



**NANO BOYUTTAKİ POLİSTİREN  
PLASTİK PARÇACIKLARIN ZEBRA  
BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOSUNDAKİ  
GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

**Teoman Özgür SÖKMEN**

**Doktora Tezi  
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı  
Yetiştiricilik Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**

**2019**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NANO BOYUTTAKİ POLİSTİREN PLASTİK PARÇACIKLARIN  
ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOSUNDAKİ GELİŞİM  
TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

Teoman Özgür SÖKMEN

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI  
Yetiştiricilik Bilim Dalı

ERZURUM  
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

NANO BOYUTTAKİ POLİSTİREN PLASTİK PARÇACIKLARIN  
ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOSUNDAKİ GELİŞİM  
TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN danışmanlığında, Teoman Özgür SÖKMEN tarafından hazırlanan bu çalışma 31/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı – Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/ çokluğu ( / )** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Muhammed ARABACI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Murat ARSLAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **07.02./2020** tarih ve **..06.../ 56.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### **NANO BOYUTTAKİ POLİSTİREN PLASTİK PARÇACIKLARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOSUNDAKİ GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Teoman Özgür SÖKMEN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı  
Yetiştiricilik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Yıllık %4'ün üzerinde bir büyüme ve 2017 yılı itibarıyla dünya genelinde yıllık 350 milyon tonluk üretimle günlük hayatımızın vazgeçilmez bir parçası hâline gelen plastikler, atık yönetimi iyi değerlendirilemediğinden dolayı ciddi bir sağlık ve çevre sorunu hâline gelmiştir. Plastik atıklardan ve diğer primer kaynaklardan salınan nano plastik parçacıkların risk faktörünün daha yüksek olduğu ve bundan dolayı özellikle nano boyut aralığındaki plastiklerin zararlı etkilerinin değerlendirilmesi ve incelenmesi için daha ayrıntılı ve moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmektedir.

Bu çerçevede sunulan tez çalışması, zebra balıklarına embriyonik dönemin erken safhasında yumurta keselerine mikroenjeksiyon yoluyla verilen 20 nm boyutundaki polistiren plastiklerin (PNP) larval dönemde beyindeki biyoakümüülasyonunu, biyoakümüülasyonun bulunduğu bölgede oksidatif DNA hasarının varlığını, tüm vücutta ise malformasyonları, apoptoz ve oksidatif stres düzeylerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla, gelişim toksisitesi çalışmaları için en iyi organizma modellerinden biri olan zebra balığı embriyosuna gıda yoluyla ya da maternal alımı simüle etmek için floresan işaretli PNP mikroenjeksiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Yaşama, yumurtadan çıkma ve malformasyonlar 120 saatlik araştırma periyodu boyunca değerlendirilmiştir. 120. saatin sonunda larvalardan alınan seri kesitler konfokal mikroskopla taranarak PNP varlığı araştırılmış ve alınan floresan sinyal bölgeleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 20 nm çaplı PNP'nin beyne ulaşarak orada biyolojik olarak birikebileceği, dahası biyobirikim gösterdiği beyin bölgelerinde oksidatif DNA hasarına yol açabileceği belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasına göre sunulan tez çalışması, uygulanan yöntem itibarıyla nano boyuttaki plastik parçacıkların omurgalı beyninde görüntülediği ilk çalışma olmuştur. Bunların sonucunda, özellikle beyinde aşırı ROS ve apoptoza ek olarak artan mortalite ve yaygın anormallikler saptandı.

Sonuç olarak, zebra balığı model organizması kullanılarak elde edilen bu veriler, plastik ürünün kullanımı ve kontaminasyonu ile ilgili hem bireysel hem de toplumsal alınacak önlemlerin gelecekte toplum ve çevre sağlığı için son derece önemli olacağını düşündürmektedir. Öte yandan, özellikle günlük kullanımda plastik ürün yoğunluğunu azaltmak ve doğru atık yönetiminin sürdürülebilir bir bilinçle uygulanmasına yönelik yaptırımların hem halk hem de çevre sağlığı üzerinde olumlu bir etkisinin olacağı düşünülmektedir.

**2019, 107 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Nanoplastikler; 8-OHdG; biyoakümüülasyon; gelişimsel toksisite

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### INVESTIGATION OF THE DEVELOPMENTAL TOXICITY OF NANO-SIZED POLYSTYRENE PLASTIC PARTICLES IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) EMBRYOS

Teoman Özgür SÖKMEN

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Aquaculture  
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Plastics, which have become an indispensable part of our daily life with an annual growth of more than 4% and production of 350 million tons worldwide as of 2017, have become a serious health and environmental problem since waste management cannot be utilized well. It is reported that the risk factor of nano-plastic particles released from plastic wastes and other primary sources is higher, and therefore more detailed and molecular studies are needed to evaluate and examine the harmful effects of plastics, especially in the nano-size range.

In this context, the thesis study presented in the early stage of the embryonic period to zebrafish, in order to examine the bioaccumulation of 20 nm polystyrene plastics (PNP) in the brain in the larval period, the presence of oxidative DNA damage in the region where the bioaccumulation is located, and malformations, apoptosis and oxidative stress levels in the body. it is made.

For this purpose, it was applied to the zebrafish embryo, one of the best organism models for developmental toxicity studies, by food or fluorescently labeled PNP microinjection method to simulate maternal uptake. Survival, hatching and malformations were evaluated during the 120-hour study period. At the end of the 120th hour, serial sections taken from the larvae were scanned with a confocal microscope and the presence of PNP was investigated and the fluorescent signal regions received were visualized with a permeable electron microscope (TEM). According to the results obtained, it was determined that PNP of 20 nm diameter could reach the brain and accumulate biologically there, moreover, it may cause oxidative DNA damage in the brain regions where it shows bioaccumulation. The thesis study presented according to the literature review was the first study in which nano-sized plastic particles were displayed in the vertebrate brain by the method applied. As a result, increased mortality and widespread abnormalities were detected, in addition to excessive ROS and apoptosis in the brain.

As a result, these data obtained using the zebrafish model organism suggest that both individual and social measures related to the use and contamination of the plastic product will be extremely important for public and environmental health in the future. On the other hand, it is thought that sanctions, especially in daily use, to reduce the density of plastic products and to apply the right waste management with a sustainable consciousness, will have a positive impact on both public and environmental health.

**2019, 107 pages**

**Keywords:** Nanoplastics; 8-OHdG; bioaccumulation; developmental toxicity

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her konuda gerekli desteği sağlayan, tezin tüm aşamalarında çok değerli bilgi ve önerileri ile bana yön veren, ilgi, destek ve güvenini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a; tez çalışmamda değerli tecrübe ve bilgileriyle, yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Alper BARAN'a, Ekrem SULUKAN'a, Medine TÜRKOĞLU'na ve Atena Ghosi GHAREHAGHAJI'a; bu zamana kadar kazandırdıkları deneyimler ve destekleri için Sayın Prof. Dr. Telat YANIK'a, Sayın Prof. Dr. Murat ARSLAN'a ve Sayın Prof. Dr. Muhammet ATAMANALP'a, ayrıca bugünlere gelmemi sağlayan ve her durumda desteklerini hissettiğim çok kıymetli anneme ve babama, çalışmalarım sırasında sabrını ve fedakârlığını hiç esirgemeyen değerli eşim Serap SÖKMEN'e ve oğlum Berk SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Teoman Özgür SÖKMEN**

**Ocak, 2019**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>5</b>
2.1. Plastikler Hakkında Genel Bilgiler.....	5
2.1.1. Plastiklerin sınıflandırılması.....	6
2.1.1.a. Termoplastikler.....	6
2.1.1.b. Termosetler.....	7
2.1.1.c. Katılma polimerizasyonu.....	8
2.1.1.d. Basamaklı polimerizasyon .....	8
2.1.2. Polistiren.....	9
2.1.2.a. Polistirenin özellikleri.....	9
2.1.3. Polietilen.....	12
2.1.3.a. Polietilen özellikleri.....	13
2.1.4. Polipropilen .....	14
2.1.4.a. Polipropilen özellikleri .....	15
2.1.5. Plastiklerin genel özellikleri.....	16
2.1.5.a. Görünüm .....	16
2.1.5.b. Yüzey özelliği.....	16
2.1.5.c. Yoğunluğu .....	16
2.1.5.d. Isıl özellikler.....	16
2.1.5.d. Hava etkisi ile bozulma .....	17
2.1.5.e. Elektriksel özellikler.....	17
2.1.5.f. Mekanik özellikler .....	18
2.1.5.g. Kimyasal zellikler.....	19

2.2. Mikroplastikler ve Nanoplastikler.....	19
2.2.1. Mikroplastikler .....	19
2.2.2. Nanoplastikler .....	20
2.2.2.a. Nanoplastiklerin kaynakları.....	21
2.2.2.b. Nanoplastik tespiti.....	24
2.2.2.c. Nanoplastiklerin akibeti.....	25
2.2.2.d. Nanoplastiklerin canlı sistemler üzerine etkileri .....	27
2.3. Oksidatif Stres .....	28
2.3.1. Serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu.....	30
2.4. Zebra Balığı ( <i>Danio rerio</i> ) .....	32
2.5. Mikroskoplar .....	36
2.5.1. Mikroskop çeşitleri.....	37
2.5.1.a. Stereo mikroskop.....	37
2.5.1.b. Floresan mikroskop .....	38
2.5.1.c. Konfokal mikroskop .....	38
2.5.1.d. Geçirimli elektron mikroskopu (TEM) .....	39
2.5.1.e. Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	39
2.6. Literatür Özeti .....	40
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>48</b>
3.1. Materyal.....	48
3.1.1. Polistiren Nanoplastiklerin Karakterizasyonu (PNP).....	48
3.1.2. Araştırmada kullanılan balık materyali .....	48
3.2. Yöntem .....	49
3.2.1. Zebra balıklarından embriyo elde etme.....	49
3.2.2. Embriyo bakımı ve PNP'nin embriyoya verilmesi .....	50
3.2.2.a. Canlı larvalarda apoptoz tespiti .....	51
3.2.2.b. Canlı larvalarda reaktif oksijen (ROS) türlerinin tespiti .....	52
3.2.2.c. Lavra kesitlerinden PNP tespiti .....	53
3.2.2.d. Oksidatif DNA hasarının tespiti.....	55
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>56</b>
4.1. Polistiren Nanoplastiklerin Karakterizasyonu (PNP).....	56
4.2. Embriyo / Larvada Yaşama ve Kuluçka Oranları .....	57



4.3. Embriyo / larva Malformasyonları .....	58
4.4. ROS ve Apoptosis Tespiti .....	59
4.5. PNP ve Oksidatif DNA Hasar Tespiti .....	61
<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>67</b>
KAYNAKÇA .....	72
EKLER .....	80
EK 1. ....	80
ÖZGEÇMİŞ .....	108



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
ABS	: Akrilonitril Bütadien-Stiren
ASA	: Acrylonitrile styrene acrylate
AYPE	: Alçak Yoğunluklu Polietilen
BM	: Vücut Malformasyonları
CD	: Compact Disc
DDT	: Dikolorodifenil Trikloroetan
DLS	: Dinamik Işık Saçma
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FTIR	: Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre
KOK	: Kalıcı Organik Kirletici
LAYPE	: Lineer alçak yoğunluklu polietilen
LSM	: Laser Scanning Microscope
OYPE	: Orta Yoğunluklu Polietilen
PA	: Polyamide-Nylon
PAH	: Poliaromatik Hidrokarbonlar
PBT	: Polybutylene terephthalate
PC	: Polycarbonate
PCB	: Poliklorlu Bifeniller
PE	: Polietilen
PE	: Polyeethylene
PE-HD / HDPE	: Polietilen-Yüksek Yoğunluklu
PE-LD / LDPE	: Polietilen-Düşük Yoğunluklu
PET/PETE	: Polietilen Tereftalat
PMA	: Polymethyl acrylate
PMMA	: Polymethyl methacrylate
PNP	: Polistiren Nanoplastiklerin Karakterizasyonu
POM	: Polyoximethylene
PP	: Polipropilen

PS (HIPS)	: Polistiren
PS-E, EPS	: Polystyrene-expandable
PTFE	: Polytetrafluoroethylene
PU, PUR	: Polyurethane
PVC	: Polivinil Klorür
PVDC	: Polyvinylidene chloride
SAN	: Styrene-acrylonitrile
SBR	: Stiren-Bütadien Kopolimer
SPI	: Plastik Endüstri Topluluğu
UV	: Ultraviyole
YYPE	: Yüksek Yoğunluklu Polietilen
ZSP	: Zetasizer Nano

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Polistirenin kullanım alanları.....	12
Şekil 2.2. Polietilen kullanım alanları.....	14
Şekil 2.3. Polipropilen kullanım alanları .....	15
Şekil 2.4. Literatürde Boyutlarına göre plastiklerin sınıflandırılması .....	22
Şekil 2.5. Genleşmiş polistiren küreciklerin yüzeyine tutturulmuş olan ve genişletilmiş polistiren küreciklerinden hızlandırılmış mekanik aşındırma...	23
Şekil 2.6. Tatlı su (solda) ve deniz suyunda (sağda) 70 nm'lik nano boyutlu polistiren agregaların transmisyon elektron mikroskopisi görüntüleri.....	27
Şekil 3.1. Zebra Balığı kapalı devre ünitesi.....	49
Şekil 3.2. Petri kapları ve embriyolar .....	51
Şekil 3.3. Kaset ve medium içine yerleştirilen embriyolar .....	52
Şekil 3.4. Cryostat yardımıyla 7-10 µm kalınlığında alınan seri kesitler .....	55
Şekil 4.1. PNP'nin karakterizasyonu.....	56
Şekil 4.2. (A) Zebra balığı embriyolarının hayatta kalma oranı. Veriler ortalama $\pm$ S.D. üç bağımsız deneyden. (B) Zebra balığı embriyolarının çıkış oranı. Veriler ortalama $\pm$ S.D. üç bağımsız deneyden .....	58
Şekil 4.3. Embriyoların mikroskopik görüntüleri ve gözlenen malformasyonların yüzdesi.....	59
Şekil 4.4. CMH2DCFDA, üretilen ROS'un in vivo olarak boyanması .....	60
Şekil 4.5. Ölü hücrenin göreceli floresan yoğunluğu, Akridin Oranj (AO) boyama ile tespiti .....	60
Şekil 4.6. 120 saat zebra balığı larvalarının beyindeki kümülatif PNP birikiminin lazer tarama mikroskopi görüntüleri. Alt panellerdeki TEM görüntüleri .....	62
Şekil 4.7. Sol panel konfokal görüntüler, besin kesesi ve (120 hpf) zebra balığı larvalarının beyin bölgelerinde PNP kaynaklı Kırmızı floresan yoğunluğu (N = 20) Sağ panel konfokal görüntüler ve (120 hpf) zebra balığı larvalarının (n = 20) beyin bölgelerinden FITC floresan ortalama yoğunluğu .....	63

- Şekil 4.8.** PNP (Kırmızı) enjekte edilen zebra balığı embriyolarının (120 hpf) beyin dokularında 8-OHdG (FITC / GFP) için immünofloresans reaksiyonlarının lazer tarama mikroskopi görüntüleri..... 64
- Şekil 4.9.** Kırmızı floresan sinyalinin PNP'den ayrılan boyadan değil, PNP'den geldiğinden emin olmak için numuneler floresan sinyalinin geldiği noktadan alınan ve daha sonra TEM tarafından tespitinin gösterimi ..... 65
- Şekil 4.10.** (A) Kontrol grubu embriyo, SA (Sodium azid) enjekte edilen embriyo grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) enjekte edilen embriyo grubu (120hpf) görüntüsü. (B) Kontrol grubu, SA (Sodium azid) grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) grubu, Hayatta kalma oranı (C) Kontrol grubu, SA (Sodium azid) grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) grubu, yumurta çıkış oranı. .... 66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı polimerlerin monomerleri ve tekrar birimleri .....	5
Çizelge 2.2. Bazı termoplastiklerin tipik özellikleri .....	6
Çizelge 2.3. Bazı termosetler ve özellikleri .....	7



## 1. GİRİŞ

Plastikler yağ; doğalgaz, kömür gibi fosil ham maddelerden üretilen, polimerlerin katkı ve dolgu malzemeleriyle karıştırılıp işlenmesiyle elde edilen, 1940'lardaki ticari gelişmelerden itibaren günlük hayatta ve üretim süreçlerinde yaygın bir şekilde kullanılan, seri üretim için uygun ve uzun ömürlü malzemelerden biridir (Wu *et al.* 2016). Plastikler; ucuz, kullanımı kolay, hafif ve dayanıklı malzemeler olmaları nisbetiyle günlük hayatımızın birçok alanına girmiştir. Plastiklerin en yaygın olarak kullanıldığı alanlar ambalaj, inşaat, otomotiv, elektrikli ve elektronik cihaz sektörleri olarak belirtilmektedir (Arnaiz *et al.* 2013; Plastics Europe 2017).

Plastiğin bir türü olan termoplastikler polistiren, polietilen, polipropilen ve polivinil klorür malzemelerinden oluşmaktadır. Bunlar arasında en sık tercih edilen ürünlerden birinin de Polistiren olduğu görülmektedir (Maul 2007). Polistiren'in özelliklerine bakıldığında sertlik, saydamlık, kırılma, enjeksiyonla kalıplama, şişirmeli kalıplama ve ısıyla şekillendirme gibi unsurların bulunması, büyük avantajlar sağlamaktadır (Peacock and Calhoun 2006). Polistirenin yüksek akış özelliğinin bulunması her zaman kolay bir şekilde işlenmesinde büyük rol oynamakta, aynı zamanda düşük maliyeti ile de artı sağlamaktadır. Bununla birlikte bazlar ve su çözeltileri ile bir araya geldiğinde dayanıklı bir yapı sergileyen polistiren, UV-ışınlarından direkt olarak etkilenmekte; dolayısıyla dış ortamlarda uzun süreli kullanımında kalitesi bozulmaktadır (Saçak 2005).

Polistirenin sıklıkla yiyecek ve içecek ambalajlarında kullanıldığı görülmektedir. Mantarların ya da bakterilerin üremesine ortam yaratacak bir ürün olmamakla birlikte, seyreltik asitlere, tuz çözeltilerine ve bazlara karşı yüksek bir dayanım sunmaktadır. Filmlerde, levha yapımlarında, kâğıt kaplamalarında, buzdolabı parçalarında, batarya kutularında, oyuncaklarda, kozmetik kutularında, ilaçlarda, teyp makaralarında, mutfak aletlerinde kullanımı oldukça yaygındır. Bunun yanında kauçuklarda ve lastiklerde de sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Polistirenin kullanım alanlarından biri de polistiren köpüklerdir. Ambalajlamalarda, ses ve ısı yalıtımlarında polistiren köpüklerden sıklıkla

yararlanılmaktadır. Ayrıca Polistiren'nin divinil benzen ile stiren yanında çapraz bağlı yapıya dönüştürülerek, jel geçirgenlik kromatografisi ve iyon değiştirici reçinelerde kullanılması gibi sınırlı kullanım alanları da bulunmaktadır (Karaduman 1998; Saçak 2005).

Plastiğin modern yaşam için vazgeçilmez olması, çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir (Oğuz 2011). Dünya genelinde yıllık 100-160 milyon tonluk plastik atık üretilmekte olup, bu miktar kentsel katı atıkların toplam kütlelerinin %8-12'sine tekabül etmektedir (Veksha *et al.* 2017). Çevre ve Şehircilik Bakanlığı'nın yayımladığı "Ulusal Atık Yönetimi ve Eylem Planı"nda Türkiye'de 2014 yılında 4 milyon ton ambalaj atığı olduğu belirtilmektedir. Meydana gelen plastik atıklar önce kara ortamını kirletmektedir. Oluşan plastik atıklar zamanla yağış, rüzgâr, akarsular ve ırmaklar gibi su kaynakları yardımıyla karalardan su ortamına taşınmaktadır. Bu taşınım esnasında plastikler fiziksel olarak daha küçük parçalara ayrılarak mikroplastik denilen parçaları oluşturmaktadır. Deniz ve limanlardaki atıkların %60-80 oranında plastiklerden kaynaklandığı ve bunların da çoğunluğunu mikroplastiklerin oluşturduğu belirtilmektedir (Browne *et al.* 2011). Öte yandan, son zamanlarda yapılan çalışmalar, plastik parçacıkların bu bozunma işleminin mikrometre düzeyinde kalmadığını ve nano düzeyde dağılmaya devam ettiğini göstermiştir (Lambert and Wagner 2016; Lehner *et al.* 2019).

Yapılan çalışmalar kapsamında nano boyuta sahip olan plastiklerin ana kaynaklarının üç farklı şekilde ele alındığı belirtilmektedir. Bunlar;

1. Genel plastik malzemelerin bozunma süreci,
2. Kişisel bakım ve kozmetik ürünler,
3. Mühendislik plastiklerinin üretim süreci

olarak ifade edilebilmektedir (Lu *et al.* 2009; Besseling *et al.* 2014; Lambert and Wagner 2016). Gelişen teknoloji ile birlikte, nano boyuta sahip plastiklerin ortaya çıkma olasılığı giderek artmıştır. Örneğin; üç boyutlu yazıcılar genellikle PLA veya



ABS gibi termoplastik polimer malzemeler kullanmaktadır (Huber *et al.* 2016). Üç boyutlu yazıcılar bu hâliyle bir nano plastik kaynağı olmuştur.

Bugün çevrede sürekli artan nano boyutlu plastik parçacık miktarıyla ilgili yeterli veri ve analitik yöntemlerin bulunmaması, doğada bulunan nanoplastiklerin miktarını belirlemeyi zorlaştırmaktadır (Koelmans 2015). Endişelendirici kısım, “daha küçük partiküllerin aynı kütle konsantrasyonuna karşılık gelen dökme malzemedan genellikle daha zehirli olması”dır (Mattsson *et al.* 2017). Önemli bir sağlık ve çevre tehdidi durumuna gelmiş olan, farklı büyüklükteki plastik parçacıkların toksit etkileri üzerinde yapılmış olan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, nanoplastiklerin canlı organizmalarda toksisiteye neden olabileceği ve nanoplastik maruziyetin vücutta birikimle sonuçlandığı (Mattsson *et al.* 2017; Veneman *et al.* 2017; Pitt *et al.* 2018), bağışıklık yanıtlarının zayıflaması (Greven *et al.* 2016), karaciğer lezyonları (Lu *et al.* 2016b) sonucunda davranış, fizyoloji ve metabolizmayı etkilediği belirlenmiştir (Mattsson *et al.* 2015). Ayrıca bazı çalışmalar, nano boyutlu plastik parçacıkların yiyecek ağı boyunca taşınabileceğini (Mattsson *et al.* 2017), vücuttaki organlar arasında yer değiştirebileceğini ve annelerden yavrulara transfer edilebildiğini de göstermiştir (Farrell and Nelson 2013; Pitt *et al.* 2018).

Toksit etkiye neden olan plastiklerin canlı organizmalara etkileri birçok faktör göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Söz konusu plastik atıklar doğrudan ya da dolaylı bir şekilde canlılara zarar verir. Ayrıca toksit maddelere ne kadar ve ne sıklıkla maruz kaldığı da önemli bir etkidir. Besin maddelerinden farklı olarak hayat boyu vücudumuzun karşılaşmış olduğu tüm maddeler ksenobiyotik olarak adlandırılmaktadır. Ksenobiyotikler, istemli ya da istemsiz olarak metabolizmaya giriş sağlamaktadır.

Biyobirikim, toksit maddelerin boşaltım veya ksenobolizma yolu ile yok edilememesi durumunda organizmanın toksit maddeyi soğurması ile ortaya çıkmaktadır. Toksik madde sudaki canlılar tarafından yutulurken besin zincirinde canlılar arasında biyobirikime neden olmaktadır (Setälä *et al.* 2014).

Sonuç olarak nanoplastiklerin, metal ve karbon bazlı olanların biyolojik etkileri daha fazla araştırmaya konu olmakla birlikte, polistiren gibi nanoplastikler hakkında çok az şey bilinmektedir. Diğer birçok kullanımın yanı sıra, yiyecek servisi ve yiyecek paketlemesi yapmak için kullanılan polistiren de doğrudan besin zincirlerine taşınabilmektedir (Lu *et al.* 2016b). Bu bağlamda polistiren, termoplastik polimerler arasında en yaygın kullanılan plastiklerden biridir ve çevrede gözlenen plastik döküntülerin ana bileşenlerindedir (Lu *et al.* 2016b).

Bu araştırma, zebra balıklarının embriyonik döneminin erken safhasında besin keselerine mikroenjeksiyon yoluyla verilen 20 nm boyutundaki polistiren plastiklerin (PNP) larval dönemde beyindeki biyoakümülyasyonunu, biyoakümülyasyonun bulunduğu bölgede oksidatif DNA hasarının varlığını, tüm vücutta ise malformasyonları, apoptoz ve oksidatif stres düzeylerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Plastikler Hakkında Genel Bilgiler

Polimerlere katı maddelerinin katılması sonucunda elde edilen bileşikler plastik olarak kabul edilmektedir (Yoruç ve Uğraşkan 2017). Monomerlerin aynı kimyasal yapıda olması polimer zinciri ile birbirine bağlanmalarına yardımcı olduğu gibi monomerlerin farklı kimyasal yapıda olması da polimer zinciri oluşturmak adına yeterlidir. Doğada ham hâlde plastik bulunmamaktadır. İnsanlar ihtiyaçları dâhilinde plastik madde üretmektedir. Monomerler belirli bir sıcaklık ve basınç altında katalizörler ile tepkimeye girmekte, böylelikle plastikler oluşmaktadır. Plastikler üretildiği zaman toz hâlde olabildiği gibi reçine ya da granül hâlinde de bulunabilmektedir. Ham petrolün işlenmesinden sonra ortada kalan atıklar plastiklerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalara göre dünyada bulunan petrolün sadece %4'ünden plastik üretilmektedir (Anonim 2012). Söz konusu tekrar eden birim olduğunda monomerin aynısı ya da benzeri ele alınmaktadır. Çizelge 2.1'de bazı polimerlerin monomerleri ve tekrar birimleri gösterilmiştir (Anonim 2012).

