sub>-NP'ün gen ekspresyonlarında bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. En yüksek subletal doz olan 25 µg/L Hg<sup>+2</sup>'nin MT-2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna oranla 19 kat (%94) arttırdığı belirlenmiştir. TiO<sub>2</sub>-NP'ü ile Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte etkisinin incelendiği deney sonucunda ise, TiO<sub>2</sub>-NP'ün Hg<sup>+2</sup>'nin toksisitesini gen ekspresyon değişimi açısından %49 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 19) ( $P < 0,001$ ).

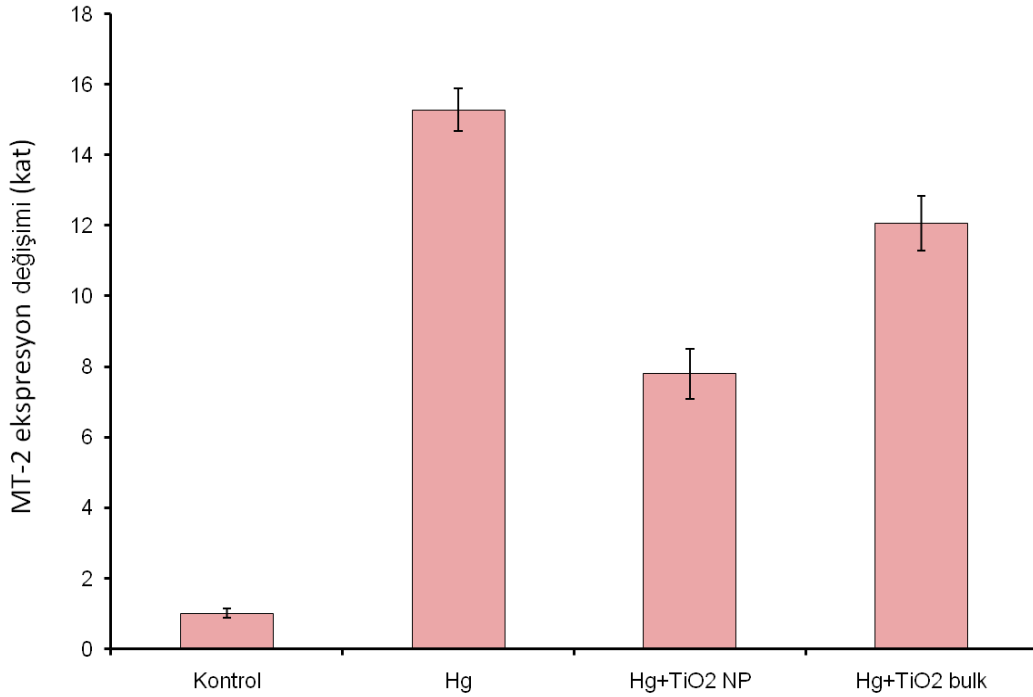


Şekil 18. Su kolonunda birlikte bulunan Hg<sup>+2</sup> ve artan konsantrasyonlarda TiO<sub>2</sub>-NP'lerin 24 saatlik test süresi sonunda zebra balığı larvalarında oluşturduğu MT-2 gen ekspresyon değişimleri



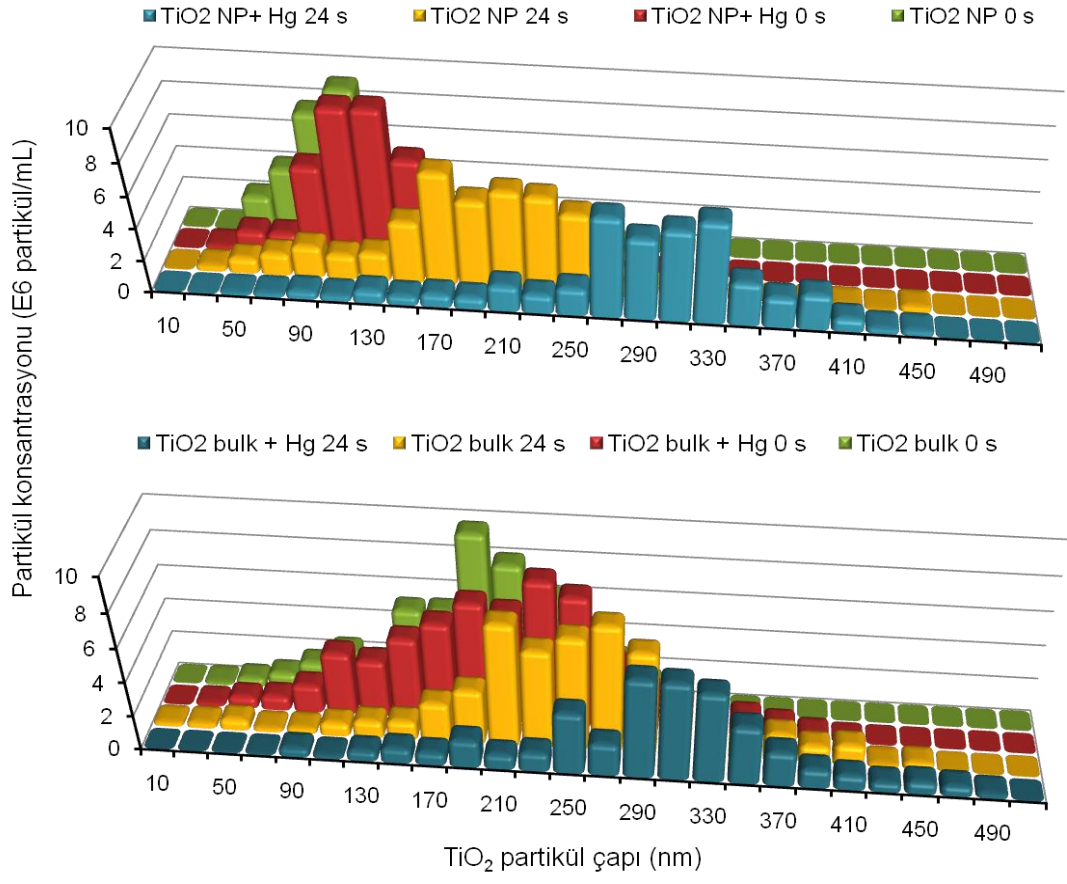
şekil 19. NP test sistemi ile TiO<sub>2</sub>-NP'lerin Hg<sup>+2</sup>'nin varlığında ve yokluğunda zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında meydana getirdiği değişimler

NP'lerin yzey alanları ve parçacık bzyklykleri de toksisite üzerinde etkili olan önemli ozelliklerdendir. NP'lerin bu etkilerinin arastırıldığı deneylerde TiO<sub>2</sub> bulk (150 nm) partikullerin yzey alanlarının kuyuk, parçacık bzyklyklerinin bzyuk olması nedeniyle NP'lere (25 nm) oranla Hg<sup>+2</sup>'nin toksisitesinin azalmasında daha az etkili oldukları tespit edilmiştir (şekil 20) ( $P < 0,001$ ).

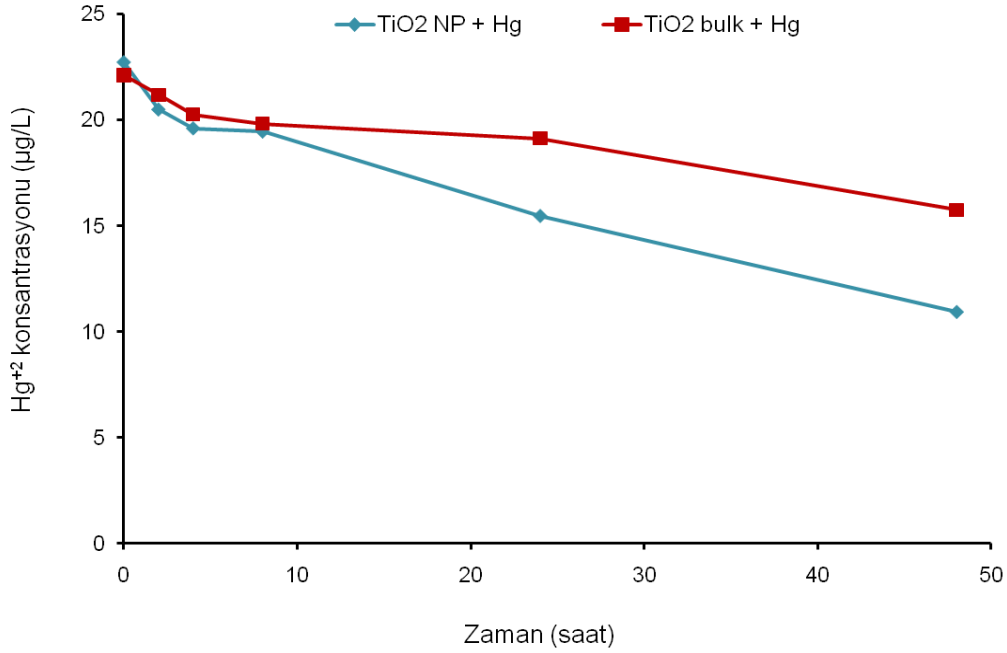


şekil 20. TiO<sub>2</sub>-NP - Hg<sup>+2</sup> karışımı, TiO<sub>2</sub> bulk partikül - Hg<sup>+2</sup> karışımı ve sadece Hg<sup>+2</sup>,ya 24 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri

TiO<sub>2</sub>-NP'ün kümelenme ve sedimentasyon özelliklerinin incelendiği deney sonuçlarında, yalnız TiO<sub>2</sub>-NP bulunan ve TiO<sub>2</sub>-NP ve Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte bulunduğu su örnekleriyle yapılan nanosight analizleri sonucunda zamana bağlı olarak su sütunundaki TiO<sub>2</sub>-NP miktarlarında kümelenme ve sedimentasyon nedeniyle önemli bir azalma tespit edilmiştir. TiO<sub>2</sub> ve Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte bulunduğu su ortamında iki maddenin miktarında da öncekine oranla daha hızlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. TiO<sub>2</sub> bulk partikülün bulunduğu su ortamında ise nispeten daha düşük oranda bir madde kaybı tespit edilmiştir (şekil 21). Ayrıca, ICP-OES analiz sonuçları, TiO<sub>2</sub>-NP'ün yüzey alanının daha fazla olması nedeniyle bulk partiküle oranla su sütunundaki Hg<sup>+2</sup> miktarında daha fazla azalmaya sebep olduğunu göstermiştir (şekil 22). Elde edilen bu sonuçlara göre, TiO<sub>2</sub>-NP ile Hg<sup>+2</sup>'nin su içerisinde birlikte bulunduğu durumlarda, etkileşim nedeniyle kompleks bir yapı oluşturmaları ve bu sayede Hg<sup>+2</sup>'nin larvalar tarafından vücuda alınımının önemli düzeyde azaldığı söylenebilir. Bunun yanında, NP'lerin toksik maddelerin etkisini azaltmada bulk partiküllere oranla daha etkili oldukları sonucuna varılabilir.



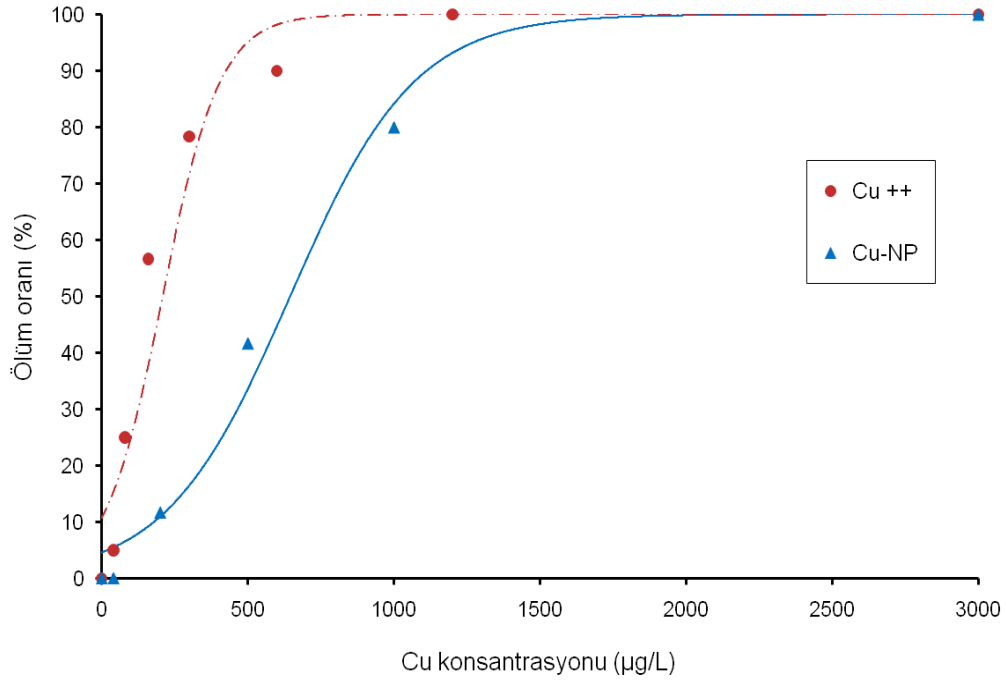
Şekil 21. TiO<sub>2</sub>-NP ve bulk partikülün Hg<sup>+2</sup>'nin varlığında ve yokluğunda su ortamında gösterdiği kümelenme ve sedimentasyon özellikleri



Şekil 22. NP test sistemi içerisinde TiO<sub>2</sub>-NP ve bulk partikül varlığında farklı Hg<sup>+2</sup> konsantrasyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler

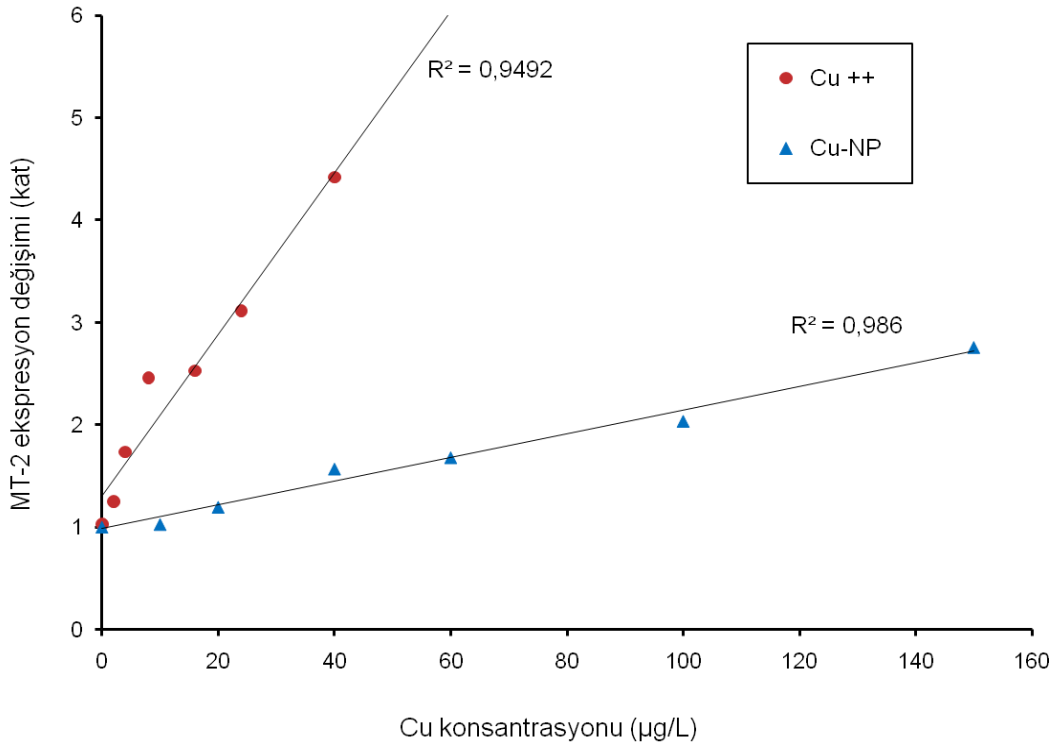
#### 3.4. Su Sertliği ve EDTA'nın Cu<sup>+2</sup> ve Cu-NP Toksisitelerine Etkisi

NP'lerin bir kısmı su içerisinde çözünme özelliğine sahip değildir. Bunun yanında, özellikle metalik NP'ler ise su içerisinde kısmen iyonlaşarak çözünebilirler. Maddelerin iyon halleriyle NP hallerinin toksisite bakımından farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla, bu çalışmada Cu<sup>+2</sup> ile Cu-NP'ler zebra balığı larvalarındaki toksisiteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, 96 saat süreyle Cu<sup>+2</sup> ve Cu-NP'ün 3 farklı zamanda yapılan doz-etki deneyleri sonucunda LC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 226 µg/l (GA:195 - 262) ve 648 µg/l (GA: 575 - 733) olarak hesaplanmıştır (Şekil 23).



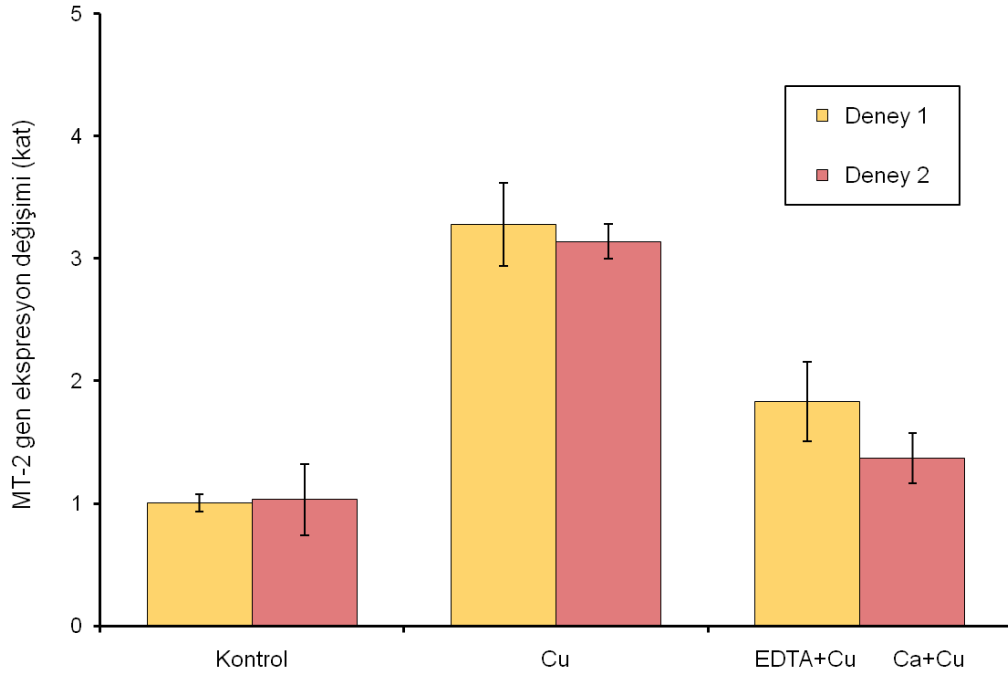
Şekil 23. NP test sistemiyle  $\text{Cu}^{+2}$  ve Cu-NP'e 96 saat süreyle maruz kalan zebra balığı larvalarının ölüm oranları

$\text{Cu}^{+2}$  ile Cu-NP'ün gen ekspresyon değişimi açısından karşılaştırıldığı deneme sonuçlarında, 96 saat süreyle her iki maddeye de maruz kalan zebra balığı larvalarında  $\text{Cu}^{+2}$ 'ın sebep olduğu gen ekspresyon artışının Cu-NP'e göre 3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, regresyon analizi sonuçları MT-2 gen ekspresyon değişimleri ile  $\text{Cu}^{+2}$  ( $R^2=0,9492$ ) ve Cu-NP ( $R^2=0,9860$ ) konsantrasyonları arasında kuvvetli bir pozitif lineer ilişki olduğunu göstermiştir (Şekil 24).