**Çizelge 2.1.** Bazı polimerlerin monomerleri ve tekrar birimleri (Anonim 2010b)

Polimer	Monomer	Tekrar biçimi
Polietilen	$2\text{HC}=\text{CH}_2$	$\left( \begin{array}{c} \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \\   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \end{array} \right)_n$
Polipropilen	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C}=\text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array} \Bigg _n$
Polistiren	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C}=\text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \Bigg _n$

### 2.1.1. Plastiklerin sınıflandırılması

#### 2.1.1.a. Termoplastikler

Termoplastikler söz konusu olduğunda ısının arttığı alanlarda yumuşama, ısının düşürüldüğü alanlarda ise sertleşme meydana gelmektedir. Dallı polimerler termoplastikler olarak adlandırılmaktadır. Polimerler zincirleri, ısı ile daha serbest hareket etme potansiyeli kazanmakta, bu nedenle yumuşama meydana gelmektedir. Isıtma söz konusu olduğunda şekillendirme kolaylaşmaktadır (Sarıkaya ve Erdik 2000). Termoplastik polimerler genel olarak çöp ve alışveriş poşetlerinde, oyuncaklarda, tükenmez kalem gövdelerinde, plastik bardaklarda sıklıkla kullanılmaktadır (Saçak 2014) (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** Bazı termoplastiklerin tipik özellikleri (Saçak 2014)

Adı	Kimyasal Formülü	Erime Sıcaklığı (°C)
<b>Alçak Yoğunluklu Polietilen</b>	$[-CH_2-CH_2-]_n$	110
<b>Yüksek Yoğunluklu Polietilen</b>	$[-CH_2-CH_2-]_n$	126-132
<b>Polipropilen</b>	$[-CH_2-CHCH_3-]_n$	160-170
<b>Polistiren</b>	$[-CH_2-CHC_6H_5-]_n$	70-115
<b>Polivinilklorür</b>	$[-CH_2-CHCl-]_n$	75-95
<b>Akrilonitril Bütadien Strien</b>	$[-CH_2-CH=CH-CH_2-]_n$	105
<b>Stiren Akrilonitril</b>	$[(CH_2-CH)_mCH_2CHCH]_n$	115-149
<b>Polietilen Tereftalat</b>	$[-CO-C_6H_4COO(CH_2)_2O-]_n$	250-260
<b>Naylon</b>	$[C_6H_{11}ON]$	256

### 2.1.1.b. Termosetler

Belli bir sıcaklıktan sonra direkt olarak sertleşen ve bir daha ısıtıldığında yumuşama özelliği göstermeyen polimerler termosetler olarak adlandırılmaktadır. Isıl işlem ile kalıplanan ve daha sonra verilen şeklin bozulmadığı ürünlerdir. Termoplastikler ile termosetler arasındaki en belirgin farklılık termosetlerin bir daha şekil alamayacak olmasıdır. Termoplastikler özellik olarak yeniden eritilebilir ve yeniden şekillendirilebilir.

Kovalent bağlar tarafından oluşturulan çapraz bağlantılar, polimer zincirinin hareketini büyük ölçüde kısıtladığı için termosetler genellikle sert (rijit) malzemelerdir. Termosette çapraz bağların derecesinin artması hareketin azalmasına ve sertliğin ön plana çıkmasına vesile olmaktadır. Buna ek olarak, güçlü kovalent çapraz bağlantılar sayesinde boyutsal stabiliteleri, yeni polimer sisteminin termal stabiliteye sahip olmasını, erimemesini, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasını ve herhangi bir çözücü ile çözülmemesini sağlar (Anonim 2010b). Bazı termosetler ve özellikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Bazı termosetler ve özellikleri (Anonim 2008c)

<b>Malzeme</b>	<b>Malzeme Özgül Ağırlığı (G/Cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Çekme Mukavemeti (Mpa)</b>	<b>Elastisite Modülü (Mpa)</b>	<b>Kullanım Sıcaklığı Sınırı (°C)</b>
<b>Fenolikler</b>	1,27	35-60	2800-9200	170-250
<b>Polyesterler</b>	1,28	45-95	2100-4600	150-175
<b>Epoksiler</b>	1,25	28-90	2800-3500	150-260
<b>Melaminler</b>	1,50	35-70	7000-11200	150-200

Söz konusu polimer sentezi olduğunda birbirinden farklı kimyasal reaksiyonlardan yararlanmak mümkündür. Polimerizasyon yöntemleri, burada iki farklı açıdan değerlendirilmektedir. Bunlardan biri ilave polimerizasyon, diğeri ise adım polimerizasyondur. Kademeli polimerizasyon ile elde edilen polimerler basamaklı

polimerdir; ilave polimerizasyon ile elde edilen polimerlere ise ek polimer denir (Saçak 2002).

#### **2.1.1.c. Katılma polimerizasyonu**

Katılma polimerizasyonu ele alındığında monomer moleküllerinin zincirlerini büyütmek istediği, bu nedenle de aktif merkezlere sıra sıra ve hızlı bir şekilde katıldığı görülmektedir. Söz konusu büyüme reaksiyonları olduğunda aktif zincirlerden ve monomer moleküllerinden bahsetmek gerekmektedir. Polimerizasyonun ilk zamanlarına bakıldığında yüksek molar kütleli polimerlerin oluştuğu, aynı zamanda reaksiyon sırasında alanda yüksek molar kütleli polimer ve monomerlerin olduğu görülmektedir (Saçak 2002).

#### **2.1.1.d. Basamaklı polimerizasyon**

Basamaklı polimerizasyon fonksiyonel grupları barındıran moleküller arasında var olmaktadır. Polimerizasyon alanı içerisinde yer alan her bir molekül, büyüklüğü önemli olmaksızın, reaksiyona girme eğilimi göstermekte; aynı zamanda polimerin molar kütlesi de yavaşça ve uzun bir süre içerisinde artmaktadır. Diels-Alder katılmasının ve nükleofilik aromatik yer değiştirme tepkimelerinin basamaklı polimer kondenzasyon tepkimeleri ile birlikte sentezlenebileceği de unutulmamalıdır (Saçak 2002). Plastik endüstrisinin başlangıcının nitroselülozun seri üretimi (1868) olarak kabul edilmektedir. Nitroselülozdan sonra ise sentetik yapıya sahip olan fenol-formaldehit polimerler üretilmiştir. Ancak, fenol-formaldehitin üretimi 1908 senesini bulmuştur. Tüm plastik malzemeler ele alındığında temel yapı taşlarının hem çalışmalar sonucunda hem de tesadüfen ortaya çıktığını söylemek gerekmektedir.

Oyuncaklar, elektrikli aletler, tıbbi malzemeler ve cihazlar, ambalajlar içerisinde plastikler sıklıkla yer almaktadır. Dayanıklı, hafif, şekil alabilen ve uygun fiyat sunan ürünler olduklarından dolayı günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir.

Dünya çapındaki plastik tüketimine bakıldığı zaman taşımacılık sektörünün %7'lik dilimde olduğu görülmektedir. Araç tasarımları kapsamında rahatlık, emniyet ve ekonomik açıdan plastikler oldukça önemlidir. Taşımacılık sektörünün plastiği tercih etmesinin en önemli nedeni maliyettir. Bunun yanında yapı ve inşaat sektöründe de %19 oranla plastik tercih edilmektedir. Bu alanda plastiklerin kullanılmasının nedeni uzun ömürlü olmasıdır (Anonim 2006).

### **2.1.2. Polistiren**

Termoplastiklerin en çok kullanılan türlerinden biri olan polistiren, hem ucuz hem de sert yapıya sahip bir polimerdir. Polistirenin aromatik polimer zincirine sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda aromatik stiren monomerinden sentezlenmektedir. Söz konusu stiren monomer olduğunda petrokimya sanayisi tarafından elde edilen sıvı hidrokarbon molekülünü ele almak gerekmektedir. Günlük hayatta sıklıkla kullanılan plastiklerin başında gelen polietilenden sonra en sık kullanılan plastik polistirendir. Polistirenin ısıtma ve soğutma işlemleri ile işlenmesi ya da kalıplanması mümkündür. Oda sıcaklığında polistiren katı bir hâlde bulunmaktadır. Günlük hayatta kullanılan pek çok ürün içerisinde polistirenin olduğu bilinmektedir. CD ve DVD kapları polistiren malzemeden elde edilmektedir. Katı polistirenden bahsetmek gerekirse saydam bir görünüme sahip olduğu görülmektedir. Renk pigmentleri sayesinde renklendirme yapmak mümkündür. Köpük, plastik beyaz su bardaklarında, plastik tabak, çatal, bıçak üretiminde polistirenden yararlanılmaktadır.

#### **2.1.2.a. Polistirenin özellikleri**

##### **1. Fiziksel özellikleri**

Sıklıkla kullanılan polistiren şeffaf ve saydam bir özelliğe sahiptir. Polistirenin yoğunluğu  $1,06 \text{ gr/cm}^3$ , gerilme dayanımı 8000 psi, vicat yumuşama noktası  $106^\circ\text{C}$ , izod darbe dayanımı 0,2-0,5 ft lb/inç, uzaması %3, esneklik modülü ise 450000 psi olarak bilinmektedir. Polistirenin sunduğu bu özellikler ağırlıklarına ve katkı

maddelerine göre değişkenlik göstermektedir. Polistirenler söz konusu olduğunda UV ışınlarına, kimyasal maddelere ve yiyeceklere karşı dayanımının düşük olduğunu söylemek gerekmektedir.

Silc *et al.* (2018) yapmış oldukları çalışmada 120 adet numuneden yararlanmış, bu numuneleri Adriyatik Denizi'nden temin etmiştir. Numunelerin %80,6'sının plastik kalıntısı olduğunu saptamıştır. %80,6 oranında saptanan plastiğın ise %38,7'sinin polistiren olduğu görülmüştür. Güney İngiltere'de yer alan Tamar Haliç'i üzerinde de plastik kalıntılar gözlemlenmiştir (Sadri and Thompson 2014).

Günümüze kadar geçen süre içerisinde farklı deney hayvanları üzerinde nano ve mikro boyutlu polistirenlerin oluşturduğu toksit etkileri incelemek adına pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Khan and *et al.* 2015; Mattsson and *et al.* 2017; Pitt *et al.* 2018; Lee and *et al.* 2019). Yapılan çalışmaların birinde zebra balığı ele alınmış, 7 gün boyunca balığa 70 µm polistiren enjekte edilmiştir. Çalışmanın sonunda ise polistirenin iltihaplanmaya ve lipid birikimine neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Lu and *et al.* 2016).

Pitt *et al.* (2018), yapmış oldukları çalışmada zebra balığı embriyosu ile polistirenin etkilerini incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda polistirenin besin kesesi içine geçeceği, gastrointestinal sistemin, safra kesesinin, karaciğerin, pankreasın ve kalbin polistirenden etkilendiğı gözlemlenmiştir. Yine bu çalışma içerisinde çeşitli konsantrasyonlarda polistirene maruz bırakılan embriyoların hipoaktif lokomotor aktivite gösterdiği görülmüştür. Zebra balığı dışında başka hayvanlar ile yapılan deneyler kapsamında (Wegner *et al.* 2012; Mattsson *et al.* 2017) polistiren nanoplastiklerin nörolojik sistemleri etkileyebileceğı ve davranışta bozukluğa neden olabileceğı sonucuna ulaşılmıştır. Yine de nörotoksik etkilerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi mümkün olmamıştır.

Bu zamana kadar yapılan PNP ile canlı organizmaları kapsayan çalışmalar sonucunda toksik etkilerin meydana gelebileceğı sonucuna ulaşılmıştır. Küresel alanda sağlık



açısından tehdit oluşturan PNP'yi engelleyebilmek ya da gerekli olan önlemleri alabilmek adına çalışmaların yapılması gerekmektedir. Nano boyutlu parçacıkların beyinde ne gibi etkilere neden olduğunu öğrenmek ve bunun düzeyini saptamak önemli bir durumdur.

## **2. Polistirenin kullanım alanları**

Polistiren tüketimindeki 1/3'lük pay ekstrüzyon uygulamalarına aittir. Genel olarak ayna ve resim çerçevelerinde inşaat alanlarında ekstrude edilmiş olan profiller sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında ekstrude edilmiş olan profillerin ısıl şekillendirme ile işlem görmesi sonucunda yumurta ve et kutuları hazırlanmaktadır. Tek kullanımlık tabaklar, bardaklar ve ince çeperli şişelerde de yine bu ürünlerin kullanıldığı görülmektedir.

Ekstrüzyon uygulaması ile polistirenin en kapsamlı kullanım alanı çift yönlü filmler olarak bilinmektedir. Burada sağlamlık ve parlaklık özelliği ön plana çıkmaktadır. Şişe kapaklarından şeker kaplarına kadar pek çok alanda polistirenin kullanıldığı görülmektedir. Bunun yanında duş kabinlerinden havalandırma ünitelerine, buzdolabı ve dondurucu parçalarına kadar pek çok alan polistireni kullanmaktadır. Radyolar ve televizyonlar için de polistiren önemli bir malzemedir. Polistiren içerisinde alevlenmeyi engelleyen reçineler yer almaktadır. Böylelikle televizyon kutusu imalatında avantaj sağlanmaktadır. Polistirenin darbelere karşı dayanımının yüksek olması; ev aletlerinde, ayakkabı topuklarında, oyuncaklarda kullanılmasına yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda tıbbi cihazlarda, kutularda ve taraklarda da sıklıkla kullanılmaktadır. Söz konusu köpük polistiren olduğunda inşaat, izolasyon ve paketleme sektöründe kullanıldığı görülmektedir (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Polistirenin kullanım alanları

### 2.1.3. Polietilen

Termoplastiklerin içinde tüketim açısından %34'lük bir orana sahip olan polietilen, etilen gazının sentezlenmesi ile oluşmaktadır. 1939 senesinden beri sanayi alanında polietilen üretimi sağlanmaktadır. Polietilenin zincir dizilimine bakıldığında dalgalanmaların olduğu, bu nedenle de düşük bir yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir. Zincir içerisindeki transferler, ana zincirdeki dalgalanmalara neden olmaktadır. Yan dallara bakıldığında etil, propil, bütil gibi alkil grupları ile karşılaşılır ve bu grupların boyları kısadır. Polietilen üretiminin 3000 atm'de yani çok yüksek bir basınçla yapıldığını söylemek gerekmektedir. Molekül kütlesine bakıldığında ise 4000-5000 kg/mol değerleri arasında olduğu görülmektedir.

Polietilenin özelliklerine bakıldığında düşük fiyatlı olduğu aynı zamanda da kimyasal tepkimelere karşı dayanıklı olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanında polietilen hem farklı yoğunluklarda hem de farklı yöntemlerle işlenebilmektedir. Pek çok alanda rahatlıkla kullanılan polietilen en çok ev eşyalarında, oyuncaklarda, hortum ve borularda, tüplerde, şişelerde karşımıza çıkmaktadır. Kabloların kılıflandırılmasında, kumaşlarda ve matel kaplamalarında kullanılmaktadır. Polimerik film üretimi ise en sık kullanılan alan olarak görülmektedir. Özellikle sera örtüleri, ambalaj filmleri, alışveriş poşetleri polietilen maddesinden üretilmektedir (Saçak 2005).

### **2.1.3.a. Polietilen özellikleri**

#### **1. Fiziksel özellikleri**

Polietilen özelliklerine bakıldığında yarı geçirgen bir yapıda olduğu, aynı zamanda yumuşatılabilen ve dayanıklı bir malzeme olduğu görülmektedir. Piyasa içerisinde en çok şeffaf olanları ile karşılaşılmaktadır. Şeffaflık ile yoğunluk arasında doğru orantı bulunmaktadır. Yoğunluğun artması durumunda şeffaflığın da arttığı bilinmektedir. Polietilen 3 farklı grupta incelenmektedir. Yoğunluğu 0,925'ten küçük olanlar, 0,925-0,94 arasında olanlar ve 0,94'ten yüksek olanlar olarak ayırım yapılabilmektedir. Burada düşük, orta ve yüksek yoğunluklu polietilenden bahsedilmektedir.

Yoğunluğun artması ile bir şeffaflık yükselmekte, şeffaflığın artması ile birlikte de sertlik, mukavemet ve yumuşama sıcaklığı yükselmektedir. Dayanımlarının ve yumuşama sıcaklığının yüksek olması, gaz ya da sıvılardan kolay etkilenmemelerine vesile olmaktadır. Yüksek yoğunluklu polietilende kopma, parçalanma ya da kırılma gibi durumlar için direnç azdır ve kalıplanma işlemi için de hem yüksek sıcaklık hem de yüksek basınç ihtiyacı doğmaktadır. Polietilen, etilenin sentezlenmesi ile elde edilmektedir. Etilenin ham maddesi petroldür ve alifatik hidrokarbon parçalanması sonucunda etilen üretilmektedir. Ayrıca etilen, az miktarda etanolün katalitik dehidrojenasyonu ile elde edilmektedir (Anonim 2008b).

Polietilen en çok kullanılan ticari polimer olarak kabul edilmektedir. Pek çok sektörde kullanılan polietilen sıklıkla üretilmektedir. Paketleme sektöründen plastik mutfak ürünlerine, otomotiv sektöründen yapı malzemelerine kadar pek çok kullanım alanı vardır.

#### **2. Polietilen kullanım alanları**

Söz konusu yüksek yoğunluklu polietilen olduğunda geniş bir kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. Yüksek yoğunluklu polietilenin %40'ı hava üfleme döküm

yöntemi aracılığı ile plastik parça üretimi için kullanılmaktadır. Temizlik ürünlerinde kullanılan şişeler, oyuncaklar, mutfak aletleri polietilenin kullanıldığı ürünlerdir. Yüksek yoğunluklu polietilenlerin %30'unun enjeksiyon kalıplama yöntemi ile elde edildiği bilinmektedir. %30'u ise ekstruzyon yöntemi ile elde edilmektedir. Paketleme sektöründe, ince film kaplamalarında, borularda ve tüplerde, kablolarda sıklıkla bu yöntem ile işlem yapılmaktadır (Çetinel 2000) Şekil 2.2'de kullanım alanlarından örnekler sunulmuştur:



**Şekil 2.2.** Polietilen kullanım alanları

#### **2.1.4. Polipropilen**

Propilen polimerizasyonu ile üretilen malzeme, polipropilen olarak karşımıza çıkmaktadır. Burada yarı sert, şeffaf ve kolaylıkla şekillendirilebilen bir malzemedен bahsedilmektedir. Ucuz olduğundan pek çok alanda rahatlıkla kullanılabilmektedir. Petrol türevi bir malzeme olduğu bilinmektedir. İlk polipropilen üretimi Lewis asitleri ve organometalik katalizörler yardımı ile yapılmıştır. Bu yöntemle kristalitesi düşük, dallanmış yapıda, ataktik yapıda, kauçuğumsu ve ticari değeri yüksek olmayan polimer elde edilmektedir (Saçak 2005).

### 2.1.4.a. Polipropilen özellikleri

#### 1. Fiziksel özellikleri

Polipropilenin erime sıcaklığının 160°C'dir. Polipropilen parçalarının üretilmesi için hava üfleli döküm tekniği ya da enjeksiyon kalıplama yöntemi kullanılmaktadır. Erime akış indeksi (MFI) üretim sürecinde önemli bir unsurdur. MFI direkt olarak polipropilenin molekül ağırlığı ile etkileşim içerisindedir.

Polipropilenin hem UV ışınlarına hem de ısı işleme karşı hassas bir yapısı olduğunu söylemek gerekmektedir. UV ışınları ve yüksek sıcaklık nedeni ile polipropilenin polimer zincirinin bozulduğu görülmektedir. Bu bozunmadan korunabilmek adına UV emen katkı maddelerinin kullanılması gerekmektedir.

#### 2. Polipropilen kullanım alanları

Polipropilenin sıklıkla valiz, çanta, traş kremi tüpü, steril sağlık ürünleri alanlarında kullanıldığı bilinmektedir. Bunun yanında plastik kaplarda, şişelerde, test tüplerinde de polipropilen kullanılmaktadır (Saçak 2005) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Polipropilen kullanım alanları

### **2.1.5. Plastiklerin genel özellikleri**

#### **2.1.5.a. Görünüm**

Plastiklerin geneline bakıldığında renksiz bir yapı ile karşılaşılmaktadır. Renkli bir plastik elde edebilmek için renklendiricilerden yararlanmak gerekmektedir. Opak bir görünüm elde etmek adına pigmentlerden yararlanılmaktadır. Organik boyalar aracılığı ile de saydam bir görünüm kazandırılabilir (Akkurt 2007; Rosato 2011).

#### **2.1.5.b. Yüzey özelliği**

Plastik söz konusu olduğunda yüzeylerinin yumuşak olduğu görülmektedir. Aynı zamanda çizilme dirençleri de oldukça düşüktür. Cam ya da seramik ile karşılaştırıldığında daha yumuşak bir ürün olduğu söylenebilir. Opak ya da renkli plastikler boya ile kaplanmış olan plastiklerden daha sert bir yapıdadır (Mills 2005; Akkurt 2007; Rosato 2011).

#### **2.1.5.c. Yoğunluğu**

Plastikler oldukça düşük bir ağırlığa sahiptir. Bu nedenle de pek çok alanda rahatlıkla kullanılabilir. Yoğunluğuna bakıldığında  $0,9-2,5 \text{ g/cm}^3$  arasında bir değere sahip olduğu görülmektedir (Crawford 2001).

#### **2.1.5.d. Isıl özellikler**

Plastiklerin ısı iletkenliğinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Isıyı iletme konusunda plastikler başarı sağlayamamaktadır, çünkü zincirlerindeki atomik hareketler nedeni ile büyük miktarda ısıyı emme eğilimi içerisindedir.

Herhangi bir yükün bulunmadığı ortamlarda 65-120°C’de, yük uygulaması yapıldığı ortamlarda ise 260°C’de bozulmaktadır. Dolayısıyla bozulmayı geciktirmek adına yük uygulanması gerekmektedir (Mills 2005; Akkurt 2007).

Termosetlerin ısıya daha dayanıklı olduğu, aynı zamanda daha sert bir yapı sunduğu bilinmektedir. Sıcaklığın belirli bir düzeye kadar yükselmesi termal stabiliteyi ortaya çıkarmaktadır. Ancak, sıcaklığın yükselmesi ile hem karbonize olma eğilimi artar hem de bozunma meydana gelir. Termosetler 150°C-230°C sıcaklığı aralığında termal kararlılığa sahiptir (Ekşi 2007).

Plastiklerin alev karşı hassasiyetleri oldukça yüksektir (Lampman 2003). Termoplastiklerin pek çoğu alev ile bir araya geldiklerinde bozulurlar. Ancak, alev uzaklaştırıldığında bu malzemeler yanmaya devam etmezler (Mouritz and Gibson 2006).

#### **2.1.5.d. Hava etkisi ile bozulma**

Polimerler kimyasal bozunma nedeni ile bir süre sonra yapısal değişikliğe uğramaktadır. Bir ya da birden çok etken bu bozulmaya neden olmaktadır. Termal, mekanik, radyasyon etkisi altında bozunmalar gerçekleşmektedir. Her bir etki farklı bir bozunmaya neden olmaktadır. Polimer bir yandan UV radyasyonuna bir yandan oksijene bir yandan da atmosferik emisyonu maruz kalabilmektedir (Massey 2007; Rosato 2011).

#### **2.1.5.e. Elektriksel özellikler**

Plastikler söz konusu olduğunda elektrik iletkenliği oldukça düşüktür. Plastiğin elektriği iletebilmesi için mutlaka içerisinde serbest dolaşan elektronlar bulundurmalıdır. Zincirlerin birbirine oldukça sıkı bağlı olması, sert bir yapı sergilemesi, yüksek kristallik derecesi sunması ve oryantasyon olaylarının meydana gelmesi elektronların serbest dolaşımını engeller. Bu nedenle de plastiğin elektrik iletkenliği düşer (Lampman

2003; Çağlarer 2006; Rosato 2011). Plastiklerin zaman içerisinde elektrik iletkenlikleri artış gösterebilir ancak, bu artış nem ile azalmaktadır. Sıcaklığın artışı da elektrik iletkenliğini arttırmaktadır.

Polistirenin işlenebilirlik açısından başarılı bir termoplastik olduğu bilinmektedir. Polistirenin fiziksel özelliklerinin dengeli olduğu görülmektedir. Aynı zamanda şeffaf bir yapı sunmakta, istendiğinde renklendirilebilmektedir.

Polistirenin işlenebilmesi için genel olarak enjeksiyon kalıplama yöntemi kullanılmaktadır. Bunun yanında darbe ve vakum kalıplama, termoform, ekstrüzyon kalıplama gibi yöntemler ile de şekillendirilmesi mümkündür. Polistirenin pek çok farklı kimyasala karşı dayanımının yüksek olduğunu da söylemek gerekmektedir:

- Alkaliler
- Tuzlar
- Daha düşük alkoller
- Zayıf asitler

#### **2.1.5.f. Mekanik özellikler**

Plastiklerin özelliklerine bakıldığında en önemli özelliklerinden birinin visko elastik davranışı olduğunu söylemek gerekmektedir. Visko elastik davranışı sünme ya da gevşeme davranışı olarak da kabul edilmektedir. Herhangi bir stres söz konusu olduğunda plastiğin sünmesi ya da deformasyonu ortaya çıkmaktadır. Deformasyona uğrayan bir plastiğin gerilmeleri azaltıldığında ise gevşeme davranışı sergilenmektedir (Akkurt 2007).