Şekil 24. 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda  $\text{Cu}^{+2}$  ve Cu-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarındaki MT-2 gen ekspresyon değışimleri

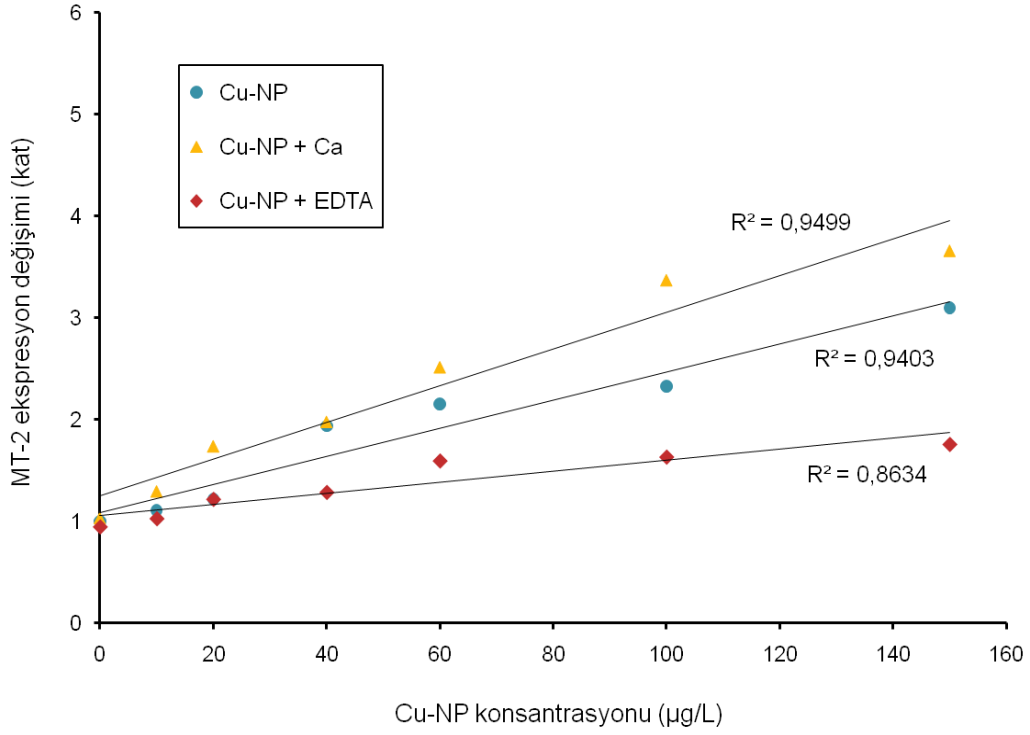
Toksik testlerde kullanılan test sularının sertliğinin ( $\text{CaCO}_3$ ) artmasıyla deneylerde kullanılan kimyasal veya metallerin toksik etkilerinin azalma eğilimi gösterdiği bilinmektedir. Aynı şekilde EDTA kullanılan test sularında da  $\text{Cu}^{+2}$  metalinin toksisitesinin azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$ 'ın toksisitesinin gen ekspresyon değışimi açısından değerlendirildiği iki farklı deney sonucunda 40  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{+2}$ 'ın zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonunu önemli derecede (3,2 kat) arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, su sertliğinin arttırılmasının (220 mg/L  $\text{CaCO}_3$ )  $\text{Cu}^{+2}$ 'ın toksisitesini %61 oranında azalttığı, aynı şekilde EDTA (5 mg/L)'nın da  $\text{Cu}^{+2}$ 'ın toksisitesini gen ekspresyonu açısından % 44 oranında düşürdüğü yapılan deneyler sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 25) ( $P < 0,001$ ). Elde edilen bu sonuçlara göre, su sistemlerindeki  $\text{Cu}^{+2}$  toksisitesinin azaltılmasında, su sertliğinin arttırılmasının EDTA kullanımına göre daha etkin bir faktör olduğu söylenebilir.



Şekil 25. 96 saat süreyle  $\text{Cu}^{+2}$ 'a maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değışimleri ve su sertliği ( $\text{CaCO}_3$ ) ve EDTA'nın ekspresyon değışimleri üzerine etkisi

MT-2 gen ekspresyon değışimleri açısından; Cu-NP'ün artan konsantrasyon serileri,  $\text{CaCO}_3$  ile Cu-NP'ün artan serileri ve EDTA ile Cu-NP'ün artan konsantrasyon serilerinin karşılaştırıldığı deney sonuçları göstermiştir ki;  $\text{CaCO}_3$  olarak sertliği yüksek olan sularda Cu-NP'ün toksisitesi artarken EDTA varlığında Cu-NP'ün toksisitesi azalma eğilimindedir (Şekil 26). Bu sonuçlara göre, bir önceki  $\text{Cu}^{+2}$  deneylerinden farklı olarak su sertliğinin artırılmasının Cu-NP'ün toksisitesini de arttırdığı söylenebilir. Bu durumun nedeninin, maddelerin NP hallerinin normal hallerinden farklı fizikokimyasal özellikler göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

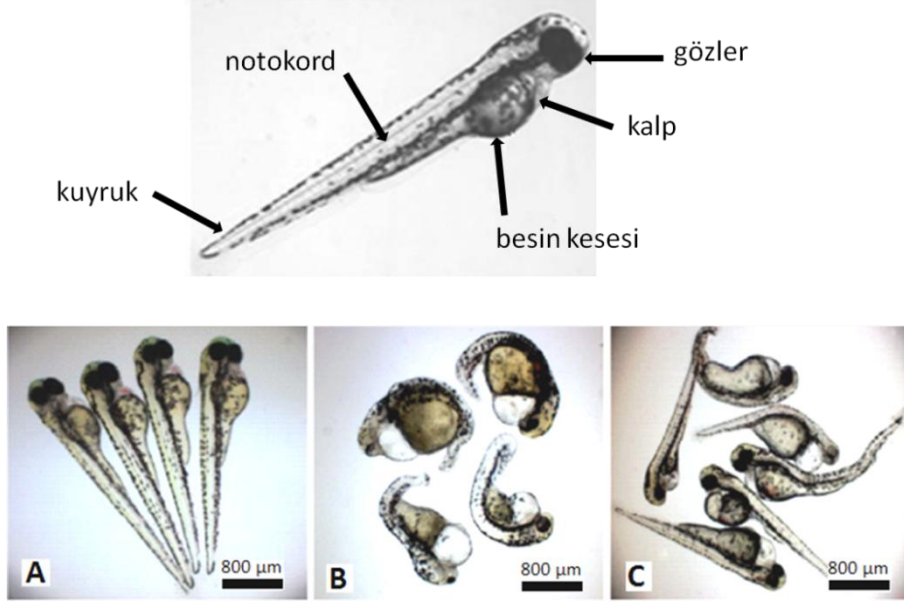




Şekil 26. 96 saat süreyle Cu-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyon değişimleri ve su sertliği (CaCO<sub>3</sub>) ve EDTA'nın ekspresyon değişimleri üzerine etkisi

### 3.5. Larva Anormallikleri

Su içerisinde kısmen iyonlaşmaları nedeniyle özellikle Ag ve Cu gibi metalik NP'ler sucul organizmalar üzerinde toksik etkilere ve bunun sonucunda da ölümlere neden olabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan NP'ler zebra balığı larvalarında genel olarak notokord eğriliği, besin kesesinde şişme ya da büzülme, kuyrukta erime gibi etkiler oluşturmakta ve ileri aşamada da ölümlerine sebep olmaktadır (Şekil 27).