### **2.1.5.g. Kimyasal zellikler**

Plastikler ile metal malzemeler birbiri ile karşılaştırıldığında plastiklerin kimyasal maddelere karşı daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Örnek vermek gerekirse termoplastikler herhangi bir zayıf asit, alkali ve tuzların çözeltisinden etkilenmemektedir. Asitlerin saklandığı kapların bu nedenle polietilen ve polipropilen malzemeden üretildiği görülmektedir. Termoplastik malzemeler, organik çözücülerin etkisinde kaldığında çözünme ya da şişme davranışı sergilemektedir. Aynı zamanda güçlü asitler de bu malzemelere etki etmektedir (Lampman 2003; Mills 2005; Akkurt 2007; Rosato 2011).

## **2.2. Mikroplastikler ve Nanoplastikler**

### **2.2.1. Mikroplastikler**

Mikroplastiklerin tanımı yapılırken sadece boyutları değil, sular ya da kimyasal maddeler içerisindeki çözünürlükleri de dikkate alınmıştır. Verschoor (2015), nadiren ortaya çıkan özellikleri de ele alarak mikroplastikler ile ilgili bir rapor hazırlamıştır. Mikroplastikler ile ilgili yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Raporların pek çoğu uluslararası bir farkındalık yaratmak adına oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda Nash ve Frias (2019) mikroplastikler için yeni bir tanım oluşturmuştur: “Mikroplastikler, suda çözünmeyen, birincil veya ikincil üretim kaynaklı, 1 mm- 5 mm arasında değişen, düzenli veya düzensiz şekilli olan herhangi bir sentetik katı parçacık veya polimerik matrislerdir” (Frias and Nash 2019).

Yapılan tanıma bakıldığında dünya çapında kabul görebilecek nitelikte olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanında mikroplastikleri inceleme, izleme ve karşılaştırma açısından da avantajlı bir tanım olduğunu söylemek gerekmektedir. Kaynaklarına bakarak mikroplastikleri iki farklı şekilde incelemek mümkündür. Birincil (primer), ikincil (sekonder) mikroplastikler araştırma kapsamındadır. Boyutları 5 mm’den daha küçük olan mikroplastikler birincil sınıfta yer almaktadır. 2017 senesine kadar legal bir

şekilde kozmetik ürünlere eklenebilen ancak, günümüzde yasaklı ürün listesinde bulunan mikrobaloncuklar, tekstil sektöründe yer alan simler, sanayi alanında kullanılan üretim paletleri birincil mikroplastikler olarak kabul edilmektedir.

Büyük boyutlu plastiklerin zaman içerisinde farklı etkiler altında aşınması sonucunda oluşan mikroplastikler ikincil grupta yer almaktadır. Plastiklerin döküntüleri, sentetik tekstil ürünlerinden kopmuş olan mikrolifler ikincil mikroplastiklere örnektir.

### **2.2.2. Nanoplastikler**

Söz konusu nanoplastikler olduğunda elde edilen bilgiler çok sınırlıdır. Stephan Wagner, yapmış olduğu çalışmalarda nanoplastikler hakkında bilgi toplamaya çalışmıştır. İlk olarak, çevrede ne kadar nanoplastik olduğu bilinmemektedir. Laboratuvar ortamında nanoplastik üzerine çalışmak adına pek çok analitik yöntem vardır, ancak bu analitik yöntemler ile çevresel etkileri araştırmak tam olarak mümkün değildir. Büyük malzemelerden koparak oluşan pek çok nanoplastik malzeme olduğu bilinmekte ancak, bu kopmaların nasıl gerçekleştiği hakkında net fikirler sunulamamaktadır. Nanoplastik parçalar oldukça küçük boyutludur. Bu nedenle hayvan dokularına ve organlarına kolay bir şekilde nüfuz edebilmektedir.

Denise Mitrano *et al.* Nanoplastiklerin akıbetini izlemek amacı ile bir çalışma yapmıştır. Metal nanoparçacıklar, metaller için yaygın şekilde kullanılan analitik teknikler ile analiz edilmiş ancak, net sonuçlara ulaşamamıştır. Çevrede bulunan nanoparçacıklar için yeterli araştırma yapılamamış olsa da metal katkılı nanoparçacıklar için laboratuvar çalışmaları sürdürmek mümkündür.

Michael Sander *et al.* Nanoplastiklerin çevrede ne kadar var olduğunu ve doğal bileşenlerinin ne olduğunu anlamak adına 13 C etiketli plastiklerden yararlanmıştır. Bu çalışma sonucunda biyolojik açıdan bozunma ihtimali olan polimer malzemelerin değerlendirilmesinde bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin en önemli özelliği ayırım

yapabilmesidir. Nanoplastiklerin oluşumunda ortak tekniklerin kullanılmasının mı yoksa moleküler parçalanmaların mı etkili olduğu bu yöntem ile anlaşılabilir.

### **2.2.2.a. Nanoplastiklerin kaynakları**

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 60 milyar TL'den fazla plastik ham madde üretilmektedir. İlk olarak silindirik ya da disk şeklindeki termoplastikler plastik işleme tesislerine gönderilmektedir. Burada pek çok plastik eritilmekte, ardından da kalıplara dökülmektedir. Ancak, bazı zamanlarda plastiklerin denizlere döküldüğü de görülebilmektedir. Kontrolsüz şekilde denizlere dökülen plastikler ise çevre kirliliğine neden olmaktadır (Gabrys *et al.* 2013).

Mikroplastik çöp kaynaklarına bakılacak olursa evsel atıklar, sanayi atıkları, trafik atıkları, atık su arıtma tesisleri ön plana çıkmaktadır. Ne yazık ki atık su arıtma tesislerinde bolca sentetik tekstil elyaf malzemesi ve kozmetik mikrobuncuklar bulunmaktadır (Browne *et al.* 2011). Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, atık su arıtma tesislerine gelen bu mikroplastikler mevcut işletilen metotlarla giderilemeden alıcı ortamlara deşarj edilmektedir (Talvitie and Heinonen 2014). Alıcı ortamlar genel olarak göller ya da akarsulardır. Bu değerli su kaynaklarına kontrolsüz bir şekilde mikroplastik ilavesi, ekolojik dengeyi bozmaktadır (Eriksen *et al.* 2013).

Kozmetik ürünlerin içerisinde yer alan mikrobuncukların çaplarının 1 mm ile 4 mm arasında değiştiği görülmektedir. Kişisel bakım ürünlerinde bulunan bu mikrobuncuklar lavabo sistemleri ile birlikte kanalizasyona ulaşmaktadır. Su içerisinde yer alan atıkların %90'ının plastik kökenli olduğunu söylemek gerekmektedir. Suda yaşayan organizmalar mikroplastikleri tüketmekte, yaşayan organizmalara geçen mikroplastikler daha sonra avcı hayvanlar tarafından da tüketilerek besin zincirine mikroplastiklerin yayılımı gerçekleşmektedir (Setälä *et al.* 2014).

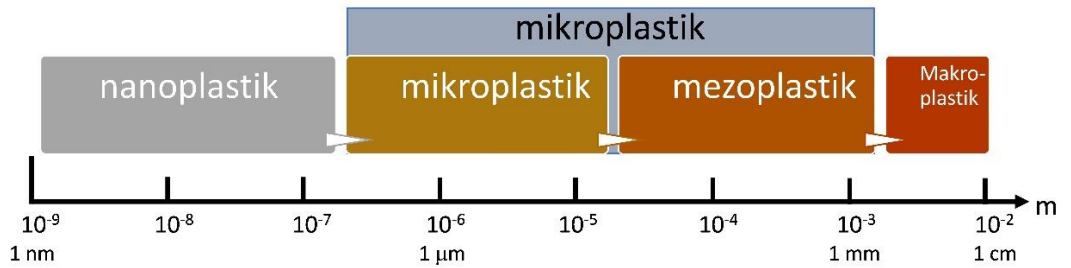
Birincil nanoplastik kaynakları söz konusu olduğunda akla ilk olarak nanoplastiklerin kullanıldığı, çevrede emisyonlara neden olan ürünler ve uygulamalar gelmelidir. Su

bazlı boyalardan yapıştırıcılara, kaplamalardan kafeslere, biyomedikal ürünlerden tıbbi teşhis ürünlerine, manyetik ürünlerden elektronik ürünlere kadar pek çok alan nanoplastik kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bunların yanında polistiren köpüğü de bir nanoplastik kaynağıdır (Zhang *et al.* 2012).

Söz konusu polistiren ve polietilen nanoparçacıklar olduğunda bunların sentezlenmesi oldukça kolaydır (Lu *et al.* 2009; Rao and Geckeler 2011). Tıbbi uygulamalar içerisinde genellikle biyolojik açıdan parçalanabilir özellik gösteren polimerik nanoparçacıklar ve nano kapsüller yer almaktadır (Guterres *et al.* 2007). Bazı araştırmalar bu açıdan incelenen nanoplastiklerin çevrede çok az miktarda bulunduğunu, bu nedenle de tehlike içermediğini söylemektedir.

Kozmetik ürünler içerisinde nanoplastiklerin yer aldığı bilinmektedir. Peeling ürünlerinde ya da cilt temizleyicileri içerisinde yaklaşık 4  $\mu\text{m}$  boyutlarında nanoplastikler yer almaktadır (Fendall and Swell 2009).

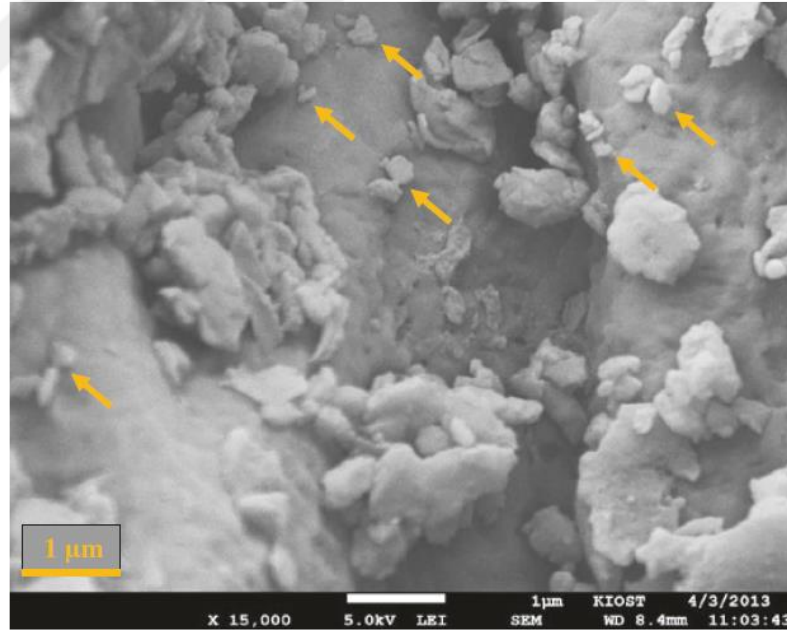
Küçük boyutlu plastik parçacıkların boyutlarına göre isimlendirilmesinde literatürde net sınırlar bulunmamakla birlikte, ilgili yayınlarda kullanılan değerlerle Şekil 2.4'teki gibi bir ölçeklendirme yapılabilir (Browne *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2009; Claessens *et al.* 2013; Desforgues *et al.* 2014; Hartmann *et al.* 2015; Rocha-Santos and Duarte 2015; da Costa *et al.* 2016). Birçok yayında mezoplastikler, mikroplastik sınıfında değerlendirilmiştir.



Şekil 2.4. Literatürde Boyutlarına göre plastiklerin sınıflandırılması

Polimerlerin zincirlerine bakıldığında çeşitli uzunluklarda oldukları görülmektedir. Her ne kadar zincirler arasında boşluklar bulunsa da zayıf sekonder bağlar ile birbirlerine bağlıdır. Fiziksel bir etkileşim sonucunda kimyasal bir bağlanma oluşmaktadır. Eğer ki bağlar zayıf etkileşimler ile oluşuyorsa bu tarz polimerler düşük enerji seviyelerinde kırılma eğilimi içerisindedir. Gerek kırılma gerek ise sürtünme gibi dış etkenler nedeni ile de nano, mikro ve milimetre boyutlarında yeni parçalar oluşmaktadır.

Genişletilmiş polistiren boncukları cam boncuk ve kum ile mekanik bir etkileşime girmiş, sonuç olarak da nano ve mikro parçaları elde edilmiştir Shim *et al.* (2014). Nanometre boyutlu olan genişletilmiş polistirenin oluşumu taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş, dağıtıcı X- ışını spektroskopisi ile de doğrulanmıştır (Koelmans *et al.* 2015) (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Genleşmiş polistiren küreciklerin yüzeyine tutturulmuş olan ve genişletilmiş polistiren küreciklerinden hızlandırılmış mekanik aşındırma (bir cam şişede 113 rpm'de yuvarlanan) ile cam boncuklarla (3 mm çapında yuvarlanan) parçalanmış mikro ve nano boyutlu polistiren parçacıklarının taramalı elektron mikroskopisi görüntüsü). Nanometre büyüklüğünde parçacıklar sarı oklarla belirtilmiştir (Koelmans *et al.* 2015).

Yapılan deney, bir yandan kumsallarda ya da nehir kıyılarında oluşan gerçek koşullar ile aynı unsurlara sahiptir. Sadece UV ışını eksikliği vardır. UV ışını ile etkileşim

içerisinde olma ya da yüksek sıcaklığa maruz kalma gibi durumlar dağılma hızının artmasına ve plastik parçalarının boyutunun azalmasına neden olmaktadır. Ancak, bu sürecin oluşumu ve göreceli önemi bu alanda doğrulanmalıdır. Bununla birlikte, mevcut bilgiler göz önüne alındığında, fiziksel erozyonun ilgili nanoplastiklerin kaynağı olduğundan şüphelenilmektedir. Henüz kanıtlanmamış olmasına rağmen, mikroplastikleri 100 nanometrenin altına düşürmek üçüncü bir nanoplastik kaynağı olabilir.

Söz konusu okyanuslar olduğunda bozulmaların daha yavaş ilerlediği tahmini yapılmaktadır. Çünkü burada daha az ışık, daha az oksijen ve daha az bakteri bulunmaktadır. Su yüzeyi içindeki mikrobiyal veya foto parçalanma daha küçük polimerlerin oluşmasına destek olabilir, ancak nano boyutlara ulaşması çok daha uzun sürecektir.

#### **2.2.2.b. Nanoplastik tespiti**

Analitik yöntemler ile deniz suyunda ya da tatlı sularda ne kadar nanoplastik olduğu net şekilde öğrenilememektedir. Laboratuvar ortamında nano malzemeler için pek çok analitik yöntem uygulanabilmektedir:

- UV-VIS spektrometresi
- Elektron mikroskobu
- Alan akış fraksiyonlama (FFF)
- Dinamik ışık saçma (DLS) (Von der Kammer *et al.* 2012)

Shim *et al.* (2014) yapmış oldukları çalışma kapsamında nanoplastiklerin varlığını tespit etmek istemiş, bunun için de Scaning Elektron Mikroskobunu kullanmıştır.

Wegner *et al.* (2012) yapmış oldukları çalışmalarında midyeden yardım almış (*Mytilus edulis*), kırmızı boyalı nanoparçacıkları tespit edebilmek adına çoklu dalga boyunda

UV-VIS kullanmıştır. Aynı zamanda biyolojik olarak kullanıma açık olan bu parçaların gerçek boyutlarına ulaşabilmek adına da dinamik ışık saçılımından (DLS) yararlanmıştır.

Velzeboer *et al.* (2014a) nanopolistiren parçalarının karakterize edebilmek adına TEM ve geleneksel ışık mikroskopisinden yararlanmıştır.

Kools *et al.* (2014) yapmış oldukları çalışmada doğal yüzey suyu örneklerinde çeşitli plastik türleri arasında ayırım yapmak için pirolizle çok açılı ışık saçılımıyla birleştirilmiş alan akış fraksiyonlama uygulanmıştır (Kools *et al.* 2014).

Andrady (2011) yapmış olduğu çalışmada plastik molozların birbirinden ayrışması sırasında nano ölçekli parçaların oluştuğunu ancak, henüz tam olarak boyutlarına ulaşamadığını belirtmiştir. Pek çok çalışma yapılmış, yapılan çalışmaların sonucunda ise nanoplastik oluşumu ispat edilmiştir (Shim *et al.* 2014).

Cózar *et al.* (2014), okyanuslarda beklenen boyut dağılımının alt ucunda plastik parçacıkların eksikliğini tespit etmiş ve nanofragmentasyonun bu eksiklik için makul bir açıklama olabileceğini savunmuştur.

### **2.2.2.c. Nanoplastiklerin akibeti**

Söz konusu su ortamı olduğunda nanoplastiklerin yeterli derece incelenmediği görülmektedir. Bu nedenle varsayımlar üzerinden işlem yapılmaktadır. Tatlı su kaynaklarından denize plastiklerin taşındığı görülmüş, mikro ve nano plastiklerin sulu çevrede sayısı artmıştır. Çökeltme, yeniden süspansiyon, foto ve biyolojik bozunma ve sudaki sediment gibi nanomalzemelerin davranışı dikkate alınması gereken önemli bir husustur (Quik *et al.* 2014; Besseling *et al.* 2014b).

Velzeboer *et al.* (2014a), 60 µm polistiren parçacıklarını kullanmış ve TEM'den yararlanmış, 28 gün sonra çok çeşitli agrega boyutları, yani  $199.3 \pm 176.3$  µm (Aralık 100-500 µm) gözlemlemiştir.

Bhattacharya *et al.* (2010), 20 µm'lik polistiren parçalarının, tatlı su fitoplankton hücreleri ile yüksek oranda bağlanma veya heteroagregasyonu olduğunu saptamıştır.

Besseling *et al.* (2014b), ilk nanoplastik durum modelini oluşturmuştur. Model, 40 km'lik bir alanda uygulanmış, nanoplastik birikiminin partikül büyüklüğüne, yoğunluğa, bağlanma verimliliğine bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Söz konusu deniz alanları olduğunda yukarıda bahsedilen tüm işlemlerin meydana geldiği bilinmektedir. Burada akış desenlerinde, bulunma sürelerinde, doğal kolloidlerde ve asılı katı maddelerin niteliğinde farklılıklar bulunmaktadır. Deniz suyu içerisindeki bağlanma verimi, yüksek bir iyonik kuvvetin oluşması nedeni ile tatlı sudan çok daha yüksektir. Çarpışma frekanslarına bakılacak olursa su kolonundaki doğal kolloidlerin ve katıların daha düşük konsantrasyonları nedeniyle daha düşüktür.

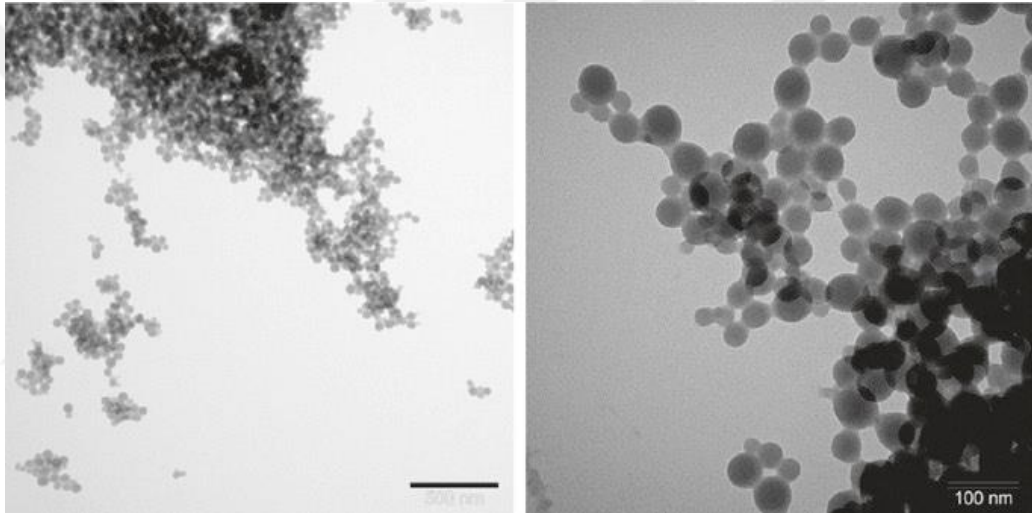
Wegner *et al.* (2012), deniz suyu içerisinde 30 µm polistiren polimerlerinin homoagregasyonunu ölçen ilk kişiler olma özelliğini taşımaktadır. 16 dakika süresince 1000 µm agreganın oluştuğu görülmüştür.

Velzeboer *et al.* (2014a), yapmış olduğu çalışmada el değmemiş 60 µm karbonsilatlı polistiren parçacıklarından yararlanmış, 28 gün sonra ise agrega boyutlarının farkını incelemiştir. Bu incelemede farklı boyutlar elde edilmiştir.

Della Torre *et al.* (2014) tarafından kullanılan 40 µm karboksilatlı polistiren parçacıkları, doğal deniz suyunda  $1764 \pm 409$  nm'lik agregalar oluştururken, 50 µm'lik amino modifiye edilmiş polistirenleri, nano-ölçekte ( $89 \pm 2$  µm) dağılmış hâlde kalmasına rağmen, kısmen toplandığı görülmüştür.



Deniz suyunun yoğunluğu daha düşük sıcaklıklarda daha yüksek tuzluluk oranlarında yükselmektedir. Yani mevsime ve yere göre farklı değerlere sahip olmaktadır. Nanoplastik parçaların yoğunluğu polimerin türüne, yüzey kimyasına, kirlenme derecesine ve biyofilmin kalınlığına bağlı olarak değişmektedir. Nanoplastik parçaların çökme durumunun nanoplastiğin yoğunluğunun deniz suyu yoğunluğundan yüksek olduğu ana kadar gerçekleştiği bilinmektedir (Cózar *et al.* 2014). Deniz ortamındaki nanoplastik davranışını özel olarak simüle eden modeller henüz yayınlanmamıştır (Burd and Jackson 2009).



**Şekil 2.6.** Tatlı su (solda) ve deniz suyu (sağda) 70 nm'lik nano boyutlu polistiren agregaların transmisyon elektron mikroskopisi görüntüleri (Koelmans *et al.* 2015)

#### 2.2.2.d. Nanoplastiklerin canlı sistemler üzerine etkileri

Yapılan pek çok çalışma kapsamında nanoplastiklerin birikimi ve etkileri incelenmiştir. Rossi *et al.* (2014), nano boyutlu polistirenin biyolojik zarlarının özellikleri incelemek adına moleküler simülasyonlar kullanmıştır. Araştırmanın sonucunda ise nanoplastiklerin lipid zarlarına hızlıca giriş yapabildiği görülmüştür. Ancak, yine de bu sonucun gerçeklik yüzdesini öngörebilmek adına daha çok deney yapılması gerekmektedir. Salvati *et al.* (2011), 40 µm ile 50 µm arasında değişen karboksilatlı nanopolistiren boyutlarının, farklı endositoz yollarıyla geri dönüşümsüz hücrelere girdiğini göstermiştir. Fare akciğer dokusunda 64 µm polistiren parçalarının ortaya

çıktığı görülmüştür. Polistiren gibi düşük toksisiteli bir materyalin nano ölçekte mevcut olduğunda inflamatuvar bir potansiyeli olabileceğini göstermektedir (Brown *et al.* 2001).

### 2.3. Oksidatif Stres

Bir hücrenin doğumundan ölümüne kadar geçen süreçten sorumlu olan mekanizmalar;

- Fiziksel,
- Kimyasal,
- Enfeksiyöz,
- İmmünolojik,
- Beslenme (Jain *et al.* 2011) olarak sıralanabilmektedir.

Hücre içerisinde apoptozis ve nekrozise neden olan pek çok faktör olsa da bunların en önemlisi oksidan maddelerdir. Oksidan maddeler, bir süre sonra hücrenin hasar almasına ve ölümüne neden olabilmektedir.

Balıklar hem doğal ortamlarında hem de yapay ortamlarda stres altında kalabilmektedir. Strese neden olan durumlar ise;

- Çevre kirliliği,
- Hastalıklar,
- Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar,
- Balık sınıflandırma,
- Ulaştırma ve aşılama,
- Balığın taşınması,
- Tek yönlü beslenme olarak sıralanabilmektedir.

Oksijen tüketen her bir organizmada olduğu gibi balıkların da reaktif oksijen ürünlerinin zararlarını bertaraf etmek adına savunma sistemi bulunmaktadır. Savunma sistemi

“antioksidan savunma sistemi” olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda savunma aşamasında kullanılan vitaminler de yine “antioksidan vitaminler” olarak isimlendirilmiştir. Antioksidan vitaminler A, E ve C olarak karşımıza çıkmaktadır.

Organizmaların anabolik ve katabolik olaylarında ve enzimlerinde yer alan antioksidan vitaminlerin yetersiz olması fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da zarar görmesine neden olabilmektedir (McCarthy *et al.* 2001). Antioksidan vitaminlerin en önemli görevi serbest radikalleri nötrlemek ve organizmayı korumaktır. Tek bir antioksidan vitamin organizmayı koruyabileceği gibi birçoğunun bir araya gelmesiyle de organizma korunabilir (Brauner 1999).

Balıkların bünyesinde yer alan antioksidan savunma mekanizmasının pek çok aktivitesi bulunmaktadır.

- Dokulara zararı olan faktörlerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar.
- Enfeksiyonun oluşmasını önlerken vücudun enfeksiyonlara karşı savunulmasında görev alır.

Bunların yanında hem moleküler oksijenin sağlanmasında hem de aminoasitlerin katabolizmasında etkilidir. Sayılan tüm reaksiyonlar içerisinde diğer oksidazları (oksijeni suya indirgeyen enzimler veya hidrojen peroksit) ve oksijenazları (oksijeni oksitleyici moleküle bağlayan enzimler) barındırmaktadır. Oksijenin dış yörüngesine eşleşmemiş elektron tek ya da birden fazla şekilde eklenerek güçlü toksine dönüşüm sağlanmaktadır. Bileşiklerin içerisinde de eşleşmemiş elektronların bulunması reaksiyonları hızlandırmakta böylelikle çok etkili hasarlar meydana gelmektedir.

Günümüzde oksijenin canlılarda meydana getirdiği toksik etkilerin oksijen metabolizması anında oluşan ve “oksijen radikalleri” olarak isimlendirilen reaktif türlerden dolayı olduğu görülmektedir. Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan çeşitli reaktif oksijen türevleri (ROS) hücre bileşenleri için toksik etkilere sahiptir.

Normal bir aerobik yaşam bağlamı olarak adlandırılan oksidatif reaksiyonlar;

- Reaktif oksijen türlerine,
- DNA,
- Proteinler,
- Karbonhidratlar,
- Lipitler gibi makro boyuttaki moleküler hücrelere kovalent bağ ile bağlanarak yapısal alanda hasarların oluşmasına neden olmaktadır.

Reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu oksidatif hasara “oksidatif stres” adı verilmektedir. Ksenobiyotiklerin metabolizması yüksek oranda reaktif oksijen türevleri (ROS) üretmekte, sulu ortamda yaşayan organizmalar genellikle kronik çevre kirliliğinin sonucu olarak oksidatif strese karşı dirençlerini kaybetmektedir (Keleştemur ve Özdemir 2011).

### **2.3.1. Serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu**

Bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron çiftini bünyesinde bulunduran atomlara ya da moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir. O<sub>2</sub>'nin redüksiyonu, hücre hasarına neden olan ROS'un oluşmasına ve artmasına neden olmaktadır. Bu durum ise “oksijen peroksidasyonu” olarak isimlendirilmiştir (Ziskoven *et al.* 2010).

Oksidanlar iki grup içerisinde incelenmektedir. Bunlardan biri tek elektron eksiği nedeni ile moleküller ile kolay bir şekilde elektron aktarımı yapan oksidanlardır. İkincisi ise non-radikal olarak adlandırılan elektron ihtiyacı olması hâlde düşük bağ kurmayı başaran oksidanlardır (Stadler 2012).

Radikaller;

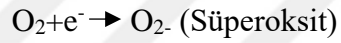
- Süperoksit radikali,

- Hidroksil radikali,
- Alkoksil radikali,
- Peroksil radikali,
- Hiperoksi radikali olarak örneklendirilebilir.

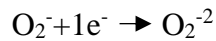
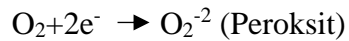
Non-Radikaller;

- Hidrojen peroksit,
- Nitrik oksit,
- Hipoklorit (Zarbin 2012) olarak örneklendirilebilir.

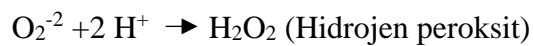
Doğal hâlde bulunan oksijen molekülüne, etrafta bulunan bir molekülden elektron gelmesi ile süperoksit radikali oluşur.



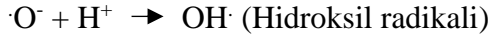
Doğal hâlde bulunan oksijen molekülü, diğer moleküllerden iki adet elektron alırsa peroksit oluşacaktır.



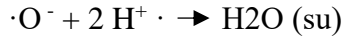
Peroksit molekülü iki  $\text{H}^+$  atomuyla birleşmesi ile birlikte hidrojen peroksit molekülü oluşmaktadır.



Tek atom durumunda ve elektronu eksik olan oksijen partikülüyle bir  $\text{H}^+$  birleşecek olursa reaktivitesi güçlü olan hidroksil radikali oluşur.



Tek atom durumunda ve eksiksiz elektronu olan oksijen radikali 2 adet  $\text{H}^+$  alırsa su molekülü oluşur.



Hidrojen peroksit molekülünün 1 adet Cl atomuyla reaksiyona girmesi sonucunda hipoklorit oluşur (Castrogiovanni and Imbesi 2012).



Floresein, karboksi-H2DCFDA'nın karboksi türevi, karboksillenmemiş formlara kıyasla tutulmasını artıran ek negatif yükler taşır. Florlanmış türev, H2DFFDA, klorlanmış floresein türevlerine kıyasla gelişmiş fotostabilite gösterir. CM-H2DCFDA pasif olarak hücrelere yayılır, burada asetat grupları hücre içi esterazlarla yarılr ve tiyol-reaktif klorometil grubu hücre içi glutatyon ve diğer tiyollerle reaksiyona girer.

#### 2.4. Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Tropikal bir tür olan zebra balığı, *Danio rerio* *Cyprinidae* familyasına aittir (Ninkovic and Bally-Cuif 2006). Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları yoğun olarak Pakistan ve Hindistan'da bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür (Mione and Trede 2010). Zebra balığının bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması, 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak üzerinde araştırmalar yapılan bir tür olmasını sağlamıştır (Miklosi and Andrew 2006). Erişkin bireylerin boyları 4.5-5 cm uzunluktadır. Morfolojik olarak erkek bireyler dişi bireylerden farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptir (Medina and Royo 2013).

Aşağıda Latince ve Türkçe terimler yer almaktadır.

- Klasis: *Osteichthyes* (Kemikli Balıklar)
- Subklasis: *Actinopterygii* (Işımsal Yüzgeçliler)
- Superordo: *Teleostei* (Gerçek Kemikli Balıklar)
- Ordo: *Cypriniformes* (Sazanlar)
- Regnum: *Animalia* (Hayvanlar)
- Filum: *Chordata* (Kordalılar)
- Subfilum: *Vertebrata* (Omurgalılar)
- Superklasis: *Pisces* (Balıklar)
- Familya: *Cyprinidae* (Sazangiller)
- Cins: *Danio*
- Tür: *Danio rerio*

Zebra balığı çalışmaları; lazer tarama mikroskopisi, davranış analizi ve genetik mühendisliği oldukça yaygındır. Bu durumun nedeni zebra balığının toksisite çalışmalarına yatkın olmasıdır. Aynı zamanda nörolojik ve beyin araştırmaları için de bu hayvanın ideal bir yapısı bulunmaktadır (Matsui 2017). Zebra balığı embriyoları ele alındığında 5-6 dpf'ye kadar besin kesesine bağımlı olarak yaşadığından kapalı sistem olarak ifade edilmekte, bu süre içerisinde embriyolar dışardan besin almamaktadır (Fraher *et al.* 2016).

Tropik balık türlerinden biri olarak kabul edilen zebra balığı (*Danio rerio*) biyomedikal araştırmalar için ideal bir yapı sunmaktadır. Zebra balığı (*Danio rerio*) özellikleri aşağıdaki gibidir;

- Jenerasyon süresi oldukça kısadır,
- Düşük bir maliyete sahiptir,
- Bakımı oldukça kolaydır,
- Embriyolar optik transparan özelliğe sahiptir,

- Gen manipölasyonları oldukça basittir.

Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları genel olarak uterusun dış bölgesinde gelişim gösterdiği için görüntüleme yapmak oldukça kolaydır. Zebra balığının (*Danio rerio*) doğurganlığı da oldukça yüksektir. Tek bir balık 1 hafta içerisinde 200-300 embriyo oluşturmaktadır. Aynı zamanda embriyoların gelişimi çok hızlıdır ve 24 saat içerisinde majör organ fertilizasyonu oluşmaktadır. Söz konusu yüksek ölçekli ilaç araştırmaları olduğunda Zebra balığı (*Danio rerio*) en ideal bir model organizma olarak değerlendirilmektedir.

Zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları haznelere yerleştirilebilmekte, binden fazla embriyo üzerinde çalışılabilmektedir. Böylece ilaç sektörü için önemli bir yere sahip olmalarının nedeni anlaşılabilir (Zon and Peterson 2005). Zebra balığı (*Danio rerio*) hücre gelişimlerini takip etmek de oldukça kolay olmaktadır. Canlı dokusunda herhangi bir hastalık olduğunda görüntüsünü alma kolaylığının olması zebra balığı (*Danio rerio*) ile çalışılmasının en önemli nedenleri içindedir (Bibliowicz *et al.* 2011). Tek dezavantajı, genlerin genelinin iki adet kopya bulunduruyor olmasıdır.

Zebra balıklarındaki üreme ovipar yöntem ile olmaktadır. 74-75 günlük olan bir zebra balığının erkeklerinin 23,1 mm uzunluğa, dişilerinin ise 24,9 mm uzunluğa sahip olması beklenmektedir. Bu uzunluğa gelen Zebra balıkları üreme için uygun bir hal almaktadır. Dişi Zebra balıklarının üreme dönemlerinde 150-400 adet arasında yumurta ürettiği bilinmektedir. Bir Zebra balığının hayatı boyunca vermiş olduğu yumurta sayısı 30 bine yaklaşmaktadır (Meseureur and Vergunst 2014).

Sulu çevrede var olan omurgalılar diğer çevrelerde yaşayan omurgalılara göre stres faktörlere daha fazla maruz kaldıkları için ekotoksikolojik araştırmalar oldukça önemlidir (Mizgirev and Revskoy 2010). Zebra balığının laboratuvar ortamında sıklıkla kullanılmasının nedenleri aşağıdaki gibidir:

- Laboratuvar ortamında basit bir şekilde beslenebilmesi



- Dış dölleme ile çoğalabilmesi
- Yumurtalarının ve embriyolarının şeffaf olması
- Yumurtaların ve larvaların gelişiminin kolay bir şekilde izlenebilmesi
- Embriyoların toksik maddelere karşı duyarlı olması (Mohseny and Hogendoorn 2014)

İnsan hastalıklarının incelenmesi için zebra balığı önemli bir modeldir (Morris 2009). İnsanların ve diğer omurgalı canlıların zebra balığı ile genom yapıları benzerdir. Aynı zamanda metabolizma sistemleri ve embriyonik gelişimleri de oldukça yakındır. İnsanlarda var olan tümör baskılayıcı gen olan sitokrom P450 grubunun zebra balığında bulunması, zebra balığını en iyi kobay durumuna dönüştürmektedir (Moshal *et al.* 2010). Bunların yanında ksenobiyotik metabolizmasının faz 1 ve faz 2 enzimleri zebra balıklarında da bulunmaktadır (Mushtaq *et al.* 2013). Laboratuvar fareleri ile zebra balıkları karşılaştırıldığında zebra balıklarının yaşam döngülerinin daha kısa olduğu görülmektedir. Böylelikle yapılan deneylerde birden fazla kuşağı takip etmek mümkün olmaktadır (Muto and Kawakami 2013). Aynı zamanda farelerin embriyo gelişimleri anne vücudunun içerisinde olduğundan araştırmacı embriyo dönemini en başından beri inceleyememektedir. Zebra balığı embriyoları ise anne vücudunun dışındadır ve bu nedenle dölleme esnasından itibaren takip edilmesi kolaydır (Newman *et al.* 2014). Toksikoloji araştırmaları söz konusu olduğunda zebra balıklarının seçilmesinin bir diğer nedeni ise testin kısılalığı ve sonuçların hassasiyetidir (Norton and Bally-Cuif 2010).

Zebra balığının embriyoları dış ortamda geliştiği için kolay bir şekilde izlenebilmekte ve istenilen koşullar değiştirilebilmektedir. Zebra balıklarının embriyo gelişimi oldukça hızlıdır. Organizasyonunda ise karmaşık bir yapı bulunmamaktadır. Bu nedenle genetik analizler için ideal bir yapı sunmaktadır. Bunun yanında zebra balığı için gen transfer yöntemlerinin geliştiğini söylemek gerekmektedir. İnsan genlerinin ve hastalıklarının pekçoğunun zebra balığında da mevcut olduğu bilinmektedir. Zebra balığı 1,7 milyar baz çiftini bünyesinde bulundurmaktadır. Elde edilen mutant özellikteki zebra balıkları insan hastalıkları için en ideal modeli oluşturmaktadır. Aynı zamanda ilaçların piyasaya

sunulmadan önce denenmesi için de optimum seçenek zebra balıklarıdır. Zebra balıkları;

- Alzheimer hastalığı,
- Konjenital kalp hastalığı,
- Polisistik böbrek hastalığı,
- Kanser gibi modelleri de içinde barındırmaktadır.

## 2.5. Mikroskoplar

Mikro skopi işleminin yapılabilmesi için mikroskop oldukça önemlidir. Yani mikroskoplar mikro boyutlarda olan nesnelerin net bir şekilde görüntülenebilmesi için gereklidir. Skop, “görüntüleme” anlamına gelmektedir. İnsanlar çıplak göz ile mikro boyuttaki nesneleri göremez. Teknolojik gelişmeler sayesinde mikroskop icat edilmiş ve mikro boyuttaki nesnelerin görüntülenmesi sağlanmıştır. Günümüz teknolojisinde 250000 kez büyütme işlemi sağlayabilen elektron mikroskopları vardır. Mikroskoplar en çok tıp bilimi içerisinde kullanılmaktadır. Patoloji için de en önemli cihazlar arasında yer almaktadır.

Mikroskoplar, bilim dünyasında en eski ve en yaygın kullanılan cihazlardır. Gelişen teknolojiye paralel olarak, bilim adamları şimdiye kadar gördükleri ve tanımladıkları yapıları canlı organizmada ve doğal olarak ve mümkün olduğunca kendi akış hızlarında görmek istediler. Bu, hücrenin canlı kalmasını, görüntülerin yeterince hızlı olmasını ve kaydedilmesini gerektiriyordu. Bunun ötesinde, elde edilen görüntüler analiz edilmek istenmiştir. Bilgisayar teknolojilerinin gelişimi bu aşamada mikroskopların gelişimine en önemli katkıyı sağlamıştır. Mikroişlemcilerin dijital veri akış yollarının hızlandırılması, entegre kartların monitörlere eş zamanlı olarak görüntü gönderebilme becerisi, alınan görüntünün kaydedilmesi, canlı hücre ortamlarının mikroskoplara geri bildirimle bağlanması canlı yapılar üzerinde gözlemler sağlamıştır. Bunlara ek olarak lazer, kamera ve dedektörlerin geliştirilmesi ile yeni nesil konfokal mikroskoplar, multifoton mikroskoplar ve süper çözünürlüklü mikroskoplar piyasaya sürülmüştür. Son

olarak, optik mikroskoplar ve elektron mikroskopları birleştirilerek aynı örnek üzerinde farklı görüntüler elde edilmiştir. Bu şekilde, farklı teknolojiler aynı sorunun cevabını farklı açılardan anlatmaya başlamıştır. Bunun üç boyutta yapılabilmesi son noktadır. Bu tür analizler, özellikle dikey ekseninde zengin hücre ağlarının bulunduğu dokularda (sinir, kas) hiç görmediğimiz yapısal detayları ortaya koymaktadır (Can 2018).

Biyoloji biriminin vazgeçilmezleri arasında yer alan mikroskop canlı dokuların izlenmesi, hücrelerin araştırılması için önemli bir yere sahiptir. Nano teknoloji alanında yapılan gelişmeler, mikroskopun da önemini arttırmıştır. Yine de günümüz teknolojisinde mikroskopların yetersiz kaldığı durumlar yaşanabilmektedir.

### **2.5.1. Mikroskop çeşitleri**

#### **2.5.1.a. Stereo mikroskop**

1671 senesinde Cherubin d'Orleans tarafından icat edilen Stereo mikroskobu her iki göze birbirinden farklı görüntüler göndererek görüntü bütünü sağlamaktadır. 1800'lü yıllara kadar sağ göze sol, sol göze ise sağ görüntü gönderilmekteydi. Bu nedenle başarılı bir icat olarak kabul edilmemişti. Francis Herbert Wenham objektifin arkasına akromatik bir prizma konulması ile ışığın ikiye bölünmesini sağlayıp ilk başarılı stereomikroskobu üretmiştir.

Işık mikroskobu ile benzer özellikleri olsa da sabit dürbün mantığını benimseyen stereo mikroskoplar 3 boyutlu görüntü elde etmede kullanılmaktadır. Yaklaştırma işlemi için tek bir objektif kullanılmaktadır. Düşük büyütme ile derinlikli görüntü elde etmek için aynı zamanda da gözle görülen cisimlerin yüzeyini incelemek için kullanılmaktadır.

### **2.5.1.b. Floresan mikroskop**

Nesneler kendilerine gelen ışınları farklı dalga boylarında yansıtmakta, bu işleme floresan denmektedir. Floresan mikroskop, floresan maddelerinin dalga boylarına göre kesitlerini görüntülenmesine yardımcı olmaktadır. Floresan mikroskop maddelerin karanlık bir zemin üzerinde parlak ışıklar yaydığı ve insan gözünün görme sınırı altındaki dalga boylu ışınların kullanıldığı mikroskop türüdür. Biyolojik örnekler önceden elde edilmiş özgül antikorlarla boyanarak istenilen yapı görüntülenir. Görüntü elde edebilmek için bu ışınlarla karşılaştığında floresan veren boyalar kullanılır. Floresan mikroskoplar parazitoloji ve bakteriyolojide önemli yer tutarlar.

Esnek ve modern görünümü ile tek bir mikroskop ile dört farklı metot da numune inceleme imkânına sahiptir. Faz kontrast gözlemleri için uygulamaların ihtiyaçlarını karşılayan, floresan, polarizasyon, dijital kamera ve CCD adaptörü gibi kullanım kolaylıklarına sahiptir.

### **2.5.1.c. Konfokal mikroskop**

Hücre araştırması için en ideal mikroskop türü konfokal mikroskoptur. Doku parçaları için ise yeterli değildir. Derinlerde yer alan hücrelere floresan emisyonunun sağlanması zor olduğundan yüksek bir enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, yüksek enerji dokuyu bozabilme ihtimaline sahiptir, bu nedenle de canlı organizmalar için uygun bir mikroskop değildir (Paddock 1999; Puralı 2004).

İlk olarak örnek üzerine lazer ışını yansıtılmaktadır. Örnek üzerinden de emisyonun yayılması sağlanmaktadır. Emisyon ışın dikroik aynadan yansır ve pinhole'den geçer. PMT (foton çarpıcı)'lar tarafından sayılır. Voltaj sinyali olarak saklanır ve digital ortamda kaydedilir. Görme alanının piksellere ayrıldığı görülmektedir. Öncelikle her bir pikselin lazer ile taranması beklenmelidir. Konfokal mikroskobunda Soğurma Geçişinin (Pin-Hole) önemli bir yeri vardır. Görüntü düzlemi önüne konan pin-hole filtre görevi görür ve odak dışı yansıyan ışığın geçmesine izin vermez. Odak alanı

içindeki ışık geçirildiğinden bu sayede sadece görmek istediğimiz alan netleşir (Junqueira and Carneiro 2006).

Canlı hücre görüntüleme, GFP (yeşil florasan protein) kullanılarak hücre ve doku içi protein trafiğini görüntüleme, floroforlarla işaretlenebilen protein, gen gibi yapıları ve onların hareket ve pozisyonlarını görüntüleme, Hibridizasyon ve florasan PCR'ın de kullanıldığı kromozom üzerindeki gen lokalizasyonunu saptamada, Subselüler fonksiyonu analiz etmede kullanılan mikroskop türüdür (Paddock 1999; Junqueira and Carneiro 2006).

#### **2.5.1.d. Geçirimli elektron mikroskopu (TEM)**

Vakumlu bir ortamda, metal bir flamanın yüksek derecelere kadar ısıtılması ile elektronlar elde edilmektedir. Elektronlar serbest bırakıldıkları zaman anot ve katot içerisinde bir ivme kazanır. Böylelikle hızları artar. Anodun merkezinde yer alan açık bölümden tüpe geçen elektronlar burada bir elektron demeti oluşturmaktadır. Elektron demeti elektro manyetik mercekle tarafından hemen saptırılmaktadır. Saptırılan elektronların bazıları atomlar ile reaksiyona girerken, bazıları direkt olarak örneğin içinden geçmektedir. Elektronların çok büyük bir bölümünün objektife ulaştığı görülmektedir. Görüntü son aşamada floresan bir ekrana ya da fotoğraf plakalarına veya elektronik kameraya düşürülür. Tüm bu işlemler sonucunda ortaya çıkan görüntü siyah-beyazdır. Koyuluğun olduğu yerlerde elektronların çok olduğu, açıklığın olduğu yerlerde ise elektron geçirgenliği olduğu anlaşılmaktadır (Junqueira and Carneiro 2006).

#### **2.5.1.e. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)**

İlk olarak SEM, örnek numune üzerinde bir noktadan harekete başlayan ince bir elektron demeti oluşturmaktadır. Ancak, oluşturulan elektron demeti örneğin içinden geçmemektedir. Doku üzerine yerleştirilen bir metal tabakadan elektronların yansıdığı görülmektedir. Herhangi bir algılayıcı bu yansımayı yakalamakta, yükselticilere

göndermektedir. Elde edilmiş olan sinyaller ise direkt olarak monitöre aktarılmaktadır (Junquera and Carneiro 2006).

SEM pek çok işlem için kullanılmaktadır. Organellerin yapısının incelenmesi, organellerin dağılımlarının anlaşılması, organellerin komşuluk ilişkilerinin değerlendirilmesi için tercih edilmektedir. Bunun yanında SEM patolojik bulgular için de önemlidir.

## 2.6. Literatür Özeti

Nanoplastiklerin *Scenedesmus obliquus*'un büyümesine ve *Daphnia magna*'nın üremesine etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; nano polistiren (NPS) yeşil alg *S. obliquus* büyümesine ve fotosentezine etkileri ve zooplankton *D. magna*'nın ölüm, yeni nesil üremesi ve malformasyonları gibi etkileri incelenmiştir. Nano plastikler alglerdeki nüfus artışını ve klorofil konsantrasyonlarını azaltmıştır. Mikroplastığe maruz bırakılan *D. magna*'nın vücut büyüklüğünde olumsuz yönde değişimler ve üremesinde ciddi değişiklikler gözlenmiştir. Yeni doğanların sayılarında ve vücut büyüklüğünde azalmalar gözlenirken, yeni doğanlar arasında malformasyona uğramış bireylerin sayısı %68'e yükselmiştir. NPS'nin bu etkileri, polistrenin 0.22 ve 103 mg nano PS/L arasındaki nano parçacıkları kullanıldığında gözlenmiştir. Malformasyonlar 30 mg nano PS/L konsantrasyonlarından itibaren başlamıştır (Besseling *et al.* 2014).

Yapılan başka bir araştırmada; biyota ve abiyotik matrislerdeki mikroplastiklerin ölçümleri, ortaya çıkan bu çevresel kirlenici için maruziyet ve risk değerlendirmelerinin anahtar unsurlarıdır. Sahada toplanan biyota, tortu ve suda mikroplastiklerin bolluğu araştırılmıştır. Yoğunluk ayırımına dayanan geliştirilmiş bir tortu ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Biyotadaki mikroplastiklerin analizi için, proteinaz kullanan uyarlanmış bir enzimatik sindirim protokolünün en iyi performans gösterdiğini ve plastik partiküllerin %97 oranında geri kazanıldığını, sonraki Raman analizinde plastikler üzerinde gözlenen bir bozulma etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Alan analizi, Kuzey Denizi'nden test edilen 9 omurgasız türden 8'inin ve İsveç Batı Kıyısı'ndan analiz

edilen kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) bireylerinin %68'inde mikroplastik olduğu ortaya konulmuştur. Plastik parçacık sayısına göre midyelerde bulunan mikroplastik konsantrasyonlar, aynı lokasyondaki tortu ve yüzey suyu örneklerinde bulunanlara göre yaklaşık bin kat daha yüksek çıkmıştır (Karlsson *et al.* 2017).