Şekil 27. Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve NP'lere maruz kalan larvalarda görülen anormallikler. A: Normal larvalar, B: NP'lere maruziyet sonucu canlı kalmış fakat anormal larvalar, C: NP'lere maruziyet sonucu ölmüş larvalar

#### 4. TARTIŞMA

NP'lerin bilinen maddelerden farklı ve eşsiz özellikler göstermesi ve bu özelliklerinin iyi derecede bilinmemesi toksisite deneylerinde bazı istenmeyen durumlara sebep olabilmektedir. Bu yüzden, NP'lerin özelliklerini belirlemek için detaylı karakterizasyon çalışmaları yapılmaksızın günümüzde yapılan in vitro toksik test metotları, NP toksisite değerlendirme çalışmaları için elverişli değildir (Schulze vd., 2008). NP'lerin bilinen kimyasallardan farklı özellikler göstermesi, toksisite testlerinde kullanılan malzeme ve elemanlarla etkileşime girmelerine neden olmaktadır, bu nedenle NP risk değerlendirme çalışmalarında farklı maruz bırakma teknikleri kullanılmalı ve uygun bir kontrol sistemi oluşturulmalıdır.

Risk değerlendirmesi yapılan in vitro nanotoksikolojik çalışmalarda NP'lerin fizikokimyasal özellikleri uygun bir test sisteminin kurulmasını sınırlamaktadır. NP'lerin toksisitelerini belirlemek için kullanılan test metotları nanospesifik özelliklerden etkilenmeyecek şekilde dizayn edilmelidir (Nel vd., 2006). Bunun yanında, son zamanlarda gerçekleştirilen NP risk değerlendirme çalışmalarında kullanılan test sistemlerinin standardizasyon eksikliği nedeniyle, elde edilen sonuçlar bakımından farklı laboratuvarlar arasında önemli farklılıklar göze çarpmaktadır (Lilienblum vd., 2008). Bu çalışmada NP'ler için sulu fazda yapılması düşünülen toksisite testlerini standart hale getirecek ve farklı laboratuvarlar tarafından yapılan çalışma sonuçları arasındaki karşılaştırılabilirlik sorununu ortadan kaldıracak yeni bir test sistemi geliştirilmiştir. Yapılan değerlendirme ve doğrulama çalışmaları sonucunda, yeni geliştirilen bu test sisteminin NP'lerin spesifik özelliklerinden etkilenmediği ve genel bir in vitro toksisite test prosedür standardı oluşturduğu kanıtlanmıştır.

NP'lerin yapışkanlık ve çökelme özelliklerinden dolayı toksisite denemelerinde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle, toksisite deneylerine başlamadan önce NP'lerin karakteristik özelliklerinin dikkatli bir şekilde belirlenmesi ve risk değerlendirmesi için metot oluşturulacağı zaman ayrıntılı bir doğrulama işleminin yapılması gerekmektedir. Günümüzde NP'ler geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen NP'lerin risk değerlendirmesi ve standardize test protokolleri konusunda ulusal veya uluslararası işbirliği ya da anlaşmalar yeterli düzeyde

değildir. NP'lerin kütleleri, sayıları, yüzey alanları ve diğer ölçülerine oranla doz tanımı henüz standardize edilememiştir. Bu nedenle, NP'ler arasındaki veri ve karşılaştırma analizlerinin objektifliği günümüzde halen sorun teşkil etmekte olan bir durumdur (SCENIHR, 2007). Bu çalışmada, yeni geliştirilen ve standardize edilen test sistemleri NP-bağımlı deneysel sorunların üstesinden gelecek potansiyele sahiptir ve NP risk değerlendirmesi için yeni bir standart oluşturabilecektir. Denemelerde kullanılan C<sub>60</sub>, Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub>-NP'ler ile yapılan çalışmalar sonucunda farklı zamanlarda yapılan toksisite deneme sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu görülmüş ve deneme süresinde oluşan partikül kaybı minimum düzeye indirilmiştir.

Metallothionein (MT), bir metabolizma ürünü olan sisteinil içerisinde bulunan, düşük molekül ağırlıklı, ağır metalleri yüksek oranda bağlama kapasitesine sahip bir proteindir. MT ekspresyonu, çoklu fizyolojik uyarı ve ağır metalleri de içeren kimyasallara maruz kalma durumlarında uyarılmaktadır (Hamer, 1986; Waalkes ve Goering, 1990). Hg<sup>+2</sup> gibi ağır metallere maruz kalma durumunda, canlı organizmalarda önemli bir uyumsal tepki olarak MT-2 sentezinde artış meydana gelmektedir (Sweet ve Zelikoff, 2001). Önemli bir toksik çevresel kirletici olduğundan dolayı Hg<sup>+2</sup> araştırmaya elverişli bir metaldir. Önceki çalışmalar göstermiştir ki hayvansal organizmalarda Hg<sup>+2</sup> maruziyeti, böbrek dokusundaki MT sentezini önemli derecede arttırmaktadır (Piotrowsky vd., 1974; Cherian ve Clarkson, 1976). Bunun yanında, zebra balıklarında da Hg<sup>+2</sup> maruziyeti MT-2 ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (Chan vd., 2006). Yapmış olduğumuz çalışmalarda da önceki çalışmalara paralel olarak Hg<sup>+2</sup>'ya maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında önemli derecede artış görülmüş ve artan miktarlarda TiO<sub>2</sub>-NP varlığında da gen ekspresyonlarında önemli derecede bir azalma tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, 24 saatlik test süresince Hg<sup>+2</sup>'nin larvalar tarafından biyolojik olarak kullanılabilirliğinin, test suları içerisindeki TiO<sub>2</sub>-NP miktarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Çevresel kontaminantların NP'ler tarafından absorpsiyonu ve canlı organizma vücudunda biyolojik olarak kullanılabilirliklerindeki değişimler yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Koelman vd., 2006; Hyung vd., 2007; Knauer vd., 2007). Tawabini vd. (2010) metal iyonlarının sulu ortamda negatif yüklü NP'ler tarafından adsorbe edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da elektrostatik özelliklerinden dolayı pozitif yüklü Hg<sup>+2</sup> iyonu ve negatif yüklü TiO<sub>2</sub>-NP'lerin su ortamında etkileşime girdikleri tespit edilmiştir.

NP'ler kümelenme davranışları ve yüzey alanlarının farklılığı sayesinde, kontaminantların uzaklaştırılmasında reaktivite ve etkinlik açısından önemli bir etkiye

sahiptir (Waychunas vd., 2005; Gilbert vd., 2009; Zeng vd., 2009). TiO<sub>2</sub>-NP ile sulu fazda yapmış olduğumuz karakterizasyon çalışmaları sonucunda da, partikül yüzey alanının Hg<sup>+2</sup> ile etkileşimde önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir. TiO<sub>2</sub>-NP'ler yüzey alanlarının bulk partiküllere oranla daha büyük olması nedeniyle Hg<sup>+2</sup>'nin canlılar tarafından vücuda alınımını azaltmada daha etkilidirler. Böylece, yapılan denemeler sonucunda da sulu fazda ve Hg<sup>+2</sup> varlığında NP yüzey alanının artmasıyla MT-2 geninin ekspresyonunda 24 saatlik deneme süresi sonunda, kontrol grubuna oranla önemli bir azalma tespit edilmiştir.

Nanopartiküllerin genellikle sulu ortam içerisinde dağılımı sağlandıktan sonra toksik testler uygulanmaktadır. Bu durum, NP'lerin kümelenme ve yüzey gerilimi gibi fizikokimyasal özelliklerinin değişimine neden olmaktadır (Maynard, 2002; Powers vd., 2006; Jiang vd., 2009). Böylece, sulu fazda NP'lerin dağılım özelliklerinin belirlenmesi çevresel uygulamalar ve NP araştırmaları için büyük önem arz etmektedir. Jiang vd. (2009) titanyum ve diğer nanopartikül süspansiyonlarının karakteristik özelliklerini (hidrodinamik büyüklük, yüzey gerilimi ve kümelenme derecesi) belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda TiO<sub>2</sub>-NP'ün partikül büyüklüğü azaldıkça partikül yüzey alanının dramatik şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada yapmış olduğumuz, nano ve bulk formda TiO<sub>2</sub>'in karşılaştırma deneyi sonucunda nano formun bulk forma göre yüzey alanının fazla olması nedeniyle Hg<sup>+2</sup>'nin su sütunundaki miktarında daha fazla azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Böylece, 24 saatlik deney süresi içerisinde TiO<sub>2</sub>-NP'ün partikül çapının ve kümelenme miktarının artması nedeniyle zamana bağlı olarak Hg<sup>+2</sup>'nin larvalar tarafından vücuda alınımını azalttığı söylenebilir.

Zebra balığı larvaları Hg<sup>+2</sup>'ya maruz kaldıklarında biyolojik bir tepki olarak MT-2 geni ekspresyonlarında değişim meydana gelmektedir. Sulu fazda C<sub>60</sub>-NP varlığında Hg<sup>+2</sup>'ya maruz kalan larvalarda Hg<sup>+2</sup>'nin biyolojik olarak kullanılabilirlik miktarının bir göstergesi MT-2 geninin ekspresyonlarındaki değişimlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda da kanıtlandığı üzere, sulu fazda pozitif yüklü metal iyonlarının negatif yüklü NP'lerle (C<sub>60</sub> gibi) elektrostatik etkileşimi sonucunda su sütunundaki metal iyonlarında bir azalma meydana gelmektedir (Tawabini vd., 2010). Bu nedenle, C<sub>60</sub> kümeleri ve Hg<sup>+2</sup>'nin sulu fazda etkileşimi nedeniyle larvaların Hg<sup>+2</sup>'nin toksisitesinden daha az etkilendiği sonucuna varmak mümkündür. Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar da diğer çalışmalarda elde edilen bu sonuçlarla benzer niteliktedir. Bütün maruz bırakma deneylerindeki test ve kontrol gruplarında, larvalar test sisteminin tabanında yerleşme eğilimi göstermektedirler. Aynı şekilde C<sub>60</sub>-NP'ler de hareketsiz su ortamlarında farklı

boyutlarda kümelenerek tabana çökmektedirler. Yapılan çalışmalarda, C<sub>60</sub>-NP'lerin tabana çökme oranının kümelenme büyüklüğü ve test çözeltileri içerisinde başlangıçta bulunan partikül konsantrasyonları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle balıklar kullanılarak yapılan araştırma sonuçlarında hareketsiz test ortamlarında C<sub>60</sub>-NP ve Hg<sup>+2</sup>'nin birleşerek tabana çökmesiyle MT-2 gen ekspresyonlarında azalma olduğu tespit edilmiştir (Avdeev vd., 2004). Bütün bu değerlendirmeler ışığında, elde edilen bulgular C<sub>60</sub> ve TiO<sub>2</sub>-NP'lerin potansiyel bir adsorbant yüzeyine sahip olmaları sayesinde, suların kontamine olmasına neden olan Hg<sup>+2</sup> iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılmasına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle, C<sub>60</sub> ve TiO<sub>2</sub>-NP'lerin çevresel kontamine suların ıslahında ve arıtılmasında önemli faydalar sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada da C<sub>60</sub> ve TiO<sub>2</sub>-NP'lerin varlığında sulu fazda diğer metal iyonlarının zebra balığı larvaları tarafından biyolojik olarak kullanılabilirliği benzer analizlerle değerlendirilmiş ve daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını doğrulayıcı nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

$\beta$ -actin geninin ekspresyon düzeylerinin hiçbir durumda değişiklik göstermemesi hedef (MT-2) genin 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,  $\beta$ -actin'in larvaların farklı gelişim aşamalarında en fazla ifade edilen gen olduğunu ve ekspresyonun en yüksek ve en sabit düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir.

Bütün NP'ler çok küçük boyutlara sahip olduklarından dolayı (<0,1  $\mu$ m), kolaylıkla çevrenin kirlenmesine sebep olabilmekte ve insanlar ve diğer canlılar için risk oluşturabilmektedirler (Griffitt vd., 2007; Lanone vd., 2009). Bu nedenle, NP'lerin potansiyel toksik etkilerinin ve en fazla hangi NP'ün çevreye daha büyük zarar verdiğinin araştırılması ve açıklığa kavuşturulması giderek artan öneme sahip olmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda, Cu-NP'lerin zebra balığı larvaları üzerindeki etkileri biyomarkör bir gen olan MT-2 ekspresyon değişimleri değerlendirilerek araştırılmış ve suda çözünebilir iyon hali olan Cu<sup>+2</sup> ile toksisite açısından karşılaştırılmıştır. Ayrıca, CaCO<sub>3</sub> olarak su sertliğinin artırılmasının ve su içerisindeki EDTA varlığının Cu<sup>+2</sup> ve Cu-NP'ün toksisiteleri üzerine etkileri zebra balıklarındaki MT-2 geninin ekspresyon değişimleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. 96 saat süreyle gerçekleştirilen akut toksisite deneylerinde Cu-NP ile Cu<sup>+2</sup>'nin LC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırıldığında Cu-NP'ün daha düşük toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Cu-NP ve Cu<sup>+2</sup> ile daha önce yapılan toksisite

çalışmalarından elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir (Griffitt vd., 2007; Lanone vd., 2009). Elde edilen bu sonuçlara göre, zebra balığı larvalarında iyon haldeki Cu ile nano haldeki Cu arasındaki toksisite farkının Cu-NP'ün farklı fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklandığı söylenebilir.

Cu-NP ve Cu<sup>+2</sup>, zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında önemli derecede bir artışa neden olmuş ve gen ekspresyon artışının Cu<sup>+2</sup>'a maruz kalan larvalarda 2,9 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Daha fazla ekspresyon artışının, iyon haldeki Cu'ın zebra balığı larvalarında daha fazla birikim oluşturmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bilindiği üzere Cu'ın larvalar tarafından vücuda alınımı, su yoluyla solungaçlara geçerek ve bağırsaklardan emilim yoluyla gerçekleşmektedir (Minghetti vd., 2010). Zebra balığı larvaları besin kesesine sahip olduklarından Cu'ın bağırsaklardaki emilimi minimum düzeyde olmaktadır. Cu'ın zebra balığı solungaçlarından sadece çözülmüş haldeki Cu<sup>+2</sup> olarak değil aynı zamanda nano Cu olarak da geçebildiği rapor edilmiştir (Griffitt vd., 2007). Ayrıca, deniz suyunda pH ve tuzlu bileşenlerin değişmesinin de Cu'ın çözünürlüğünü arttırdığı bilinmektedir (Palmer ve Benezeth, 2008). Canlı vücudundaki Cu tutulumu geni olan CTR1 geni ve ATP7A ve G genlerinin ekspresyonu dahi vücut içerisindeki Cu akışını ve dengesini sağlamak için arttırılmaktadır (Chen vd., 2011). Benzer şekilde, yapılan bu çalışmalarda da Cu-NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarının vücutlarındaki Cu birikiminin, iyon haldeki Cu<sup>+2</sup>'a maruz kalan larvalardaki birikimden daha az olduğu, MT-2 gen ekspresyonları arasındaki farklılıklar değerlendirilerek tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında yapılan testlerden elde edilen sonuçlar CaCO<sub>3</sub> olarak su sertliğinin arttırılmasının, Cu<sup>+2</sup>'ın larvalar üzerindeki toksisitesinin azalmasına ve Cu-NP'ün ise toksisitesinin artmasına neden olduğunu göstermiştir. Cu'ın bu iki form arasındaki toksisite farkının NP'lerin sahip oldukları farklı fizikokimyasal özelliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanında, su sertliğinin Cu'ın balıklara olan toksisitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve yumuşak sularda Cu'ın toksisitesinin sert sulardakine oranla daha yüksek olduğu söylenebilir. Biyotik ligand modelleri (örn., balıklar) üzerindeki bağlanma bölgeleri için, kalsiyumun (Ca) Cu ile rekabetine oranla daha önemli bir sertlik katyonu olduğu düşünülmektedir. Örneğin, yapılan birkaç çalışma sonucunda görülmüştür ki Ca sertliği, hem balıklar için (Erickson vd., 1996; Welsh vd., 2000; Naddy vd., 2002; Terzi ve Verep, 2012), hem de omurgasız hayvanlar (De Schemphelaere ve Janssen, 2002; Naddy vd., 2002) için kimyasal ve metal toksisitesi

açısından koruyucu bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak Ca, canlıların hayatta kalabilmesi için gerekli olan temel bir elementtir. Bunun yanında, Ca'un balıklardaki Cu-biyotik ligand bağlanma bölgeleri için kimyasal olarak rekabete giren önemli bir katyon olduğu düşünülmektedir.

EDTA da sucul organizmalarda metallerin biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkilediği bilinen diğer bir kimyasal maddedir (Khangarot, 1981). Yapılan bu çalışma sonucunda  $Cu^{2+}$  ve Cu-NP'lerin bulunduğu su ortamlarına EDTA ilave edildiğinde Cu toksisitesinin ve MT-2 gen ekspresyonlarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, EDTA'nın test suyu içerisindeki  $Cu^{+2}$  iyonlarıyla bağlanıp, su içerisinden çok az miktarda serbest iyon çıkışını sağlayarak ve bu sayede metallerin larvalar tarafından vücuda alınım oranını azaltarak kalıcı bir EDTA-iyon ( $Cu^{+2}$ ) değişim kompleksi oluşturduğunu göstermektedir. EDTA gibi su içerisinde muhtemel metal toksisitesini azaltan maddeler, sadece birikme sonucu oluşan Cu'ı değil aynı zamanda Cu gibi vücut içerisinde varolan, canlı için gerekli ve fizyolojik öneme sahip olan eser elementleri de ortadan kaldırmaktadır. *Lepistes (Poecilia reticulata)* balıkları kullanılarak yapılan bazı çalışmalar, EDTA'nın kompleks bir yapı oluşturması nedeniyle Cu'ın toksisitesinde önemli derecede azalma meydana geldiğini açıkça göstermiştir (Khangarot, 1981). Bu çalışmalar ayrıca diğer toksisiteden koruyucu maddelerin, salmonid türlerinde de Cu ve çinkoya (Zn) karşı etkili bir koruma sağladığını göstermiştir (Sprague vd, 1965). Sodyum sitrat, sodyum tiyosülfat vb. anti-kirletici maddelerin, Cu tuzlarının toksisitesini önemli derecede azalttığı (Shaw ve Brown, 1974), bunun yanında EDTA'nın metal toksisitesini azaltmada en etkili madde olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (Sprague vd., 1965).