Silva-Cavalcanti *et al.* (2017) yaptıkları araştırmada ulaştıkları sonuçlar: Mikroplastik kirliliği deniz ekosistemlerinde yaygındır ve biyolojik çeşitlilik için büyük bir tehdittir. Bununla birlikte, mikroplastiklerin tatlı su ortamları ve biyota üzerindeki etkileri hakkındaki bilgimiz hala çok sınırlıdır. Mikroplastiklerin tatlı su organizmaları ile etkileşimi ve insanların mikroplastikleri tüketen organizmaların tüketimiyle ilişkili riskler ile ilgili önemli bilgi eksiklikleri vardır. Bu çalışmada Güney Amerika'nın yarı kurak bölgelerinde insanlar tarafından yoğun olarak tüketilen, yaygın bir tatlı su balığı olan *Hoplosternum littorale*'nin mikroplastikleri yutması değerlendirilmiştir. Yerel balıkçıların yakaladığı balıkların bağırsaklarında bulunan plastik kalıntıları ve diğer gıda maddelerinin bolluğu ve çeşitliliği ele alınmıştır. Balıkların %83'ünün bağırsağında plastik enkaz olduğu gözlemlenmiş, şimdiye kadar bir balık türü için bildirilen en yüksek frekans olduğu tespit edilmiştir. Balık bağırsaklarından tespit edilen plastik atığın çoğunun (%88,6) mikroplastikler (<5 mm) olarak belirlenmiştir. Nehrin kentleşmiş bölgelerinde balıkların daha fazla mikroplastik tükettiğini ve mikroplastiklerin yutulmasının balıkların bağırsağındaki diğer gıda maddelerinin çeşitliliği ile negatif korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Tatlı su biyotasının mikroplastik kirliliğine karşı savunmasız olduğunu ve kentleşmenin, tatlı su ortamlarının mikroplastiklerle kirlenmesine katkıda bulunan önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Balıkların bağırsak içeriğinin, tatlı su ekosistemlerindeki mikroplastik kirliliğin kalitatif değerlendirilmesinde bir araç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür. Mikroplastiklerin yüksek insidansından sorumlu süreçleri belirlemek ve mikroplastikleri alan tatlı su balıklarının tüketimiyle insanlara yönelik riski değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Deng *et al.* (2017) yapmış oldukları araştırmada şu sonuçlara ulaşmıştır: Mikroplastikler (MP) önemli bir çevre sağlığı sorunudur ve giderek daha fazla endişe kaynağıdır. MP'ler

okyanuslarda, nehirlerde, sedimanlarda, kanalizasyonlarda, toprakta ve hatta sofrata tuzlarında tespit edilmiştir. Deniz canlıları ve insanlar üzerindeki MP'lere maruz kaldığı belgelenmiştir, ancak memeli canlılara MP'lerinin toksisite etkisi hakkında bilgi sınırlıdır. Burada farelerde MP'lerin doku dağılımı, birikimi ve dokuya özgü sağlık riskini araştırmak için iki çaplı (5 µm ve 20 µm) floresan ve bozulmamış polistiren mikroplastikler (PS-MP'ler) parçacıkları kullanılmıştır. Sonuçlar, MP'lerin partikül büyüklüğüne büyük ölçüde bağlı olan doku birikimi kinetiği ve dağılım paterni ile karaciğer, böbrek ve bağırsakta biriken MP'lerin olduğunu göstermiştir. Ek olarak, çoklu biyokimyasal biyobelirteçlerin ve metabolomik profillerin analizleri, MP'lere maruz kalmanın enerji ve lipit metabolizmasının yanı sıra oksidatif strese neden olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, nörotoksitenin kan biyobelirteçleri de değişmiştir. Sonuçlar, MP'lerin fare dokuları boyunca dağılımını ve birikmesini ortaya çıkarmıştır ve MP'lere maruz kalmanın potansiyel toksisitesini gösteren çeşitli biyobelirteçlerde önemli değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur (Deng *et al.* 2017).

Yapılan başka bir araştırmada, zebra balığı içinde polistiren mikroplastiklerin (PS-MP'ler) alımı ve doku birikimi saptanmış ve karaciğerdeki toksik etkiler araştırılmıştır. Sonuçlar, 7 günlük maruziyetten sonra 5 µm çapında MP'lerin balık solungaçlarında, karaciğerde ve bağırsakta, 20 µm çapında MP'lerin sadece balık solungaçlarında ve bağırsaklarında biriktiğini göstermiştir. Histopatolojik analizler hem 5 µm hem de 70 µm PS-MP'lerin balık karaciğerinde iltihap ve lipit birikmesine neden olduğunu göstermiştir. PS-MP'ler ayrıca süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini önemli ölçüde arttırmış ve bu da MP'lerle tedaviden sonra oksidatif stresin indüklendiğini göstermiştir. Ek olarak, metabolomik analiz sonuçlarına göre; MP'lere maruz kalmanın balık karaciğerinde metabolik profillerin değişmesine neden olduğunu ve lipit ve enerji metabolizmasını bozduğu ileri sürülmüştür (Lu *et al.* 2016).

Mattsson *et al.* (2017) araştırmalarında şu sonuçlara ulaşmıştır: Plastik malzeme üretimindeki muazzam artışlar dünya çapında plastik kirliliğinin birikmesine neden olmuştur. Birçok çalışma, büyük boyutlu plastiklerin organizmalar üzerindeki fiziksel etkilerini ele alırken, çok azı farklı kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerine rağmen



plastik nanoparçacıklara odaklanmıştır. Dolayısıyla, organizmaların ekosistem fonksiyonu, davranışı ve metabolizması üzerindeki etkilerini anlamak zor olmaya devam etmiştir. Burada plastik nanopartiküllerin suda yaşayan zooplanktonun hayatta kalmasını azalttığını ve balıklarda kan-beyin bariyerini geçerek, davranış bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir. Daha geniş bir perspektiften, bulgular plastik nanoparçacıkların bir gıda zinciri yoluyla aktarıldığını, tüketicinin beynine girdiğini ve davranışını etkilediğini, böylece doğal ekosistemlerin işlevini ciddi şekilde bozduğunu göstermiştir (Mattsson *et al.* 2017).

Pitt *et al.* (2018) yapmış oldukları araştırmada şu sonuçlara ulaşmıştır: Plastikler, sucul ortamlarda artan bir endişe kaynağı olarak her yerde bulunan antropojenik kirleticilerdir. Makroplastik kirliliğinin ekolojik etkileri iyi belgelenmiştir, ancak nanoplastikler hakkında daha az şey bilinmektedir. Mevcut çalışma nanoplastiklerin, plastik kirliliğinin ekolojik yüküne katkıda bulunabilecek potansiyel olumsuz etkilerini araştırmaktadır. Bu amaçla, yetişkin zebra balığının (*Danio rerio*) polistiren nanopartiküllere (PS NP'ler) diyetle maruz kalmasının nanoplastiklerin yavrulara transferine yol açıp açmayacağını ve nanoplastik maruziyetin zebra balığı fizyolojisini etkileyip etkilemediği incelenmiştir. Özellikle, yetişkin dişi ve erkek zebra balığı (F0 jenerasyonu) bir hafta boyunca diyet yoluyla PS NP'lere maruz bırakılmış ve F1 jenerasyonunu üretmek için yetiştirilmiştir. Dört F1 grubu oluşturulmuştur: kontrol (maruz bırakılmamış dişi ve erkekler), anne (maruz kalan dişiler), baba (maruz kalan erkekler) ve birlikte ebeveyn (maruz kalan erkekler ve dişiler). Eş-ebeveyn PS NP maruziyeti üreme başarısını önemli ölçüde etkilememiştir. F0 balıklarından alınan dokuların değerlendirilmesi, PS NP'lere maruz kalmanın beyin, kas ve testislerdeki glutatyon redüktaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığını, ancak kalp veya gonadlardaki mitokondriyal fonksiyon parametrelerini etkilemediğini ortaya çıkarmıştır. F1 embriyolarının ve larvalarının değerlendirilmesi, PS NP'lerin anne ve birlikte ebeveyn tarafından maruz bırakılan F1 embriyolarının / larvalarının yumurta sarısı, gastrointestinal sistem, karaciğer ve pankreasında bulunduğunu ortaya koymuştur. Maternal ve ko-ebeveyn maruziyet gruplarındaki embriyolarda bradikardi de gözlenmiştir. Ek olarak, glutatyon redüktaz aktivitesi ve tiyol seviyeleri, maternal ve /

veya ko-ebeveyn maruziyet gruplarından F1 embriyolarında / larvalarında azalmıştır. F1 larvalarında mitokondriyal fonksiyon ve lokomotor aktivite etkilenmemiştir. Bu çalışma, (i) PS NP'lerin annelerden yavrulara aktarıldığını ve (ii) PS NP'lere maruz kalmanın yetişkin dokularındaki ve F1 larvalarındaki antioksidan sistemi değiştirdiğini göstermiştir. PS NP'lerin biyolojik olarak birikebileceği ve yavrulara geçebileceği sonucuna varılmış, ancak bu büyük fizyolojik rahatsızlıklara yol açmamıştır (Pitt *et al.* 2018).

Bhattacharya *et al.* (2010), yaptıkları araştırmada ulaştıkları sonuçlar: Nano boyuttaki plastik boncukların bir model selüloz filmi ve iki canlı alg türü olan *Chlorella* ve *Scenedesmus* üzerine fiziksel adsorpsiyonu incelenmiştir. Bu adsorpsiyonun, boncuklar ile modelin ve canlı sistemlerin selüloz bileşeni arasındaki elektrostatik çekim nedeniyle olduğu bulunmuştur. Böyle bir yük tercihi, plastik boncuklarla bağlanması aynı zamanda Freundlich katsayıları ile karakterize edilen algal morfolojisi ve hareketliliğine bağlı olan *Chlorella* ve *Scenedesmus* için özellikle belirgindir. Bir CO<sub>2</sub> tükenme deneyi kullanarak, plastik boncukların adsorpsiyonunun, muhtemelen nanopartiküller tarafından ışık ve hava akışının fiziksel blokajı yoluyla alg fotosentezini engellediği gösterilmiştir. ROS analizi ayrıca plastik adsorpsiyonun alg ROS üretimini arttırdığı ifade edilmiştir. Plastik maruziyetine bu tür alg tepkilerinin sudaki besin zincirinin sürdürülebilirliği üzerinde etkileri olabilir (Bhattacharya *et al.* 2010).

Ward and Kach (2009), yaptıkları araştırmada elde ettikleri bulgular: Nanomalzemelerin bilim ve teknolojiye uygulanması arttıkça, herhangi bir ekotoksikolojik etkiyi anlama ihtiyacı giderek önem kazanmaktadır. Birkaç balık ve omurgasız türü üzerinde yapılan son çalışmalar, zararlı etkilerin mümkün olduğunu gösteren veriler sağlamıştır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin sudaki organizmalar tarafından alınma şekli çok az araştırılmıştır. Nanopartiküllerin, <15'lik bir tutma verimi ile <1 µm tek tek parçacıkları yakalayan iki tür süspansiyon besleme (*midye*, *Mytilus edulis*; *istiridye*, *Crassostrea virginica*) tarafından alınması incelenmiştir. Bu sınırlama göz önüne alındığında, nanoparçacıkların çok sayıda alınmadığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, (1) dağılmış veya (2) laboratuvarında üretilen agregalara gömülmüş iki floresan etiketli,

100 nm polistiren tanecikler verilmiştir. Sonuçlar, agregatların 100 nm parçacıkların alımını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Nanopartiküllerin bağırsakta tutulma süresi 10 µm'lik polistiren taneciklerinden daha uzun olmuştur, bu da nanopartiküllerin sindirim bezine taşındığını göstermiştir. Veriler, nanopartikül yutulmasının bir mekanizmasının olduğunu düşündürmüştür. Toksikolojik etkiler, nanomalzemelerin daha yüksek trofik seviyelere aktarılması üzerinde etkileri vardır (Ward and Kach 2009).

Wegner *et al.* (2012), yaptıkları araştırmada elde ettikleri sonuçlar: Endüstriyel nanoplastik üretimi ve mikroplastiklerin denizdeki daha küçük partiküllere ayrışması arttıkça, deniz ortamındaki potansiyel nanoplastik miktarı artar. Midyelerin 100 nm polistiren (PS) boncukları aldıkları; ancak bugüne kadar bu alımın organizma üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada, organizmaya farklı nano PS ve farklı alg (*Pavlova lutheri*) konsantrasyonlarına maruz bırakarak 30 nm PS'nin mavi midye (*Mytilus edulis*) beslenme davranışı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ortamındaki nano PS agregasyonunun durumu, dinamik ışık saçılması kullanılarak değerlendirilmiştir. *M. edulis*, nano PS mevcut olduğunda filtreleme aktivitesini azaltmış ve sudaki nano PS konsantrasyonunda bir azalmaya neden olmuştur. Biyolojik tahlilden sonra *M. edulis*'in ayağı etrafında nano PS varlığı, organizmanın nano PS'yi sudan çıkardığını doğrulamıştır. Bu nedenle nanoplastiklerin *M. edulis*'teki etkilerini ve insanlar da dahil olmak üzere avcılar için olası sonuçlarını araştırmak için kronik etki çalışmalarına ihtiyaç vardır (Wegner *et al.* 2012).

Kashiwada (2006), yapmış olduğu araştırmada şu sonuçlara ulaşmıştır: 39.4-42.000 nm çapında parçacıklar medaka yumurtalarının koryonuna adsorbe edilmiş ve yağ damlacıklarında birikmiştir; 474-nm parçacıklar, yumurtalara en yüksek biyoyararlanıma sahiptir. 39.4 nm çapında parçacıklar embriyonik gelişim sırasında yumurta sarısı ve safra kesesine kaymıştır. Yetişkin medaka, 10 mg / L nanoparçacık çözeltisine maruz bırakıldığında esas olarak solungaçlarda ve bağırsakta 39.4-nm nanoparçacıklar biriktirmiştir. Nanopartiküller ayrıca beyin, testis, karaciğer ve kanda da tespit edilmiştir. Erkek ve dişi medaka kanındaki nanopartikül konsantrasyonları

sırasıyla 16.5 ve 10.5 ng / mg kan proteinidir. Bu sonuçlar nanopartiküllerin kan-beyin bariyerine nüfuz edebildiğini ve sonunda beyine ulaştıklarını göstermektedir. Nanopartiküllere 24 saat maruz kalan medaka yumurtalarında tuzluluğa bağlı akut toksisite gözlenmiştir. Nanopartiküllerin biyoyararlanımı ve toksisitesi çevresel faktörlere ve çoklu fizikokimyasal özelliklere bağlıdır. Nanomateryal uygulamaların risklerini ve faydalarını tanımlamak için ticari ürünlerde kullanılan nanoparçacıkların toksik etkileri ve çevresel önemi hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Kashiwada 2006).

Cedervall *et al.* (2012), yapmış oldukları araştırmada şu sonuçlara ulaşmıştır: Nano boyutlu parçacıklar, birçok teknik ve biyomedikal alanda ilerleme sağlar. Nanopartiküllerin kozmetik, deterjan, gıda ve diğer ticari ürünlerde kullanımı, organizma metabolizması üzerindeki etkilerinin az olmasına rağmen hızla artmaktadır. Burada, suda yaşayan bir gıda zinciri yoluyla alglerden, zooplanktondan balığa taşınan ticari olarak üretilen polistiren nanoparçacıkların, lipit metabolizmasını ve tüketicinin davranışını etkilediğini gösterilmiştir. Kontrol ve test balıkları arasında en az üç bağımsız metabolik parametre farklıdır: kilo kaybı, kan serumundaki trigliseritlerin kolesterol oranı ve kolesterolün kas ve karaciğer arasındaki dağılımı. Ayrıca, nanopartiküllerin in-vitro balık serumunda apolipoprotein A-I'e bağlandığını ve böylece yutma yoluyla emildiklerinde yağ rezervlerini kullanmalarını engellendiği gösterilmiştir. Metabolik etkilere ek olarak, nanoparçacık içeren zooplankton tüketiminin balığın beslenme davranışını etkilediği tespit edilmiştir. Birçok nano boyutlu ürün, kanalizasyon sistemi aracılığıyla tatlı su ve deniz habitatları ile sonuçlanacağından, çalışma üretimden önce yeni nano boyutlu malzemelerin test edilmesi için potansiyel bir biyolojik analiz sunmaktadır. Sonuç olarak, çalışma, protein korona nano partiküllerin etrafındaki moleküler bileşimi bilgisinden, organizma ve ekosistem düzeyinde tanımlanmış bir nanoparçacığın potansiyel biyolojik risklerinin test edilebilir bir moleküler hipotezi ve biyo-tahlilinin yapılabileceğini göstermektedir (Cedervall *et al.* 2012).

Casado *et al.* (2013), yaptıkları araştırmada ulaştıkları sonuçlar: Farklı silika ve polietilenimin polistiren (PS-PEI) nanopartiküllerinin (NP'ler) farklı çaplarının akut ekotoksitesitesi, farklı trofik seviyeleri temsil eden su organizmaları üzerinde değerlendirilmiştir. *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Pseudokirchneriella subcapitata* ve *Vibrio* balıkları, bir dizi standart akut ekotoksosite testinde kullanılmış ve çalışmalar bir gökkuşağı alabalığı gonad hücre hattında (RTG-2) iki sitotoksikolojik son nokta ile tamamlanmıştır. NP'lerin fiziko-kimyasal karakterizasyonu, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyometrisi kullanılarak kullanılan farklı test ortamlarında gerçekteşirilmifitir. Test edilen tüm sucul organizmalar için 1000 µg ml<sup>-1</sup>'e kadar konsantrasyonlar için hiçbir etki gözlenmeyen silika NP'lere maruziyetin aksine, PS-PEI NP'lere 0.40 µg ml<sup>-1</sup> ile konsantrasyonlarda maruz kaldıktan sonra önemli toksisite saptanmıştır. Farklı organizmalar için her NP çapı için farklı duyarlılıklar gözlenmiştir: *P. subcapitata* ≥ *D. magna* > *T. platyurus* > *V. fischer*. Gözlemlenen etkiler bazı durumlarda NP boyutuna bağlıyken, daha büyük NP'ler için daha yüksek bir etki gözlenmiştir. Son olarak, sitotoksosite çalışmaları, her iki NP grubu için en yüksek konsantrasyonlarda PS-PEI NP'lerde daha büyük bir etki göstermiştir. Bununla birlikte, bu konsantrasyonlarda nanopartiküllerin birikmesi ve sedimantasyonu gözlendiğinden, sitotoksosite çalışmalarının güvenilir bir ekotoksosite test modeli olmadığı bulunmuştur (Casado *et al.* 2013).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Polistiren Nanoplastiklerin Karakterizasyonu (PNP)

Floresan polistiren nanoplastikler (PNP), Thermo Fisher Scientific firmasından (Cat. No: R25) ticari olarak temin edilmiştir. Sıvı hâlde bulunan floresan polistiren nanoplastiklerin içeriğinde %1 oranında katı parçacıklar bulunmaktadır. Parçacığın yoğunluğu  $1.05 \text{ g / cm}^3$  ve dalga boyu ise 542/612 nm olarak belirlenmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM; HT-7700, Hitachi, Japonya) analizi ile PNP'nin ortalama çapı doğrulanmıştır. Ayrıca, PNP'nin zeta potansiyeli bir Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, UK) kullanılarak analiz edilmiştir. Boyut ve zeta potansiyel ölçümleri, PNP süspansiyonunun damıtılmış su içinde 25°C'de seyreltilmesinin ardından gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.2. Araştırmada kullanılan balık materyali

Araştırmada kullanılan 10-12 aylık damızlık zebra balıkları (*Danio rerio*) Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilmiştir. Zebra balıklarının 10 litrelik akvaryumlar içerisinde üremeleri sağlanmıştır. Günlük olarak yapılan yemlemede, sabah ve akşam olmak üzere iki defa *Artemia sp.*, ile beslenmiştir. Balıklar 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık fotoperiyot uygulamasında kapalı devre sistemde tutulmuştur (Pentair & Aqaumaks) (Şekil 3.1). Su kriterleri sistem tarafından sürekli olarak otomatik kontrol ve kayıt altında tutulmaktadır.



**Şekil 3.1.** Zebra Balığı kapalı devre ünitesi

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Zebra balıklarından embriyo elde etme**

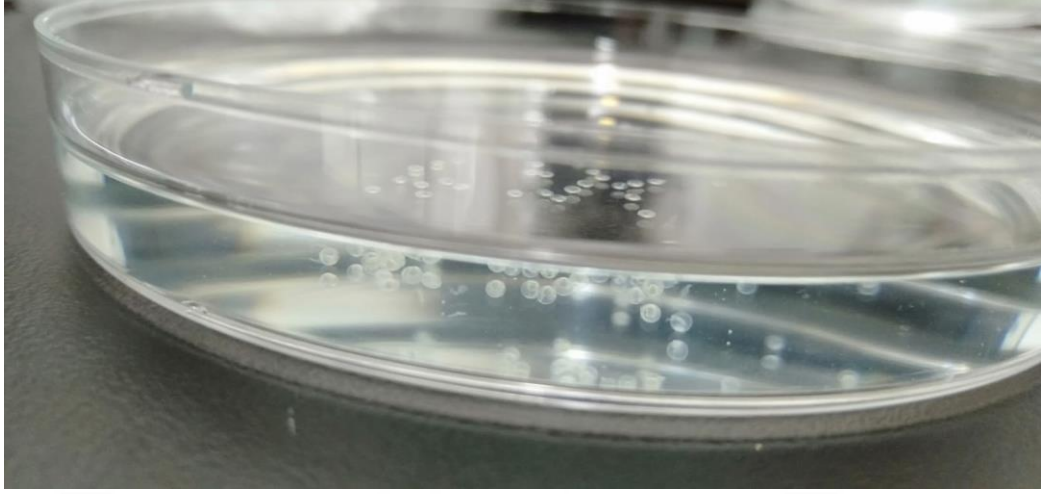
Denemeden önceki gün erkekler ve dişiler 2:1 oranında karanlığın başlangıcından hemen önce üreme tanklarına yerleştirilmiştir. Eşleştirme, yumurtlama ve dölleme sabah ışığının başlamasından 30 dakika sonra gerçekleştirilmiştir. Akvaryumların tabanına yerleştirilen cam ızgara yardımıyla anaç balıkların yumurtaları yemeleri engellenmiştir. Daha sonra, akvaryum tabanında biriken döllemiş yumurtalar sifonlanarak toplanıp, petri plaklarına aktarılmıştır. Döllemiş ve uygun gelişim düzeyindeki embriyolar stereo mikroskop altında seçilmiştir. Seçilme işleminin ardından sağlıklı embriyolar toplanarak araştırmada kullanılmıştır Embriyolar E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, %0,01 metilen mavisi)

(Westerfield 1993) medium solüsyonuna alınmıştır. Embriyolar 28°C’de etüv ortamında saklanmıştır.

### **3.2.2. Embriyo bakımı ve PNP’nin embriyoya verilmesi**

Embriyolar 4 saat boyunca stereo mikroskobu altında incelenerek döllenenmemiş ve hayatta olmayan embriyolar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 4. saatin sonunda sağlıklı embriyolar Stereomikroskop altında mikro manipülatör sistemi (Narishige, Japonya) ile embriyoya yaklaşık 3 nL (Nanolitre), 20 nm büyüklüğündeki PNP’ler embriyoların besin kesesine enjekte edilmiştir (Baran vd 2018). Kontrol grubu olarak yaklaşık 3 nL ultra-saf H<sub>2</sub>O enjekte edilen ve hiçbir uygulama yapılmamış embriyolar kullanılmıştır. Enjekte edilen ve kontrol grubu embriyoları E3 ortamında tutulmuş ve E3 ortamları her 24 saatte bir yenilenmiştir. Çalışma süresince toplam 2000 civarında embriyoya PNP enjekte edilmiş ve çalışma sırasında yaklaşık 2000 embriyo kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her enjeksiyon deneyinden sonra, enjekte edilen ve kontrol grubu embriyoları, her birinde 50 embriyo olacak şekilde yaklaşık 40 ml E3 ortamı ile dolu petri kaplarına aktarılmıştır. Enjeksiyonu takip eden 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde tüm embriyolar / larvalar bir stereomikroskop altında (Zeiss, Discovery V12) incelenmiştir. Gözlem sonucunda morfolojik anormallikler (perikardiyal ödem, besin kesesi ödemi, vücut malformasyonları ve kavisli vücut eksenini dâhil) kaydedilmiştir. İlgili dönemde yaşam ve koryondan çıkış oranları belirlenmiştir. Ölü zebra balıkları kaydedilmiş ve gözlemler sırasında solüsyondan çıkarılmıştır. Görüntüleme sırasında larvaların hareketsiz olmaları için larvalar %3’ü metil selüloz içine alınmıştır. Tüm işlemler, Atatürk Üniversitesi onaylı Kurumsal Etik Kurallarına (2018/229) uygun olarak gerçekleştirilmiştir.





**Şekil 3.2.** Petri kapları ve embriyolar

### **3.2.2.a. Canlı larvalarda apoptoz tespiti**

Canlı larvalarda hücre ölümlerinin belirlenmesi için elektrostatik çekim kuvveti önemli bir yere sahiptir. Bu elektrostatik çekim kuvveti; benzer elektrik yükleri arasında bir itme kuvveti yaratırken, farklı elektrik yükleri arasında bir çekme kuvveti oluşturur. Benzer ve zıt kuvvetler arasında oluşan bu kuvvet elektrostatik kuvvet olarak adlandırılmaktadır. DNA ve RNA üzerinde bu etkinin incelenebilmesi için metakromik bir boya olan Akridin Oranj (AO) kullanılmaktadır (Hu *et al.* 2011). AO boyası; plazma membranı zarar görmüş apoptik veya nekrotik hücrelerden geçebilirken, sağlıklı hücrelerden geçemez.

Denemenin 120. saatinde her gruptan rastgele seçilen 50 larva, 5'erli gruplandırılarak PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 3 kez yıkanıp ardından 5 mg/ml AO boyası ile muamele edilerek, 28°C'de 30 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından üç kez PBS ile yıkamıştır (Duan *et al.* 2013). Larvalar floresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Larvalardan gelen floresans ışık yoğunluğu ZEN (blue edition) yazılımı kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.2.2.b. Canlı larvalarda reaktif oksijen (ROS) türlerinin tespiti

Zebra balığı larvalarında reaktif oksijen türlerinin birikimini tespit etmek için ROS türlerinin indikatörü olan CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-krometil-2',7'- diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) kullanılmıştır. Bu molekül birçok farklı ROS ile reaksiyona girer ve oksidatif stresin genel bir göstergesidir. Bu indikatör ROS ile oksitlendiğinde yeşil renkte floresan oluşturmaktadır (Kartal 2015). Denemenin 120. saatinde her gruptan rastgele seçilen 50 larva 5'erli şekilde gruplandırılarak eppendorf içerisinde ultra saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Sonra eppendorf içerisinde kalan su uzaklaştırılmıştır. 28°C'de 2 saat boyunca karanlık bir ortamda, etüvde 1 µg/ml; CM-H<sub>2</sub>DCFDA ile inkübe edilmiştir. Daha sonra larvalar ultra saf su ile 3 kez yıkanıp, ardından %3'lük metilselüloz ile sabitlenmiştir (Kim *et al.* 2014). Canlı örneklerin görüntüleri floresan stereo mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Almanya) kullanılarak incelenmiştir.



**Şekil 3.3.** Kaset ve medium içine yerleştirilen embriyolar

### 3.2.2.c. Lavra kesitlerinden PNP tespiti

120. saatlere kadar 28°C sıcaklıktaki inkübatörde tutulan larvalar, süre sonunda anestezi uygulanarak %4'lük paraformaldehit içerisinde 4°C'de bir gece fikse edilmiştir. Ertesi gün %0,7 tritonX100 içeren PBS (Phosphate-buffered saline) tamponunda oda sıcaklığında 4 x 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından sırasıyla %5, %10 ve %15 sükröz ile oda sıcaklığında birer saat ve %30 sükröz ile 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir (Westerfield 1993; Kinoshita *et al.* 2011; Sökmen vd 2019). Daha sonra larvalar, ortada kontrol iki yanda enjekte edilmiş larva olacak şekilde üçerli gruplar hâlinde 7x7x5 mm (en-boy-derinlik) ebatlarındaki kasetlere konulan OCT (Optimal cutting temperature medium) içerisine mikroskop altında aynı pozisyonda ve seviyede olacak şekilde gömülmüş ve derhal sıvı azot içerisinde dondurulmuştur (Sökmen vd 2019). Kontrol grubu olarak hiçbir uygulamanın yapılmadığı (NIK) larvalar kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerden crayostat cihazı ile 7-10 µm kalınlığında seri kesitler polizinli lam üzerine alınmış ve kesitler yine konfokal mikroskop altında incelenmiştir. Konfokal mikroskoptan alınan floresan ışımaların enjekte edilen PNP'den geldiğini teyit etmek amacıyla, ışımaların geldiği noktalardaki doku kesitlerinden rastgele seçilen bölgeler, steril mikro pipet ucu ile alınıp 5 µl ultra saf su içerisinde aktarılmıştır. Alınan numuneler geçirimli elektron mikroskop (TEM) gritleri üzerine aktarılıp standart protokolün ardından TEM ile plastik parçacıklar görüntülenmiştir. Beyinden gelen floresan ışımaların PNP'den ayrılmış olabilecek floresan molekülden değil, floresan işaretli PNP'den geldiği teyit edilmiştir.

Larvaların anlatılan şekilde gömülmesi ve aynı kesitte görüntülenmesi, özellikle immunfloresans analizlerde floresan yoğunluğunun sayısallaştırılması (kuantifiye edilmesi) aşamasında ışık/lazer şiddetinden kaynaklı olası hataların/şüphelerin elemine edilmesi adına önemli olmuştur. Diğer yandan, partikül boyutunun 20 nm olmasından dolayı beyin dokusundan alınan 7-10 µm kalınlığındaki kesitlerde PNP'nin görüntülenebilme olasılığını artırmak adına bloklardan seri kesitler alınması önem arz etmiştir. Bir diğer husus, bu denli küçük parçacıkların konfokal mikroskopta görüntülenmesi ancak kümülatif bir birikim olması durumunda mümkün olmuştur. Bu

denli bir birikim değil de dağınık hâlde bulunması ihtimaline karşın, parçacıkların beyine ulaşıp ulaşmadıklarını tespit etmek adına; aynı kesitte bulunan kontrol ve enjekte edilen larvalara ait kesitlerdeki beyin bölgeleri ve enjeksiyon yapılan bölge (yumurta kesesi) seçilerek buradan gelen parçacığa ait dalga boyundaki floresan sinyal yoğunluğu analiz edilmiştir (Şekil 4.7). Enjeksiyon yapılan bölge referans alınarak, kontrol ve enjekte larvalara ait beyin bölgeleri kıyaslanmıştır. Şekil 4.7'deki konfokal analizin görüntüsüdür. 1 ve 2 numaralı bölgeler sırasıyla enjeksiyon yapılan ve kontrol larvanın beyni, 3 numaralı bölge ise enjeksiyonun yapıldığı balığın yumurta kesesidir.

Yukarıda anlatılan metot tekrarlanarak seri alınan kesitler %0,7 tritonX100 içeren PBS (PBST) ile 4°C'de 30 dk. ve %4'lük paraformaldehit içerisinde 4°C'de 30 dk. bekletilmiştir. Ardından iki sefer TBST (%0,1 tritonX100 içeren Tris-buffered saline) içerisinde oda sıcaklığında 3 x 5 dk muamele edilmiş ve %1'lik protein blok ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan istenilen primer antikor (8 OHdG) damlatılmıştır (dilüent oran: 1/200). Primer antikora uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra TBST içerisinde oda sıcaklığında 3 x 10 dk muamele edilmiş ve ardından 1\50 oranında sulandırılan immunfloresans antikor (FITC, DAPI Dilüent Oranı: 1/1000) preparatların üzerine damlatılmış ve karanlık ortamda 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda TBST içerisinde oda sıcaklığında 3 x 10 dk muamele edilmiş ve ardından 9 kısım distile su ve 1 kısım oranında gliserol karışımı dokular üzerine damlatılarak, lamel ile kapatılıp konfokal mikroskopta incelenmiştir. Alınan görüntülerde floresan yoğunluğu konfokal mikroskop yazılımı ile kuantifiye edilerek değerlendirilmiştir (Kinoshita *et al.* 2018).



**Şekil 3.4.** Cryostat yardımıyla 7-10 µm kalınlığında alınan seri kesitler

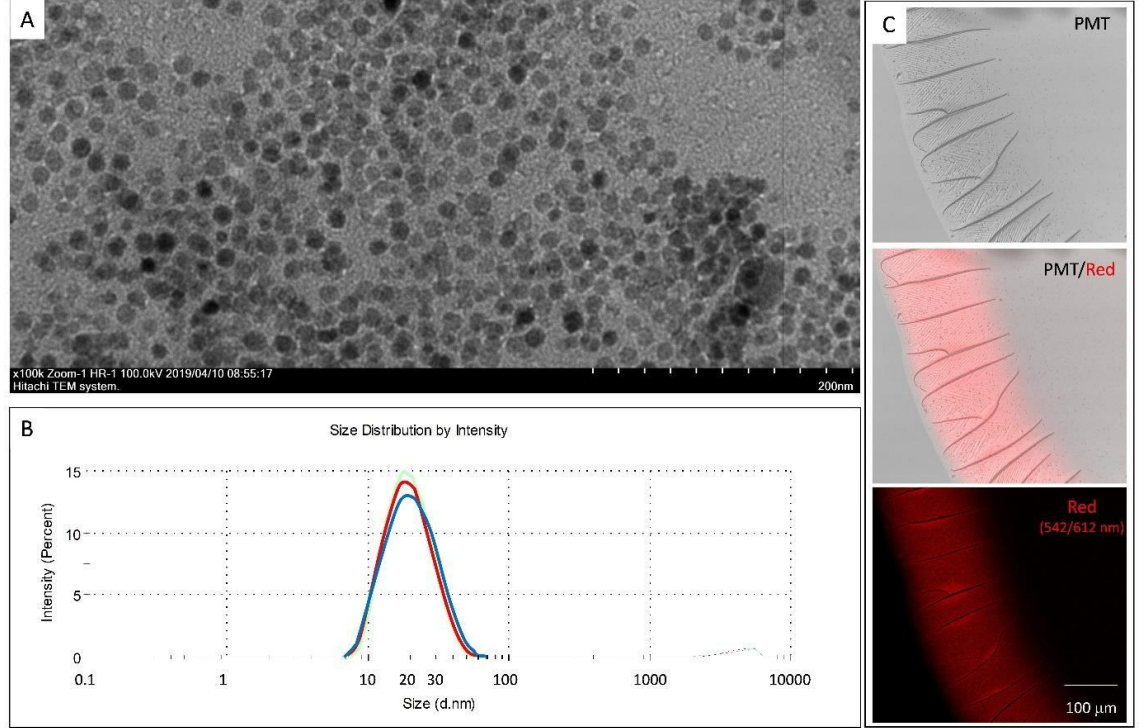
#### **3.2.2.d. Oksidatif DNA hasarının tespiti**

PNP enjekte edilmiş embriyonun, PNP saptanan kısımları alınarak; endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için 10 dakika boyunca %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile (Hidrojen Peroksit) muamele edilmiştir. Daha sonra, slaytlar antijen geri kazanım çözeltisine (pH 6.0) olacak şekilde muamele edilmiş ve antijenleri maskelemek için mikrodalga fırında 15 dakika boyunca ısıtılmıştır. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) (sc 66036, Santa Cruz, EU) primer antikoru, PNP saptanan kısımlara 1/100 oranında seyreltilerek uygulanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra immüno Floresan antikor (Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) Catalog no: ab6785, Abcam) yukarıda belirtilen kısımlara 1/250 oranında seyreltilmiş şekilde uygulanmış ve karanlıkta bekletilerek, distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra slaytlar, ayrıntılı olarak lazer taramalı konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 710) ile incelenmiştir. 8-OHdG çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olması nedeniyle oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kabul edilmiştir (Dizdaroglu 1992).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Polistiren Nanoplastiklerin Karakterizasyonu (PNP)

Polistiren nanoplastikler TEM ile görüntülendi. TEM görüntülerine göre, PNP'nin boyutu  $20 \pm 3.2$  (SD) nm (Şekil 4.1.A) olarak tespit edilmiştir. Ek olarak, PNP'nin ortalama büyüklüğü, zetasizer analizlerinden  $18.43 \pm 0.28$  (SD) nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).



#### Şekil 4.1. PNP'nin karakterizasyonu

(A) İletim elektron mikroskobu görüntüsü. (TEM) (B) Boyut dağılımı. (C) Lazer tarama mikroskobu görüntüsü

Zetasizer analizinden bahsetmek gerekirse taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü olarak ifade edilmektedir. Zetasizer analizi dağılma mekanizmaları ile ilgili bilgi almak adına verimlidir ve elektrostatik dağılma kontrolünün sağlanmasında rol oynar. Belli bir yükteki tane, süspansiyon içerisindeki karşı yükteki iyonları çeker, sonuç olarak, yüklü tanenin yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşur ve daha sonra da

yüklü tanenin yüzeyinden dışa doğru yayılmış bir yüzey oluşur. “Kayma yüzeyi” bu yayılmış yüzey içerisinde oluşur. Hem yüklü tane hem de çevrede bulunan iyonlar, kayma yüzeyi kapsamında hareket eder. Kayma yüzeyi içerisinde yer alan potansiyel zetasizer yani zeta potansiyeli olarak adlandırılır. Tanelerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler. Zeta potansiyeli ölçümlerinden çeşitli alanlarda yararlanılmaktadır;

- Seramik üretiminde yüksek zeta potansiyeli ve düşük görünür viskozite'ye sahip seramik (kil) süspansiyonu yaratarak kolayca şekil almasını sağlamada,
- Boya sanayinde en iyi dispersiyonu elde etmek için katkı malzemelerinin dozajını kontrol etmede,
- Su ve atık su temizliğinde yabancı maddeleri çöktürme (coagulation) dozajını ayarlama,
- Kâğıt üretiminde zeta potansiyeli kontrolü ile kaliteyi tutturmakta ve ilaç üretiminde kullanılmaktadır.

#### **4.2. Embriyo / Larvada Yaşama ve Kuluçka Oranları**

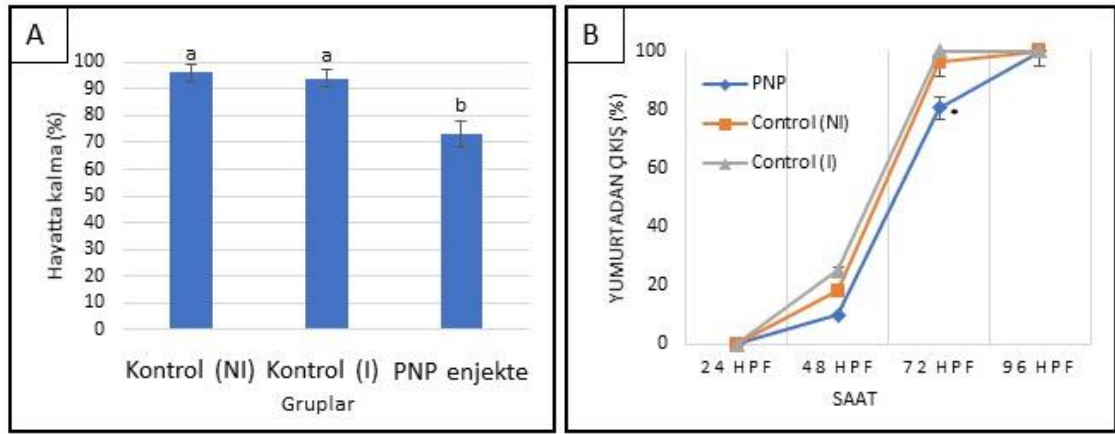
PNP'nin zebra balığı üzerindeki gelişimsel toksisite etkilerini değerlendirmek için yaşama ve kuluçka oranları belirlenmiştir (Şekil 4.2.A). PNP enjeksiyon grubunda yaşama oranı 96. saatin sonunda anlamlı olarak azalmıştır ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.2.A). (Şekil 4.2 B)'de görüldüğü gibi yumurtadan çıkış oranı 72. Saatte PNP enjekte edilmiş embriyolarda anlamlı olarak düşük çıkmıştır. Gelişimin izlendiği diğer saatlerde (24, 48, 96 hpf) ise anlamsız olarak tespit edilmiştir.

PNP üretici firma tarafından deiyonize suda birikmeyi engellemek ve stabiliteyi arttırmak için eser miktarda sürfaktan (Sodyum dodesil sülfat (SDS)) ve koruyucu madde (Sodium azid) ile gönderildiği için toksik etkinin bu katkı maddelerinden ileri gelip gelmediği incelenmelidir. Yapılmış çalışmalar, bu tür sürfaktanların eser miktarının zebra balığı embriyosu için toksik olmadığını göstermiştir (Pitt *et al.* 2018). Buna rağmen, bu konsantrasyonlarda toksik olmadıklarından emin olmak için zebra



balıklarının embriyolarına SDS ve sodium azid enjekte edilmiştir. Bu maddelerin enjekte edilen hacimde kontrol grubuna nazaran ROS, yaşama ve 8 OdHG seviyeleri üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.10).

Verilerin analizinde tanımlayıcı istatistiklerden sayı, yüzde (Şekil 4.2, Şekil 4.3), ortalama ve standart sapma (Şekil 4.1); gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için ANOVA ve post hoc Tukey testi kullanılarak (Şekil 4.2) değerlendirilmiştir.

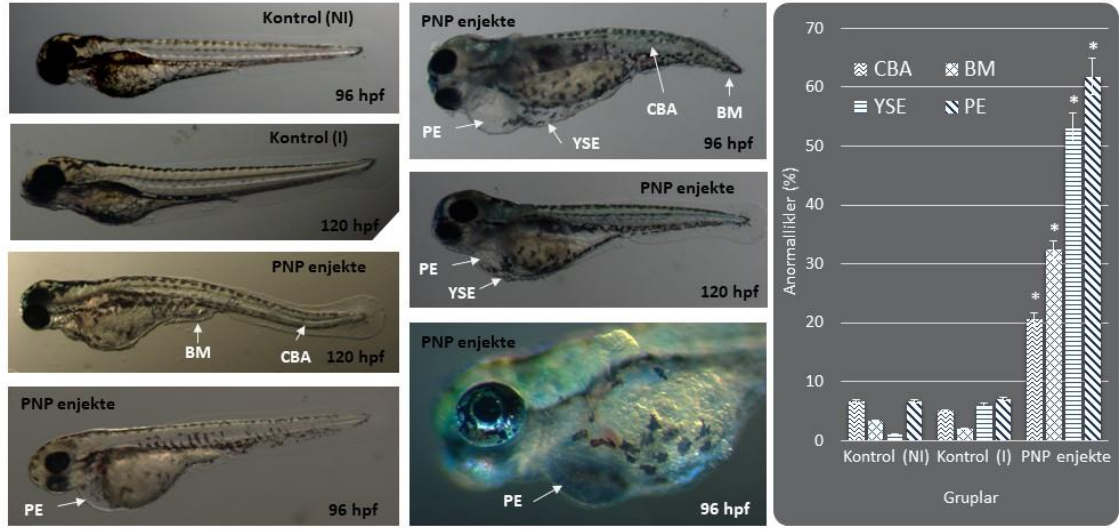


**Şekil 4.2.** (A) Zebra balığı embriyolarının hayatta kalma oranı. Veriler ortalama  $\pm$  S.D. üç bağımsız deneyden. ( $p < .05$ ; ANOVA, Tukey testi). (B) Zebra balığı embriyolarının çıkış oranı. Veriler ortalama  $\pm$  S.D. üç bağımsız deneyden (\*  $p < .05$ ; ANOVA, Tukey testi)  
PNP: Polistiren Nano Plastik enjekte edilen grup, Kontrol (I): Su enjekte edilen grup.  
Kontrol (NI): Enjeksiyon yapılmayan grup.

### 4.3. Embriyo / larva Malformasyonları

Perikardiyal ödem (PE), besin kesesi ödemi (YSE), vücut malformasyonları (BM) (kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve kafa malformasyonu dahil) ve kavisli vücut eksenini (CBA) gibi tipik malformasyonlar PNP enjekte edilen ve kontrol gruplarında 28°C'de araştırılmıştır. 120 saatlik deney süresi boyunca 48, 72, 96 ve 120 saat kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p < 0,005$ ) (Şekil 4.3), PNP enjekte edilen gruplar; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında tüm malformasyonlar açısından anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).





**Şekil 4.3.** Embriyoların mikroskopik görüntüleri ve gözlenen malformasyonların yüzdesi

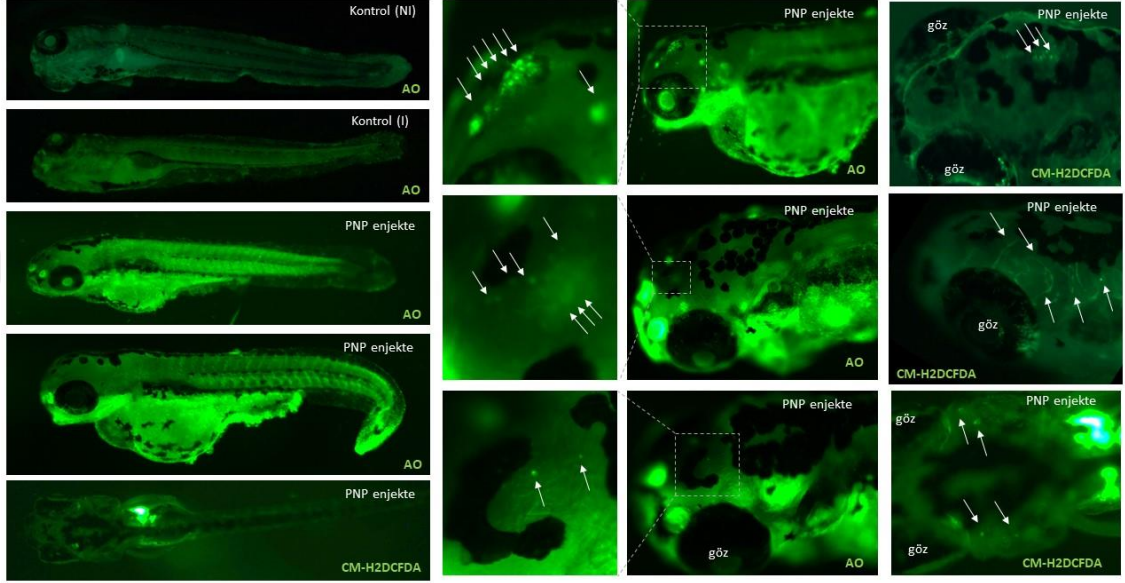
YSE: Besin kesesi ödemi; PE: Perikardiyal ödem; CBA: Kavisli gövde eksen; BM: Vücut malformasyonları (kuyruk bozukluğu, kısa kuyruk ve kafa bozukluğu dâhil).

#### 4.4. ROS ve Apoptosis Tespiti

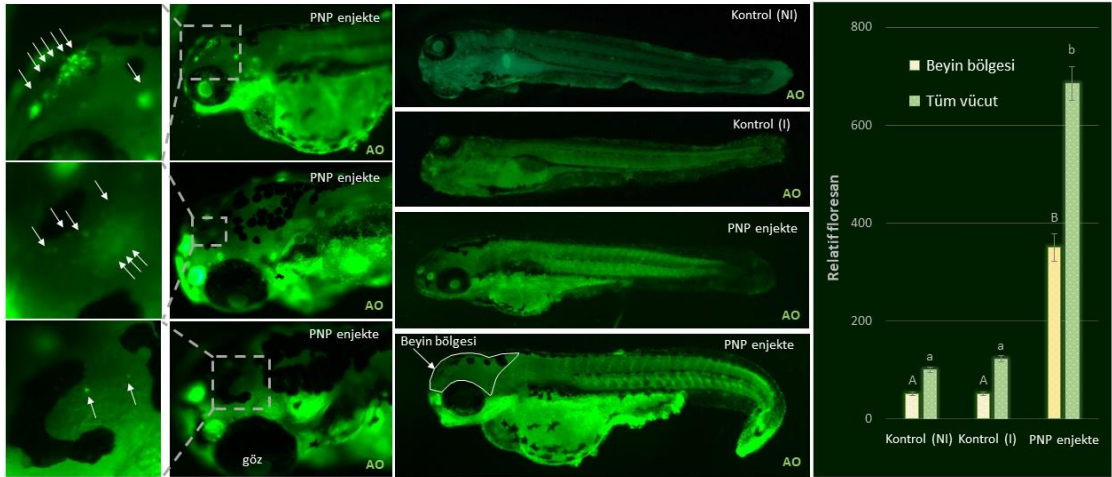
PNP'nin canlı embriyoda ROS üretimine neden olup olmadığını belirlemek için CM-H2DCFDA kullanılmıştır. Bu gösterge, herhangi bir ROS tarafından oksitlendiğinde yeşil bir floresan üretir. CM-H2DCFDA, hücrelerdeki reaktif oksijen türleri (ROS) için bir gösterge olarak kullanılan H2DCFDA'nın bir klorometil türevidir. CM-H2DCFDA, asetat gruplarının hücre içi esterazlar tarafından yıkımlandığı ve tiyol reaktif klorometil grubunun hücre içi glutasyon ve diğer tiyoller ile reaksiyona girdiği hücrelere pasif bir şekilde diffuze olur. Eğer hücrede oksidasyon ve dolayısıyla ROS üretimi varsa, hücre içinde sıkışmış bir floresan katkı maddesinin (DCF) salınmasına sebep olur. Bu bağlamda PNP'nin ROS üretimine sebep olup olmadığını incelediği bu araştırmamızda PNP enjekte edilen grupta bulunan zebra balığı larvalarının tüm vücudunda, özellikle de baş bölgesinde, floresan sinyal birikiminin kontrol grubuna göre daha yoğun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

PNP enjeksiyonuna maruz kalmanın bütün canlı larvalarda hücre ölümüne neden olup olmayacağını belirlemek için Akridin Oranj (AO) kullanılmıştır (Şekil 4.4). Elde

edilen sonuçlara göre, PNP alımının genel hücresel ölümden anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Gözlenen genel hücresel ölümler, diğer sonuçlar (malformasyonlar ve ROS tespiti) ile doğrulanmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5).