NP'lerin sanayide yaygın şekilde kullanılması, onların çevresel etkileri konusunda belirsizliklere neden olmaktadır. Metal NP'lerin su içerisinde kısmen çözünebilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle, kirletici özelliği olan metallerden üretilmiş NP'lerin balıklarda toksik etkilerinin biyomarkır gen ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirilerek araştırılması büyük önem arz etmektedir (Klaine vd., 2008). Yapılan bu toksisite denemelerinde doza bağlı olarak  $Cu^{2+}$  ve Cu-NP'lerin, MT-2 geninin mRNA düzeylerinde değişimlere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu genler kendi işlevsel özelliklerinin yanı sıra, çevresel Cu kirliliğinin izlenmesi için de potansiyel biyomarkırlar olarak görev yapmaktadırlar. Sonuç olarak,  $Cu^{+2}$  ile Cu-NP'ün zebra balığı larvalarında toksisitelerini karşılaştırdığımız çalışmalarda  $Cu^{+2}$ 'ın  $LC_{50}$  değerinin Cu-NP'e oranla çok



daha düşük (daha toksik) olduğu belirlenmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$ 'in larvalardaki toksisitesi ve MT-2 gen ekspresyonlarındaki değişimler su sertliğinin arttırılmasıyla azalmış, fakat Cu-NP uygulanan larvalarda su sertliğinin arttırılmasıyla toksisite ve gen ekspresyon değişimlerinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca, su içerisinde EDTA varlığında  $\text{Cu}^{+2}$  ile Cu-NP'ün toksisiteleri ve gen ekspresyon değişimlerinde azalma eğilimi görülmüştür. Suda çözünebilen iyon haldeki Cu için varolan çalışmalar ve düzenlemeler, metalik NP'lerle 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.

Günümüz bilim insanları nano ölçekli ürünlerin geliştirilmesinin bilime, sağlık sektörüne ve teknolojiye faydalı olacağı konusunda hemfikirdirler, 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 iç ilişkisinin geliştirilmesi, uygun ekotoksikolojik çalışmaların geliştirilmesini kolaylaştıracak, çevresel zararların belirlenmesini ve önlenmesini sağlayacaktır.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, yeni bir NP test sistemi geliştirilerek C<sub>60</sub>, TiO<sub>2</sub>, Cu ve Ag NP'lerin zebra balığı larvalarıyla doz-etki deneyleri yapılmış, NP'lerin letal (LC<sub>50</sub>) ve subletal konsantrasyonları belirlenerek MT-2 proteinini kodlayan genin ekspresyonundaki değişimler, Sybergreen yöntemiyle ve Real-time PZR aracılığıyla analiz edilmiştir. Bunun yanında, NP'lerin karakteristik özellikleri belirlenerek Hg<sup>+2</sup>, su sertliği (CaCO<sub>3</sub>) ve EDTA ile su ortamındaki etkileşimleri incelenmiştir.

Kullanılan test canlılarına zarar vermeden homojen bir karışım ortamı sağlayan NP test sistemi için, iki litrelik cam beherler ve çoklu manyetik katıştırıcılar kullanılmıştır. Yapılan ICP-OES metal analizleri sonucunda statik sistemde oluşan NP kaybının %95 düzeyinden %20 seviyelerine kadar düştüğü tespit edilmiştir. NP'lerin letal (LC<sub>50</sub>) ve subletal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla statik test sistemi ile larval zebra balıkları için doz-etki deneylerinde benzer sonuçlar elde edilemezken, yeni test sistemi ile üç farklı zamanda tekrarlanan doz-etki deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu görülmüştür. Yapılan deneyler sonucunda 96 saat LC<sub>50</sub> değerleri Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub> NP'ler için sırasıyla 0,27; 0,65 ve 897 mg/L olarak hesaplanmıştır. Farklı zamanlarda gerçekleştirilen bağımsız deneylerin LC<sub>50</sub> değerlerinin varyasyon katsayıları oldukça düşük olmakla birlikte Ag, Cu ve TiO<sub>2</sub>-NP'ler için sırasıyla %14,81; %10,94 ve %12,69 olarak hesaplanmıştır.

Testlerde kullanılan NP'lerin parçacık büyüklüğü etkilerinin, diğer toksik maddelerle ve test suyunun özellikleri ile etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmalarda, artan miktarlarda Hg<sup>+2</sup> konsantrasyonları ile yapılan MT-2 gen ekspresyon değişimlerinin regresyon analizi sonucunda, bulunan sonuçlar arasında güçlü bir lineer ilişki ( $R^2 = 0,9688$ ) olduğu belirlenmiştir. En yüksek subletal doz olan 25 µg/L Hg<sup>+2</sup>'nin MT-2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna oranla 10 kat (%89) arttırdığı tespit edilmiştir ( $P < 0,001$ ).

C<sub>60</sub>-NP'ler ile Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte etkisinin araştırıldığı gen ekspresyon deneyleri sonucunda C<sub>60</sub>'ın Hg<sup>+2</sup>'nin toksisitesini %84 oranında azalttığı belirlenmiştir. Sadece C<sub>60</sub> bulunan ve C<sub>60</sub> ve Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte bulunduğu su örnekleriyle yapılan nanosight ve ICP-OES analizleri sonucunda zamana bağlı olarak su sütunundaki C<sub>60</sub> miktarında kümelenme ve sedimentasyon nedeniyle bir azalma görülürken C<sub>60</sub> ve Hg<sup>+2</sup>'nin birlikte bulunduğu su ortamında iki maddenin miktarında da daha hızlı bir azalma tespit edilmiştir ( $P < 0,001$ ). Elde edilen bu sonuçlara göre, C<sub>60</sub> ile Hg<sup>+2</sup>'nin su içerisinde kompleks bir yapı oluşturması

ve bu oluşum nedeniyle  $Hg^{+2}$ 'nin larvalar tarafından vücuda alınımının önemli düzeyde azaldığı düşünülmektedir.

24 saat süreyle 25  $\mu g/L$   $Hg^{+2}$  ve artan miktarlarda  $TiO_2$ -NP'e maruz kalan zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonlarında ters orantılı bir ilişki olduğu belirlenmiş,  $TiO_2$ -NP konsantrasyonu artarken gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Partikül yüzey alanının toksisite üzerine etkisinin araştırıldığı deneylerde  $TiO_2$  bulk partikülün NP'e oranla  $Hg^{+2}$ 'nin toksisitesini önlemede daha az etkili olduğu tespit edilmiştir. Sadece  $TiO_2$ -NP bulunan ve  $TiO_2$ -NP ve  $Hg^{+2}$ 'nin birlikte bulunduğu su örnekleriyle yapılan nanosight analizleri sonucunda zamana bağlı olarak su sütunundaki  $TiO_2$ -NP miktarında kümelenme ve sedimantasyon nedeniyle bir azalma görülürken  $TiO_2$ -NP ve  $Hg^{+2}$ 'nin birlikte bulunduğu su ortamında iki maddenin miktarında da daha hızlı bir azalma tespit edilmiştir. ICP-OES analizi sonuçları,  $TiO_2$ -NP'lerin yüzey alanlarının daha fazla olması nedeniyle bulk partiküle oranla su sütunundaki  $Hg^{+2}$  miktarında daha fazla azalmaya sebep olduğunu göstermiştir ( $P < 0,001$ ).

96 saat süreyle  $Cu^{+2}$  ve Cu-NP'ün 3 farklı zamanda yapılan doz-etki deneyleri sonucunda  $LC_{50}$  değerleri sırasıyla 226  $\mu g/l$  (195 - 262) ve 648  $\mu g/l$  (575 - 733) olarak hesaplanmıştır. Regresyon analiz sonuçları, MT-2 gen ekspresyon değişimleri ile  $Cu^{+2}$  ( $R^2 = 0,9492$ ) ve Cu-NP ( $R^2 = 0,9860$ ) konsantrasyonları arasında kuvvetli bir pozitif lineer ilişki olduğunu göstermiştir. Bu deneylerde ayrıca  $Cu^{+2}$ 'in sebep olduğu gen ekspresyon artışının Cu-NP'e göre 3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

İki farklı deney sonucu 40  $\mu g/L$   $Cu^{+2}$ 'in zebra balığı larvalarının MT-2 gen ekspresyonunu önemli derecede artırdığını göstermiştir. Ayrıca su sertliği ( $CaCO_3$ ) ve EDTA'nın (5 mg/L)  $Cu^{+2}$ 'in toksisitesini gen ekspresyonu açısından önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir ( $P < 0,001$ ). MT-2 gen ekspresyon değişimleri açısından; Cu-NP artan konsantrasyon serileri,  $CaCO_3$  ile Cu-NP artan serileri ve EDTA ile Cu-NP artan konsantrasyon serilerinin karşılaştırıldığı deney sonuçları göstermiştir ki;  $CaCO_3$  olarak sertliği yüksek olan sularda Cu-NP'ün toksisitesi artarken EDTA varlığında Cu-NP'ün toksisitesi azalma eğilimindedir. NP'lerin subletal dozlarının zebra balığı larvalarında notokord eğriliğine ve besin keselerinde dezenformasyona sebep oldukları tespit edilmiştir. Günümüzde NP'lerin su ortamındaki davranışları, organizmalar tarafından vücuda alınma mekanizması ve potansiyel toksik etkileri konusunda halen çok az bilgi mevcuttur. Yapılan bu çalışma, NP'lerin çevremizde oluşturduğu risklerin tespit edilebilmesine kolaylık sağlayabilecek ve gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutabilecektir.

## 6. 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.

NP'lerin çevresel düzeylerinin günümüzde çok düşük seviyelerde olduğu düşünülmekle 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.