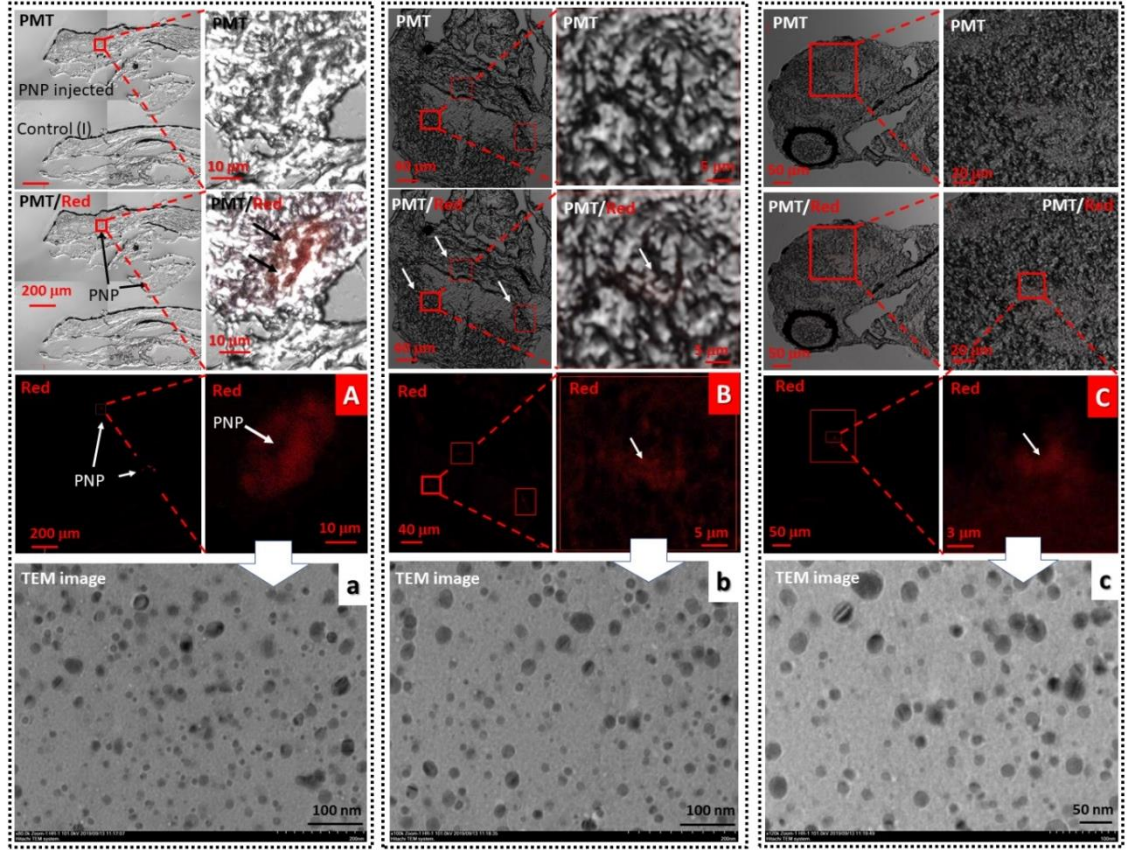
Şekil 4.4. CMH2DCFDA, üretilen ROS'un in vivo olarak boyanması



Şekil 4.5. Ölü hücrenin göreceli floresan yoğunluğu, Akridin Oranj (AO) boyama ile tespiti

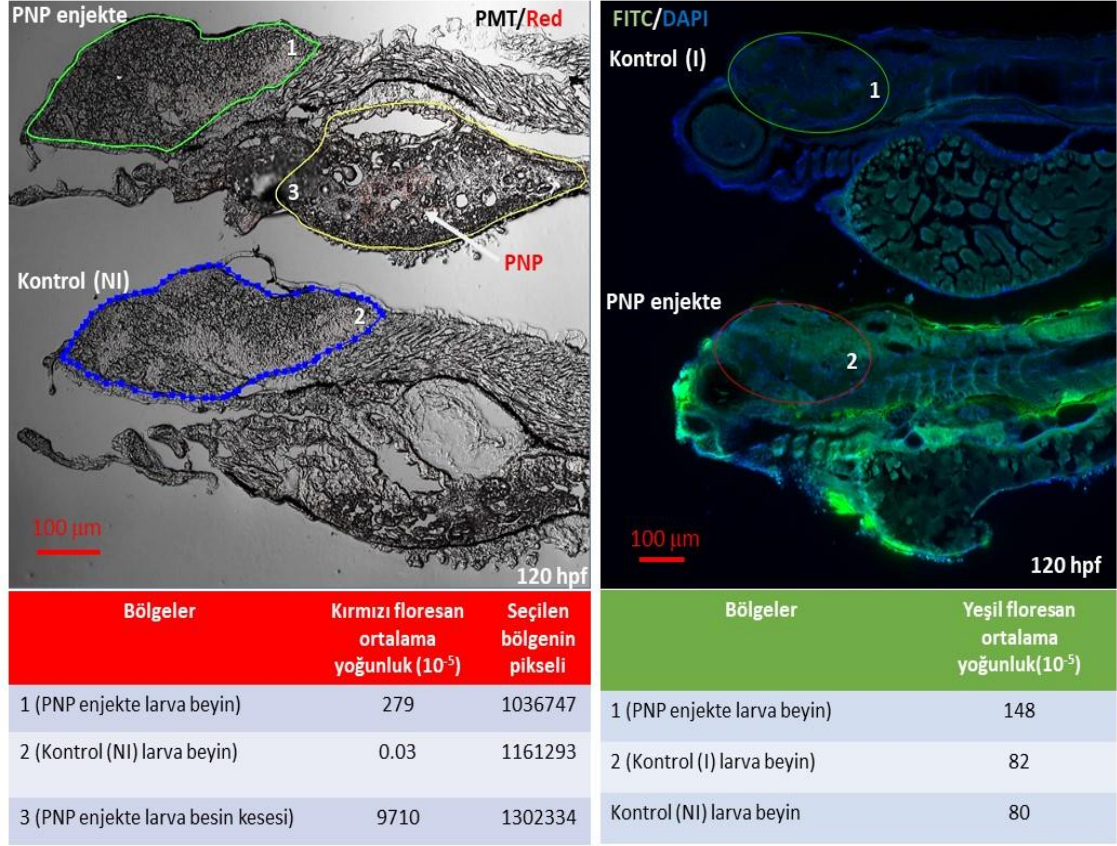
#### 4.5. PNP ve Oksidatif DNA Hasar Tespiti

Çalışmanın bu bölümünde PNP'nin beyine ulaşıp ulaşamayacağını anlamak için, LSM (Laser Scanning Microscope) ile PNP enjekte edilen üç yüzün üzerinde larvaya ait slayt bölümleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, zebra balığı larvalarının beyinde PNP'nin kümülatif biyoakümülyasyonu incelenen larvaların %33'ünde tespit edilmiştir (Şekil 4.6). PNP'nin kümülatif biyoakümülyasyonunun tespitine ek olarak, PNP'nin beyin boyunca dağılıp dağılmayacağını anlamak için beyin bölgesinde floresan yoğunluğu analizi yapılmıştır (Şekil 4.7). Bu analizde bir kontrol ve bir PNP enjekte edilen larva içeren kesitlerde üç bölge belirlenmiştir. Bunlardan biri referans olarak kullanılan enjekte edilmiş larvaların besin kesesidir (Şekil 4.7'deki bölge 3), diğerleri enjekte edilen ve kontrol grubunun beyin bölgeleridir (Şekil 4.7'deki bölgeler 1 ve 2). Toplamda farklı larvalara ait yirmi seçilmiş bölüm floresan yoğunluk analizi için kullanılmıştır. Yirmi farklı bölümden elde edilen bu sonuçlara göre, PNP'nin kümülatif biyoakümülyasyonun yanı sıra beyin boyunca dağıldığı sonucu tespit edilmiştir. Diğer yandan, 8-OHdG için immünopozitivite reaksiyonları, PNP enjekte edilmiş zebra balığı beyin dokusunun birçok nöron hücrelerinde belirlenmiştir (Şekil 4.7). Ayrıca, bu immünopozitiflik sinyallerin çoğu, PNP'den gelen sinyallerle üst üste bindiği saptanmıştır (Şekil 4.8).

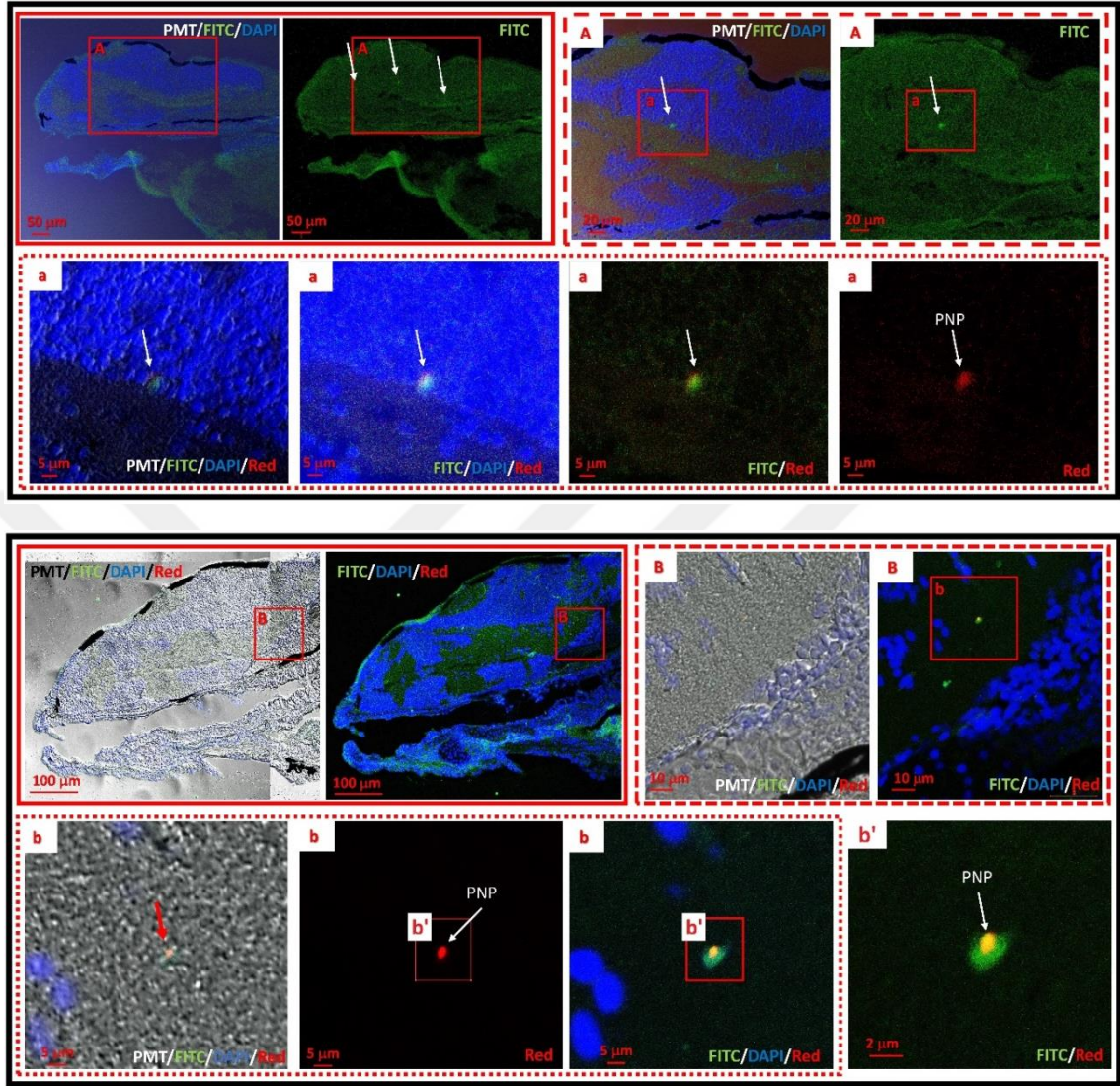


**Şekil 4.6.** 120 saat zebra balığı larvalarının beyindeki kümülatif PNP birikiminin lazer tarama mikroskopi görüntüleri. Alt panellerdeki TEM görüntüleri





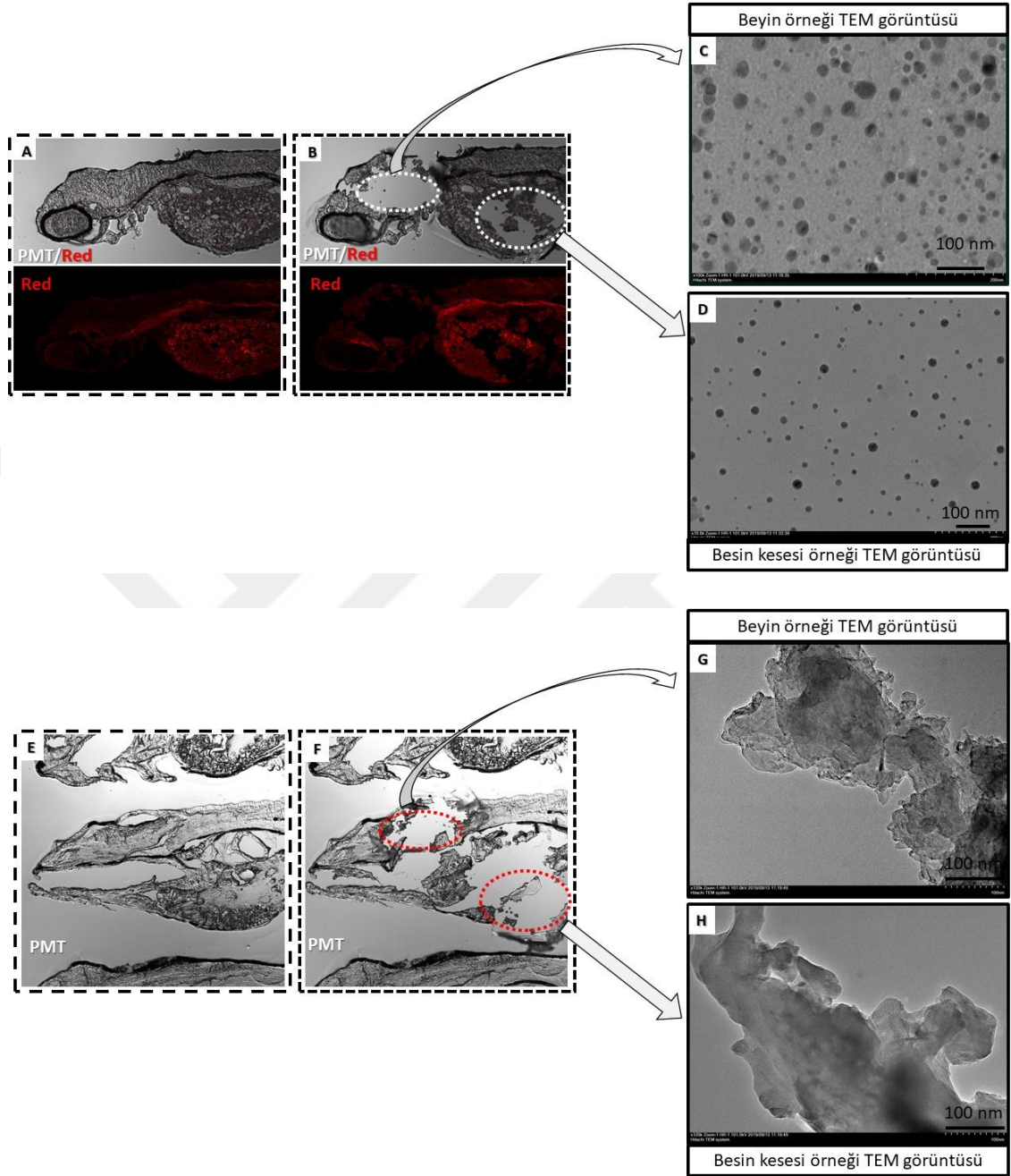
**Şekil 4.7.** Sol panel konfokal görüntüler, besin kesesi ve (120 hpf) zebra balığı larvalarının beyin bölgelerinde PNP kaynaklı Kırmızı floresan yoğunluğu (N = 20) Sağ panel konfokal görüntüler ve (120 hpf) zebra balığı larvalarının (n = 20) beyin bölgelerinden FITC floresan ortalama yoğunluğu



**Şekil 4.8.** PNP (Kırmızı) enjekte edilen zebra balığı embriyolarının (120 hpf) beyin dokularında 8-OHdG (FITC / GFP) için immüno Floresans reaksiyonlarının lazer tarama mikroskopi görüntüleri

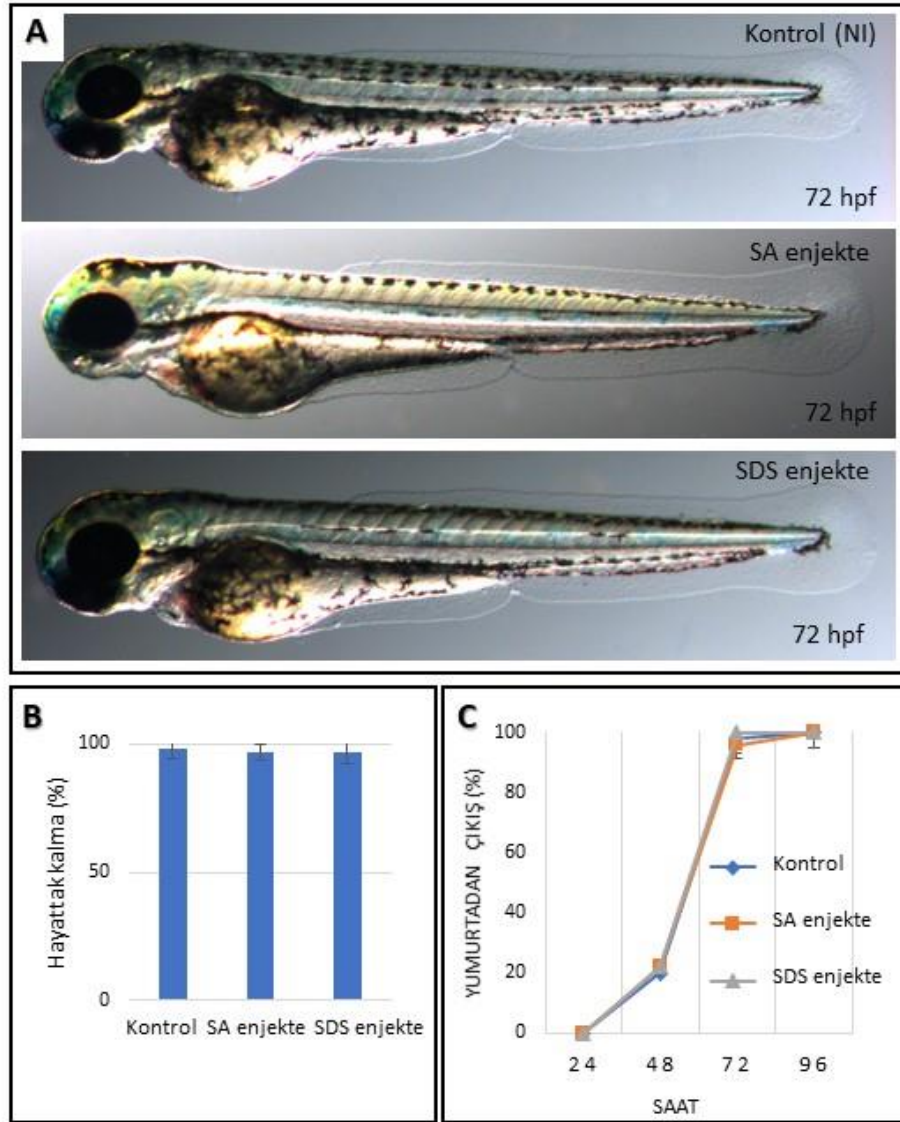
DAPI (6-Diamidino-2-phenylindole) ile etiketlenmiş hücre çekirdeği. DAPI (DNA'nın boyanmasında kullanılır, molekülün floresanlığı görünmesini sağlar).





**Şekil 4.9.** Kırmızı floresan sinyalinin PNP'den ayrılan boyadan değil, PNP'den geldiğinden emin olmak için numuneler floresan sinyalinin geldiği noktadan alınan ve daha sonra TEM tarafından tespitinin gösterimi

(A) PNP enjekte edilen larva bölümünün konfokal görüntüsü (120 hpf). (B) Panel A'da aynı larva örneklemeinden sonra konfokal görüntüsü. (C) PNP enjekte edilen larvaların beyin numunesinin TEM görüntüsü. (D) PNP enjekte edilen larvaların besin kesesi numunesinin TEM görüntüsü. (E) PNP enjekte edilmeyen larva bölümünün konfokal görüntüsü (120 hpf). (F) Panel E'de aynı larva örneklemeinden sonra konfokal görüntüsü. (G) PNP enjekte edilmeyen larvaların beyin numunesinin TEM görüntüsü. (H) PNP enjekte edilmeyen larvaların besin kesesi numunesinin TEM görüntüsü.



**Şekil 4.10.** (A) Kontrol grubu embriyo, SA (Sodium azid) enjekte edilen embriyo grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) enjekte edilen embriyo grubu (120hpf) görüntüsü. (B) Kontrol grubu, SA (Sodium azid) grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) grubu, Hayatta kalma oranı (C) Kontrol grubu, SA (Sodium azid) grubu, SDS (Sodyum dodesil sülfat) grubu, yumurta çıkış oranı.



## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Polistiren, termoplastik polimerler arasında en yaygın kullanılan plastiklerden biri olmakla birlikte çevrede gözlenen plastik döküntülerin ana bileşenlerindedir (Lu *et al.* 2016). Diğer birçok kullanımın yanı sıra gıda hizmeti ve gıda ambalajı yapmak için de kullanılan polistiren, doğrudan gıda zincirlerine taşınabilmektedir (Lu *et al.* 2016). Polistiren nanoplastiklerin toksik etkilerini değerlendirmek için çok kısıtlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar polistirenin canlı organizmalar üzerinde toksik bir etkiye neden olabileceğini göstermektedir. Ancak, günümüzde küresel bir sağlık tehdidi olan nano boyutta plastiklere karşı alınabilecek önlemler için daha ayrıntılı ve moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda, nano boyutlu partiküllerin ulaşılacağı yerde moleküler düzeyde sebep olabileceği hasar seviyesinin tespit edilmesi önemlidir.

Bu araştırmada, zebra balıklarının embriyonik gelişim evresi sırasında besin kesesine PNP'yi mikroenjeksiyon yoluyla vererek, beyine ulaşımını belirlemek ve beyine ulaşması durumunda burada biyolojik olarak birikiminin tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, PNP'nin beyne ulaşması durumunda, biyoakümüülasyonun bulunduğu yerde oksidatif DNA hasarına neden olup olmayacağını ve tüm vücutta vücut malformasyonları, apoptoz ve oksidatif stresin olup olmayacağını belirlemek istenmiştir.

Larvaların yaşam oranları, PNP enjekte edilen grupta kontrol gruplarına nazaran anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Benzer çalışma yapan Pitt *et al.* (2018) ise mevcut araştırma sonuçlarından farklı olarak herhangi bir yaşam oranları ile ilgili bir fark bulamadıklarını belirtmişlerdir. Mevcut araştırmada böyle bir durumun ortaya çıkması PNP'lerin direkt besin kesesine enjekte edilmesi, balık türlerinin fizyolojik ve immünolojik durumları gibi faktörlerden ileri geldiği düşünülmüştür. Bu sonucun aksine Mattson ve ark. mevcut araştırmamızda elde edilen verilerimizle uyumlu bir biçimde, doza bağımlı olarak *Daphnia magna* balık larvalarında ölüme sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Yumurtadan çıkış, zebra balığı embriyosundaki embriyogenez sürecinde önemli bir adım olarak kabul edilmektedir (Yumnamcha *et al.* 2015). Yumurtadan çıkış, erken larva aşamalarında veya embriyo gelişim hızının birincil etkilerinde ikincil olarak etkilenebilir (Dave and Xiu 1991). Yumurtadan çıkış genellikle, koryonu parçalayıcı proteazın serbest bırakılması, hormonal düzeyde değişme, perivitellin basıncında artış, kas kasılmaları veya embriyonun aktif su alımı gibi birtakım birleşik çaba ile şekillenir (Dave and Xiu 1991; De la Paz *et al.* 2017). Balıklarda yumurtadan çıkmanın gecikmesi, inhibisyonu veya hızlandırılması, toksik kimyasallara maruz kalma gibi farklı ekzojen faktörlerden etkilenebilir (Sulukun vd 2017). Bu çalışmanın sonuçları, PNP'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarında kuluçka gecikmelerinin olduğunu göstermektedir. Yumurta çıkışında gözlemlenen bu gecikme, gecikmiş gelişim veya embriyoların koryonu parçalama yetersizliğine bağlı olabilir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, besin kesesine enjekte edilen PNP'lerin zebra balığı larvalarının beynine ulaştığı ve burada biyolojik olarak birikebildiği ve ayrıca vücutlarında malformasyonlara neden olduğu belirlenmiştir. En yüksek malformasyon yüzdesi, sıvı dengesinde bozulmalar olabileceğini düşündüren perikardiyal ve besin kesesi ödemidir. PNP'ler kırmızı kan hücreleri ile yer değiştirebilir (Geiser *et al.* 2005; Raftis and Miller 2019) ve bu nedenle beyine kan yoluyla girebilir. Kan-beyin engeli zebra balığı için yaklaşık 72 hpf'de oluşturulduğundan (Xie *et al.* 2010), PNP'lerin larvaların beyinde erken aşamalarda daha büyük miktarda taşınması mümkündür. Öte yandan, beyindeki PNP'lerin gözlemlenmesinin bir başka olası nedeni, vücut sıvılarında yukarıda belirtilen dengesizlikten dolayı genel hemodinamik fizyolojinin bozulmasının ikincil bir sonucu olabilir. Bununla birlikte, PNP'lerin beyne doğrudan mı yoksa dolaylı olarak mı ulaşabildiğinin ana mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için transkripsiyonel paternlere dayalı daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Mattsson and *et al.* (2017) medaka larvalarının beyinde PNP floresansı buldular. Bu araştırmanın sonuçları Pitt *et al.* (2018) tarafından yayınlanan çalışmanın sonuçları ile de örtüşmektedir. Bu çalışmada PNP'lerin 24 hpf'de besin kesesinde biriktiği ve gelişim boyunca gastrointestinal sistem, safra kesesi, karaciğer, pankreas, kalp ve beyne göç ettiği gösterilmiştir. PNP'lerin yumurtadan çıkış, canlılık ve

malfromasyon oluşumuna etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Buna karşın PNP'lerin beyinde birikiminden ileri gelebilecek davranış bozukluklarına neden olabileceği tespit edilmiştir. Mevcut araştırmamızda, PNP'yi immünokimyasal olarak analiz edilmiş ve biriktikleri yerleri slaytlardan görüntü alarak dokusal düzeyde belirlenmiştir. Mevcut kısıtlı araştırmalarda PNP'lerin beyindeki varlığı genel olarak floresans görüntüleme teknikleri ortaya konmuşken bizim çalışmamızda dokusal düzeyde ilk defa varlıkları ortaya konulmuştur.

Araştırmada, PNP'nin ayrıca zebra balığı larvalarında biriktiği beyin bölgelerinde oksidatif DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Balık beyninin düzenleyici ve önemli fonksiyonel rolleri vardır ve balık toksikolojisi çalışmalarındaki önemli organlardan biridir (Topal vd 2017). Ksenobiyotiklerin neden olduğu beyin hasarı geri döndürülemez ve bu olay vücutta biyokimyasal ve fizyolojik hasara neden olabilir (Topal vd 2017).