NP'lerin ekosistemlerde izleyecekleri yolların tanımlanmasında ve etkilerinin belirlenmesinde küme oluşturma ve sedimantasyon özelliklerinin açıklığa kavuşturulması gerekir. Yapılacak çalışmalarda NP'lerin 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 NP'lerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli bulgular sağlayabilir. Av-avcı ilişkisi içinde olan canlılarla yürütülecek kronik testler vasıtasıyla uzun vadede NP'lerin izleyeceği yollar ve besin zincirinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutabilecektir.

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

## 7. KAYNAKLAR

- Altinok, I., 2004. Toxicity and Therapeutic Effects of Chloramin-T for Treating *Flavobacterium columnare* Infection of Goldfish, Aquaculture, 239, 47-56.
- Altinok, I., Capkin, E. ve 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.
- APHA/AWWA/WEF, 1992. Standart Metods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1.
- Arnold, H., Pluta, H.J. ve 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.
- Atamanalp, M., 2004. Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Yayınlanmamış.
- Avdeev, M.V., Khokhryakov, A.A., Tropin, T.V, Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Derevyanchenko, L.I., Rosta, L., Garamus, V.M., Priezzhev, V.B., Korobov, M.V. ve Aksenov, V.L., 2004. Structural Features of Molecular-Colloidal Solutions of C60 Fullerenes in Water by Small-Angle Neutron Scattering, Langmuir, 20, 4363-4368.
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sanchez, A. ve Puentes, V., 2009. Evaluation of the Ecotoxicity of Model Nanoparticles, Chemosphere, 75, 850-857.
- Boxall, A.B.A., Chaundhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B. ve 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.
- Braunbeck, T. ve Appelbaum, S., 1999. Ultrastructural Alterations in the Liver and Intestine of Carp (*Cyprinus carpio*) Induced Orally by Ultra-low Doses of Endosulfan, Diseases of Aquatic Organisms, 36,3, 183-200.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute Quantification of mRNA Using Realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays, Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193.
- Buzea, C., Blandino, I.P. ve Robbie, K., 2007. Nanomaterials and Nanoparticles, Sources and Toxicity Biointerphases 2, 4, 17-172.

- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P. ve Frabetti, F., 2011. Identification of Housekeeping Genes Suitable for Gene Expression Analysis, Gene Expression Patterns, 11, 271-276.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P. ve Cheuk, W.K., 2006. Metallothionein Gene Expression in Zebrafish Embryo-Larvae and ZFL Cell-Line Exposed to Heavy Metal Ions, Marine Environmental Research, 62, 83-87.
- Chen, D., Zhang, D., Yu, J.C. ve Chan, K.M., 2011. Effects of Cu<sub>2</sub>O Nanoparticle and CuCl<sub>2</sub> on Zebrafish Larvae and a Liver Cell-Line, Aquatic Toxicology, 105, 344-354.
- Cherian, M.G. ve Clarkson, T.W., 1976. Biochemical Changes in Rat Kidney on Exposure to Elemental Mercury Vapor: Effect on Biosynthesis of Metallothionein, Chemico-Biological Interactions, 12, 109-120.
- 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. ve Owen, R., 2008. Ecotoxicity Test Methods and Environmental Hazard Assessment for Engineered Nanoparticles, Ecotoxicology, 17, 421-437.
- Çıracı, S., 2005. Nanoteknolojinin Doğuşu: Türkiye’de Nanoteknoloji, Bilim ve Teknik, 8.
- Daughton, C.G., 2004. Non-Regulated Water Contaminants: Emerging Research, Environmental Impact Assessment Review, 24, 711-732.
- De Schemphelaere, K.A.C. ve Janssen, C.R., 2002. A Biotic Ligand Model Predicting Acute Copper Toxicity for *Daphnia magna*: The Effects Of Calcium, Magnesium, Sodium, Potassium, and pH, Environmental Science & Technology, 36, 48-54.
- Dobrovolskaia, M.A. ve McNeil, S.E., 2007. Immunological Properties of Engineered Nanomaterials, Nature Nanotechnology, 2, 469-478.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C., Kreyling, W. ve Borm, P.J.A., 2004. Nanotoxicology, Occupational and Environmental Medicine, 61, 727-728.
- 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.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, Jr.H.P. ve Leonard, E.N., 1996. The Effects of Water Chemistry on the Toxicity of Copper to Fathead Minnows, Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 181-193.

- FAO, 1987. Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shorterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247, Roma.
- Federici, G., Shaw, B.J. ve 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.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. ve Williams, P.M., 1996. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR, Genome Research, 6, 995-1001.
- Gilbert, B., Ono, R.K., Ching, K.A. ve Kim, C.S., 2009. The Effects of Nanoparticle Aggregation Processes on Aggregate Structure and Metal Uptake, Journal of Colloid and Interface Science, 339, 285-295.
- Goldman, L. ve Coussens, C., 2005. Implications of Nanotechnology for Environmental Health Research, Environmental Health Sciences, Research and Medicine, 70, 6-9.
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. ve Clesceri, L.S., 1985. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D. ve Barber, D.S., 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles, Toxicological Science, 107, 404-415.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C. ve Barber, D.S., 2008. Effects of Particle Composition and Species on Toxicity of Metallic Nanomaterials in Aquatic Organisms, Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 1972-1978.
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D. ve Barber, D.S., 2007. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio rerio*), Environmental Science & Technology, 41, 8178-8186.
- Guzman, K.A., Taylor, M.R. ve Banfield, J.F., 2006. Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding, Environmental Science & Technology, 40, 1401-1407.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein, Annual Review of Biochemistry, 55, 913-951.
- Handy, R.D. ve 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.
- Handy, R.D., Owen, R. ve Valsami-Jones, E., 2008. The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current Status, Knowledge Gaps, Challenges, and Future Needs, Ecotoxicology, 17, 315-325.

- Hao, L., Wang, Z. ve Xing, B., 2009. Effect of Sub-Acute Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Oxidative Stress and Histopathological Changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Sciences, 21, 1459-1466.
- Henry, T.B., Menn, F.M., Fleming, J.T., Wilgus, J., Compton, R.N. ve Sayler, G.S., 2007. Attributing Effects of Aqueous C<sub>60</sub> Nano-Aggregates to Tetrahydrofuran Decomposition Products in Larval Zebrafish by Assessment of Gene Expression, Environmental Health Perspectives, 115, 1059-1065.
- Hund-Rinke, K. ve Simon, M., 2006. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles TiO<sub>2</sub> on Algae and Daphnids, Environmental Science and Pollution Research, 13, 225-232.
- Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B. ve Kim, J.H., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase, Environmental Science & Technology, 41, 179-184.
- Jiang, J., Oberdörster, G. ve Biswas, P., 2009. Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies, Journal of Nanoparticle Research, 11,1, 77-89.
- Ju-Nam, Y. ve Lead, J.R., 2008. Manufactured Nanoparticles: An Overview of Their Chemistry, Interactions and Potential Environmental Implications.
- Kashiwada, S., 2006. Distribution of Nanoparticles in the See-Trough Medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives, 114, 1697-1702.
- Khangarot, B. S., 1981. Chelating Agent EDTA Decreases the Toxicity of Copper to Fish, Current Science, 50, 246-248.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., Mclaughlin, M.J. ve Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability, and Effects, Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 1825-1851.
- 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.
- Knauer, K., Sobek, A. ve Bucheli, T.D., 2007. Reduced Toxicity of Diuron to the Freshwater Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in the Presence of Black Carbon, Aquatic Toxicology, 83, 143-148.
- Koelman, A.A., Jonker, M.T.O., Cornelissen, G., Bucheli, T.D., Van Noort, P.C.M. ve Gustafsson, Ö., 2006. Black Carbon: The Reverse of Its Dark Side, Chemosphere, 63, 365-377.



- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. ve Schnekenburger, J., 2009. Current In Vitro Methods in Nanoparticle Risk Assessment: Limitations and Challenge, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 72, 370-377.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J. ve Lind, K., 2006. The Real-Time Polymerase Chain Reaction, Molecular Aspects of Medicine, 27, 95-125.
- Kubista, M.A., Stalberg, A. ve Bar, T., 2001. Light-Up Probe Based Real-Time Q-PCR. In: Raghavachari, R., Tan, W., eds., Genomics and Proteomics Technologies. 1st ed. Proceedings of SPIE, 53-58.
- Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W. ve Sepulveda, M.S., 2010. The Effects of Silver Nanoparticles on Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Embryos, Ecotoxicology, 19, 185-195.
- Lanone, S. ve Boczkowski, J., 2006. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms, Current Molecular Medicine, 6, 651-663.
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. ve 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.
- Laufer, B. ve Nation, P.A., 1999. Vocabulary-Size Test of Controlled Productive Ability, Language Testing, 16, 36-55.
- Leblond, V.S., Bisson, M. ve 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.
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H. ve 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.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. ve 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.
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W.F., Lynch, I. ve Lindman, S., 2007. Nucleation of Protein Fibrillation by Nanoparticles, Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 8691-8696.

- Loomis, T.A., 1978. Essentials of Toxicology, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R. ve 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.
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C. ve 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.
- Mark, R., Wiesner, P.E. ve Bottero, J., 2007. Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials, Inc. McGraw-Hill, 231-331.
- Maynard, A.D., 2002. Experimental Determination of Ultrafine TiO<sub>2</sub> De-Agglomeration in Surrogate Pulmonary Surfactant - Preliminary Results, Annals of Occupational Hygiene, 46, 197-202.
- Minghetti, M., Leaver, M.J. ve 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.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment, Environmental International, 32, 967-976.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Soverchia, C., Haigh, S.D. ve 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.
- Moore, M.N., 1990. Lysosomal Cytochemistry in Marine Environmental Monitoring, Histochemical Journal, 22, 187-191.
- Mueller, N.C. ve Nowack, B., 2008. Exposure Modelling of Engineered Nanoparticles in The Environment, Environmental Science & Technology, 42, 4447-4453.
- Naddy, R.B., Stubblefield, W.A., May, J.R., Tucker, S.A. ve Hockett, J.R., 2002. The Effect of Calcium and Magnesium Ratios on the Toxicity of Copper to Five Aquatic Species in Freshwater, Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 347-352.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. ve Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel, Science, 311, 622-627.
- Nowack, B. ve Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in The Environment, Environmental Pollution, 150,1, 5-22.

- Nowak, B., 1992. Histological Changes in Gills Induced by Residues of Endosulfan, Aquatic Toxicology, 23, 65-83.
- O'Connell, M.J., 2006. Carbon Nanotubes Properties and Applications, Boca Raton London New York USA, 18-31.
- Oberdörster, E., 2004. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass, Environmental Health Perspectives, 112, 1058-1062.
- Oberdörster, E., Zhu, S.Q., Blickley, T.M., Clellan-Green, P. ve Haasch, M.L., 2006. Ecotoxicology of Carbon-Based Engineered Nanoparticles: Effects of Fullerene (C-60) on Aquatic Organisms, Carbon, 44, 1112-1120.
- Oberdörster, G., Stone, V. ve Donaldson, K., 2007. Toxicology of Nanoparticles: A Historical Perspective, Nanotoxicology, 1, 2-25.
- OECD, 1992. Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for The Testing of Chemicals: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, No: 210.
- Palmer, D.A. ve Benezeth, P., 2008. Solubility of Copper Oxides in Water and Steam. In: 14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto, 491-496.
- Pascoe, D. ve Edwards, R.W., 1989. Aquatic Eco.: Fundamental Concepts and Methodologies. Volume II. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, 203, 93-126.
- Pelkmans, L. ve Helenius A., 2002. Envocytosis via caveolae, Traffic, 3, 311-320.
- Perez, S., Farre, M. ve Barcelo, D., 2009. Analysis, Behaviour and Ecotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials in the Aquatic Environment, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28, 820-832.
- Piotrowsky, J.K., Trojanowska, B., Wisniewska-Knypl, J.M. ve Bolanowska, W., 1974. Mercury Binding in the Kidney and Liver of Rats Repeatedly Exposed to Mercury Chloride: Induction of Metallothionein by Mercury and Cadmium, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27, 11-19.
- Powers, K.W., Brown S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M. ve 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.
- Pritchard, D.K., 2004. Literature review explosion hazards associated with nanopowders.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M. ve Forman, H.J., 2005. Glutathione, Stress Responses, and Redox Signaling in Lung Inflammation, Antioxidants & Redox Signaling, 7, 42-59.

- Rahman, I., 2000. Regulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells, Biochemical Pharmacology, 60, 1041-1049.
- Rand, G.M., 1995. Fundamentals of Aquatic Tox., Second Edition, ISBN 1-56032-090-7.
- Reiman, J., Oberle, V., Zuhom, I.S. ve Hoekstra, D., 2004. Size-Dependant Internalization of Particles Via the Pathways of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis, Biochemical Journal, 377, 159-169.
- Sayes, C.M., Fortner, L.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M. ve Ausman, K.D., 2004. The Differential Cytotoxicity of Water Soluble Fullerenes, Nanoletters, 4, 1881-1887.
- Saygı, Ş., Deniz, G., Kutsal, O. ve 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.
- 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.
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.M., Schäfer, U.F., Becker, K., Schnekenburger, J., Schulze Isfort, C., Landsiedel, R. ve Wohleben, W., 2008. Not Ready to Use-Overcoming Pitfalls When Dispersing Nanoparticles in Physiological Media, Nanotoxicology, 2, 51-61.
- 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. ve Tyler, C.R., 2010. Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout, Toxicological Sciences, 115, 521-534.
- Shaw, T.L. ve Brown, V.M., 1974. The Toxicity of Some Forms of Copper to Rainbow Trout, Water Research, 8, 377-382.
- Smedes, F., 1994. Sampling And Partition of Neutral Organic Contaminants in Surface Waters with Regard to Legislation, Environmental Quality and Flux Estimations, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 57, 215-229.
- Smedsrud, T., Dannevig, B.H., Tolleshaug, H. ve Berg. T., 1984. Endocytosis of A Mannoseterminated Gglycoprotein and Formaldehyde-Treated Human Serum

- Albumin in Liver and Kidney Cells from Fish (*Salmo alpinus* L.), Developmental & Comparative Immunology, 8, 579-588.
- Smith, C.J., Shaw, B.J. ve 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.
- Sprague, J.B., Elson, P.F., ve Saunders, R.L., 1965. Sublethal Copper-Zinc Pollution in A Salmon River - A Field and Laboratory Study, International Journal of Air and Water Pollution, 9, 531-543.
- Suter, L., Babiss, L.E. ve Wheeldon, E.B., 2004. Toxicogenomics in Predictive Toxicology in Drug Development, Chemistry & Biology, 11,2, 161-171.
- Sweet, L.I. ve Zelikoff, J.T., 2001. Toxicology and Immunology of Mercury: A Comparative Review in Fish and Humans, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 4, 161-205.
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Schulz, H., Ziesenis, A., Schramel, P. ve Heyder, J., 2004. Fate and Toxic Effects of Inhaled Ultrafine Cadmium Oxide Particles in the Rat Lung, Inhalation Toxicology, 16, 83-92.
- Tawabini, B., Al-Khaldi, S., Atieh, M. ve Khaled, M., Assessing the Efficiency of Locally Produced Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) in Treating Water Contaminated with Mercury, Proceedings of Enviro Arabia 2010 Conference, Manama, Bahrain, 18-21 April 2010.
- Terzi, E. ve Verep, B., 2012. Effects of Water Hardness and Temperature on the Acute Toxicity of Mercuric Chloride on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Toxicology and Industrial Health, 28,6, 499-504.
- TÜBİTAK Nanoteknoloji Strateji Grubu, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi, 2004, Ankara, Türkiye.
- Tong, Z., Bischoff, M., Nies, L., Applegate, B. ve Turco, R.F., 2007. Impact of Fullerene (C60) on A Soil Microbial Community, Environmental Science & Technology, 41, 2985-2991.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. ve Schins, R.P.F., 2007. Cellular Response to Nanoparticles: Target Structures and Mechanisms, Nanotoxicology, 1, 52-71.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L. ve Tanguay, R.L., 2007. In Vivo Evaluation of Carbon Fullerene Toxicity Using Embryonic Zebrafish, Carbon, 45, 1891-1898.
- Ünsal, M., 1998. Kirlilik Deneyleri-Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi-T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No:11.168s.

- Vural, N., 1996. Toksikoloji, A.Ü.Ecz.F. Yayınları No: 73, Ankara, A.Ü. Basımevi, 1-20.
- Waalkes, M.P. ve Goering, P.L., 1990. Metallothionein and Other Cadmium Binding Proteins: Recent Developments, Chemical Research in Toxicology, 3, 281-288.
- Waychunas, G.A., Kim, C.S. ve Banfield, J.F., 2005. Nanoparticulate Iron Oxide Minerals in Soils and Sediments: Unique Properties and Contaminant Scavenging Mechanisms, Journal of Nanoparticle Research, 7, 409-433.
- Welsh, P.G., Lipton, J., Chapman, G.A. ve Podrabsky, T.L., 2000. Relative Importance of Calcium and Magnesium in Hardness-Based Modification of Copper Toxicity, Environmental Toxicology and Chemistry, 19, 1624-1631.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. ve Biswas, P., 2006. Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials, Environmental Science & Technology, 40, 4336-4345.
- Wurl, O. ve Obbard, J.P., 2004. A Review of Pollutants in the Sea-Surface Microlayer (SML): A Unique Habitat for Marine Organisms, Marine Pollution Bulletin, 48, 1018-1030.
- Xue, A. ve Hwang, D., Nanotechnology Funding: Corporations Grab the Reins, Lux Research, April 2011.
- Yauk, C.L. ve Berndt, M.L., 2007. Review of the Literature Examining the Correlation Among DNA Microarray Technologies, Environmental and Molecular Mutagenesis, 48,5, 380-394.
- Zeng, H., Singh, A., Basak, S., Ulrich, K.U., Sahu, M., Biswas, P., Catalano, J.G. ve Giammar, D.E., 2009. Nanoscale Size Effects on Uranium(VI) Adsorption to Hematite, Environmental Science & Technology, 43,5, 1373-1378.
- Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., Duan, Z., Chen, W. ve 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.

## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Trabzon'un Yomra ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1997 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2001 yılında bu fakülteden bölüm üçüncülüğü derecesiyle mezun oldu.

2007 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 2008 yılında Rize Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2009 yılında 35. madde ile KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'na görevlendirildi. 2011 yılında YÖK Doktora Araştırma Bursu ile bir yıl süreyle İngiltere Plymouth Üniversitesi'nde çalışmalarda bulundu. Halen KTÜ Deniz Bilimleri Fakültesi'nde lisansüstü eğitime ve görevine devam etmektedir. İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.