Mattsson *et al.* (2017), 52 nm PNP'nin *Daphnia magna* için 0.075 g / l'nin üzerinde toksik olduğunu ve nanoplastikle kirlenmiş *Daphnia magna* yiyen balıkların davranış bozuklukları ve beyin hasarı gösterdiğini bildirmiştir. Bu bulguların tümü, Chen and *et al.* (2017) gözlemlediği hipoaktivite ile tutarlıdır. Chen; PNP'lerin neden olduğu hipoaktivitenin oksidatif stres ve düşük asetilkolinesteraz aktivitesinden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Oksidatif DNA hasarının değerlendirilmesi için ROS tarafından indüklenen DNA hasarının ürünlerinden biri olan 8-OHdG'nin beyinden immünofloresan sinyalleri kullanılmıştır. Ayrıca ROS ve apoptotik hücrenin floresan sinyalinin tüm vücutta, özellikle beyin bölgelerinde, 120 saatin sonunda biriktiği tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar, aşırı ROS'un, otofaji ve apoptoz gibi hücre yaşama ve / veya hücre ölümü süreçleri dâhil olmak üzere çeşitli hücrel sinyalleşme yollarının aktivasyonuna katıldığı gösterilmiştir (Kaminsky and Zhivotovsky 2014; Redza-Dutordoir and Averill-Bates 2016). Ayrıca oksidatif stres koşullarında ROS seviyesindeki düşük seviye artışlarının bile progenitör hücreleri erken hücre döngüsü kesintisine veya farklılaşmasına götürebildiği bildirilmiştir. Bu, embriyoenez sırasında anormal gelişmeye yol açan ROS kaynaklı apoptozisin ortaya çıkmasına neden olmuştur

(Shi and Zhou 2010; Baran vd 2018). Sonuçlar, ayrıca PNP enjeksiyonunun yaklaşık yüzde 27'lik bir ölümlle sonuçlandığını ve zebra balığı embriyosunda hafif bir kuluçka gecikmesi ile neticelendiğini göstermiştir. Son enjeksiyon konsantrasyonunun (toplam yumurta kesesinin %0.027'si) göz önüne alındığında bu ölüm göz ardı edilemez, ayrıca hayatta kalan PNP enjekte edilen balıkların %60'ından fazlasında bazı ciddi malformasyonlar vardır. nceki çalışmalarda artmış embriyonik veya larval malformasyonunun ROS kaynaklı apoptoziden kaynaklanmış olabileceği öne sürülmüştür (Bagchi *et al.* 1995; Sulukan vd 2017; Baran vd 2018; omakli vd 2018). Bu nedenle, bu araştırmada gözlenen malformasyonların nedeni, ROS kaynaklı apoptoza neden olan PNP olarak düşünülebilir. Bunların sonucunda, özellikle beyinde aşırı ROS ve apoptozise ek olarak artan mortalite ve yaygın anormallikler tespit edilmiştir.

Embriyonik gelişim evresi sırasındaki vücut malformasyonları, toksik maddelere maruz kalan balık embriyolarının genel bir tepkisi olarak düşünülebilir (omakli vd 2018). Toksikite alışmaları, malformasyonların ana nedenlerinden birinin, reaktif oksijen türleri (ROS) veya toksik maddeler tarafından indüklenen apoptoz olduğunu öne sürmüştür (Bagchi *et al.* 1995). ROS miktarı hücresel antioksidan savunma sisteminin tolere edebileceği seviyeyi aştığında, azalmış hücresel antioksidan kapasitenin bir sonucu olarak oksidatif strese yol açmaktadır (Trachootham *et al.* 2009). 8- hidrokși-2-deoksiguanozin (8-OHdG), ROS tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarı ürünlerinden biridir ve oksidatif stres markörlerinden biri olduğu bildirilmiştir (Panieri and Santoro 2016; Topal vd 2017). Ayrıca, aşırı ROS seviyesine bağlı olarak apoptotik sinyal oksidatif stres, zebra balığı embriyosunda hücresel düzeyde meydana gelen malformasyona yol açabilir (Shi *et al.* 2010).

PNP'nin beyine ulaşıp ulaşamayacağını anlamak için PNP enjekte edilen 300'n üzerindeki larvaya ait slayt bölümleri, LSM (Laser Scanning Microscope) ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, zebra balığı larvalarının beyinde PNP'nin kümülatif biyoakmlasyonu incelenmiş ve larvaların %33'nde tespit edilmiştir. PNP'nin kümülatif biyoakmlasyonunun tespitine ek olarak, PNP'nin beyin boyunca

dağılıp dağılmayacağını anlamak için beyin bölgesine floresan yoğunluğu analizi yapılmıştır. Bu analizde bir kontrol ve bir PNP enjekte edilen larva içeren bölümlerde üç bölge belirlenmiştir. Bunlardan biri referans olarak kullanılan enjekte edilmiş larvaların besin kesesi, diğerleri ise enjekte edilen ve kontrol grubunun beyin bölgeleridir. Toplamda farklı larvalara ait yirmi seçilmiş bölüm floresan yoğunluk analizi için kullanılmıştır. Yirmi farklı bölümden elde edilen bu sonuçlara göre, PNP'nin kümülatif biyoakümülyasyonun yanı sıra; beyin boyunca dağıldığı sonucu tespit edilmiştir. Diğer yandan, 8-OHdG için immünopozitivite reaksiyonları, PNP enjekte edilmiş zebra balığı beyin dokusunun birçok nöron hücrelerinde belirlenmiştir. Ayrıca, bu immünopozitiflik sinyallerinin çoğunun PNP'den gelen sinyallerle üst üste bindiği saptanmıştır.

Bu araştırmada, gıda ile alınan veya maternal olarak transfer edilen 20 nm çaplı PNP'nin, beyne ulaşabildiğini ve biyolojik olarak birikebildiğini, ayrıca biyolojik olarak biriktiği beyin bölgelerinde oksidatif DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir. Bunların sonucunda, özellikle beyinde aşırı ROS ve apoptoz tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların yanı sıra, PNP'nin beyine transfer mekanizmasını netleştirmek için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu çalışma ile bir kez daha plastik atıkların, bunlardan ve diğer kaynaklardan salınan nano boyutlu parçacıkların tehlike boyutları gösterilmiştir. Sonuç olarak, zebra balığı model organizması kullanılarak elde edilen bu veriler, plastik ürünün kullanımı ve kontaminasyonu ile ilgili hem bireysel hem de toplumsal alınacak önlemlerin gelecekte toplum ve çevre sağlığı için son derece önemli olacağını düşündürmektedir. Öte yandan, özellikle günlük kullanımda plastik ürün yoğunluğunu azaltmanın ve doğru atık yönetiminin sürdürülebilir bir bilinçle uygulanmasına yönelik yaptırımlarda bulunmanın, hem halk hem de çevre sağlığı üzerinde olumlu bir etki oluşturacağı açıktır.

## KAYNAKÇA

- Akkurt, S., 2007. Plastik Malzeme Bilimi Teknolojisi ve Kalıp Tasarımı, Birsen Yayınevi, İstanbul.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (8), 1596-1605.
- Anonim, 2004. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü KM453 Kimya Mühendisliği Laboratuvarı II Deney Bilgileri. 2004- 05 Güz Yarıyılı. 30-32, Ankara.
- Anonim, 2006. Plastik Sanayii Özel Gözetim Raporu. DPT, 1-92 s., Ankara.
- Anonim, 2008b. Ankara il çevre durum raporu Ankara Valiliği İl Çevre Orman Müdürlüğü yayını, 923 s., Ankara.
- Anonim, 2008c. Web Sitesi: [http://www.plastikfirmalari.com/plastiklerin\\_molekuler\\_yapilari.html](http://www.plastikfirmalari.com/plastiklerin_molekuler_yapilari.html), Erişim Tarihi: 15.01.2020
- Anonim, 2010b. Web Sitesi: <http://www.polimernedir.com/polimer-nedir-2/> Erişim Tarihi: 15.01.2020
- Anonim, 2012. Proses İzahları Petkim, İzmir.
- Anonim, 2019. [https://www.pagev.org/upload/files/Hammadde\\_%20Yeni%20Tebli%C4%9F%20Bilg%203/T%C3%BCrkiye%20Plastik%20Sekt%C3%B6r%20C4%B0zleme%20Raporu%202017%20Mart.pdf](https://www.pagev.org/upload/files/Hammadde_%20Yeni%20Tebli%C4%9F%20Bilg%203/T%C3%BCrkiye%20Plastik%20Sekt%C3%B6r%20C4%B0zleme%20Raporu%202017%20Mart.pdf), Erişim Tarihi: 20.01.2020
- Arnaiz, N., Gomez-Rico, M. F., Martin Gullon, I., & Font, R. (2013). Production of carbon nanotubes from polyethylene pyrolysis gas and effect of temperature. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(42), 14847-14854.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A., & Stohs, S. J., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104(1-3), 129-140.
- Baran, A., Köktürk, M., Atamanalp, M., & Ceyhun, S. B., 2018. Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable Daily Intake). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 16-21.
- Besseling, E., Quik, J. T. K. & Koelmans, A. A., 2014b. Modeling the fate of nano- and microplastics in freshwater systems. May 2014, SETAC Annual Meeting, Basel, Switzerland.
- Besseling, E., Wang, B., Lüring, M., & Koelmans, A. A., 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental science & technology*, 48(20), 12336-12343.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C., 2010. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 16556–16561
- Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM., 2011. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Prog Mol Biol Transl Sci*; 100: 287-330.

- Brauner, C. J., 1999. The effect of diet and short duration hyperoxia exposure on seawater transfer in coho salmon smolts (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 177(1-4), 257-265.
- Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., & Donaldson, K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175, 191–199.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R., 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175-9179.
- Browne, MA, Galloway, T. ve Thompson, R. (2007). Microplastic—an emerging contaminant of potential concern? 3, 559-561.
- Burd, A. B., & Jackson, G. A., 2009. Particle aggregation. *Annual Review Marine Science*, 1, 65–90
- Can, A., 2018. Yaşam Bilimlerinde A'dan Z'ye Mikroskopi, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.
- Casado, M., Macken, A., & Byrne, H., 2013. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environment International*, 51, 97–105.
- Castrogiovanni P., Imbesi R., 2012. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise, *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 117, 2, 107- 117.
- Cedervall, T., Hansson, L. A., Lard, M., Frohm, B., & Linse, S., 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS ONE*, 7(2), e32254
- Chen, Z., Zhang, W., Huang, Q., Zeng, Z., Wu, J., & Zhang, Y., 2017. Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, MB ve Janssen, CR (2013). Sedimanlarda ve tarlada toplanan organizmalarda mikroplastiklerin tespiti için yeni teknikler. *Deniz kirliliği bülteni* , 70 (1-2), 227-233.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., & Fernández-de-Puelles, M. L., 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.
- Crawford, R.J., 2001. Plastic Engineering, *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, Polymers, Ed. Meyers, R. A., Academic Press, 457-474.
- Çağlarer, E., 2006. Pamuk ve İpek Elyaflarla Takviye Edilmiş Plastik Matrisli Kompozitlerin Elektriksel Özellikleri, *Pagev Plastik Dergisi*, 85:90-112
- Çetinel, H., 2000. Polietilen ve polipropilenin mekanik özelliklerinin incelemesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(3), 79-87.
- Çomaklı, S., Köktürk, M., Topal, A., Özkaraca, M., & Ceyhun, S. B., 2018. Immunofluorescence/fluorescence assessment of brain-derived neurotrophic factor, c-Fos activation, and apoptosis in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to glufosinate. *Neurotoxicology*, 69, 60-67.
- DA Costa, JP, Santos, PS, Duarte, AC ve Rocha-Santos, T. (2016). – Sources, fates and effects. *Science of The Total Environment*. 566-567, 15-26.

- Dave, G., & Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21(1), 126-134.
- De la Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S., & Allende, M. L., 2017. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 710.
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., & Corsi, I., 2014. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. *Environmental science & technology*, 48(20), 12302-12311
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, 7, 46687
- Desforges, J. P. W., Galbraith, M., Dangerfield, N., & Ross, P. S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine pollution bulletin*, 79(1-2), 94-99.
- Dizdaroglu, M., 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 331-342.
- Ekşi, O., 2007. Plastik esaslı malzemelerin ısıllı şekil verme özelliklerinin incelenmesi (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., and Amato, S., 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 177-182.
- Farrell, P., & Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental pollution*, 177, 1-3.
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A., 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1225–1228
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, NA, Meikle, PJ, Sinclair, AJ ve Gibert, Y. (2016). Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Reports*. 14, 1317-1329.
- Frias, J. P. G. L., & Nash, R., 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine pollution bulletin*, 138, 145-147.
- Gabrys, J., Hawkins, G., & Michael, M. (Eds.), 2013. *Accumulation: the material politics of plastic*. Routledge.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., ... ve Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives*. 113, 1555-1560.
- Greven, A. C., Merk, T., Karagöz, F., Mohr, K., Klapper, M., Jovanović, B., & Palić, D., 2016. Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 35(12), 3093-3100.
- Guterres, S. S., Marta, P. A., & Adriana, R. P., 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, 147–157.



- Hartmann, NIB, Nolte, T., Sørensen, MA, Jensen, PR ve Baun, A. (2015). Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics: Lessons Learned from Nanoecotoxicology. ASLO Aquatic Sciences Meeting, 2015.
- Huber, C., Abert, C., Bruckner, F., Groenefeld, M., Muthsam, O., Schuschnigg, S., ... & Windl, R., 2016. 3D print of polymer bonded rare-earth magnets, and 3D magnetic field scanning with an end-user 3D printer. *Applied Physics Letters*, 109(16), 162401.
- Jain, A., Mal, J., Mehndiratta, V., Chander, R., & Patra, S. K., 2011. Study of oxidative stress in vitiligo. *Indian journal of clinical biochemistry*, 26(1), 78-81.
- Junqueira, C., & Carneiro, J., 2006. *Histología Básica: Texto y Atlas*. Ed.
- Kaminsky, V. O., Zhivotovsky, B., 2014. Free Radicals in Cross Talk Between Autophagy and Apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21, 86-102.
- Karaduman, A. 1998. Plastik atıkların geri kazanımının araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. 5 s., Ankara.
- Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., & Leslie, H. A., 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 403-408
- Kartal, A., 2015. Benzil Benzoatın Sitotoksitesinin In Vitro Koşullar Altında Araştırılması.
- Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 114, 1697–1702.
- Keleştemur, G. T., & Özdemir, Y., 2011. Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 69-73.
- Khan, F.R., Syberg, K., Shashoua, Y., Bury, N.R., 2015. Influence of polyethylene microplastic beads on the uptake and localization of silver in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental pollution*, 206, 73-79.
- Kinoshita, S., Koizumi, N., Ueno, M., Okumura, N., Imai, K., Tanaka, H., ... & Toda, M., 2018. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *New England Journal of Medicine*, 378(11), 995-1003.
- Kinoshita, S., Siddique, B. S., Ceyhun, S. B., Asaduzzaman, M., Asakawa, S., & Watabe, S., 2011. Species-specific expression variation of fish MYH14, an ancient vertebrate myosin heavy chain gene orthologue. *Fisheries Science*, 77(5), 847-853.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine anthropogenic litter* (pp. 329–344). Springer, Berlin.
- Kools, S. A., Bauerlein, P., Siegers, W., Cornelissen, E. & De Voogt, P., 2014. Detection and analysis of plastics in the watercycle. In abstract book 24th annual meeting SETAC 2014
- Lambert, S., & Wagner, M., 2016. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere*, 161, 510-517.
- Lampman, S., 2003. *Characterization and Failure Analysis of Plastics*, ASM International, Materials Park, OH
- Lee, W. S., Cho, H. J., Kim, E., Huh, Y. H., Kim, H. J., Kim, B., ... & Jeong, J., 2019. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale*, 11(7), 3173-3185.

- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B., 2019. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environmental science & technology*, 53(4), 1748-1765.
- Lu, K., Lu, L. ve Suresh, S., 2009. Nano ölçekte tutarlı iç sınırlar tasarlayarak malzemelerin güçlendirilmesi. *bilim*, 324 (5925), 349-352.
- Lu, L. M., Zhang, L., Qu, F. L., Lu, H. X., Zhang, X. B., Wu, Z. S., ... & Yu, R. Q. (2009). A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: enhancing sensitivity through a nanowire array strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), 218-223.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., & Ren, H., 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4054-4060
- Massey, L.K., 2007. *The Effects of UV Light and Weather on Plastics and Elastomers*, Second Edition, William Andrew Publisher, NY, USA
- Matsui, H. J. N. r., 2017. The use of fish models to study human neurological disorders. 120, 1-7.
- Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, L. A., Linse, S., Malmendal, A., & Cedervall, T., 2015. Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental science & technology*, 49(1), 553-561.
- Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L. A., & Cedervall, T., 2017. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific Reports*, 7(1), 11452
- Maul, J., 2007. *Ullmann's Encyclopedia of Industry Chemistry: Polystyrene and Styrene Copolymers*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., & Buckley, D. J., 2001. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, 58(1), 45-52.
- Medina C, Royo JL., 2013. Zebrafish as a model organism to study host-pathogen interactions, *Methods*, 62(3):241-245
- Mesureur, J., & Vergunst, A. C., 2014. Zebrafish embryos as a model to study bacterial virulence. In *Host-Bacteria Interactions* (pp. 41-66). Humana Press, New York, NY, 2014.
- Miklosi A, Andrew RJ., 2006. The zebrafish as a model for behavioral studies, *Zebrafish*, 3(2): 227-234
- Mills, N.J., 2005. *Plastics, Plastics, Third Edition: Microstructure and Engineering Applications*, Publisher: Butterworth-Heinemann.
- Mione MC, Trede, NS., 2010. The zebrafish as a model for cancer, *Disease Models & Mechanisms*, 3(9-10), 517-523
- Mizgirev, I. V., & Revskoy, S., 2010. A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. *Cancer biology & therapy*, 9(11), 895-902
- Mohseny, A. B., & Hogendoorn, P. C. W., 2014. Zebrafish as a model for human osteosarcoma. In *Current Advances in Osteosarcoma* (pp. 221-236). Springer, Cham, 2014.
- Morris, J. A., 2009. Zebrafish: a model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia. In *Progress in brain research* (Vol. 179, pp. 97-106). Elsevier.

- Moshal, K. S., Ferri-Lagneau, K. F., & Leung, T., 2010. Zebrafish model: worth considering in defining tumor angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 20(4), 114-119
- Mouritz, A.P. and Gibson, A.G., 2006. *Fire Properties of Polymer Composite Materials*, Springer, Holland.
- Mushtaq, M. Y., Verpoorte, R., & Kim, H. K., 2013. Zebrafish as a model for systems biology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 29(2), 187-205
- Muto, A., & Kawakami, K., 2013. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 110
- Newman, M., Ebrahimie, E., & Lardelli, M., 2014. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*, 5, 189.
- Ninkovic, J., & Bally-Cuif, L., 2006. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, 39(3), 262-274
- Norton, W., & Bally-Cuif, L., 2010. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*, 11(1), 90
- Oğuz, N., 2011. "Hurda Polietilen Karakterizasyonu ve Geri Dönüşümün Ürün Özellikleri Üzerindeki Etkinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Paddock, S. W. (Ed.), 1999. *Confocal microscopy: methods and protocols* (Vol. 122). Springer Science & Business Media.
- Panieri, E., & Santoro, M. M., 2016. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell death & disease*, 7(6), e2253.
- Peacock, A., and Calhoun, A., 2006. *Polymer Chemistry Properties and Applications*, Hanser Publishers, Munich.
- Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., ... & Di Giulio, R. T. (2018). Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *Science of the Total Environment*. 643, 324-334.
- Plastics Europe 2017. *Plastics the Facts 2017: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data for 2017*
- Puralı, N., 2004. Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. *Acta Medica*, 35(2), 17-113.
- Quik, J. T. K., de Klein, J. J. M. & Koelmans, A. A., 2014. Spatially explicit fate modelling of nanomaterials in natural waters. May 2014, SETAC Annual Meeting, Basel, Switzerland.
- Raftis, J. B., Miller, M. R., 2019. Nanoparticle translocation and multi-organ toxicity: A particularly small problem. *Nano Today*. 26, 8-12.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters. *Progress in Polymer Science*, 2011(36), 887-913.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1863, 2977-2992.
- Rocha-Santos, T., Duarte, A. C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 65, 47-53.
- Rosato, D.V., 2011. *Plastics End Use Applications*, Springer Science Business Media, LLC.

- Rossi, G., Barnoud, J., & Monticelli, L., 2014. Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 241–246.
- Ryan, PG, Moore, CJ, van Franeker, JA ve Moloney, CL (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. 364, 1999-2012.
- Saçak, M. 2002. Polimer Teknolojisi. Gazi Yayınları, Ankara.
- Saçak, M. 2014. Polimer Teknolojisi. Gazi Kitapevi, 170-73, Ankara.
- Saçak, M., 2005. Polimer Teknolojisi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Gazi Kitabevi ISBN:975-8895-82-6 s.431, Ankara.
- Sadri, S. S., Thompson, R. C., 2014. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Mar Pollut Bull.* 81, 55-60.
- Salvati, A., Åberg, C., dos Santos, T., Varela, J., Pinto, P., Lynch, I., & Dawson, K. A., 2011. Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 818-826.
- Sarıkaya, Y., Erdik E. 2000. Temel Üniversite Kimyası. Gazi Kitapevi, 1036-1037, Ankara.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental pollution*, 185, 77-83.
- Shi, X., Zhou, B., 2010. The Role of Nrf2 and MAPK Pathways in PFOS-Induced Oxidative Stress in Zebrafish Embryos. *Toxicological Sciences*. 115, 391-400.
- Shim, W.J., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M. & Han, G.M., 2014. Producing fragmented microand nano-sized expanded polystyrene particles with an accelerated mechanical abrasion experiment. May 2014, SETAC Annual Meeting, Basel, Switzerland
- Silva-Cavalcanti, J. S., Silva, J. D. B., de França, E. J., de Araújo, M. C. B., & Gusmão, F., 2017. Microplastics ingestion by a common tropical freshwater fishing resource. *Environmental Pollution*, 221, 218-226
- Sökmen, T. Ö., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Baran, A., Özkaraca, M., & Ceyhun, S. B., 2019. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *NeuroToxicology*, 77, 51-59.
- Stadler K., 2012. Oxidative stress in diabetes, *Advances in experimental medicine and biology*, 771, 272-287.
- Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M. ve Ceyhun, SB (2017). An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Daino rerio*). *Chemosphere*. 180, 77-85.
- Talvitie, J., and Heinonen, M., 2014. Preliminary study on synthetic microfibers and particles at a municipal waste water treatment plant. *Baltic Marine Environment Protection Commission HELCOM*, 1-14.
- Topal, A., Çomaklı, S., Özkaraca, M., Baran, A., Köktürk, M., Parlak, V., ... & Ceyhun, S. B., 2017. Immunofluorescence evaluation of 4-hydroxynonenal and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activation in zebrafish (*Daino rerio*) larvae brain exposed (microinjected) to propyl gallate. *Chemosphere*, 183, 252-256.

- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P., 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature reviews Drug discovery*, 8(7), 579.
- Veksha, A., Giannis, A., & Chang, V. W. C., 2017. Conversion of non-condensable pyrolysis gases from plastics into carbon nanomaterials: Effects of feedstock and temperature. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 124, 16-24.
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F., & Koelmans, A. A., 2014a. Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes and fullerenes. *Environmental Science and Technology*, 48, 4869–4876
- Veneman, W. J., Spaink, H. P., Brun, N. R., Bosker, T., & Vijver, M. G., 2017. Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 190, 112-120.
- Ward, J. E., & Kach, D. J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environment Research*, 68, 137–142.
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., & Koelmans, A. A., 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behaviour of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2490–2497
- Westerfield, M., 1993. The zebrafish: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Inst. of Neuroscience, University of Oregon.
- Wu, S. C., Zhang, S. Q., Xu, Z. W., Kang, G. Z., & Cai, L. X., 2016. Cyclic plastic strain based damage tolerance for railway axles in China. *International Journal of Fatigue*, 93, 64-70.
- Xie, J., Lee, S. ve Chen, X. (2010). A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development. *BMC developmental biology*. 10, 76.
- Yoruç, A. B. H., & Uğraşkan, V., 2017. Yeşil Polimerler ve Uygulamaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(1), 318-337.
- Yumnamcha, T., Roy, D., Devi, M. D., & Nongthomba, U., 2015. Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(10), 1363-1381.
- Zarbin M., 2012. Treatment of oxidative stress with chelation therapy, *Archives of ophthalmology*, 130, 12, 1597-1598.
- Zhang, H., Kuo, Y.-Y., Gerecke, A. C., & Wang, J., 2012. Co-release of hexabromocyclododecane (HBCD) and nano- and microparticles from thermal cutting of polystyrene foams. *Environmental Science and Technology*, 46, 10990–10996
- Ziskoven, C., Jäger, M., Zilkens, C., Bloch, W., Brixius, K., & Krauspe, R., 2010. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthopedic reviews*, 2(2).
- Zon LI, Peterson RT., 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*; 4:35–44.

## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Erzincan'da doğan Teoman Özgür SÖKMEN, ilkokul ve ortaokul eğitimini Erzincan'da lise eğitimini İstanbul'da tamamlamıştır. 1994-1998 yılları arasında lisans eğitimini, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik, bölümünde tamamlamıştır.2008-2011 yılları arasında yüksek lisans eğitimini, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği, Yetiştiricilik Anabilim Dalında tamamlamıştır.2013- yılında Doktora eğitimine, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği, Yetiştiricilik Anabilim Dalında başlamıştır.2013-Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tercan Meslek Yüksekokulu Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü İş Sağlığı ve Güvenliği Programında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.